

UNIVERSITE DE PROVENCE

AIX-MARSEILLE I

T H E S E

présentée par

María del Refugio TREJO HERNANDEZ

(Boursière CONACyT, Mexique)

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR-MENTION SCIENCES

(Spécialité : Biologie Cellulaire-Microbiologie)

**PHYSIOLOGIE DE CROISSANCE DE SOUCHES DE *CLAVICEPS* :
PRODUCTION D'ALCALOIDES PAR FERMENTATION
EN MILIEU SOLIDE**

Soutenue le 18 Décembre 1992 devant la commission d'examen :

MM. J. P. BELAICH

M. BENSOUSSAN

Rapporteur

J. L. GARCIA

Président

J. P. LARPENT

Rapporteur

M. RAIMBAULT

J. J. SANGLIER

4260078234

2 ep FD1
Non Nam

Réalisée au Laboratoire de Biotechnologie du Centre ORSTOM de Montpellier

02 DEC. 1996

084
FERNEN
TRE



F

RESUME

Dans le cadre de ce travail, nous avons comparé la croissance et la production d'alcaloïdes de l'ergot du seigle par *Claviceps purpurea* et *Claviceps fusiformis* en cultures en milieu solide (FMS) et en milieu submerge (FSm). L'étude de la biosynthèse d'alcaloïdes par ces souches a été réalisée en variant les conditions environnementales et la composition du milieu de culture. Ces facteurs se sont révélés très importants lors de la biosynthèse d'alcaloïdes, aussi bien sur les rendements de production que sur le profil d'alcaloïdes produits.

L'analyse des gaz a constitué un outil performant pour évaluer l'adaptation des souches à la culture en milieu solide. Cette technique nous a permis d'établir les conditions de culture en FMS et de suivre en continu l'évolution de la croissance en fonction du CO₂ dégagé.

L'utilisation de la méthodologie des plans d'expériences, nous a permis de préciser l'influence des différents facteurs étudiés. Ainsi, la source de carbone, la source d'azote, l'aération, le phosphate inorganique et l'addition de précurseurs (tryptophane, valine, proline) se sont révélés comme les facteurs principaux ayant des effets prépondérants sur la biosynthèse d'alcaloïdes. En particulier, le rôle du tryptophane comme précurseur de la biosynthèse d'alcaloïdes a été amplement confirmé, de même que l'effet stimulateur du saccharose. Il a été clairement mis en évidence que les variations observées dans le spectre d'alcaloïdes produits sont directement liées à la composition du milieu de culture et à la technique de culture utilisée.

Le rendement en alcaloïdes totaux exprimé par rapport à la biomasse est plus élevé en fermentation en milieu solide qu'en milieu submergé, d'un facteur 3 pour *C. purpurea* (23,58 mg/g de biomasse PS) et 10 pour *C. fusiformis* (187,76 mg/g de biomasse PS) après 200 heures de culture.

La culture en FMS sur support imprégné s'est avérée très intéressante pour la production de métabolites secondaires à haute valeur ajoutée. On a en effet observé des productions en alcaloïdes par FMS deux fois plus élevées pour *C. purpurea* (414,43 mg/l) et quatre fois pour *C. fusiformis* (891,86 mg/l) que celles obtenues en culture submergée. Ces résultats constituent donc une contribution à l'amélioration de la production des alcaloïdes de l'ergot du seigle par biotechnologie et à la valorisation des sous-produits tropicaux par le biais de la FMS.

MOTS CLEFS : *Claviceps purpurea*, *Claviceps fusiformis*, alcaloïdes de l'ergot du seigle ; fermentation en milieu solide (FMS) ; support solide inerte ; bagasse de canne à sucre ; substrats amylicés ; caractéristiques de croissance.

AVANT-PROPOS

La présente étude a été réalisée dans le Laboratoire de Biotechnologie du Centre ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération) de Montpellier, sous la Direction Scientifique du Dr. Maurice RAIMBAULT. Elle se situe dans le contexte d'un programme de recherche général portant sur la "Valorisation de sous-produits agricoles tropicaux par la voie biotechnologique" pour la production de substances d'intérêt économique, et plus précisément dans le cadre d'une coopération entre l'Universidad Autónoma Metropolitana (UAM, México) et l'ORSTOM développée depuis 1981 concernant la Fermentation en Milieu Solide. Ma thèse s'intègre dans ce contexte.

Ce travail a été effectué lors de mon séjour en France (Septembre 1988 à Décembre 1992), en tant que boursière du CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexique) et du CEFI (Comité d'Etudes sur la formation d'Ingénieurs, France).

Au cours de mes recherches, j'ai eu l'opportunité de collaborer et de bénéficier des discussions fructueuses, ainsi que des conseils avisés du Dr. B.K. Lonsane du CFTRI (Central Food Technological Research Institute, Mysore India).

A Leo

A mis padres Cipriano y Ma. del Carmen

A mis hermanos Raciél, Maricela, Elizabeth y Laura

A mi Abuelita

A toda la familia

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier Monsieur Maurice RAIMBAULT, pour sa direction scientifique, pour l'accueil dans son équipe de travail ainsi que pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de cette thèse.

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur Jean-Louis GARCIA, Directeur de Recherche à l'ORSTOM qui me fait l'honneur de présider ce jury. Je le remercie de m'avoir accordé sa confiance. Pour ces conseils avisés et pour toute l'attention particulière qu'il a porté au cours des corrections de cet ouvrage, je lui exprime ma gratitude.

Je remercie profondément Mr le Professeur Jean-Paul LARPENT qui a bien voulu accepter à la fois de juger ce travail et d'assurer la charge de rapporteur. Je lui suis très reconnaissante pour ses judicieuses suggestions.

Je remercie Monsieur Maurice BENSOUSSAN, Maître de Conférence à l'ENS.BANA de Dijon pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Je lui suis reconnaissante pour toute l'attention particulière qu'il a porté à la correction de cet ouvrage.

Je tiens à remercier le Professeur Jean-Pierre BELAICH, Professeur à l'Université de Provence, pour avoir accepté de participer à ce jury et jugé mon travail en tant qu'examineur.

Enfin que Monsieur Jean-Jacques SANGLIER, Directeur de Recherche de la Société SANDOZ, soit ici remercié pour avoir accepté de juger mon travail en tant qu'examineur. Sa présence à ce jury honore.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mr Sevastianos ROUSSOS, Responsable du Laboratoire de Biotechnologie à l'ORSTOM-Montpellier pour ses judicieuses suggestions, pour m'avoir conseillée tout au long de ce travail, mais aussi et surtout pour sa sympathie, son amitié et son enthousiasme.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux gouvernements Mexicain et Français pour leurs appuis lors de la réalisation de ce travail.

L'ambiance de collaboration et d'amitié qui a entouré ce travail a été excellente. Je tiens à exprimer mes amicaux remerciements aux collègues intimement associés à certains aspects de cette thèse. Je citerai parmi eux E. BRESSON, S. DENIS, G. SAUCEDO, E. GIRAUD et I. GAIME qui ont eu la lourde charge de correction de mes manuscrits.

J'exprime toute ma reconnaissance à G. SAUCEDO pour son entière disponibilité, ses judicieuses suggestions ; la chaleur de ses encouragements ne m'ont jamais fait défaut tout au long de la réalisation de ce travail. Je tiens à remercier également A. TORRES pour son soutien et amitié durant ces derniers mois.

Je tiens à remercier B.K. LONSANE pour m'avoir fait partager sa grande expérience, lors de son séjour en France.

C'est avec beaucoup de sympathie que je tiens à remercier N. PUJET pour m'avoir procurée l'appui administratif nécessaire, pour sa compétence dans la recherche et l'organisation des références bibliographiques ainsi que pour l'ambiance chaleureuse qu'elle a su maintenir au sein du laboratoire.

Je tiens également à remercier B. MARIN Directeur de Recherche à l'ORSTOM qui a toujours mis à ma disposition avec beaucoup de gentillesse son matériel et sa documentation dont je pouvais avoir besoin pour la réalisation de ce travail ; pour ses nombreuses suggestions et son importante disponibilité à mon égard.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail de recherche, je tiens à exprimer toute ma gratitude. Une mention spéciale pour D. DUFOUR, L. HANNIBAL, S. TUFFERY, J. RODRIGUEZ de LEON pour leur collaboration à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier l'équipe du laboratoire de Pedologie et particulièrement Mme E. GAVINELLI, pour leur collaboration et gentillesse à mon égard. Je remercie également MM. CHANUT et GALLON pour m'avoir aidée dans l'utilisation du matériel analytique dont ils ont la responsabilité.

J'adresse mes remerciements également à toute l'équipe du Laboratoire de Phytopathologie pour avoir mis à disposition avec beaucoup de gentillesse son matériel analytique et la documentation dont je pouvais avoir besoin pour la réalisation de cette étude.

Je ne voudrais pas oublier le service de documentation de l'ORSTOM et particulièrement Mme E. PELLEGRIN. C'est grâce à elle que j'ai pu me procurer des documents assez difficilement localisables. Qu'elle soit assurée de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier Mr ROSSI et Mr DATAS de l'université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc, pour leur collaboration dans la prise des images au microscope électronique à balayage.

Enfin mes remerciements vont également à toute l'équipe du Laboratoire de Microbiologie ORSTOM de l'Université de Provence. Qu'ils sachent que je les remercie tous sans exception, pour leur aide et leur sympathie.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A°	:	Amnstrongs
ATCC	:	American Type Culture Collection
ARN	:	Acide ribonucléique
ATP	:	Adenosine Triphosphate
A _w	:	Activité de l'eau
CBS	:	Centraal Bureau Voor Schimmelcultures
CHN	:	Teneurs en Carbone, Hydrogène et Azote
Ci	:	Concentration initiale en Dioxide de carbone
C/N	:	Rapport massique Carbone/Azote
CO ₂	:	Dioxide de carbone
CPG	:	Chromatographe en Phase Gazeuse
DAL	:	Dérivés de l'Acide Lysergique
dCO ₂	:	Dérivée de la concentration en Dioxide de carbone en fonction du temps
DNA	:	Acide desoxiribonucléique
DNS	:	Acide Dinitrosalicylique
dO ₂	:	Dérivée de la concentration en Oxygène en fonction du temps
ΔT	:	Intervalle de temps
FMS	:	Fermentation en Milieu Solide
FSm	:	Fermentation milieu Submergé
HPLC	:	Chromatographie Liquide Haute Performance
ICRISAT	:	International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics
IMAS	:	Institute of Microbiology Academy Sciences
IPB	:	Institute of Plant Biochemistry
LSD	:	Acide Lysergique diéthylamine
MSI	:	Matière Sèche Initiale
N	:	Nombre d'expériences
NRRL	:	Northwestern Utilization Research and Development Division
O ₂	:	Oxygène moléculaire
P	:	Nombre de facteurs
Pi	:	Phosphate inorganique
PDA	:	Milieu gelosé Pomme de terre glucose
PDBA	:	p-Diméthyl-aminobenzaldéhyde
PS	:	Poids sec
QR	:	Coefficient Respiratoire
R ²	:	Coefficient de Régression multiple
RIPB	:	Research Institute for Pharmacy and Biochemistry
ΣbiXi	:	Termes linaires d'un modèle mathématique

$\sum b_{ii}X_i^2$:	Termes de deuxième degré d'un modèle mathématique
$\sum b_{ij}X_iX_j$:	Termes d'interaction d'un modèle mathématique
$\int CO_2$:	Intégrale de la concentration en Dioxide de carbone en fonction du temps
$\int O_2$:	Intégrale de la concentration en Oxygène en fonction du temps
μ	:	Activité spécifique de croissance
$Y_{p/s}$:	g de produit formé par g de substrat consommé
$Y_{p/x}$:	g de produit formé par g de biomasse produite
$Y_{x/s}$:	g de biomasse produite par g de substrat consommé

TABLE DE MATIERES

1. INTRODUCTION	1
2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
2.1 Les alcaloïdes de l'ergot du seigle	4
2.1.1 Chimie des alcaloïdes de l'ergot	4
2.1.2 Importance pharmaceutique des alcaloïdes de l'ergot	5
2.1.3 Les sources de production des alcaloïdes de l'ergot	9
2.1.3.1 Les microorganismes	9
2.1.3.2 Les plantes	10
2.1.3.3 Culture parasitique de <i>Claviceps</i>	10
2.1.3.4 Culture saprophytique en milieu liquide de <i>Claviceps</i>	12
2.1.3.5 Production d'alcaloïdes par synthèse chimique	13
2.2 <i>Claviceps</i>	15
2.2.1 Cycle biologique	15
2.2.2 La biosynthèse des alcaloïdes de l'ergot	19
2.2.3 Physiologie de la formation des alcaloïdes	21
2.2.3.1 Différenciation cellulaire	22
2.2.3.2 Les métabolismes primaire et secondaire	23
2.2.3.3 Facteurs nutritionnels et environnementaux	25
2.3 Fermentation en milieu solide (FMS)	26
2.3.1 Antécédents	26
2.3.2 Définition	27
2.3.3 Les applications de la FMS	28
2.3.4 Caractéristiques des fermentations solides	29
2.4 Conclusion	35

3. MATERIEL ET METHODES	36
3.1 Microorganismes	36
3.2 Milieux de culture	36
3.2.1 Milieu de conservation	36
3.2.2 Milieu pour la production d'inoculum (MI)	36
3.2.3 Milieux pour la croissance apicale	36
3.2.4 Milieu de préculture	37
3.2.5 Milieu de production d'alcaloïdes (milieu base)	37
3.3 Traitement du substrat solide	37
3.3.1 Bagasse de canne à sucre	37
3.3.2 Céréales	37
3.4 Conditions de culture	38
3.4.1 Préparation de l'inoculum et préculture	38
3.5 Dispositifs de fermentation	38
3.5.1 Culture en milieu liquide	38
3.5.1.1 Culture en fiole de 250 ml	38
3.5.1.2 Culture en bioréacteur	39
3.5.2 Culture en milieu solide	39
3.5.3 Mise en œuvre de la culture en milieu solide	39
3.6 Traitements des échantillons	42
3.7 Techniques de dosage de la biomasse	44
3.7.1 Dosage de la glucosamine	44
3.7.2 Détermination des acides nucléiques	44
3.7.3 Détermination de la composition en C, H et N	45
3.8 Techniques colorimétriques pour le dosage des sucres	45
3.8.1 Dosage des sucres réducteurs	45
3.8.2 Dosage des sucres totaux	45
3.8.3 Dosage des sucres par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)	46
3.9 Dosage du phosphate inorganique	47
3.10 Détermination des lipides	48
3.11 Méthodes physico-chimiques	48
3.11.1 Matière sèche	48
3.11.2 Mesure du pH	48
3.12 Détermination des alcaloïdes de l'ergot du seigle	49
3.12.1 Extraction d'alcaloïdes	49
3.12.2 Dosage des alcaloïdes par spectrophotométrie	49
3.12.3 Dosage des alcaloïdes par HPLC	51
3.13 Analyse des gaz	51
3.14 Expression des résultats	53
3.14.1 Calcul de la quantité d'inoculum	53

3.14.2	Biomasse, substrats et produits	53
3.14.3	Calculs des rendements des fermentations	54
3.14.4	Mesure des gaz	54
3.15	Planification statistique	55
3.16	Détermination du profil enzymatique (API ZYM)	56
RESULTATS ET DISCUSSION		
4.	PHYSIOLOGIE DE LA CROISSANCE DE <i>CLAVICEPS</i> EN FSm	57
4.1.	Sélection de souches performantes	57
4.1.1	Croissance apicale sur milieux gélosés	58
4.1.2	Description morphologique des souches de <i>Claviceps</i>	60
4.1.3	Screening en milieu liquide	60
4.3	Définition des facteurs essentiels pour la croissance de <i>Claviceps</i>	64
4.3.1	Effet de la source d'azote	64
4.3.2	Influence de la source de carbone	68
4.3.3	Effet du rapport C/N	69
4.4	Obtention de l'inoculum	71
4.4.1	Sporulation de <i>C. purpurea</i>	72
4.4.2	Effet de la quantité d'inoculum de <i>C. fusiformis</i>	75
4.5	Etude physiologique de la croissance de <i>Claviceps</i> en milieu liquide	77
4.5.1	Physiologie de la croissance et de la production d'alcaloïdes par <i>C. purpurea</i>	78
4.5.2	Physiologie de la croissance et de la production d'alcaloïdes par <i>C. fusiformis</i> (HA)	80
4.6	Conclusion	82
5.	CROISSANCE DE <i>C. PURPUREA</i> SUR SUBSTRAT AMYLACE	83
5.1.	Influence des facteurs de l'environnement	83
5.1.1	Influence de la teneur en eau	83
5.1.2	Le contrôle du pH	84
5.1.3	Effet du taux d'inoculation	86
5.2	Définition des facteurs essentiels pour la croissance de <i>C. purpurea</i>	90
5.3	Cinétique de la croissance de <i>C. purpurea</i> sur substrat amylicé	96

5.4 Effet du milieu de culture sur la production d'alcaloïdes en FMS	98
5.5 Conclusion	101
6. BIOSYNTHESE D'ALCALOÏDES PAR <i>CLAVICEPS PURPUREA</i> SUR SUPPORT IMPREGNE	104
6.1 Profil fermentaire au cours de la culture sur support imprégné	105
6.2 Criblage des facteurs intervenant dans la production d'alcaloïdes	107
6.3 Etude des facteurs essentiels sur la production et le rendement $Y_{p/x}$	115
6.4 Cinétique de production d'alcaloïdes par <i>C. purpurea</i> sur support imprégné	120
6.5 Conclusion	121
7. BIOSYNTHESE D'ALCALOÏDES PAR <i>C. FUSIFORMIS</i> EN FMS	122
7.1 Etude cinétique de la croissance de <i>C. fusiformis</i> en FMS	122
7.2 Effet de la source de carbone et de l'aération	124
7.3 Définition des facteurs essentiels pour la production d'alcaloïdes par <i>C. fusiformis</i>	127
7.3.1 Analyse de la variance	130
7.3.2 Analyse statistique	131
7.3.3 Analyse des effets individuels des facteurs	136
7.3.4 Recherche du chemin optimal	137
7.3.5 Analyse graphique de surfaces d'isoréponse	138
7.4. Conclusion	142
8. COMPARAISON DES PERFORMANCES DE LA FMS ET DE LA FSm POUR LA PRODUCTION D'ALCALOÏDES	145
9. CONCLUSION	148
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	150
ANNEXES	

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Des études, dont l'origine remonte au siècle dernier, ont révélé que les intoxications parmi les populations qui se nourrissaient de farine de seigle ergoté, étaient provoquées par le développement de *Claviceps*, champignon responsable de la formation de l'ergot. L'ergot est la dénomination vulgaire du sclérote de ces champignons. Par la suite, de nombreuses recherches sur le pouvoir toxique de l'ergot ont conduit à la découverte de diverses applications pharmaceutiques.

De nos jours, les alcaloïdes de l'ergot du seigle sont d'un grand intérêt pour l'industrie pharmacologique en raison de leurs multiples actions biologiques. En effet, certains alcaloïdes et leurs dérivés agissent sur le système nerveux sympathique et sur les muscles utérins. Beaucoup sont connus pour leur action inhibitrice de la sécrétion de prolactine, et d'autres pour leur activité stimulatrice des récepteurs dopaminergiques.

En raison de leur importance pharmaceutique et thérapeutique, les alcaloïdes de l'ergot du seigle ont donné lieu à des nombreuses recherches conduisant au développement de plusieurs procédés de production. Toutefois, ces systèmes de production restent limités à la synthèse de certains alcaloïdes dont la qualité n'est pas comparable à celle rencontrée dans le sclérote de *Claviceps purpurea*.

Les *Claviceps*, comme la plupart de champignons, présentent à l'état sauvage une grande variabilité génétique. Leur teneur en alcaloïdes notamment, ainsi que leur répartition naturelle peuvent varier considérablement d'un champ de seigle à l'autre. Cette variabilité est incompatible avec une production industrielle régulière. Afin de résoudre ce problème, des travaux s'imposent aussi bien sur les procédés de culture que sur la recherche de souches stables offrant une production toujours stable en alcaloïdes.

A ce propos, de nombreux essais ont déjà été entrepris dans différents pays, notamment en Suisse, en Europe de l'Est, au Japon et aux Etats Unis, dans le but d'obtenir des alcaloïdes de l'ergot par culture directe du champignon sur un milieu favorable. Ces essais ont conduit à une prise de brevets sur les procédés de culture, mais aucun de ceux-ci ne permet de remplacer l'infection artificielle de plantes par les *Claviceps*. De nos jours, les recherches sont orientées vers la production des alcaloïdes de l'ergot par fermentation submergée (FSm).

La réalisation d'une culture *in vitro* de souches de *Claviceps* semble apparemment aisée. Cependant, la variabilité génétique, ainsi que la faible probabilité d'obtenir des souches stables après amélioration génétique, conduisent à de faibles rendements de production en alcaloïdes. De plus, la culture artificielle saprophytique ne permet pas l'obtention de tous les principes actifs de l'ergot et leur composition paraît assez variable.

Malgré les progrès acquis dans ce domaine depuis un siècle, les recherches s'orientent toujours vers trois principaux axes d'étude, dans le but d'améliorer le rendement de production :

- 1) Amélioration des techniques de fermentation existantes et recherche de nouveaux procédés.
- 2) Recherche de nouvelles espèces présentant une stabilité génétique élevée et une haute productivité.
- 3) Recherche et optimisation de milieux de culture avec addition d'inducteurs des alcaloïdes.

Pour ces raisons et dans le but de répondre aux besoins, nous proposons l'application de la fermentation en milieu solide (FMS) comme un procédé alternatif de production d'alcaloïdes, car cette technique présente un certain nombre d'avantages par rapport au système traditionnel de FSm.

Le principe de cette méthode concerne la croissance de champignons filamenteux pour la production de métabolites primaires et secondaires (PANDEY, 1992) sur des matériaux solides préalablement humidifiés avec une solution minérale. L'eau indispensable à la croissance du microorganisme se trouve absorbée ou complexée à l'intérieur de la matrice solide. Cette matrice, qui sert à la fois de source de nutriments et de support, est envahie par le champignon au cours de sa croissance. La culture en milieu solide a été conçue comme une simulation de l'habitat naturel de ce groupe de microorganismes, afin de reproduire les conditions de culture les mieux adaptées, et favoriser ainsi le développement de leurs activités métaboliques.

Les *Claviceps*, en parasitant les plantes de seigle, synthétisent des alcaloïdes lors de leur développement. Il s'agit d'une croissance sur un matériel solide, réalisée dans des conditions naturelles peu contrôlées. Nous avons choisi d'utiliser la technique de culture en milieu solide afin de nous rapprocher au maximum de ces conditions naturelles de développement du microorganisme, tout en maintenant le contrôle de son environnement. La fermentation en milieu solide (FMS) représenterait donc une technique intéressante, car elle permettrait de reproduire des conditions proches de celles rencontrées dans la nature, ce qui conduirait à la synthèse d'alcaloïdes similaires à ceux obtenus naturellement.

De plus, l'application de la FMS permettrait de surmonter certaines limitations rencontrées dans la FSm. En effet, la formation de mousse, la sensibilité de *Claviceps* à l'antimousse, le stress mécanique provoqué par l'agitation, la nécessité d'un système équilibré aération/agitation, l'inhibition des enzymes impliquées dans la biosynthèse des alcaloïdes par la croissance rapide, etc,... constituent des problèmes sérieux inhérents à la FSm dans la production saprophytique d'alcaloïdes par *Claviceps*, et que l'on ne retrouve pas en FMS.

Les principales motivations de ce travail ont été l'évaluation de la technique de FMS pour la biosynthèse de métabolites secondaires (en prenant comme modèle d'étude celui des alcaloïdes de l'ergot du seigle) ainsi que l'étude parallèle de la physiologie de souches du genre *Claviceps*, dans le but de mieux connaître ces microorganismes et de pouvoir orienter leur métabolisme.

Dans un premier temps, nous avons étudié la croissance et le métabolisme de *Claviceps* cultivé sur des substrats amylacés. Pour établir les mécanismes de production d'alcaloïdes et définir les principaux paramètres de la croissance de nos souches en FMS, il a été indispensable de connaître les conditions optimales de culture. A cet effet, nous avons étudié plus particulièrement l'influence des facteurs environnementaux et nutritionnels sur la production quantitative et qualitative d'alcaloïdes par *C. purpurea* cultivé sur différents milieux de culture à base de substrats naturels.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une étude de la croissance de *C. purpurea* et de *C. fusiformis* sur support imprégné. Dans ce but, nous avons réalisé une étude nutritionnelle afin de déterminer l'effet de la composition du milieu de culture sur la biosynthèse des alcaloïdes.

Enfin, nous avons réalisé une comparaison des performances des deux techniques de culture pour la production d'alcaloïdes de l'ergot du seigle par deux espèces de *Claviceps*.

**ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette étude bibliographique comporte 3 parties : une première partie présente les généralités sur les alcaloïdes de l'ergot du seigle ; la deuxième partie décrit la biologie et le métabolisme de *Claviceps* ; la troisième partie concerne les concepts généraux de la fermentation en milieu solide.

2.1- Les alcaloïdes de l'ergot du seigle

Les alcaloïdes de l'ergot représentent un groupe de composés biologiquement actifs, produits principalement par les espèces appartenant au genre *Claviceps*, parasite des céréales et des graminées. L'ergot a été tout d'abord décrit comme un poison hautement toxique, et ensuite comme une substance biologique potentiellement active présentant des propriétés thérapeutiques.

De très nombreuses recherches ont été menées sur le principe actif du pouvoir toxique de l'ergot. TANRET (1875) a obtenu la première préparation cristallisée : l'ergotinine amorphe. Mais ce n'est qu'en 1920 que STOLL a isolé pour la première fois un alcaloïde chimiquement pur, l'ergotamine. Par la suite, STOLL et HOFMANN (1943) ont réalisé la synthèse partielle d'un alcaloïde naturel de l'ergot, l'ergobasine. Depuis, plus de 50 composés de l'ergot ont été isolés à partir de différentes espèces de champignon, en particulier chez *Claviceps purpurea*.

2.1.1- Chimie des alcaloïdes de l'ergot

Les alcaloïdes de l'ergot sont des métabolites secondaires produits par des microorganismes et des plantes. Ils constituent un groupe de substances caractérisées par la structure tétracyclique de l'ergoline (JACOBS et GOULD, 1937). Celle-ci est une indole-quinoline partiellement hydrogénée (Fig. 2.1). Le noyau ergoline est formé à partir de l'acide mévalonique et du tryptophane. Dans la nature, l'atome d'azote en position 6 est méthylé et l'atome de carbone en position 8 est généralement substitué.

Dans la plupart des cas, il existe une double liaison entre les carbones 8-9 ou 9-10. En pharmacologie, la configuration du carbone 8 permet de distinguer les séries lévogyres actives de l'acide lysergique, des séries dextrogyres faiblement actives.

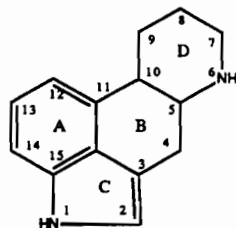


Fig. 2.1.- Structure de l'ergoline

Les alcaloïdes peuvent être divisés en 3 grands groupes en fonction de leur structure chimique (Tableau 2.1) :


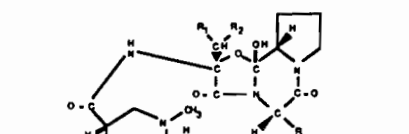
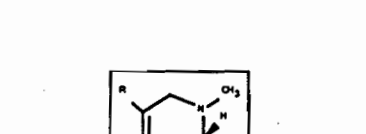
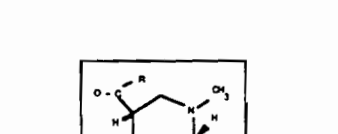
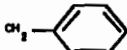
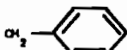
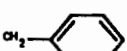
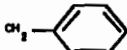
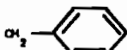
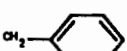
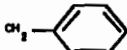
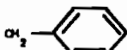
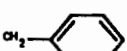
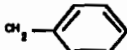
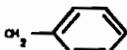
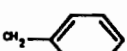
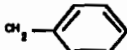
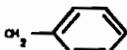
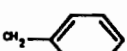
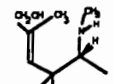
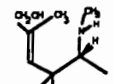
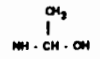
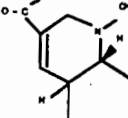
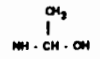
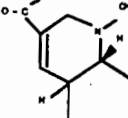
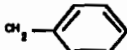
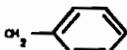
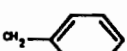
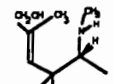
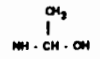
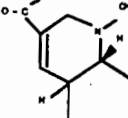
- 1) Les alcaloïdes de type clavine
- 2) Les alcaloïdes peptidiques
- 3) Les alcaloïdes de l'acide lysergique et leurs dérivés

L'ergotamine, alcaloïde peptidique, et l'ergométrine sont les composés actifs les plus utilisés en pharmacologie parmi tous les alcaloïdes de l'ergot. Par contre, les clavines sont considérées comme des composés à faible activité biologique. Ceux-ci peuvent être transformés chimiquement afin d'obtenir des dérivés présentant de nouveaux effets pharmacologiques. Les principales sources d'obtention de ces alcaloïdes, ainsi que leurs activités pharmacologiques, sont décrites ci-après.

2.1.2- Importance pharmacologique des alcaloïdes de l'ergot

D'importants travaux de caractérisation des différentes activités biologiques des alcaloïdes ont été réalisés (BOVE, 1970 ; BERDE et SCHILD, 1978 ; KIDRIC et coll., 1986). Les actions pharmacologiques des alcaloïdes de l'ergot sont très complexes et variées.

La structure chimique de base des dérivés de l'ergot présente certaines similitudes avec trois neuromédiateurs essentiels : la noradrénaline, la dopamine et la sérotonine. Cette ressemblance structurale peut expliquer l'aptitude de différents alcaloïdes à interférer sur divers récepteurs spécifiques. En effet, le spectre des effets de ces composés traduit une action partielle agoniste ou antagoniste sur les récepteurs adrénergiques, dopaminergiques et sérotoninergiques (BERDE et STÜRMER, 1978). Cette action est fonction de la configuration chimique de chaque alcaloïde. La parenté structurale entre l'ergoline et les trois neuromédiateurs est décrite dans la Fig. 2.2.

 <p>Structure de Pergoline</p>	 <p>Alcaloïdes peptidiques</p>	 <p>Clavines</p>	 <p>Acide lysergique et dérivés simples</p>																																															
<table border="0"> <thead> <tr> <th></th> <th>R_1</th> <th>R_2</th> <th>R_3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ergotamine</td> <td>H</td> <td>H</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Ergocristine</td> <td>CH_3</td> <td>CH_3</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Ergocriptine</td> <td>CH_3</td> <td>CH_3</td> <td>$CH_2CH(CH_3)_2$</td> </tr> <tr> <td>Ergocornine</td> <td>CH_3</td> <td>CH_3</td> <td>CH_2CH_3</td> </tr> <tr> <td>Ergostine</td> <td>H</td> <td>CH_3</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		R_1	R_2	R_3	Ergotamine	H	H		Ergocristine	CH_3	CH_3		Ergocriptine	CH_3	CH_3	$CH_2CH(CH_3)_2$	Ergocornine	CH_3	CH_3	CH_2CH_3	Ergostine	H	CH_3		<table border="0"> <thead> <tr> <th></th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Agroclavine</td> <td>CH_3</td> </tr> <tr> <td>Elymoclavine</td> <td>CH_2OH</td> </tr> <tr> <td>Festoclavine</td> <td>$CH_2 \equiv H$</td> </tr> </tbody> </table>		R	Agroclavine	CH_3	Elymoclavine	CH_2OH	Festoclavine	$CH_2 \equiv H$	<table border="0"> <thead> <tr> <th></th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Acide Lysergique</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Amide de l'acide lysergique (Ergine)</td> <td>NH_2</td> </tr> </tbody> </table>		R	Acide Lysergique	OH	Amide de l'acide lysergique (Ergine)	NH_2										
	R_1	R_2	R_3																																															
Ergotamine	H	H																																																
Ergocristine	CH_3	CH_3																																																
Ergocriptine	CH_3	CH_3	$CH_2CH(CH_3)_2$																																															
Ergocornine	CH_3	CH_3	CH_2CH_3																																															
Ergostine	H	CH_3																																																
	R																																																	
Agroclavine	CH_3																																																	
Elymoclavine	CH_2OH																																																	
Festoclavine	$CH_2 \equiv H$																																																	
	R																																																	
Acide Lysergique	OH																																																	
Amide de l'acide lysergique (Ergine)	NH_2																																																	
<table border="0"> <thead> <tr> <th></th> <th>R_1</th> <th>R_2</th> <th>R_3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ergotamine</td> <td>H</td> <td>H</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Ergocristine</td> <td>CH_3</td> <td>CH_3</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Ergocriptine</td> <td>CH_3</td> <td>CH_3</td> <td>$CH_2CH(CH_3)_2$</td> </tr> <tr> <td>Ergocornine</td> <td>CH_3</td> <td>CH_3</td> <td>CH_2CH_3</td> </tr> <tr> <td>Ergostine</td> <td>H</td> <td>CH_3</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		R_1	R_2	R_3	Ergotamine	H	H		Ergocristine	CH_3	CH_3		Ergocriptine	CH_3	CH_3	$CH_2CH(CH_3)_2$	Ergocornine	CH_3	CH_3	CH_2CH_3	Ergostine	H	CH_3		<table border="0"> <thead> <tr> <th></th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Agroclavine</td> <td>CH_3</td> </tr> <tr> <td>Elymoclavine</td> <td>CH_2OH</td> </tr> <tr> <td>Festoclavine</td> <td>$CH_2 \equiv H$</td> </tr> <tr> <td>Lysergine</td> <td>$CH_2 \equiv H$</td> </tr> <tr> <td>Lysergol</td> <td>$CH_2OH \equiv H$</td> </tr> <tr> <td>Chenoclavine</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		R	Agroclavine	CH_3	Elymoclavine	CH_2OH	Festoclavine	$CH_2 \equiv H$	Lysergine	$CH_2 \equiv H$	Lysergol	$CH_2OH \equiv H$	Chenoclavine		<table border="0"> <thead> <tr> <th></th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Acide Lysergique</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Amide de l'acide lysergique (Ergine)</td> <td>NH_2</td> </tr> <tr> <td>Ergometrine</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Acide Paspelique</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		R	Acide Lysergique	OH	Amide de l'acide lysergique (Ergine)	NH_2	Ergometrine		Acide Paspelique	
	R_1	R_2	R_3																																															
Ergotamine	H	H																																																
Ergocristine	CH_3	CH_3																																																
Ergocriptine	CH_3	CH_3	$CH_2CH(CH_3)_2$																																															
Ergocornine	CH_3	CH_3	CH_2CH_3																																															
Ergostine	H	CH_3																																																
	R																																																	
Agroclavine	CH_3																																																	
Elymoclavine	CH_2OH																																																	
Festoclavine	$CH_2 \equiv H$																																																	
Lysergine	$CH_2 \equiv H$																																																	
Lysergol	$CH_2OH \equiv H$																																																	
Chenoclavine																																																		
	R																																																	
Acide Lysergique	OH																																																	
Amide de l'acide lysergique (Ergine)	NH_2																																																	
Ergometrine																																																		
Acide Paspelique																																																		

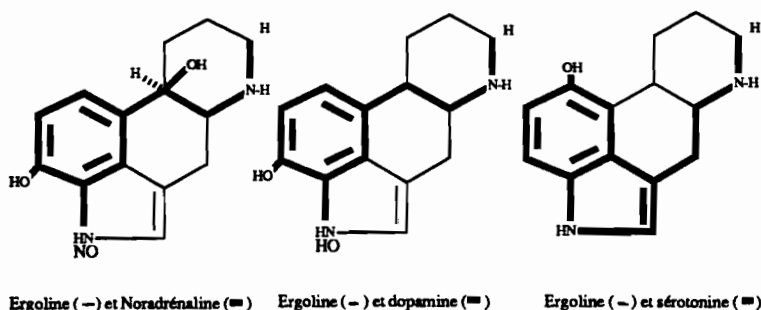


Fig. 2.2.- Ressemblance structurale entre neuromédiateurs et noyau "ergoline"

Les connaissances fondamentales des propriétés des alcaloïdes, qu'ils soient d'origine naturelle ou transformés chimiquement, sont à la base du profil pharmacologique. Les principales activités biologiques des alcaloïdes ont été rapportées par BERDE et STÜRMER (1978) (Tableau 2.2). Actuellement, les alcaloïdes de l'ergot et leurs dérivés sont couramment utilisés pour lutter contre l'atonie utérine, la migraine, les problèmes vasculaires, l'insuffisance cérébrale, l'hypertension, l'hyperprolactinémie, l'acromégalie et la maladie de Parkinson. La fig. 2.3 montre les principaux groupes d'alcaloïdes utilisés en pharmacie.

Tableau 2.2 : Profil comparé de l'activité de quelques alcaloïdes de l'ergot (résumé d'après BERDE et STÜRMER 1978) d'après une sélection de tests expérimentaux. (Activité maximale égale 1000)

Substance	Ergotamine	Dihydro- ergotamine	Bromocryptine	Dihydro- ergotoxine	LSD	Methyl- ergométrine	Methysergide
Blocage des α -récepteurs périphériques (vésicule séminale)	50	350	230	1000	1	<0,4	<0,4
Blocage des récepteurs à sérotonine périphériques	10	40	3	10	250	250	1000
Action vasopressive artérielle	1000	120	<10	30	10	<10	30
Action utérotonique	500	-	0	0	670	1000	40
Activité dopaminergique centrale	<1	<1	1000	10	1000	400	<1
Action sur la fertilité	50	<40	1000	70	<40	<80	<40
Action métabolique cérébrale	400	240	190	1000	60	2,5	5

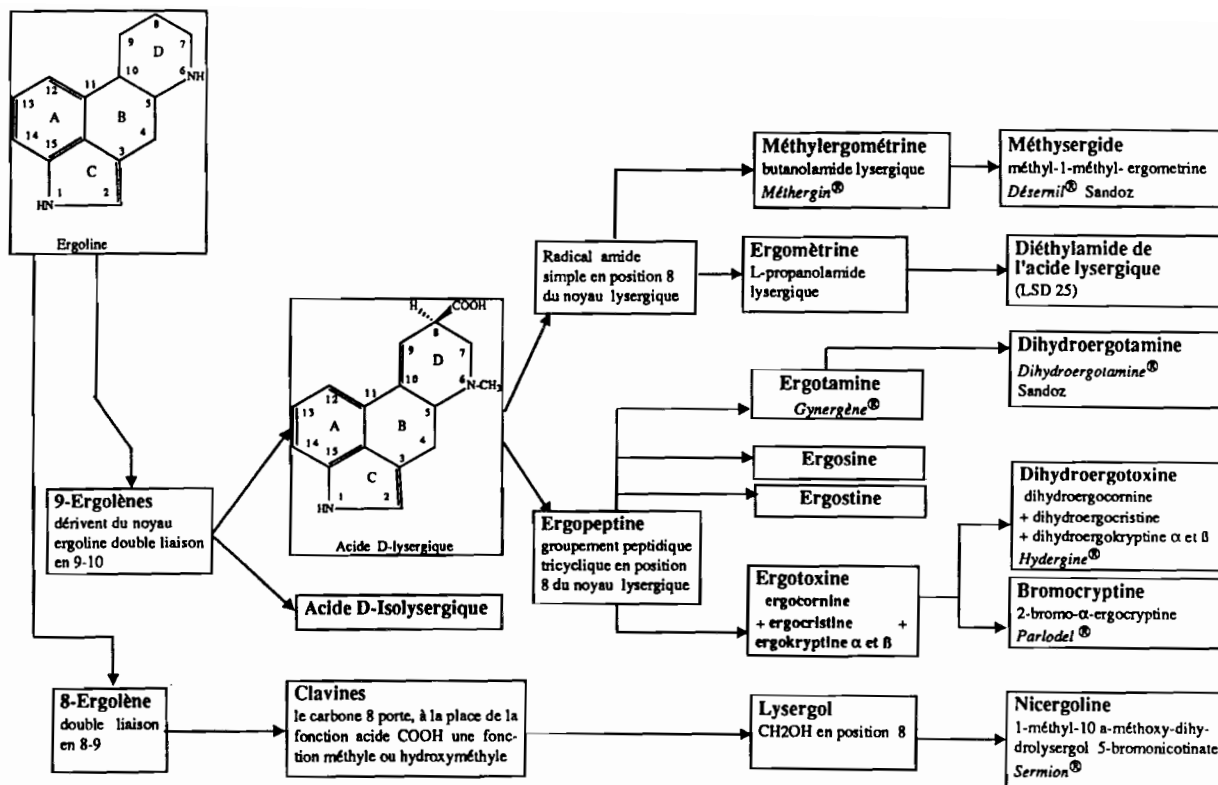


Fig. 2.3.- Principaux groupes d'alcaloïdes utilisés en pharmacie (D'après BRETAU et DE TOUR DU PIN, 1981).

2.1.3- Les sources de production des alcaloïdes de l'ergot

2.1.3.1- Les microorganismes

Les ascomycètes du genre *Claviceps* représentent la principale source productrice d'alcaloïdes de l'ergot. Plus de 50 alcaloïdes différents ont été isolés à partir de 50 espèces de champignons (REHACEK et SAJDL, 1990) (Tableau 2.3).

Tableau 2.3.- Espèces de *Claviceps* parasites de céréales et de graminées (d'après REHACEK et SAJDL, 1990)

Espèce	Plante hôte	Type d'alcaloïde	Référence
<i>C. purpurea</i>	Céréales		
	<i>Secale cereale</i>	peptidique alkanolamide amide clavine	KOBEL et coll., 1962
	<i>Sorghum vulgare</i>	peptidique clavine	MANTLE, 1974
	<i>Zea mays</i>	clavine	MANTLE, 1974
<i>Claviceps</i> sp.	Graminées		
	<i>Agropyrum</i> sp.	clavine	ABE et coll., 1952
	<i>Festuca arundinacea</i>	peptidique	MANTLE, 1969
	<i>Pennisetum typhoides</i>	clavine	STOLL et coll., 1954
	<i>Alopecurus myosuroides</i>	peptidique	CORBERTT et coll., 1974
<i>C. purpurea</i>	<i>Spartina townsendii</i>	dérivés de l'acide lysergique	CASTAGNOLI et MANTLE, 1966
<i>C. paspali</i>	<i>Paspalum</i> sp.	Acide lysergique amide	MANTLE, 1974
<i>C. fusiformis</i>	<i>Pennisetum typhoides</i>	clavine	VINING et NAIR 1966
	<i>Pennisetum typhoides</i>	clavine	WAIBLINGER et GROGER, 1972
<i>C. microcephala</i>	<i>Phragmites communis</i>	peptidique	MANTLE, 1969

Claviceps purpurea est une espèce importante. Elle parasite environ 400 espèces différentes de graminées dont les principales appartiennent aux familles des *Festuceae*, *Hordeae*, *Aveneae* et *Agrostideae*. Cependant, la plupart des sclérotés obtenus industriellement sont issus de cultures infectées du seigle, du blé ou de l'orge. Ils contiennent essentiellement des alcaloïdes de type peptidique (ergocristine, ergotamine, ergokryptine et ergocomine).

Les souches de *Claviceps fusiformis* se développent sur des espèces de *Pennisetum* (Afrique centrale) et produisent des sclérotés contenant principalement des alcaloïdes de type clavine. *Claviceps paspali* est la troisième espèce importante. Elle parasite le *Paspalum* (dans le sud de l'Europe, en Amérique et en Asie). Le sclérote formé contient principalement des dérivés simples de l'acide lysergique. D'autres espèces produisant des alcaloïdes de type clavine ont été retrouvées en Extrême Orient (REHACEK et SAJDL, 1990).

TABER et VINING (1958) ont mis en évidence la présence d'alcaloïdes de type clavine dans une souche de *Penicillium roqueforti*. Chez *Rhizopus arrhizus*, la fumigaclavine B a été détectée. Plus tard, la festuclavine et les fumigaclavines A et B ont été isolées chez *Aspergillus fumigatus* (SPILSBURGY et WILKINSON, 1961). Plus récemment, NARAYAN et RAO (1982) ont mis en évidence dans les cultures de certaines souches d'*A. fumigatus*, divers alcaloïdes dont la chanoclavine, l'agroclavine, l'élymoclavine, les fumiclavines A, B, et C et les festuclavines. Enfin, des alcaloïdes de l'ergot ont été isolés de certaines souches de *Geotrichum candidum* (EL REFAI et coll., 1970).

2.1.3.2- Les plantes

Une autre source d'alcaloïdes a été découverte par HOFMANN et TSCHERTER (1960) dans les graines de *Rivea corymbosa*. Les graines de cette plante étaient utilisées au Mexique précolombien pour la guérison des malades et comme drogue pour ses propriétés hallucinogènes ("l'ololiuqui"). L'analyse du principe actif de l'ololiuqui a révélé la présence de dérivés de l'ergoline, parmi lesquels l'acide lysergique-amide, responsable des effets hallucinogènes, l'acide isolysergique amide, et la chanoclavine. Par la suite, d'autres alcaloïdes ont été isolés par différents auteurs (REHACEK et SAJDL, 1990) dont les 2-hydroxyéthylamides de l'acide lysergique, l'acide isolysergique, l'élymoclavine, le lysergol, l'ergonovine, l'ergosine, l'ergosinine, la cycloclavine, etc...

Une liste d'organismes différents du genre *Claviceps* et produisant des alcaloïdes est rapportée dans le tableau 2.4.

2.1.3.3- Culture parasitique de *Claviceps*

Dès la découverte des propriétés thérapeutiques de l'ergot, celui-ci a fait l'objet de nombreuses études mycologiques, biochimiques et thérapeutiques, afin d'établir la nature de ses principes actifs. Etant donné le grand intérêt de l'ergot suscité en médecine, la production naturelle des sclérotés est devenue insuffisante pour couvrir la demande. Des méthodes de culture au champ ont été adaptées et réalisées sur des plantes susceptibles d'être infectées et cultivées dans des zones où le sclérote se développe naturellement.

Par la suite, la culture naturelle a été remplacée par une culture systématique avec infection manuelle ou mécanique des plantes de seigle. L'infection a été réalisée par pulvérisation d'une suspension de conidies ou d'ascospores sur les épis, au moment de leur formation, environ deux semaines avant la floraison. Si les fleurs sont contaminées, les premiers signes de l'infection se manifestent entre 12 et 14 jours plus tard, par l'apparition d'une grosse gouttelette d'exsudat au sommet de l'épis.

L'ergot se développe ensuite et le premier sclérote apparaît environ un mois après l'inoculation puis mûrit en 3 à 4 semaines. Le tableau 2.3 reporte les espèces productrices d'alcaloïdes et leurs plantes hôtes.

Des efforts multiples ont été réalisés pour l'amélioration technologique de ce procédé. Ceux-ci concernent le développement des machines à inoculer (BEKESY, 1938) et à récolter (STOLL et BRACK, 1944), la sélection des souches, la production de l'inoculum, la conservation des souches, et... Malgré les progrès réalisés dans ces domaines, la production de l'ergot reste particulièrement onéreuse et les rendements sont très variables. En effet, les conditions atmosphériques pendant la période d'inoculation des plantes, de développement de l'infection et de la récolte des sclérotés sont décisives pour le rendement final en alcaloïdes. De même, la virulence de l'inoculum, le développement de la plante hôte et la maturation des sclérotés sont affectés par les changements climatiques. L'ensemble, lié à la récolte mécanique qui entraîne des pertes importantes en raison de la taille variable des sclérotés qui dépend de leur maturation, explique les rendements très variables obtenus.

La culture parasitique de l'ergot exige également une quantité élevée de main d'œuvre ce qui rend le procédé peu rentable. En conséquence, pour éviter les problèmes posés lors de la culture parasitique, et afin de mieux contrôler la production d'alcaloïdes de l'ergot, une technique de culture saprophytique en milieu liquide a été développée.

2.1.3.4- Culture saprophytique en milieu liquide de *Claviceps*

Parallèlement au développement technologique de la culture naturelle, des recherches ont été entreprises dans le but d'obtenir une culture saprophytique des souches productrices d'alcaloïdes, par la culture submergée aérobie de souches de *Claviceps*.

Malgré les efforts réalisés, il a fallu attendre 1948 pour que ABE obtienne, pour la première fois, des clavines en culture stationnaire. Ces premiers résultats ont permis d'une part, de démontrer la possibilité de produire des alcaloïdes par voie saprophytique (*in vitro*) et d'autre part d'aider à élucider la voie de biosynthèse de l'ergoline. Plus tard, de nombreux auteurs ont produit des alcaloïdes de type clavine à partir des souches isolées de sclérotés d'*Elymus mollis* et *Pennisetum yphoidem*. BANKS et coll. (1974) ont obtenu environ 4 g/l d'agroclavine avec *C. fusiformis*. Actuellement, les rendements en agroclavine sont de l'ordre de 6.5 g/l avec des souches de *C. fusiformis*. Par ailleurs, des rendements élevés concernant la production de dérivés de l'acide lysergique ont été rapportés. La production d'acide lysergique α -hydroxyéthylamide par une souche de *C. paspali* a été décrite (ARCAMONE et coll., 1961).

Par la suite, la production de l'acide lysergique et de ses dérivés a été réalisée avec succès par PACIFIC et coll. (1962) et par GRÖGER et TYLER (1963). KOBEL et coll. (1964) ont décrit une souche de *C. paspali* capable de produire l'acide lysergique $\Delta^{8,9}$ par culture liquide. Cet alcaloïde peut être transformé en acide lysergique $\Delta^{9,10}$, servant par la suite comme précurseur pour la synthèse d'autres alcaloïdes plus actifs.

En ce qui concerne la production des alcaloïdes peptidiques, STOLL et coll. (1954) ont obtenu des traces d'ergotamine en culture stationnaire. TONOLO (1966) et AMICI et coll. (1969) sont parvenus à produire des quantités appréciables de cet alcaloïde en cultures liquides agitées avec des concentrations élevées en sucres. La production de 8-ergokryptine par une souche de *C. purpurea* en culture submergée a été décrite par BIANCHI et coll. (1976). Une fermentation combinée de deux espèces de *Claviceps* a été mise au point pour la production d'ergotoxines (KOBEL et SANGLIER, 1976 ; PUC et coll., 1987).

AMICI et coll. (1969) ont également décrit la production d'ergocornine, d'ergocristine et d'ergokryptine, mais en utilisant des souches qui ne sporulent pas. Tout en considérant ces observations, KOBEL et SANGLIER (1976, 1978) ont proposé l'utilisation de souches qui sporulent normalement, mais dont la sporulation est bloquée au cours de la production des alcaloïdes. Ils ont également suggéré l'utilisation d'un milieu de culture spécifique qui empêcherait la conidiogénèse et favoriserait la biosynthèse d'alcaloïdes.

Par ailleurs, de nombreux auteurs ont uniquement enregistré une production d'alcaloïdes au cours de cultures où le mycélium présentait certaines caractéristiques morphologiques proches de celles observées dans les sclérotés. Le Tableau 2.5 présente la liste des principales souches de *Claviceps* utilisées en culture saprophytique.

Actuellement, des souches de microorganismes hyperproductrices d'alcaloïdes de l'ergot sont recherchées. Cependant, la sélection, l'amélioration génétique, la conservation et les conditions optimales de culture des souches constituent des problèmes délicats et sont parfois difficiles à obtenir.

2.1.3.5- Production d'alcaloïdes par synthèse chimique

La purification et la caractérisation des structures chimiques des alcaloïdes de l'ergot ont toujours été l'une des préoccupations majeures pour les pharmacologues.

Pourtant, c'est après la purification de l'ergotamine (STOLL, 1920) que différentes équipes se sont intéressées à la structure des alcaloïdes. Les premiers résultats ont été obtenus par JACOBS et GOULD (1937) qui ont synthétisé l'ergoline à partir de l'acide 3-nitro- α -naphthoïque. Par la suite, de nombreux composés ont été obtenus, par synthèse partielle ou totale.

Tableau 2.5 .- Souches capables de produire les alcaloïdes de l'ergot en culture saprophytique.
(D'après ROBBERS, 1984 ; REHACEK et SAJDL, 1990)

Espèces	Souches	Alcaloïdes	Références
<i>Claviceps paspali</i>	ATCC 13895	Acide lysergique 2-hydroxyethylamide	ARCAMONE et coll., 1961
	NRRL 3027	Dérivés de l'acide lysergique	ROBBERS et coll., 1972
	ATCC 34500	Chanoclavine, acide isolysergique 2-hydroxyethylamide	ERGE et coll., 1972
	ATCC 13892	Dérivés de l'acide lysergique *	PERTOT et coll., 1988
<i>C. purpurea</i>	IMAS129/35	Agroclavine, elymoclavine	ERGE et coll., 1972
	ATCC14934	Ergonovine, ergotamine, ergosine, ergocristine, chanoclavine	TABER et VINING, 1981
	CBS 164-59	Dérivés de l'acide lysergique*	KOPP et REHM, 1984
	ATCC 20102	Ergotamine, ergokryptine	AMICI et coll., 1969
	ATCC 20103	Ergokryptine	AMICI et coll., 1969
	IPB Pepty-695/S	ergotoxines	ERGE et coll., 1984
	ATCC 20106	Ergocomine, ergosine	AMICI et coll., 1969
	RIPB PLA 4	Ergotamine	REHACEK et coll., 1974
	L-27	Ergotoxines	MILICIC et coll., 1989
	IMCAS 129	Agroclavine, elymoclavine, chanoclavin	PAZOUTOVA et REHACEK, 1981
<i>Claviceps sp.</i>	ATCC 26019	Agroclavine, elymoclavine	ROBBERS et coll., 1978
	ATCC 26245	Elymoclavine	TABER, 1964
<i>C.usiformis</i>	139/2/1	Alcaloïdes de type clavine	BANKS et coll., 1974
	IMCAS 27	Elymoclavine	REHACEK et coll., 1986

IPB : INSTITUTE OF PLANT BIOCHEMISTRY OF THE ACADEMY OF SCIENCES HALLE, ALLEMAGNE

ATCC : AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, ROCKVILLE, USA

IMAS : INSTITUTE OF MICROBIOLOGY ACADEMY SCIENCES HALLE, ALLEMAGNE

RIPB : RESEARCH INSTITUTE FOR PHARMACY AND BIOCHEMISTRY, PRAGUE

IMCAS : INSTITUTE OF MICROBIOLOGY CZECHOSLOVAK ACADEMY OF SCIENCES, PRAGUE

CBS : CENTRAAL BUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, BAARNS, PAYS BAS

* Technique d'immobilisation du mycélium

Ainsi, la synthèse des alcaloïdes peptidiques a pu être accomplie, dans un premier temps, par la synthèse de l'acide lysergique et ensuite, par celle de la partie peptidique. En 1961, HOFMANN et coll. ont produit pour la première fois l'ergotamine. Plus tard, STADLER et coll. (1969) ont décrit la méthode de synthèse des alcaloïdes du groupe ergotoxine. Afin de caractériser la structure et les effets pharmacologiques des alcaloïdes peptidiques, la synthèse partielle à partir des différents acides aminés a été souvent employée.

Actuellement, la synthèse chimique est toujours réalisée en utilisant comme précurseurs les alcaloïdes à faible activité pharmacologique. Ainsi, les clavines et les dérivés de l'acide lysergique sont les principaux précurseurs des molécules recherchées. Ils sont utilisés pour la synthèse de nouvelles molécules ayant des effets pharmacologiques différents.

Cette première partie nous a permis d'approfondir les connaissances sur la chimie et l'importance pharmacologique des alcaloïdes de l'ergot. Par ailleurs, et afin de mieux comprendre la physiologie de production des alcaloïdes chez *Claviceps*, nous avons consacré la deuxième partie de l'étude bibliographique aux différents aspects biologiques et physiologiques des souches de *Claviceps*.

2.2- *Claviceps*

Les champignons du genre *Claviceps* sont des agents phytopathogènes infectant des organes hautement spécialisés. Ils ne se développent naturellement que dans les ovaires des graminées et cypéracées. Le genre *Claviceps* appartient à la classe des Ascomycètes, famille des Clavicipitaceae et ordre des Sphaeriales. Il prolifère principalement dans les zones tempérées. On connaît actuellement plus de 50 espèces de *Claviceps*. Ces espèces se distinguent par leurs caractéristiques morphologiques, notamment la formation de sclérote. Le type de sclérotos formés, ainsi que leur contenu en alcaloïdes, peuvent varier d'une espèce à l'autre, mais aussi au sein d'une même espèce, spécialement chez *C. purpurea*.

2.2.1- Cycle biologique

Conditions parasitiques

Dans la nature, le cycle biologique de *Claviceps* est très complexe. Il est constitué de deux cycles : asexué et sexué. Le premier consiste en la formation d'un mycélium filamenteux (Sphacelia) qui se reproduit à partir de conidies. Le deuxième commence avec la formation du sclérote dans lequel les ascospores se forment après germination des ascocarpes. C'est exclusivement dans le sclérote que les alcaloïdes sont produits.

Généralement, le cycle biologique est décrit à partir du sclérote (Fig 2.6). Celui-ci apparaît à la fin de l'été sur de multiples graminées et à la place de certains grains. C'est une masse allongée, compacte, noirâtre et légèrement arquée dénommée plus communément "ergot". Après une hibernation généralement nécessaire à sa maturation (BEKESY, 1956), le sclérote développe un ou plusieurs stromas périthéciaux.

Au sein de ces derniers se différencient les anthéridies et les ascogones (organes sexuels) qui vont donner naissance après plasmogamie, à des hyphes binucléés représentant un stade dicaryotique transitoire (KILLIAN, 1919). Après caryogamie, la cellule s'allonge pour former l'asque qui renferme 8 ascospores. L'apparition des ascospores correspond approximativement à l'éclosion des graminées. L'invasion de l'ovaire floral par l'ascospore s'opère durant la période située quelques jours avant ou après la fertilisation de l'ovaire. Il y a croissance du champignon autour de l'ovaire puis invasion de celui-ci par la base. Cette colonisation se poursuit durant une ou deux semaines.

Les hyphes forment un amas mycélien lâche et produisent à l'extrémité de conidiophores peu différenciés, de très nombreuses conidies hyalines, unicellulaires et uninucléées (JUNG et coll., 1957). C'est le stade sphacélien durant lequel aucun alcaloïde n'est synthétisé et dont le développement est très dépendant de l'humidité ambiante. La plante hôte réagit en formant un miélat sirupeux, riche en sucres, acides aminés et substances minérales, qui sert de solution nutritive au champignon, et de véhicule pour la dissémination des conidies (CORBETT et coll., 1974 ; MOWER et HANCOCK, 1975). Ces conidies provoquent une dissémination de la maladie. En effet, le vent, la pluie et certains insectes friands du miélat permettent leur transport de graminées en graminées.

Lorsqu'une graminée mûrit et commence à sécher, les hyphes se transforment en un plectenchyme compact, aux cellules à membranes épaisses, ne produisant pas de conidies et riches en lipides et en alcaloïdes : le sclérote (Fig. 2.7). Celui-ci se forme par la base et les restes du tissu sphacélien sont rejetés vers le sommet (KYBAL, 1964). Les cellules du sclérote sont multinucléées et peuvent être formées par anastomoses. Les sclérotites proviennent de la germination des spores concentrées dans le miélat (KYBAL, 1964). Ce processus a probablement lieu pas à pas lors de la phase de croissance intensive du parasite. Les conidies sont capables de former du mycélium de type sphacélien ou du mycélium de type sclérotial. La transition de la phase sphacélienne à la phase sclérotiale entraîne des changements dans la morphologie, la croissance et le métabolisme de *Claviceps*. La production d'alcaloïdes est accompagnée d'une synthèse de protéines, d'une diminution de la teneur en phosphates et en azote, et d'un processus de différenciation morphologique.

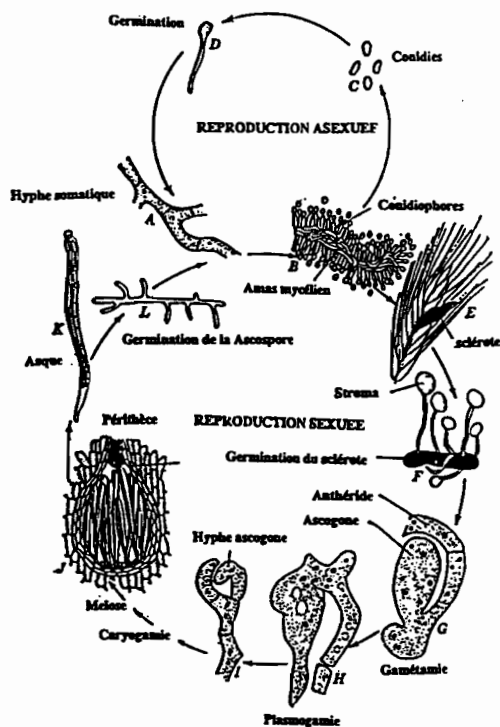


Fig. 2.6.- Cycle biologique de *Claviceps purpurea* d'après BRENFELD (ENGLER et PLANT, 1897)



Fig. 2.7.- Coupe transversale dans un sclérote de *Claviceps purpurea* (x 500) (D'après MANTLE et TONOLO, 1968)

Par ailleurs, une condition essentielle à la formation d'alcaloïde par une souche, est la présence de l'information génétique correspondante. L'expression de cette information dépend des conditions externes, en particulier de la qualité et de la quantité de nutriments. La source de nutriments pendant la phase sphacélienne est fournie par la plante hôte. A la fin de cette étape, une conidiogénèse intense a lieu. Par la suite, on observe une forte croissance et une maturation graduelle du sclérote. Les différents changements de conditions durant le développement du parasite sont supposés induire la formation du sclérote et la biosynthèse d'alcaloïdes.

Des études réalisées par STOLL et BRACK (1944) ont démontré que le sclérote peut aussi se développer dans les nodules de la plante. Par conséquent, la présence de l'ovaire n'est plus indispensable à la formation du sclérote. L'étude du développement de *Claviceps* sur le seigle a montré qu'aucun rapport n'existe entre le champignon et la plante. Celle-ci joue seulement le rôle de source de nutriments pour le champignon (RAMSTAD et GJERSTAD, 1955).

Conditions saprophytiques

Pour une meilleure compréhension des différents aspects concernant la culture de *Claviceps sp.*, on essaiera de résumer les principales caractéristiques de la culture saprophytique. Les cultures saprophytiques des souches de *Claviceps sp.*, productrices d'alcaloïdes, montrent que ces dernières présentent un métabolisme oxydatif important. Celui-ci résulte de la synthèse de matériaux de réserve, tels que les lipides, les glucides, etc... (REHACEK et SADJL, 1990). D'autre part, une morphologie spécifique a été observée chez les souches présentant une production d'alcaloïdes élevée. Cette morphologie se caractérise par l'apparition d'un mycélium qui est principalement constitué d'hyphes courts et ramifiés.

Le tissu plectenchymatique de l'ergot a été comparé avec les amas de cellules de type sclérotial formés en culture submergée (MANTLE et TONOLO, 1968 ; MANTLE, 1969 ; VORISEK et coll., 1974). Ces changements morphologiques sont provoqués par une adaptation aux conditions environnementales peu favorables (PAZOUTOVA et coll., 1980). La formation des cellules peut être induite par l'addition de colorants au milieu de culture (acriflavine, bleu de toluidine, fluoresceine, fuschine basique, bleu de méthylène, etc...) par divers traitements mutagènes ainsi que par des substances produisant un effet sur la pression osmotique du milieu.

La composition du milieu de culture peut avoir une forte influence sur la formation des cellules de type sclérotial. En particulier, une concentration élevée en sucres et la présence d'un acide du cycle tricarboxylique (acide citrique, oxalique...) ont un effet très favorable. KOBEL et SANGLIER (1986) ont proposé l'utilisation d'un milieu riche pour la phase sphacélienne de *Claviceps* et d'un milieu spécifique avec une concentration en sucres de 300 g/l pour la production d'alcaloïdes.

Les conidies dans la culture naturelle et la culture saprophytique sont uninucléées. Il en est de même pour les conidies produisant le mycélium sphacélien en culture saprophytique. Par contre, dans un mycélium plus âgé, des cellules avec plusieurs noyaux ont été observées. Ceci a été considéré comme le signe du début de la sclérotinisation du mycélium (REHACEK et SAJDL, 1990).

Dans les cultures de surface et submergées, on observe deux types de conidies : des macroconidies et des microconidies. Celles-ci présentent un cytoplasme granulaire avec des vacuoles riches en lipides (PAZOUTOVA et coll., 1977). Les souches qui forment des hyphes de type sclérotial ne produisent que des chlamydospores. La présence de chlamydospores a toujours été associée à la formation de cellules de type sclérotial, et au début de la production d'alcaloïdes (REHACEK et KOZOVA, 1975).

Par ailleurs, les techniques d'immobilisation de microorganismes ont récemment été utilisées pour la production d'alcaloïdes avec différentes souches de *Claviceps*. KREN et coll. (1987) ont utilisé l'immobilisation de *C. fusiformis* pour la production de clavines. Des cultures avec mycélium immobilisé de *C. paspali* pour la production de clavines ont été rapportées par ROZMAN et coll. (1989).

2.2.2- La biosynthèse des alcaloïdes de l'ergot

Les précurseurs

De nombreux travaux dans le domaine de la biosynthèse des alcaloïdes ont été réalisés (TYLER, 1961 ; WINKLER et GRÖGER, 1962 ; THOMAS et BASSET, 1972 ; FLOSS, 1980 ; REHACEK et SAJDL, 1990). Ces études ont été facilitées par l'utilisation de la culture saprophytique. Les principales voies mises à jour sont rapportées dans la Fig. 2.8 (ROBBERS et coll., 1978 ; REHACEK et SAJDL, 1990).

Il a été ainsi établi que les souches de *Claviceps* synthétisent l'ergoline à partir de trois précurseurs principaux : le tryptophane, une unité de l'isoprène dérivé de l'acide mévalonique, et un groupe méthyle qui provient de la méthionine. La fig. 2.9 montre l'incorporation des différents précurseurs dans la structure de l'ergoline. Ces précurseurs nécessaires à la biosynthèse des alcaloïdes sont produits lors du métabolisme primaire. Ainsi, MOTHE et coll. (1958) ont démontré que le [^{14}C]-tryptophane injecté dans les plantes infectées par l'ergot, se retrouve dans l'ergonovine et dans la partie de l'acide lysergique des alcaloïdes peptidiques. D'autres études confirment sa présence dans l'élymoclavine et l'ergokryptine en culture saprophytique.

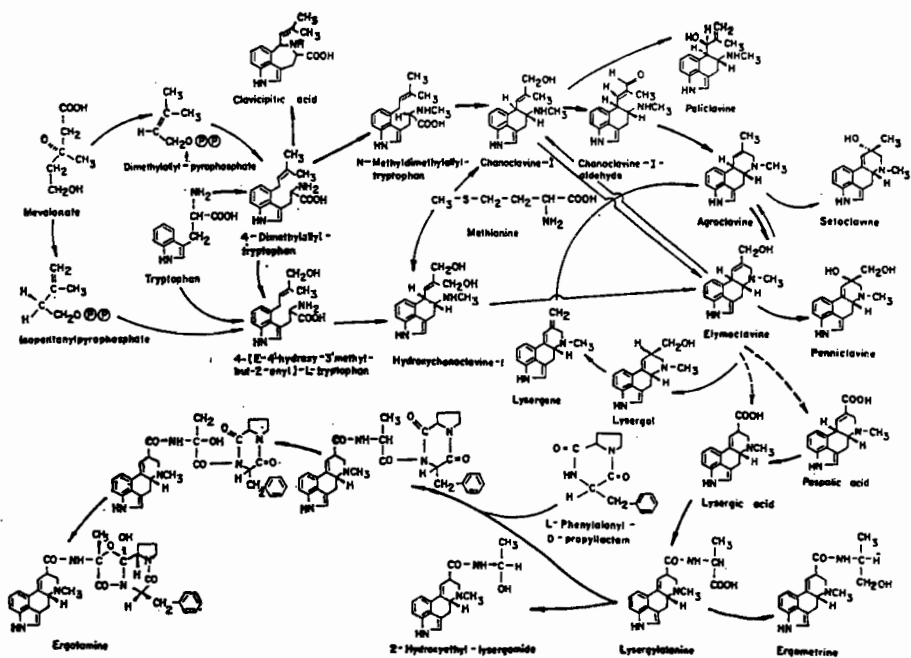


Fig. 2.8.- Voies métaboliques de biosynthèse des alcaloïdes de l'ergot (REHACEK et SAJDL, 1990)

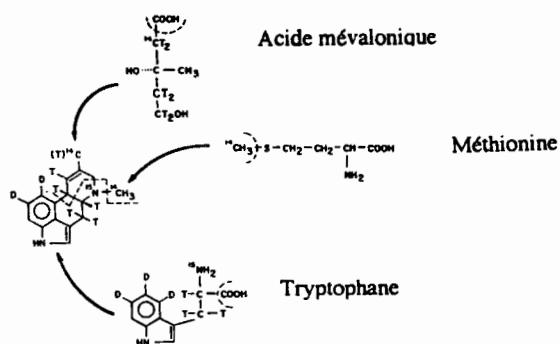


Fig. 2.9 Incorporation de précurseurs

L'ensemble de ces résultats prouvent l'incorporation du tryptophane marqué dans la structure de l'ergoline, à l'exception du groupe carboxyle et de l'hydrogène en position 4 (MOTHES et coll., 1958 ; TABER et VINING, 1959 ; GRÖGER et coll., 1960).

Par ailleurs, il a été constaté que les acides aminés sont des précurseurs potentiels dans la biosynthèse des alcaloïdes de l'ergot (BREUEL et coll., 1982). MAIER et coll. (1981) ont étudié la biosynthèse de l'ergotamine par des extraits cellulaires de *C. purpurea*. Ils ont observé l'incorporation de la leucine, de l'alanine et de la proline dans la chaîne peptidique de l'ergotamine.

Dans le cas des alcaloïdes du groupe ergotoxine, BEACCO et coll. (1978) ont constaté que l'addition d'acides aminés tels que la L-valine, L-leucine et L-isoleucine au milieu de culture déterminait significativement la proportion des alcaloïdes : ergocomine, α -ergokryptine et β -ergokryptine respectivement. L'administration d'acides aminés exogènes influence fortement le spectre des alcaloïdes produits dans le sclérote (KOBEL et SANGLIER, 1978).

La biosynthèse des alcaloïdes est généralement réalisée dans le réticulum endoplasmique des cellules. Puis, les alcaloïdes sont stockés dans les vacuoles et/ou les gouttelettes lipidiques. Cependant, les alcaloïdes de type clavine et les dérivés de l'acide lysergique se retrouvent principalement dans le milieu de culture (VORISEK et REHACEK, 1978). Par contre, les alcaloïdes de type ergopeptidique sont surtout localisés dans les gouttelettes lipidiques qui sont le principal endroit de stockage des alcaloïdes (NEUMANN, 1985). Lors du développement de *Claviceps* en culture parasitique ou saprophytique, la synthèse des alcaloïdes est accompagnée d'une accumulation de lipides.

En ce qui concerne le catabolisme des alcaloïdes, très peu d'études ont été entreprises. Néanmoins, différentes hypothèses ont été proposées notamment celle de GROSS et coll. (1970) qui ont considéré qu'un excès d'alcaloïdes dans la cellule pouvait induire leur propre dégradation. Ils seraient alors ramenés sous une forme similaire aux alcaloïdes produits par les plantes. Il est probable enfin que les alcaloïdes soient dégradés dans les vacuoles (REHACEK et SAJDL, 1990).

2.2.3 - Physiologie de la formation des alcaloïdes

Les alcaloïdes de l'ergot sont produits lorsque les conditions extérieures deviennent limitantes en un nutriment essentiel. En culture submergée, la synthèse d'alcaloïdes est réalisée sous conditions de faible croissance et s'accompagne de changements très importants au niveau biochimique (REHACEK et MALIK, 1972 ; VINING, 1973 ; LUCKNER, 1985 ; MILICIC et coll., 1987).

Le métabolisme des alcaloïdes de l'ergot n'est pas exprimé de la même façon dans les organismes producteurs. La synthèse des alcaloïdes est réalisée à l'aide d'enzymes spécifiques codées par des gènes non impliqués dans la croissance. En général, la synthèse des alcaloïdes est considérée comme un processus hautement contrôlé dans lequel l'expression des gènes est régulée par les métabolismes anabolique, catabolique et énergétique de la cellule.

Parmi les principaux mécanismes de régulation, on peut distinguer les trois suivants : 1) La spécificité structurale et la régulation des gènes codant pour les enzymes responsables de la synthèse des alcaloïdes (synthétases), 2) Le contrôle des voies métaboliques primaires qui fournissent des molécules ou des précurseurs directs de la synthèse et 3) L'inhibition des enzymes qui modifient ou dégradent les alcaloïdes (REHACEK et SAJDL, 1990).

Les alcaloïdes de l'ergot sont généralement produits par des enzymes réprimées ou inhibées en conditions de croissance rapide. Ces enzymes sont présentes dans une forme réprimée dans le mycélium quand le milieu de culture contient une concentration élevée en phosphate. Elles sont induites par une lente diminution du niveau du phosphate intracellulaire.

2.2.3.1- Différenciation cellulaire

La différenciation cellulaire est considérée comme le résultat d'une expression différente du génome sous diverses conditions et à différents temps (BU'LOCK, 1974). Le rapport entre la production d'alcaloïdes et la différenciation cellulaire a fait l'objet de nombreuses recherches, principalement par REHACEK et coll. (VORISEK et coll. 1974 ; REHACEK et KOZOVA, 1975) et par MANTLE et coll. (MANTLE et TONOLO, 1968 ; MANTLE et coll., 1969).

En culture parasitique, la différenciation cellulaire se manifeste par la formation du sclérote et la synthèse d'alcaloïdes, l'ensemble étant accompagné de différents changements biochimiques. Un comportement similaire a été retrouvé pour les cultures submergées de *Claviceps*. Dans ces conditions, la production d'alcaloïdes est accompagnée par la sporulation (PAZOUTOVA et coll., 1977) et la différenciation du mycélium qui provoque la formation des cellules à parois épaisses ressemblant à celles du sclérote (MANTLE et TONOLO, 1968).

Le rapport entre la sporulation et la biosynthèse des alcaloïdes a été très étudié par différents auteurs. Il a été constaté que pour certaines souches de *Claviceps*, la conidiogénèse influence négativement la biosynthèse des alcaloïdes. Cela dépend des conditions physiologiques auxquelles les souches sont soumises. Ainsi, des conditions spécifiques sont nécessaires pour la production des alcaloïdes (SPALLA, 1973 ; VORISEK et coll., 1974 ; REHACEK, 1983).

Les résultats d'autres études avec d'autres souches rapportent la formation simultanée des conidies avec la synthèse des alcaloïdes. D'autres travaux montrent que la phase de production des alcaloïdes est caractérisée par une prédominance de chlamydospores en présence des cellules végétatives, avec une croissance lente et une production élevée de lipides (VORISEK et coll., 1974).

2.2.3.2- Les métabolismes primaire et secondaire

Le métabolisme primaire est généralement équilibré et les intermédiaires sont rarement accumulés du fait de la spécificité élevée de leur système enzymatique et de l'utilisation des voies de synthèse peu diversifiées. Les voies du métabolisme primaire sont pratiquement les mêmes pour tous les organismes vivants.

En revanche, le métabolisme secondaire concerne certains groupes de microorganismes qui produisent des métabolites dits secondaires. Ces métabolites ne sont pas indispensables au développement des microorganismes mais ils peuvent avoir un rôle important pour leur survie. Ils sont généralement synthétisés dans la phase subséquente à la croissance ; ils possèdent essentiellement des structures chimiques variées et peu usuelles et forment des mélanges de composés de même famille (DUMENIL et SANGLIER, 1989 ; REHACEK et SAJDL, 1990).

La fig. 2.10, montre les interrelations entre les produits du métabolisme primaire et la formation de produits du métabolisme secondaire. Les alcaloïdes de l'ergot appartiennent au groupe des métabolites secondaires. BU'LOCK (1974) a interprété le métabolisme secondaire comme une manifestation d'une différenciation accompagnée d'une croissance déséquilibrée. Parmi les caractéristiques principales des métabolites secondaires, on peut citer les suivantes (SIRE et coll., 1989) :

- * Ils ne sont pas nécessaires au développement de l'organisme. Des mutants ayant perdu la capacité de synthétiser ces composés restent capables de se développer.
- * Les métabolites secondaires sont souvent synthétisés dans des conditions bien précises. Dans la plupart des cas, leur synthèse démarre après la phase de croissance active (trophase) durant la fin de la période de croissance et le début de la phase stationnaire (idiophase).
- * Ils présentent une diversité structurale importante et leurs structures chimiques sont souvent complexes.
- * Les voies métaboliques sont généralement longues, complexes, parfois multiples et imbriquées.
- * Il est souvent difficile de leur attribuer un rôle physiologique dans l'organisme producteur.

Toutefois des fonctions dans le métabolisme des microorganismes leurs sont attribuées (LUCKNER et coll., 1984) :

- détoxification des substances accumulées lors du métabolisme primaire;
- intervention dans les processus de différenciation cellulaire;
- réponses chimiques (signaux) de coordination avec des organismes multicellulaires ;
- réponse aux conditions environnementales.

La synthèse des métabolites secondaires, comme les alcaloïdes de l'ergot, commence lorsque plusieurs conditions sont remplies : carence en certains composants du milieu, synthèse des précurseurs, levée de l'inhibition des enzymes impliquées dans ce métabolisme, etc...

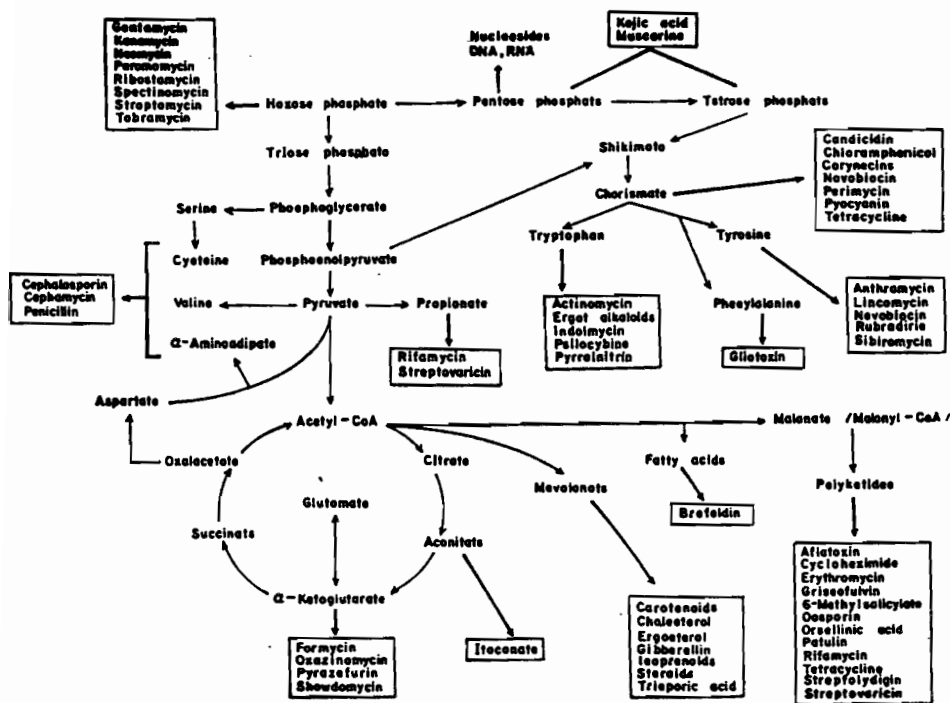


Fig. 2.10.- Interrelations entre les produits du métabolisme primaire et la formation de métabolites secondaires (REHACEK et SAJDL, 1990).

2.2.3.3- Facteurs nutritionnels et environnementaux

Source de carbone. D'une façon générale, les conditions optimales pour la production d'alcaloïdes ne sont pas nécessairement les mêmes que pour la croissance. L'induction de la biosynthèse nécessite des pressions osmotiques très élevées de l'ordre de 10 à 20 bars, lesquelles peuvent être obtenues par utilisation de concentrations élevées en sucres (200-300 g/l de saccharose) ou avec NaCl. Il a été constaté qu'une pression osmotique importante inhibe la conidiogénèse et induit la différenciation cellulaire. En revanche, une concentration inférieure influence négativement la synthèse d'alcaloïdes (AMICI et coll., 1967 ; PUC et SOCIC, 1977). Le choix de la source de carbone dépend du microorganisme utilisé, mais il est généralement admis que l'utilisation d'une source de carbone lentement métabolisée, favorise la formation des alcaloïdes (REHACEK et SAJDL, 1990).

Néanmoins, d'autres auteurs préconisent l'utilisation d'une double source de carbone. Ainsi, l'utilisation du saccharose, du sorbitol ou du mannitol, en association avec un intermédiaire du cycle de Krebs (acides citrique, succinique, etc.) a été proposée (ARCAMONE et coll., 1970 ; PAZOUTOVA et REHACEK, 1981 ; PERTOT et coll., 1984). D'autres auteurs ont utilisé des mélanges de sucres : saccharose et galactose (TABER et VINING, 1958) ; saccharose et mannitol (ARCAMONE et coll., 1961) ; maltose et glucose (KREN et REHACEK, 1984). Par ailleurs, il y a une inhibition de la production d'alcaloïdes lorsque la concentration en glucose du milieu de culture est élevée (KREN et coll., 1984). En outre, les concentrations élevées en glucose stimulent la formation de glucanes qui présentent un effet négatif sur la synthèse des alcaloïdes.

Source d'azote. La source d'azote a un rôle très important pour la croissance et la production d'alcaloïdes chez *Claviceps*. En effet, la forme sous laquelle l'azote est apporté peut influencer nettement les rendements de production et la manifestation du phénotype de *Claviceps* (REHACEK et SAJDL, 1990). Les principales sources d'azote utilisées sont le succinate d'ammonium, la farine de soja, l'urée, l'extrait de levure, l'asparagine, l'oxalate d'ammonium (KOBEL et SANGLIER, 1986) et le sulfate d'ammonium. La concentration optimale d'azote nécessaire à la production d'alcaloïdes est comprise entre 2,5 et 5 g/l.

Le phosphate inorganique. Le phosphore est un élément essentiel pour de nombreux processus de fermentation à cause de son effet sur la formation des métabolites secondaires (KYBAL et coll., 1968 ; DEMAIN, 1972). Néanmoins, la concentration en phosphore inorganique doit être très faible pour que les enzymes responsables de la biosynthèse des alcaloïdes soient induites (WAART et TABER, 1960 ; ROBBERS et coll., 1978 ; PAZOUTOVA et REHACEK, 1984).

En effet, le phosphate réprime la diméthylaltryptophane synthétase (KRUPINSKI et coll., 1976) et diminue l'activité de la chanoclavine-cyclase (ERGE et coll., 1973). Il apparaît que les enzymes qui dégradent les alcaloïdes sont activées par le phosphate. Le phosphate inorganique serait un répresseur des enzymes catalysant la synthèse des alcaloïdes. Ces observations concernant la synthèse des alcaloïdes ont également été faites pour la production d'antibiotiques (LARPENT et SANGLIER, 1989).

Facteurs environnementaux. Parmi les paramètres de culture, le pH, la température et l'aération sont les facteurs environnementaux les plus étudiés. Ainsi, le pH est un facteur primordial dans la production de métabolites secondaires. Dans le cas de *Claviceps*, le pH optimal pour la croissance et la production d'alcaloïdes est compris entre 5,2 et 5,5. La production d'alcaloïdes se déroule dans des conditions aérobies (la concentration de l'oxygène dissous est un paramètre très important en fermentation liquide). ARCAMONE et coll. (1961) ont suggéré une forte aération pour l'obtention de rendements élevés en alcaloïdes.

Afin de compléter notre étude bibliographique, nous avons consacré la dernière partie de ce chapitre aux concepts généraux de la fermentation en milieu solide qui sera notre principal outil de travail.

2.3- Fermentation en milieu solide (FMS)

2.3.1- Antécédents

Les fermentations en milieux solides sont employées depuis des centaines d'années pour la préparation d'aliments fermentés, l'ensilage, le compostage... La FMS a été supplantée par le développement de la fermentation en milieu liquide. Elle ne subsiste que dans les pays orientaux, africains et asiatiques qui produisent des aliments fermentés de façon traditionnelle. Il a fallu attendre de nombreuses années pour que ce procédé connaisse à nouveau un regain d'intérêt.

Parmi les travaux réalisés sur ce thème, ceux de HESSELTINE et coll. (1972, 1977a et b) ont été les plus importants. Ils ont permis d'informer de l'importance technologique de ces systèmes de fermentation. Actuellement, le développement industriel qui concerne les procédés d'optimisation, d'automatisation et de mécanisation de la fermentation en milieu solide est un domaine exclusif des pays orientaux, et en particulier du Japon.

2.3.2- Définition

La "fermentation en milieu solide", traduction de l'anglais "solid state culture" ou "solid state fermentation", est désignée par HESSELTINE (1972) comme "une fermentation dans laquelle le substrat n'est pas liquide". Par la suite, différents auteurs la décrivent comme étant la croissance et le métabolisme de microorganismes sur des matériaux solides (avec une structure organisée) en l'absence de tout liquide sous forme libre (RAIMBAULT, 1980 ; MOO-YOUNG et coll., 1983). Pour AIDOO et coll. (1982), la fermentation en milieu solide englobe toute fermentation qui a lieu sur un substrat solide ou sur un support solide nutritionnellement inerte.

Dans le cadre de notre travail, la définition que nous retiendrons est celle proposée par LONSANE et coll. (1985), ORIOL (1987) et SAUCEDO-CASTAÑEDA (1991) comme "une culture microbienne qui se développe en surface et à l'intérieur d'une matrice solide et en l'absence d'écoulement de liquide". La matrice poreuse peut être constituée d'un substrat humide ou d'un support inerte capable d'absorber les nutriments qui se trouvent dissous dans une solution.

Ainsi, on peut distinguer deux types de fermentation solide en fonction de la nature de la phase solide utilisée (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991) :

- 1) Culture solide avec une phase substrat-support. La phase solide est constituée d'un matériel qui assure à la fois la fonction de support et de source de nutriments. Ce matériel a été limité à l'utilisation de substrats amylacés et lignocellulosiques. La plupart des applications en FMS utilisent ce système.
- 2) Culture solide avec une phase support imprégnée d'un milieu liquide. Dans ce type de fermentation, la phase solide est considérée comme un support inerte, qui ne constitue pas une source de nutriments pour les microorganismes, mais sert de réservoir d'une solution nutritive, celle-ci étant absorbée sur la matrice solide. Dans la FMS, la capacité d'adsorption est un facteur important dans le choix d'un support. Les matériaux utilisés sont divers, et la plupart ont une forte capacité de rétention d'eau (exemples : bagasse de canne à sucre, écorce de bois, éponge, polyuréthane, amberlite, vermiculite...).

Il faut noter que la classification précédente ne tient pas compte des fermentations avec des phases solides mélangées, qui sont un cas intermédiaire. Celui-ci a été utilisé afin d'améliorer la capacité de rétention d'eau de matériaux amylacés par addition d'un matériel fibreux qui rend le système solide plus poreux (ORIOL, 1987).

2.3.3- Les applications de la FMS

L'utilisation de la culture en milieu solide pour l'homme n'est pas récente. D'innombrables applications sont citées dans la littérature. La diversité des aliments et des boissons préparés en utilisant cette technique dans les pays orientaux, africains et latino-américains n'est pas encore bien connue. Une liste des applications les plus importantes dans le domaine de la production de métabolites primaires et secondaires a été récemment rapportée par PANDEY (1992).

Nous retiendrons seulement les principaux métabolites secondaires produits par fermentation en milieu solide (Tableau 2.6).

Tableau 2.6.- Production de quelques métabolites secondaires par fermentation en milieu solide

Microorganisme	Métabolite	substrat ou support	Référence	Année
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxines	Manioc	BARRIOS et coll.	1990
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxines	Riz	MUDGETT	1986
	Aflatoxines	Maïs	SILMAN	1979
<i>Aspergillus oryzae</i>	Pyrazines	Blé+soja	SERRANO et coll.	1992
<i>Penicillium et</i> <i>Propioni bacterium</i>	Arômes	Fromage	REVAH et LEBAUT	1988
<i>Trichoderma viride</i>	Arômes	Agar	GERVAIS ET SARRETTE	1990
<i>Neurospora spp.</i>	Arômes	Riz	YAMAUCHI et coll.	1989
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilline	Bagasse	BARRIOS et coll.	1988
<i>Streptomyces viridifaciens</i>	Tétracycline	Patates douces	YANG et LIGH	1989
<i>Giberella fujikomori</i>	Acide gibbérellique	Son de blé	KUMAR et LONSANE	1987 a,b
<i>Streptomyces clavuligerus</i> et <i>Cephalosporium acremonium</i>	Cephalosporine	orge	JERMINI et DEMAIN	1989

2.3.4- Avantages et inconvénients

De nombreux auteurs ont souvent énuméré les avantages et les inconvénients de la fermentation en milieu solide par rapport à la FSm (LONSANE et coll., 1985 ; MUDGETT, 1986 ; HESSELTINE, 1987) :

Avantages de la FMS :

- * Simplicité du milieu de culture ; il suffit seulement parfois d'ajouter une solution minérale
- * Conditions de culture proches de celles des milieux naturels
- * Diminution des contaminations bactériennes grâce à une faible humidité

- * Diminution des effluents liquides à traiter
- * Réduction du coût opératoire lors de la récupération des métabolites
- * Aération facilitée par la porosité du matériel solide utilisé
- * Réduction du volume des fermenteurs par rapport à la culture liquide
- * Dans les fermentations traditionnelles, la microflore naturelle du substrat sert d'inoculum
- * Utilisation directe des produits fermentés

Inconvénients de la FMS :

- * Risque d'élévation de la température au sein du système
- * Régulation difficile des différents paramètres de culture (pH, humidité, etc...)
- * Nécessité de prétraitements des matériaux dans de nombreux cas
- * Problèmes dus à la diminution de l'humidité lors des fermentations de longue durée
- * Utilisation de quantités élevées d'inoculum
- * Estimation de la biomasse

2.3.5- Caractéristiques des fermentations solides

Les microorganismes

Les microorganismes utilisés en FMS peuvent être divisés en deux groupes. Le premier concerne les microorganismes de la microflore naturelle (endogène) du substrat, le second, la culture pure ou mixte. Les procédés de compostage et d'ensilage utilisent la microflore naturelle ou des concentrats d'inoculum. Les cultures pures sont largement utilisées pour la production de Koji par *Aspergillus oryzae* au niveau industriel (PANDEY, 1992). Naturellement, la plupart des microorganismes présentent la capacité de se développer sur des substrats solides, mais seuls les champignons filamenteux sont capables de se développer en l'absence d'eau libre (KARANTH, 1991).

Par ailleurs, ils présentent l'avantage d'envahir le support ou substrat solide, par leur croissance par élongation du mycélium (apicale). L'ensemble lié à la géométrie du substrat utilisé permet une croissance apicale du mycélium orientée dans toutes les directions des espaces libres, permettant ainsi l'approvisionnement en nutriments (RAIMBAULT, 1980). A l'inverse, les levures et les bactéries ne peuvent se développer qu'à la surface et à l'intérieur des cavités de la matrice solide (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991).

Les substrats et supports

Dans la nature, les champignons filamenteux se développent sur des matériaux solides : sur le bois, le papier, ou comme parasites des plantes dans les racines, les feuilles, les tiges ou les fleurs. Ils sont capables d'envahir la surface et de pénétrer dans les espaces inter-cellulaires et intra-cellulaires pour se procurer les nutriments nécessaires à leur développement.

Pour comprendre la croissance d'un microorganisme sur matériaux solides, il est indispensable de considérer la nature du matériel, le microorganisme et le mécanisme de dégradation généralement réalisé par un système enzymatique.

Les graines des céréales ou d'autres matériels de type amylacé, sont constituées de sucres accessibles et facilement dégradables par les microorganismes. Cependant, il est nécessaire de réaliser un prétraitement afin de faciliter leur dégradation. Il est également indispensable de travailler avec une granulométrie du substrat bien déterminée, de manière à faciliter l'aération, principal problème en FMS.

Les matériaux lignocellulosiques sont des substrats plus complexes et difficiles à dégrader. Ils sont composés d'hémicellulose, de cellulose et de lignine. La présence de lignine limite l'action des enzymes microbiens, en raison de leur interaction physico-chimique avec les polysaccharides. La cellulose et les hémicelluloses peuvent être dégradées par les microorganismes lorsque la lignine est dépolymérisée, solubilisée ou éliminée par des traitements chimiques ou biologiques. Ce type de matériel est également utilisé comme support inerte quand il n'a pas subi de traitement chimique.

Activité de l'eau et Humidité

En FMS, la quantité maximale d'eau présente dans le milieu est fonction de la capacité de rétention de la phase solide. Toutefois, cette quantité de liquide doit être nécessaire à la croissance des microorganismes sans détruire la structure solide ou réduire la porosité du substrat ou du support (ORIOLE, 1987). Un excès d'eau peut entraîner une limitation des échanges gazeux et de chaleur (MOO YOUNG et BLANCH, 1982), ainsi que des problèmes d'hétérogénéité de la croissance, dus au gradient d'humidité dans le substrat.

De plus, la faculté de développement des microorganismes sur des matériaux solides est déterminée par l'activité de l'eau. Celle-ci représente la disponibilité de l'eau totale d'un produit. Ceci est généralement représenté par les courbes de sorption (isothermes de sorption) qui établissent une relation entre le pourcentage d'eau (humidité) et l'activité de l'eau. Ces courbes présentent une forme sigmoïdale où trois zones distinctes sont définies : a) une zone où la disponibilité de l'eau est quasi nulle ($0,0 \leq A_w \leq 0,2$) ; b) une zone intermédiaire ($0,2 \leq A_w \leq 0,6$) et c) une zone où l'eau est libre ($0,6 \leq A_w \leq 0,9$) (ACKER, 1969 ; ORIOLE, 1987).

Généralement, les bactéries se développent à des activités de l'eau élevées ($0,85 \leq A_w \leq 0,99$). Par contre, pour les levures, l'activité de l'eau optimale se situe entre 0,75 et 0,9, et pour les champignons, entre 0,6 et 0,9.

L'eau en FMS a différents rôles : elle intervient dans la constitution des microorganismes, elle sert à véhiculer enzymes, nutriments et métabolites, et elle intervient dans la solubilisation de l'oxygène gazeux (ORIOLE, 1987). Cependant, une humidité élevée dans le substrat entraîne une diminution de la porosité de la matrice solide, une faible diffusion de l'oxygène, une réduction du volume dû au gaz, ainsi que des risques de contaminations bactériennes. Par contre une faible humidité aboutit à une croissance limitée et diminue l'accessibilité du substrat (MISRA, 1991). Par ailleurs, des changements s'opèrent au cours de la fermentation. Ils sont dus à l'évaporation et à la libération d'eau issue du métabolisme des microorganismes (LONSANE et coll., 1985).

De nombreux auteurs ont mis en évidence l'importance de l'eau sur le métabolisme des microorganismes (RAIMBAULT, 1980 ; GERVAIS et coll., 1988a-d ; ORIOLE et coll., 1988a ; GERVAIS et SARRETE, 1990). Dans la plupart des cas, l'augmentation de l'humidité du substrat provoque une augmentation du taux spécifique de croissance (μ), de la biomasse et de la synthèse d'enzymes (NISHIO et coll., 1979 ; NARAHARA et coll., 1982 ; SATO et coll., 1983).

En raison de l'importance de l'humidité, plusieurs auteurs ont conçu des procédés nouveaux permettant de bien contrôler l'eau au cours de la fermentation en milieu solide. A ce sujet, deux types de fermenteurs ont été développés, agités et statiques. Les réacteurs agités ont l'avantage de permettre le contrôle de l'humidité et de la température durant la fermentation, et l'ajout de sel ou de substrat à l'état dissous. Le principal problème qui se pose est la rupture du mycélium, lorsque l'agitation de la masse est trop forte (ORIOLE, 1987). Ce type de fermenteur a été préconisé par différents auteurs (ARIMA, 1964 ; LINDENFELSER et CIEGLER, 1975 ; RAIMBAULT, 1980 ; DURAND et CHEREAU, 1988).

Dans le cas des fermenteurs statiques, la seule possibilité de régulation de l'humidité au cours de la fermentation, consiste en une modification de l'équilibre entre la phase solide humide et l'humidité relative de l'air passant à travers le fermenteur (RAIMBAULT, 1980 ; SATO et coll., 1983 ; NARAHARA et coll., 1984 ; ROUSSOS, 1985). Ceci peut être obtenu en modulant la température et l'humidité relative de l'air. A ce propos, des systèmes de régulation de l'humidité ont été développés (GERVAIS et BAZELIN, 1986 ; BARSTOW et coll., 1988 ; RYOO et coll., 1991).

Aération et échanges gazeux

En FMS, le contrôle de l'environnement gazeux est un facteur important pour le développement des microorganismes. En effet, l'oxygène fourni doit être suffisant pour ne pas limiter la croissance. Celle-ci dépend de la vitesse du flux gazeux dans la masse du produit, de la vitesse de transport de l'oxygène dans le milieu et de la vitesse de consommation d'O₂ par le microorganisme (RAIMBAULT, 1980).

Pour MOO YOUNG et coll. (1983) les transferts de gaz peuvent être effectués par différents mécanismes :

- * Le transfert inter-particule qui concerne les échanges de masse par convection entre la phase gazeuse et l'interphase gaz-solide. La porosité inter-particulaire est définie comme l'espace vide occupé par l'air au sein de la matrice solide. Cette porosité est fonction aussi bien de la nature du matériel utilisé, que de la quantité d'humidité présente et du débit d'air dans le fermenteur.
- * Le transfert intra-particulaire qui concerne la diffusion d'O₂ et du CO₂ entre l'interphase solide-gaz et l'intérieur de la matrice solide.

En FMS, l'aération est un facteur très important qui assure différentes fonctions :

- a) l'approvisionnement en oxygène pour la croissance aérobie et le métabolisme ;
- b) la régulation de la température
- c) l'élimination de la vapeur d'eau, du CO₂ et de certains métabolites volatils.

Dans le cas des matériaux fibreux, il existe des espaces disponibles favorisant la diffusion de l'oxygène. Par contre, dans le cas des substrats amylacés (céréales), les espaces sont réduits et la diffusion de l'air est plus difficile et limite la croissance. Afin d'éviter ce type de problèmes, il est indispensable de réaliser des prétraitements qui permettent l'obtention de substrats ayant une granulométrie définie.

De nombreux auteurs ont mis en évidence l'effet de la composition en CO₂ et en O₂ sur le métabolisme des microorganismes cultivés en FMS. Ainsi, lors de la production d'enzymes par *Aspergillus oryzae* sur riz, des effets positifs de la pression partielle de l'oxygène ont été observés sur le rendement en amylases (BAJRACHARYA et MUDGETT, 1980). De même NARAHARA et coll. (1982) ont obtenu des rendements supérieurs en amylase et en protéine, quand la pression partielle en CO₂ est comprise entre 2 et 5 %, au cours de la phase exponentielle de croissance, et en protéases, pour une pression partielle de 5 % durant la phase stationnaire.

Le problème de l'hétérogénéité toujours présent en FMS peut entraîner des gradients importants dans la composition de l'air. RATHBUN et SHULER (1983), lors de la fabrication du Tempeh, ont enregistré des pressions partielles en O₂ proches de 2 % et des pressions partielles en CO₂ pouvant atteindre 21 % dans la partie inférieure du réacteur.

Il est évident que des systèmes permettant le contrôle de l'environnement gazeux sont nécessaires afin de contrôler le métabolisme des microorganismes. En raison de l'importance du contrôle de l'environnement gazeux et son effet sur le métabolisme, un système d'analyse automatique des gaz a été mis au point afin d'étudier leurs effets sur le déroulement des FMS. Il permet de suivre en temps réel l'évolution des activités respiratoires au cours d'une fermentation (SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1992).

Contrôle de la température

En FMS, le dégagement de la chaleur produite au cours des activités métaboliques des microorganismes provoque une élévation de la température au sein du fermenteur; ce qui pose un réel problème (HESSELTINE, 1987). D'une part, l'hétérogénéité du matériel solide entraîne la formation de gradients de température dus à la forte activité microbienne. D'autre part, la faible activité de l'eau, l'absence d'agitation lors de l'utilisation de fermenteurs statiques, la faible conductivité thermique des matériaux biologiques nuisent au développement des microorganismes (MOO YOUNG et coll., 1983 ; BARSTOW et coll., 1988 ; GRAJEK, 1988 ; GONZALES-BLANCO et coll., 1990 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1990).

En effet, l'augmentation de la température est directement proportionnelle à la hauteur du substrat et à l'activité métabolique des microorganismes (MALATHI et coll., 1991).

L'influence de la température sur le métabolisme des microorganismes a été le sujet de nombreuses recherches (RAIMBAULT, 1980 ; RATHBUN et SHULER, 1983 ; HUERTA-OCHOA, 1984 ; LONSANE et coll., 1985 ; GONZALEZ-BLANCO et coll., 1990 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll. 1990).

Dans le but de résoudre ce problème, plusieurs auteurs ont établi des stratégies pour la régulation de la température. La plupart d'entre eux ont utilisé une convection forcée d'air à travers le fermenteur. D'autres ont utilisé les propriétés refroidissantes de l'évaporation de l'eau pour contrôler automatiquement l'humidité et la température (GERVAIS et BAZELIN, 1986 ; BARSTOW et coll., 1988 ; DURAND et CHEREAU, 1988 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1990 ; RYOO et coll., 1991).

Contrôle du pH

En FMS, la mesure du pH en continu a toujours été un problème. Les difficultés proviennent principalement de l'hétérogénéité et de la faible teneur en eau dans le milieu de culture qui ne permettent pas une mesure satisfaisante du pH. Dans la plupart des cas, on réalise une estimation globale du pH après une mise en suspension de l'échantillon solide dans un volume d'eau 10 fois supérieur (ORIOU, 1987). Toutefois, cette méthode ne permet pas de mesurer le pH à l'intérieur de la matrice au cours de la fermentation ; elle ne tient donc pas compte des gradients de pH locaux résultant des réactions biologiques.

Le contrôle du pH en FMS est donc difficile. Afin d'éviter de fortes variations de pH, RAIMBAULT (1980) a préconisé l'utilisation de sels minéraux qui confèrent au milieu de culture un pouvoir tampon. Ainsi, un mélange de sulfate d'ammonium et d'urée, en proportions adéquates, a permis de maintenir le pH à des valeurs favorables à la croissance d'*Aspergillus niger*. Cette technique a été, par la suite, utilisée par différents auteurs (HUERTA-OCHOA, 1984 ; ROUSSOS, 1985 ; ORIOU, 1987 ; DUFOUR, 1990 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991 ; TREJO-HERNANDEZ et coll., 1991).

Estimation de la biomasse

L'estimation de la biomasse en milieu solide, par comparaison avec le milieu submergé, est très difficile. Les méthodes de dosage couramment utilisées en fermentation liquide ne peuvent généralement pas l'être en FMS, à cause de la nature du matériel et de la capacité des microorganismes à pénétrer dans les espaces intercellulaires et intracellulaires de la matrice solide. En raison de la difficulté de séparation du mycélium du matériel solide, on est obligé de procéder à un échantillonnage et à l'application de méthodes indirectes de dosage de la biomasse.

Certains auteurs estiment la biomasse en dosant les protéines du champignon soit par la méthode de LOWRY et coll. (1951), mais elle n'est fiable que sur des substrats ne contenant pas de lignines, soit par la méthode de Kjeldahl après précipitation des protéines dans l'acide trichloroacétique (ORIOU, 1987).

La méthode de la glucosamine est également largement utilisée. Cette dernière est un constituant spécifique de la paroi du champignon. Elle est libérée après hydrolyse acide de chitine de l'échantillon et dosée par la méthode d'ELSON et MORGAN (1933). Cette méthode et la détermination de l'ergostérol ont été utilisées par SEITZ et POMERANZ (1983) pour le dosage de la biomasse du sclérote de l'ergot de l'orge, du seigle et d'autres graminées. La méthode de l'ergostérol pour l'évaluation indirecte de la biomasse a été également préconisée par d'autres auteurs (SEITZ et coll., 1979 ; GORDON et WEBSTER, 1984 ; MATCHAM et coll., 1985).

Pour la plupart des méthodes utilisées, il est nécessaire de réaliser une hydrolyse acide de chitine de l'échantillon. Ainsi, le dosage des acides aminés totaux (CHAPLIN, 1976 ; PEÑALOZA et coll., 1985), la détermination des acides nucléiques (OGUR et ROSE, 1950 ; SOLOMON et coll., 1983) et la détermination de la chitine (SMITH, 1980) sont réalisés après l'hydrolyse acide.

Certains auteurs mesurent la teneur en ATP d'un échantillon solide, qui permet également de suivre la croissance des microorganismes (COCHET et coll., 1984 ; THIERRY et CHICHEPORTICHE, 1988). D'autres utilisent la détermination de la teneur en azote total par l'analyse de la composition élémentaire de l'échantillon solide avec un analyseur CHN (DUFOUR, 1990).

Plus récemment, AURIA et coll. (1990) ont constaté que l'évolution de la pression à l'intérieur du fermenteur présentait une corrélation avec la croissance du champignon.

Par la suite, ils se sont aperçus que l'évolution de ce paramètre pouvait être rapportée de façon indirecte à la biomasse produite d'*Aspergillus niger* cultivé sur amberlite.

Enfin de nombreux auteurs ont suggéré l'utilisation de la mesure des gaz (CO_2 et O_2) comme une méthode indirecte d'évaluation de la croissance au cours de la fermentation. Cette technique permet de suivre en continu l'évolution de l'activité microbienne. A partir des teneurs en CO_2 et O_2 , on peut prévoir l'évolution de la croissance (SUGAMA et OKAZAKI, 1979 ; RAIMBAULT, 1980 ; CARRIZALES et coll., 1981 ; SATO et coll., 1983 ; SATO et YOSHIKAWA, 1988 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991). Ainsi, la chromatographie en phase gazeuse et des analyseurs spécifiques de CO_2 et O_2 sont utilisés pour le dosage des effluents gazeux.

MATERIEL ET METHODES

3. MATERIEL ET METHODES

3.1- Microorganismes

Lors de cette étude nous avons utilisé des souches de champignons du genre *Claviceps*, (Tableau 3.1). Ces souches ont diverses origines : les unes proviennent de collections internationales, certaines nous ont été offertes et d'autres sont des souches sauvages que nous avons isolées à partir de grains de céréales contaminés et de sclérotés.

Tableau 3.1 .- Liste des différentes souches de *Claviceps* étudiées.

Nom de l'espèce	Code	Origine
<i>Claviceps purpurea</i>	1029c	Dr. Keller, Institut de Berlin, Université de Berlin, *
<i>Claviceps paspali</i>	<i>C. paspali</i>	ATCC 13892
<i>Claviceps fusiformis</i>	HA	ATCC 26019
<i>Claviceps fusiformis</i>	ICRISAT	ICRISAT, INDE **
<i>Claviceps fusiformis</i>	LDH	ICRISAT, INDE **
<i>Claviceps microcephala</i>	<i>C. microcephala</i>	Prof. Lacoste, Muséum National de Cryptogamie de Paris

* (KELLER, 1986)

** International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics

3.2- Milieux de culture

3.2.1- Milieu de conservation

Les souches ont été répiquées régulièrement et conservées sur gélose inclinée (PDA-Difco). Après incubation de 14 jours à 24° C, elles sont soit lyophilisées, soit conservées à 4 °C pendant environ 6 mois.

3.2.2 - Milieu pour la production d'inoculum (MI)

Pour la production de l'inoculum, nous avons utilisé un milieu gélosé contenant (g/l) : 70 g d'extrait de malt, 30 g de farine de seigle, 20 g de gélose. Le pH a été ajusté à 5,2 avec une solution d'hydroxyde d'ammonium à 20 %. Le milieu a été autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

3.2.3- Milieux pour la croissance apicale

La croissance apicale a été défini comme l'aptitude d'un microorganisme à coloniser une surface solide (RYAN et coll., 1943). Pour assurer la croissance apicale, l'ensemble des souches a été cultivé sur quatre milieux de culture différents (g/l) : M1(Saccharose, 100 ; acide succinique, 6 ; NH₄OH, à pH 5.2 ; MgSO₄, 0.4 ; KH₂PO₄, 0.4 ; agar, 20), M2 (Extrait de malt, 70 ; Amidon de pomme de terre, 30 ; agar, 20), M3 (Extrait de malt, 70 ; agar, 20), et M4 (Farine de seigle, 70 ; agar, 20). Le premier est un milieu synthétique et les trois autres de milieux naturels qui ne nécessitent pas l'apport complémentaire d'éléments minéraux. Dans le milieu proposé par SANGLIER, 1977) la saccharose et l'acide succinique sont les sources de carbone d'énergie. La source d'azote est fourni par l'ammonium.

3.2.4- Milieu de préculture

Le milieu de préculture utilisé dans la première partie de notre étude est celui proposé par KOBEL et SANGLIER (1986), dont la composition est la suivante : Saccharose 100,0 g ; Oxalate d'ammonium 3,0 g ; Amidon de pomme de terre 10,0g ; KH_2PO_4 0,25g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,25 g ; KCl 0,12 g ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 16,60 mg ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 6,80 mg, eau 1000 ml.

3.2.5- Milieu de production d'alcaloïdes (milieu de base)

Le milieu proposé par KOBEL et SANGLIER (1986) puis modifié par la suite constitue le milieu de base. Le milieu est composé, sauf spécification de (g/l) : saccharose 210,0 ; Oxalate d'ammonium 9,60 ; Urée 1,73 ; KH_2PO_4 0,625 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,625 ; KCl 0,31 ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,025 ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,01. Le pH est ajusté à 5,2 avec une solution d'hydroxyde d'ammonium à 20 %. Le milieu est autoclavé à 121° C pendant 20 min.

3.3- Traitement du substrat solide

Tout au long de cette étude, nous avons utilisé différents substrats amylacés et un support solide de nature lignocellulosique.

3.3.1- Bagasse de canne à sucre

La bagasse, résidu lignocellulosique de la canne à sucre recueilli après l'extraction du saccharose, est utilisée comme support. Le lot que nous avons utilisé provient de la sucrerie "Emiliano Zapata" de Zacatepec, dans l'état de Morelos au Mexique. Dans cette usine, deux fractions de bagasse sont séparées : la première correspond aux fibres longues destinées à la fabrication du papier, et la deuxième aux fibres courtes ou "bagacillo", constituées essentiellement de moëlle. C'est le bagacillo, soigneusement lavé avec de l'eau pour éliminer les impuretés issues de la récolte de la canne et de l'extraction du sucre, qui a été utilisé.

Cette bagasse est tamisée et la fraction comprise entre 20-50 mesh (taille de particule de 0,8 à 0,3 mm) est retenue. Elle est lavée trois fois à l'eau du robinet et rincée avec de l'eau déminéralisée. Elle est ensuite séchée à 60°C puis stockée jusqu'à son utilisation.

3.3.2- Céréales

Les grains de seigle et de blé sont concassés (environ 3 morceaux par grain) et cuits à la vapeur dans un autoclave, à 121° C pendant 15 min puis refroidis au congélateur pendant environ 12 heures. Ce refroidissement brutal provoque la rétrogradation de l'amidon soluble pendant la phase de cristallisation de l'eau, et permet l'obtention d'un produit non collant. Ils sont ensuite décongelés et séchés dans une étuve ventilée à 60°C. Enfin, le substrat obtenu est broyé et tamisé. Les particules retenues ont une taille qui varie entre 0,8 et 0,3 mm. Ce traitement a été appliqué aux différents substrats utilisés : le seigle et le blé. Ces céréales sont issues de cultures dites "biologiques", c'est à dire sans utilisation de produits chimiques. La composition moyenne des substrats utilisés est indiquée dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 .- Composition des principaux substrats solides (g/100 g)

Constituant	grains de seigle	farine de seigle complète	grains de blé	farine de blé complète	Semoule de blé
Protéines	8,65	8,96	9,80	9,74	10,80
Matières grasses	1,90	1,36	2,10	1,88	0,98
Sucres totaux	58,06	62,80	59,40	63,90	67,40
Fibre totale	14,59	13,30	12,50	9,56	6,15
Sels Minéraux	1,90	0,98	2,40	1,52	0,47
Humidité	14,70	13,60	13,80	13,40	14,20

Ces substrats constituent la source de carbone des différents milieux de culture. Pour la fermentation en milieu solide nous avons additionné à 100 g de substrat solide, une source d'azote et des sels minéraux comme suit : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 11,8 g ; Urée, 2 g ; KH_2PO_4 , 1 g, à pH 5, 2 et à une humidité initiale de 50 %. La solution minérale a été ajustée à pH 5.2 puis autoclavée à 121° C, pendant 15 min.

3.4- Conditions de culture

3.4.1- Préparation de l'inoculum et préculture

Un fragment de mycélium lyophilisé de la souche choisie est placé au centre d'une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé MI stérilisé. Après 14 jours d'incubation à 26°C, les colonies sont reprises dans de l'eau stérile et on obtient environ 10^8 spores par ml. Pour les souches ne produisant pas de conidies, l'inoculation se fait avec des fragments de gélose de 1 cm².

La préculture est réalisée en fioles de 250 ml contenant 50 ml de milieu. Les conditions de culture sont les suivantes : inoculum $2,7 \times 10^7$ spores/g de substrat carboné, agitation 220 rpm, température d'incubation 26° C et durée 5 jours.

3.5- Dispositifs de fermentation

3.5.1- Culture en milieu liquide

Pour la culture en milieu liquide, nous avons utilisé deux types de réacteurs de fermentation : des fioles de 250 ml et un bioréacteur de 2 l.

3.5.1.1- Culture en fiole de 250 ml

Les cultures liquides en fioles d'Erlenmeyer de 250 ml ont été réalisées avec 50 ml de milieu de culture. Le pH est ajusté à 5,2 avant stérilisation. Les fioles ont été inoculées avec $2,7 \times 10^7$ spores/ g de substrat carboné ou 10 % v/v d'une culture contenant environ 10 g/l (concentration finale 1 g/l) et incubées à 25-26°C pendant 5 jours pour la préculture ou 7-14 jours pour la culture de production avec une agitation de 150 rpm.

3.5.1.2- Culture en bioréacteur

Un fermenteur de marque LSL Biolafitte (type cellulaire) à agitation mécanique a été utilisé. Son volume utile est d'environ 1,4 litre. Le fermenteur a été équipé de sondes stérilisables Ingold pour la mesure de l'oxygène dissout et du pH et d'un bloc de commande-régulation (pH, agitation, aération, etc...).

Le fermenteur contenant le milieu de culture, équipé des sondes, a été autoclavé à 121 °C pendant 30 min. La sonde de pH est préalablement calibrée avec des tampons à pH 4 et pH 6.87. Après refroidissement de l'ensemble, la sonde à oxygène est également calibrée.

L'ensemencement du milieu de culture a été réalisé à l'aide d'un inoculum homogène constitué d'une suspension mycélienne de 5 jours. Des prélèvements sont effectués à des intervalles de temps réguliers. Ils permettent de suivre l'évolution de la biomasse et des paramètres biochimiques et physiques de la fermentation (Fig. 3.1).

3.5.2- Culture en milieu solide

Pour la culture en milieu solide, nous avons utilisé des colonnes comportant deux compartiments. Ce type de réacteur de fermentation solide a déjà été décrit et utilisé par différents auteurs (RAIMBAULT, 1980 ; HUERTA-UCHOA, 1984 ; ROUSSOS, 1985 ; TREJO-HERNANDEZ, 1986 ; ORIOL, 1987 ; DUFOUR, 1990 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991).

Ce réacteur est constitué de colonnes de verre de 4 cm de diamètre et 20 cm de longueur dont le volume utile est d'environ 250 ml. Une fois remplies avec le support, les colonnes sont montées sur un humidificateur et introduites dans un bain thermostaté à 26°C (Fig. 3.2).

L'aération dans les fermenteurs est réalisée à l'aide d'une canalisation à haute pression dont le débit de l'air est réglé à 0,2 bar par un manodétendeur. Avant son passage dans la colonne, l'air est humidifié deux fois à température ambiante à l'aide de bulleurs en verre fritté plongeant dans de l'eau, puis distribué en passant par un ballon à fond rond muni d'une entrée et de plusieurs sorties.

Le contrôle du flux d'air saturé en eau s'effectue par l'intermédiaire de microvannes à pointeaux. Afin de s'assurer de la saturation et de la mise à température de l'air, un petit bulleur est disposé sous chaque colonne. Le débit d'air est réglé à la sortie de chaque colonne à raison de 2 ml/min/g de MSI (Matière Sèche Initiale). Le dispositif permet le contrôle et le suivi en continu de la fermentation (Fig.3.2).

3.5.3- Mise en œuvre de la culture en milieu solide

Le jour précédant le démarrage de la fermentation, la quantité de bagasse nécessaire est répartie en sachets autoclavables et stérilisée à 121° C pendant 15 min ; une fois refroidie, elle est prête à l'emploi. Le volume de milieu de base utilisé est vérifié ; les sels minéraux et les précurseurs sont additionnés et le pH est ajusté à la valeur souhaitée.

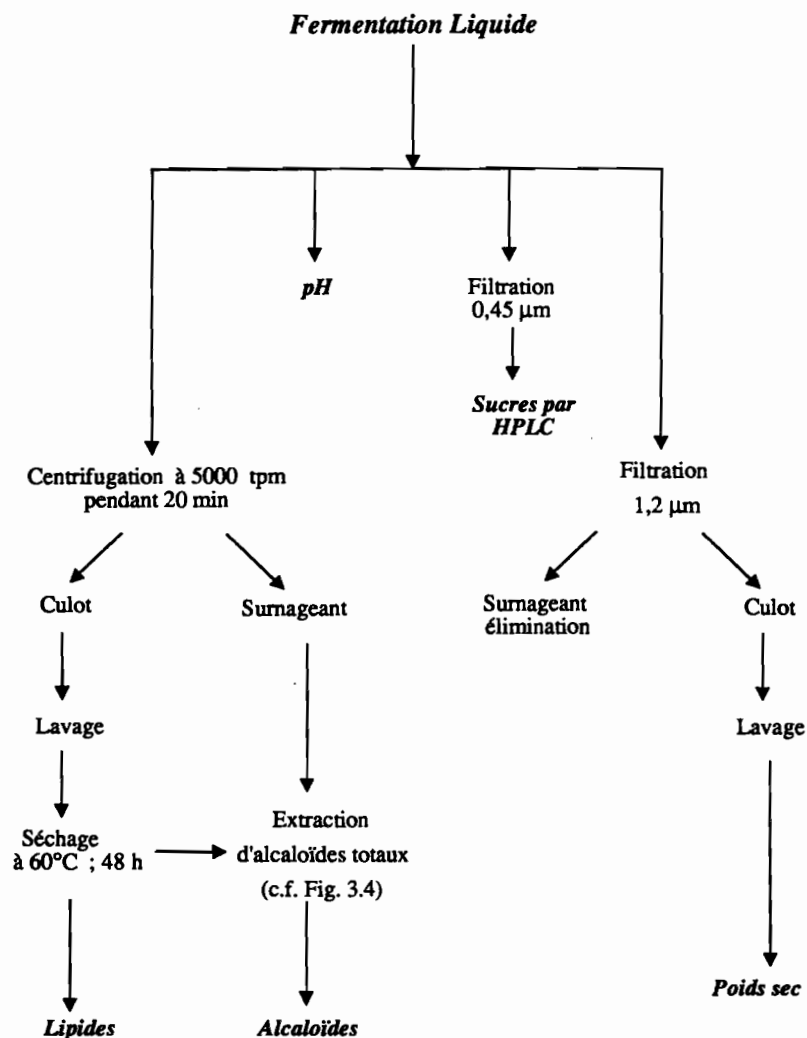


Fig. 3.1 .- Schéma de traitement et d'analyse des échantillons provenant de la fermentation liquide

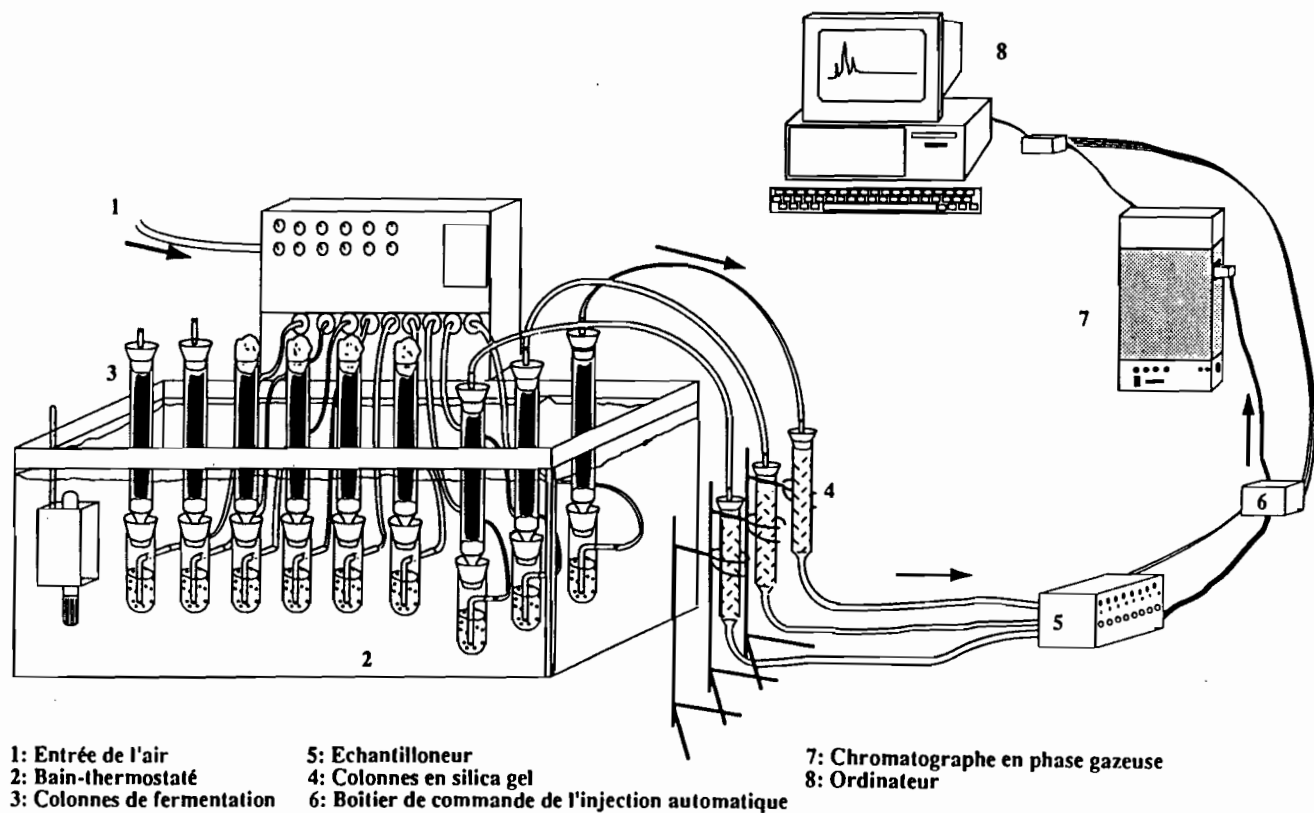


Fig. 3.2. - Dispositif d'analyse automatisé des gaz de la fermentation solide. utilisant un chromatographe en phase gazeuse

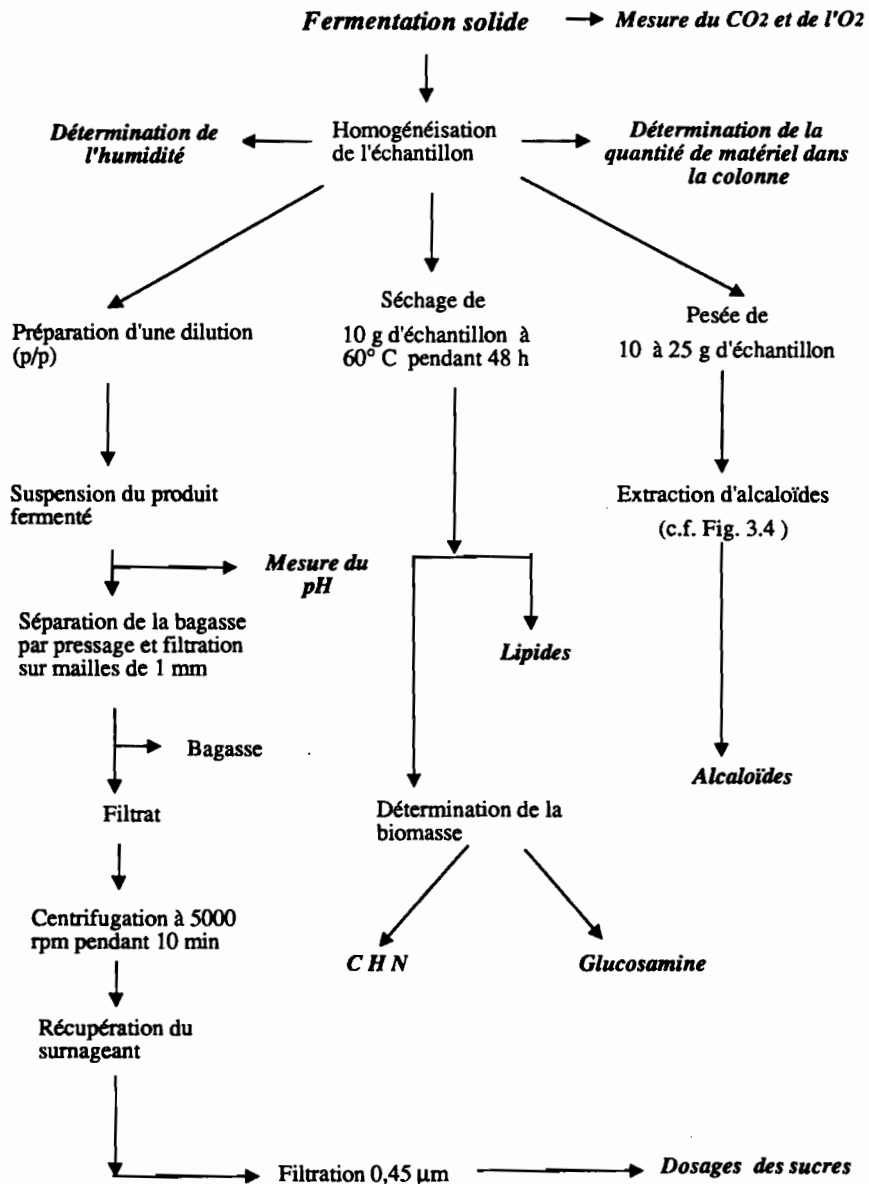


Fig. 3.3 .- Schéma de traitement et préparation des échantillons de la fermentation solide pour les différentes analyses biochimiques.

3.7- Techniques de dosage de la biomasse

La présence de lignine dans la bagasse et dans les céréales entraîne des interférences lors du dosage des protéines par la méthode de LOWRY (1951), ainsi qu'avec les méthodes classiques de dosage des protéines. C'est pourquoi il a fallu utiliser d'autres méthodes comme le dosage de la glucosamine d'ELSON et MORGAN (1933), de la teneur en acides nucléiques (ORIOL, 1987), et la détermination de la composition élémentaire CHN (DUFOUR, 1990).

3.7.1- Dosage de la glucosamine

La méthode de dosage de la glucosamine et de la chondrosamine a été mise au point par ELSON et MORGAN (1933). Une hydrolyse acide totale est nécessaire pour libérer la glucosamine de la paroi des champignons. La glucosamine ainsi libérée se combine avec l'acétyl-acétone pour former un composé pyrrolique. Ce dernier réagit avec le réactif para-diméthylamino-benzaldéhyde (PDBA) pour former un composé stable, rouge, présentant un maximum d'absorbance à 530 nm.

- Réactif A : 1 ml d'acétylacétone dans 50 ml de carbonate de sodium 0,5 N.
- Réactif B : 0,8 g de PDBA dissous dans 30 ml de HCl 12 N + 30 ml d'éthanol.

A 2 ml de surnageant de l'échantillon hydrolysé on ajoute 1 ml de réactif A et 1 ml d'eau distillée. La solution est portée au bain marie bouillant pendant 15 min. Les tubes sont refroidis puis on ajoute 4 ml d'éthanol.

On ajoute ensuite 1 ml de réactif B, ainsi qu'1 ml d'éthanol. On détermine la D.O. à 530 nm après 30 min. La gamme étalon est réalisée avec du chlorhydrate de D-glucosamine (0 à 100 mg/l). Une seconde courbe étalon est obtenue directement avec une culture du champignon en milieu liquide. Elle est filtrée, lavée à l'eau distillée, puis séchée 24 h à 60°C et finement broyée avant d'être traitée comme les échantillons.

3.7.2- Détermination des acides nucléiques

La détermination de la teneur en acides nucléiques permet d'avoir une approche indirecte de l'activité métabolique des champignons au cours de leur développement (OGUR et ROSEN, 1950). Les échantillons issus de la fermentation solide sont séchés à l'étuve à 55°C et broyés à sec à l'aide d'un broyeur Tecator, de façon à obtenir une très fine poudre homogène. Une fraction d'environ 2 g de cette poudre est mise en suspension dans 100 ml d'eau distillée et homogénéisée à l'ultraturax (13500 rpm). 5 ml sont alors prélevés et centrifugés (6000 rpm pendant 15 min) ; le surnageant est éliminé.

On ajoute 5 ml d'acide perchlorique 7 N au culot puis les tubes contenant les échantillons homogénéisés sont placés dans un bain marie agité à 70 °C pendant 20 min. Ils sont ensuite à nouveau centrifugés à 6000 rpm pendant 10 min. Une dilution au 1/10^{ème} est alors réalisée sur le surnageant. La mesure de la D.O. est effectuée directement sur cette dilution, à 260 nm. Une courbe étalon de 0 à 20 mg/l est réalisée avec de l'ARN type VI de la levure *Torula* (SIGMA).

3.7.3 Détermination de la composition en C, H et N

Les compositions élémentaires en carbone, en hydrogène, et en azote de la biomasse et de la bagasse ont été déterminées grâce à un analyseur "LECO" CHN 600.

L'analyse est réalisée par combustion dans l'oxygène pur, à 950°C, d'un échantillon séché et finement moulu à l'aide d'un broyeur Tecator. Environ 50 à 80 mg de broyat sont introduits dans des capsules d'étain (catalyseur de la réaction de combustion) et placés dans la chambre de combustion. Au cours de celle-ci il y a production de CO₂, de vapeur d'eau, d'oxydes d'azote, d'azote et d'oxydes de soufre. Les oxydes de soufre sont retenus par de la chaux dans un second four de façon à éviter la formation d'acide sulfurique avec la vapeur d'eau résultant de la réaction. Les autres gaz sont recueillis et mélangés.

Après mélange des gaz de combustion, une fraction de 10 ml est prélevée pour l'analyse d'azote. Elle est entraînée par de l'hélium et traverse un ensemble de purification constitué de tournure de cuivre portée à 800°C pour éliminer l'oxygène et transformer les oxydes d'azote en azote, d'ascarite et d'anhydride pour retenir le CO₂ et l'H₂O. L'azote est alors dosé dans une cellule à conductibilité thermique. Le carbone et l'hydrogène sont analysés par des cellules infrarouges.

Cette méthode d'analyse détermine la teneur totale en carbone, en hydrogène et en azote d'un échantillon, exprimée en pourcentage par rapport à la matière sèche. L'utilisation de cette méthodologie a permis de réaliser une estimation directe de la biomasse en FMS par le dosage de l'azote protéique, d'une manière comparable à la culture liquide.

3.8- Techniques colorimétriques pour le dosage des sucres

3.8.1- Dosage des sucres réducteurs

Les sucres réducteurs sont dosés par la méthode de MILLER (1959). Les sucres réduisent l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNS) en acide 3-amino-5-nitrosalicylique, à chaud et en milieu basique. Le produit de la réaction présente une coloration jaune orangée présentant un maximum d'absorption à 575 nm. La méthode permet de doser des solutions de concentrations comprises entre 0 et 2 g/l de glucose.

La composition du réactif DNS est la suivante (g/l) : Acide 3, 5 dinitrosalicylique 10, 0 ; Hydroxyde de sodium 10, 0 ; Sulfite de sodium 0, 5 ; Phénol 2,0.

L'échantillon à doser est dilué convenablement de façon à obtenir une concentration en sucres réducteurs voisine de 1 g/l. A 1 ml de cette dilution on ajoute 1 ml du réactif au DNS. Le mélange est porté à ébullition 5 min et refroidi rapidement. Après addition de 8 ml d'eau distillée, le contenu des tubes est homogénéisé au vortex, et la densité optique est lue à 575 nm. Une courbe étalon de glucose de 0 à 1 g/l est réalisée.

3.8.2 Dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux est effectué d'après la méthode de DUBOIS et coll. (1956) en utilisant le réactif à l'Anthrone. Une hydrolyse des polysaccharides est réalisée en milieu acide à chaud. L'Anthrone réagit avec les hexoses et les aldopentoses pour donner une coloration bleu-verte très intense, présentant une absorbance maximale à 625 nm. La présence de protéines contenant du tryptophane donne une couleur rouge à l'échantillon et interfère avec la réaction.

Cette méthode de dosage est une méthode très sensible qui permet de doser les sucres dans une plage de concentrations comprises entre 0 et 50 mg/l.

Le réactif est préparé en dissolvant 200 mg d'anthrone dans 100 ml d'acide sulfurique pur.

A 2,5 ml de l'échantillon préalablement dilué on ajoute 5 ml de réactif à l'anthrone. Les tubes sont agités avec soin et portés à ébullition pendant 10 min. La réaction est arrêtée par refroidissement en plaçant les tubes dans un bain marie à 0°C. L'absorbance est lue à 625 nm. Une courbe étalon de 0 à 2 g/l de glucose est préparée.

3.8.3. Dosage de sucres par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

Au cours de ce travail, nous avons mis au point une méthodologie analytique par HPLC permettant la séparation et la quantification simultanée d'un certain nombre de composants produits lors de la fermentation, en particulier des sucres, des acides organiques et des alcools. Dans le cas d'une fermentation avec *Claviceps*, la présence de ces métabolites nous indique une contamination soit par des champignons filamenteux, soit par des levures ou des bactéries.

Les échantillons de la fermentation sont centrifugés puis filtrés sur filtre 0,45 µm (Fig. 3.3). Les filtrats sont dilués afin d'obtenir des concentrations en sucres comprises entre 0 et 10 g/l.

Les composants sont séparés sur une colonne "Biorad" Aminex HPX87H. Cette colonne est constituée par une résine greffée H⁺ et un copolymère de styrène et de sulfonate de divinyl-benzène. Elle sépare les composés par l'action combinée d'une interaction hydrophobe et d'un échange d'ions.

Deux détecteurs sont branchés en série en sortie de colonne : un réfractomètre pour l'analyse des sucres et de quelques acides organiques et un détecteur UV à 210 nm qui met en évidence les substances présentant des doubles liaisons. L'analyse est effectuée au moyen d'un appareillage modulaire, constitué d'une pompe LDC Constametric 3200, d'un four Jones Chromatography, d'un détecteur réfractomètre Philips PU 4026 et d'un détecteur ultraviolet LDC Spectromoniton 3100. Les signaux provenant des détecteurs sont traités par un logiciel d'intégration informatisé nommé CHROMA et commercialisé par la société Biosystème. Les conditions opératoires sont les suivantes (GIRAUD et coll., 1991) :

- Détecteurs : Réfractomètre et ultraviolet à 210 nm
- Solvant-éluant : H₂SO₄ 6 mM
- Débit du solvant : 80 ml min⁻¹
- Pression : 800 - 900 PSI ou MegaPa
- Volume injecté : 20 µl
- Température : 65° C

Le tableau 3.2 donne la liste des principaux composants qu'il est possible de quantifier ainsi que leurs temps de rétention.

Tableau 3.2 . Composants séparés par l'HPLC et quantifiés sur un détecteur ultraviolet et à index réfractométrique

Composant	UV	Réfractomètre
Amidon	-	4,63
Acide Oxalique	5,09	5,36
Glucose	-	6,80
Acide Malique	7,09	7,21
Acide Lactique	9,53	9,67
Acide Acétique	11,22	11,35
Acide Propionique	13,16	13,30
Acide Isobutyrique	14,73	14,88
Méthanol	-	14,89
Acide Butyrique	15,95	16,10
Ethanol	-	17,00
Acide Isovalérique	21,55	18,42
Acide Valérique	-	21,74

3.9- Dosage du phosphate inorganique

Le dosage du Phosphate Inorganique (Pi) est réalisé d'après la méthode de TAUSSKY et SHORR (1953). Les ions phosphate réagissent avec le molybdate d'ammonium, en présence de FeSO_4 , pour former un complexe phospho-molybdique de couleur bleue intense, présentant une absorbance maximale à 690 nm. Les phosphates sont dosés directement dans le surnageant convenablement dilué de façon à obtenir une quantité de phosphates proche de 20 $\mu\text{g}/\text{tube}$.

Préparation du réactif sulfomolybdique : dissoudre 25 g de molybdate d'ammonium dans 250 ml de H_2SO_4 20 N (278 ml de H_2SO_4 36 N ou 66 °B dans 222 ml d'eau). Ce réactif, placé dans une bouteille en verre inactinique, se conserve plusieurs mois à 4° C.

Milieu de dosage : dissoudre 2,5 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans environ 35 ml d'eau bidistillée. Ajouter 5 ml de réactif sulfomolybdique, puis ajuster à 50 ml dans une fiole jaugée. Ce milieu de dosage est à préparer le jour même. Solution étalon: 218,7 mg de KH_2PO_4 anhydre dans 250 ml de H_2O (200 mg/l de Pi). La gamme étalon est préparée avec 0 à 80 mg/l de Pi (0 à 20 μg de Pi dans le tube).

Pour le dosage du Pi, la courbe étalon et les échantillons subissent simultanément le traitement suivant :

Mélanger, dans l'ordre

- 0,25 ml d'échantillon,
- 0,50 ml de milieu de dosage,
- 1,25 ml d'eau bidistillée,
- Agiter .
- Laisser reposer 15 min à la température ambiante.
- Mesurer la D.O à 650 nm.

3.10 - Détermination des lipides

Le dosage des lipides a été réalisé par le système d'extraction SOXTEC System HT 1043-001 (note d'application de Tecator Application Laboratory). Ce système permet l'extraction totale des lipides du milieu solide.

Une portion de 2 g de l'échantillon séché 48 h à 60°C, est finement broyée. L'extraction des lipides est réalisée à l'éther de pétrole en deux étapes : pendant la première, l'échantillon est placé à l'intérieur d'une capsule qui contient de l'éther de pétrole, puis porté à ébullition pendant 15 min. Au cours de la deuxième étape, l'échantillon est retiré de la capsule et rincé pendant 45 min avec de l'éther de pétrole. Celui-ci est ensuite évaporé et la capsule contenant les lipides est mise à l'étuve jusqu'à évaporation complète. La teneur en lipides est calculée par différence de pesée après l'extraction ; elle est exprimée en g de lipides par 100 g de MS.

3.11- Méthodes physico-chimiques

3.11.1- Matière sèche

En fermentation solide, il est indispensable de suivre l'évolution de la matière sèche du milieu de culture. En effet, l'eau produite lors de la dégradation des substrats carbonés, de même que la perte de poids sec due à la respiration, ainsi que le transfert de l'eau par le flux d'air conduisent à des variations de l'humidité au cours de la fermentation. Cette mesure de l'humidité permet d'exprimer la quantité de métabolites produits par rapport au substrat carboné initial ou par rapport à la matière sèche initiale. Des bilans matières peuvent ainsi être réalisés.

Le poids sec est évalué par différence de pesée. Environ 6 à 8 g d'échantillon (matière fraîche) sont pesés à l'aide d'une balance de précision Sartorius R160D ; l'échantillon est mis à sécher pendant 24 h à 105°C (SATO et coll., 1983). Une fois sec et refroidi dans une atmosphère sèche (dessiccateur contenant du silicagel), il est à nouveau pesé sur la même balance.

La perte d'eau de l'échantillon ainsi calculée permet d'exprimer la matière sèche (quantité de solides pour 100 g d'échantillon frais), ou la teneur en eau (masse d'eau contenue dans 100 g de matière fraîche). Les résultats sont exprimés en pourcentage de matière sèche ou en pourcentage d'humidité.

3.11.2- Mesure du pH

La détermination du pH est effectuée directement sur la suspension obtenue avec l'échantillon de fermentation solide (Fig. 3.3). La mesure est réalisée à l'aide d'un pH-mètre digital Knick muni d'une électrode combinée Ingold. L'étalonnage de l'appareil est réalisé au moyen des solutions tampon (Schott-Geräte) de pH 4 et 7 à 25 °C.

3.12- Détermination des alcaloïdes de l'ergot du seigle

3.12.1- Extraction d'alcaloïdes

Principe. Les alcaloïdes sont extraits de la matière première par un solvant organique concentré par évaporation. Ils sont récupérés par de l'acide, puis la solution est ajustée à pH 9. Une seconde extraction est réalisée dans les mêmes conditions, par le chloroforme puis les alcaloïdes sont concentrés sous vide. Cette extraction est recommandée afin d'éviter des interférences dues au tryptophane, lors du dosage des alcaloïdes totaux. La récupération finale est réalisée dans un volume connu de solvant. La solution obtenue est dosée par HPLC. Les alcaloïdes, détectés à 254 nm, sont suffisamment séparés pour pouvoir réaliser une détermination quantitative.

Dans un premier temps, les alcaloïdes sont extraits par un mélange d'acide tartrique à 4 % et d'acétone (1:2), puis concentrés sous vide et récupérés avec du méthanol. Par la suite, des modifications ont été réalisées en vue d'améliorer l'extraction. Un schéma complet de la méthode est décrit dans la fig. 3.4.

Isolement des alcaloïdes totaux. Une quantité de produit fermenté d'environ 10 g (ou 1 à 2 g de mycélium sec), est introduite dans un flacon de 250 ml contenant 100 ml d'acétate d'éthyle et 10 ml d'acide tartrique à 4 %. Une agitation est réalisée pendant 12 heures, à température ambiante, pour assurer une bonne suspension du matériel solide. L'extrait est recueilli par filtration du marc sur une maille de 50 µm et une deuxième extraction est réalisée avec 100 ml d'acétate d'éthyle pendant 1/2 h.

Après filtration, les solutions organiques réunies sont concentrées à l'évaporateur rotatif sous 100 mm de Hg, à une température n'excédant pas 50° C, jusqu'à l'obtention d'un résidu huileux. Ce résidu est alors repris dans de l'acide et alcalinisé à pH 9 avec une solution d'hydroxyde d'ammonium à 20 %, puis extrait avec 3 x 30 ml de chloroforme. Les solutions organiques sont recueillies et évaporées sous vide. Les alcaloïdes sont repris par addition de 2 ml de méthanol. La solution ainsi obtenue est analysée par spectrophotométrie pour la détermination des alcaloïdes totaux et par HPLC pour l'analyse quantitative.

3.12.2- Dosage des alcaloïdes par spectrophotométrie

Une fraction aliquote de l'extrait cru d'alcaloïdes mesurée avec précision est quantifiée avec le réactif de van Urk selon la méthode proposée par BANKS et coll. (1974). Le p-diméthyl-aminobenzaldéhyde réagit avec les alcaloïdes de l'ergot du seigle pour donner un complexe bleu.

Le réactif a la composition suivante: p-diméthylaminobenzaldéhyde 125 mg ; Acide sulfurique conc. 65 ml ; Eau distillée 35 ml et FeCl₃ 5 mg. Deux ml de ce réactif sont mélangés à 1 ml de l'extrait d'alcaloïdes préalablement dilué. Il se développe une coloration bleue proportionnelle à la concentration en alcaloïdes. L'absorbance est lue à 580 nm. La teneur en alcaloïdes est calculée à partir d'une courbe standard d'ergonovine (0 - 10 µg/ml).

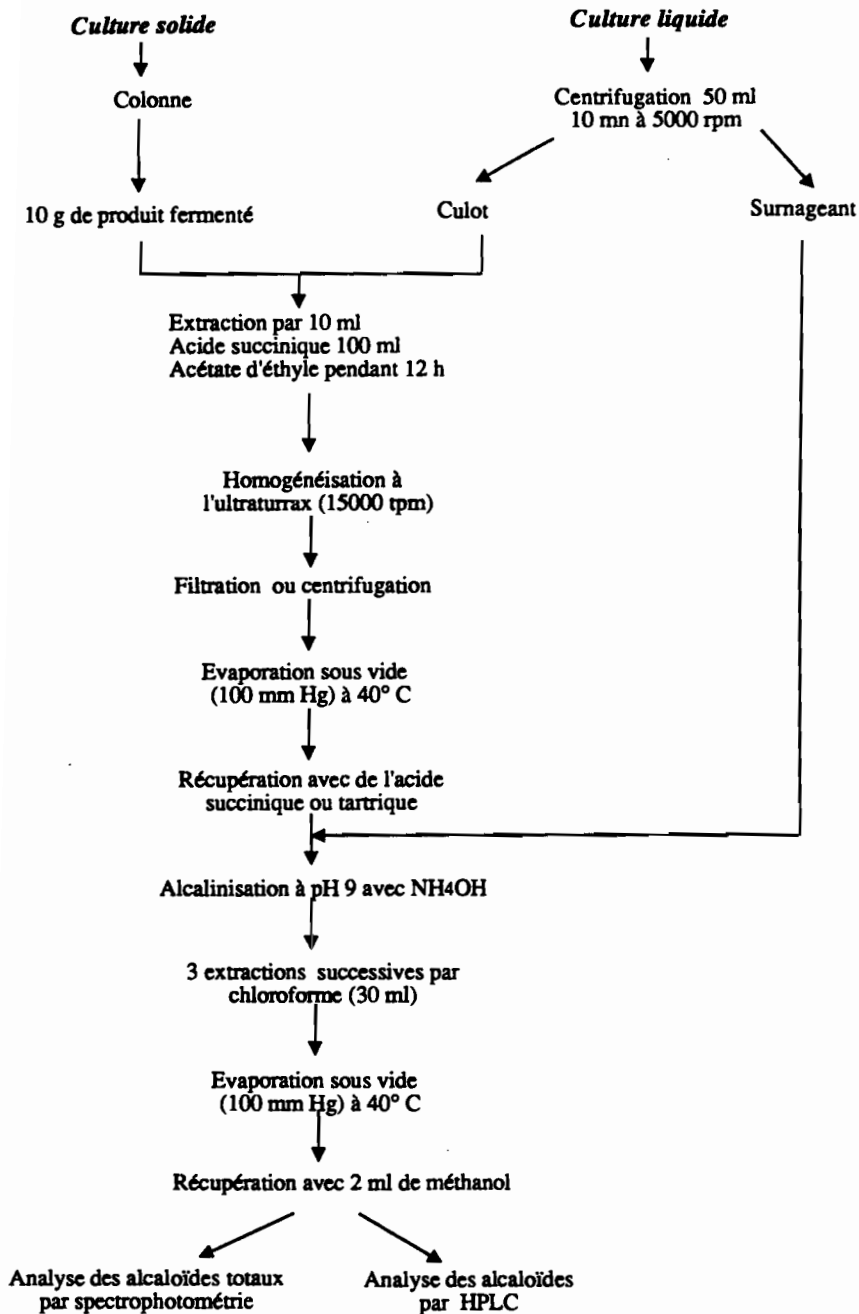


Fig. 3.4.- Schéma d'extraction des alcaloïdes de l'ergot du seigle

3.12.3- Dosage des alcaloïdes par HPLC

La phase organique obtenue lors de l'extraction des alcaloïdes (c.f. Fig. 3.4) est analysée par HPLC. Les composants sont analysés à l'aide d'un Chromatographe Phillips, modèle PU 4100 et d'un détecteur UV modèle PU4110. Une interface de commande permet de relier cet analyseur à un ordinateur, pour permettre l'exploitation des données. L'injection est réalisée avec un injecteur automatique Phillips. Le pompage du solvant est contrôlé par un système double de pompes pistons, au niveau duquel le mélange d'échantillon-phase mobile est réalisé sous haute pression.

Ce chromatographe est équipé d'un détecteur multicanaux à barrettes de diodes (PU4021), ce qui permet d'obtenir une série continue de spectres "instantanés" au même moment où l'échantillon phase mobile traverse la cellule du détecteur. Cet appareil peut fonctionner soit dans l'UV, soit dans le visible.

La colonne de Type RP C18 a un diamètre interne et une longueur de 4 x 125 mm ; elle est constituée d'un support Nucléosil 120 dont le diamètre des particules est de 5 µm (MACHEREY-NAGEL et Co., DÜREN, RFA). Une précolonne de type C18 est placée en avant de la colonne pour éliminer les impuretés des échantillons. Ce type de colonne a été utilisé pour la quantification des alcaloïdes par ERNI et coll. (1976), BETHKE et coll. (1976) et SZEPESY et coll. (1978), mais avec une taille de particule de 10 µm. Une solution, avec une concentration connue des différents alcaloïdes étalons, a été réalisée par dissolution dans le méthanol. La phase mobile est constituée par : 40% Acétonitrile + 60 % Solution de 200 mg/l de carbonate d'ammonium. Les conditions d'analyse par HPLC sont les suivantes (sauf spécification) :

Détection :	UV à 254 nm.
Débit :	800 µl/min.
Pression :	180-210 bar.
Volume d'injection :	20 µl.

Les solutions étalon utilisées sont : l'ergotamine, la dihydroergotamine, le lysergol, l'ergonovine et l'ergocryptine (SIGMA) et les solvants utilisés : Acétonitrile et méthanol (MERCK). Courbes étalon (Annexe A).

3.13-Analyse des gaz

Pour l'analyse des gaz au cours de la FMS, deux systèmes ont été mis au point dans le laboratoire : le premier est constitué d'un chromatographe en phase gazeuse (CPG) muni d'un détecteur à conductibilité thermique. Le deuxième est doté d'une détection infrarouge pour la mesure du CO₂ et d'un polarographe "Beckman" pour l'O₂. Avant ce travail, l'analyse des gaz se faisait de façon conventionnelle à l'aide d'enregistreurs analogiques. Actuellement, chaque système d'analyse est couplé à un ordinateur permettant de suivre l'évolution des gaz tout au long de la FMS (SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA et coll., 1992).

Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Le chromatographe utilisé IGC 11 de DELSI est un chromatographe à colonne concentrique, équipé d'un détecteur à catharomètre et d'un four permettant de régler de façon isothermique la température de la colonne et celle du détecteur ($\theta = 60^{\circ}\text{C}$). Il n'y a pas de régulation de température au niveau de l'injecteur. Cet appareil est utilisé en continu grâce à un injecteur automatique.

La colonne utilisée pour séparer les composants est une colonne concentrique de type "All-tech" CTR I. Sa partie extérieure est remplie d'un support assurant un tamis moléculaire de 5 Å, tandis que sa partie centrale est remplie de Porapak, polymère poreux ne retenant pas les gaz. Les conditions opératoires de la CPG sont les suivantes:

Détecteur :	Conductivité thermique
Température :	60°C isothermique
Phase mobile :	Hélium
Débit de l'éluant :	35 ml min ⁻¹
Tension du catharomètre :	160 mA
Pression de l'éluant :	1 bar
Volume injecté :	0,3 ml

Chaque gaz présente une conductibilité thermique différente ; il est donc nécessaire d'étalonner le détecteur avant de procéder à l'analyse des gaz à mesurer (CO₂, O₂, N₂). Pour cela, des mélanges étalons sont utilisés et des courbes de calibrations sont établies pour chaque gaz. La colonne permet de séparer les composés dont la liste est donnée dans le Tableau 3.3.

Tableau 3.3.- Liste des composants séparés par la colonne CTR I

Composants	Séparation	Temps de rétention (min)
Air	Colonne porapak	0,38
Méthane	Colonne porapak	-
Dioxyde de carbone	Colonne porapak	0,6
Oxygène	Colonne tamis moléculaire	1,5
Azote	Colonne tamis moléculaire	2,2
Méthane	Colonne tamis moléculaire	-
Monoxyde de carbone	Colonne tamis moléculaire	-

Après intégration et calcul des pourcentages des différents gaz dans l'échantillon, on trace les cinétiques de production de CO₂ ou de consommation d'O₂ rapportées aux débits d'air traversant les colonnes de fermentation.

3.14- Expression des résultats

3.14.1- Calcul de la quantité d'inoculum

Une suspension de conidies de *C. purpurea* est convenablement diluée (F) afin d'obtenir entre 25 et 50 conidies par unité de comptage d'une cellule de Malassez. Le comptage a été réalisé en calculant le nombre moyen (n) de conidies par unité de comptage, sur 20 unités.

Le nombre des conidies contenues par ml d'une suspension (N) est ensuite calculé en utilisant la formule suivante:

$$N = n \cdot F \cdot 10^5$$

N = nombre de conidies / ml de la suspension

n = nombre moyen de conidies par cellule

F = Facteur de dilution (inverse de la dilution)

* Facteur qui dépend de la hauteur de la cellule de Malassez

Nous avons exprimé les résultats de deux façons : d'abord le nombre de conidies par ml et ensuite le nombre total de conidies produites par g de substrat carboné initialement présent dans le milieu de culture.

3.14.2- Biomasse, substrats et produits

Les résultats expérimentaux sont exprimés par rapport à la matière sèche initiale (MSI). Il est donc nécessaire de tenir compte de la perte de poids sec due à la respiration des microorganismes ainsi qu'aux dilutions effectuées pendant les analyses. La technique utilisée pour développer les formules de calcul est basée sur l'analyse dimensionnelle. Par exemple, le calcul d'évaluation des alcaloïdes par spectrophotométrie ou par HPLC sera :

$$\frac{P \cdot D \cdot 100 \cdot (1 - \% \text{ Perte} / 100)}{\% \text{ MS}} = P \text{ en mg / g MSI}$$

où P est la quantité d'alcaloïdes (mg/ml) estimée à partir de la suspension libre de bagasse (Fig 3.3) ; D est l'inverse de la dilution effectuée sur l'échantillon de la fermentation (ml/g de matière fraîche) ; le % de MS est la teneur en matière sèche exprimée en pourcentage ; le % de Perte est le pourcentage de poids sec perdu au cours de la FMS jusqu'au moment du prélèvement ($100 \cdot (g \text{ MSI} - g \text{ MS}) / g \text{ MSI}$).

Cette relation est également valable pour le dosage des sucres, du phosphate inorganique et des autres produits de la fermentation tels que les lipides, la biomasse, etc...

3.14.3- Calculs des rendements des fermentations

Les rendements sont calculés en tenant compte de l'augmentation de la biomasse, de la quantité de substrat consommé et des produits formés :

$Y_{x/s}$: g de biomasse produite par g de substrat consommé

$Y_{p/s}$: g de produit formé par g de substrat consommé

3.14.4 - Mesure des gaz.

Les résultats de la respirométrie (mesures de l'O₂ et du CO₂) ont toujours été exprimés par rapport à la matière sèche initiale. Les analyses permettent de mesurer directement la vitesse instantanée (dérivée) de l'évolution des gaz ou de déterminer leur production globale (intégrale).

La mesure directe de la vitesse instantanée (dérivée) de la production ou de la consommation des gaz est réalisée par l'échantillonnage d'un courant d'air provenant de la fermentation. Les résultats sont exprimés par rapport à la matière sèche initiale selon l'équation suivante :

$$\frac{(\text{CO}_2 \text{ ou O}_2) * \text{Débit} * 60}{\text{Poids initial} * \% \text{ MSI}} = \text{ml de gaz/h gMSI}$$

où CO₂ et O₂ sont les teneurs des gaz dans l'air, exprimées en pourcentage (p.e. CO₂ ≈ 0 % et O₂ ≈ 21 % au début de la fermentation), le débit de l'air est exprimé en ml/min, le poids du contenu de la colonne est exprimé en gramme et la teneur en matière sèche initiale est exprimée en pourcentage (% MSI).

L'accumulation ou la consommation totale des gaz peut être calculée en intégrant les données de la vitesse par la règle du trapèze selon la relation suivante :

$$\Delta t * C_i + (C_{i+1} - C_i) * \Delta t * 0,5$$

où Δt est l'intervalle de temps entre deux analyses, i et $i+1$, C_i est la valeur de la concentration du gaz au début de l'intervalle de temps, et C_{i+1} est la valeur du gaz à la fin du même intervalle.

Par ailleurs, le quotient respiratoire est donné par la relation :

$$QR = \frac{\text{Quantité de CO}_2 \text{ produit}}{\text{Quantité d'O}_2 \text{ consommé}}$$

3.15 Planification statistique

Des matrices d'HADAMARD, plans factoriels à 2 niveaux, et un plan centré composé permettant de considérer simultanément l'action de plusieurs facteurs expérimentaux ont été utilisés pour l'étude de l'influence des facteurs nutritionnels et environnementaux sur la biosynthèse d'alcaloïdes et la croissance (BOX et WILSON, 1951 ; HIMMELBLAU ; 1961).

Dans une matrice d'HADAMARD et dans un plan factoriel à 2 niveaux, l'ensemble des combinaisons des différentes variables contrôlées (x_i) considérées aux niveaux codés -1 et +1 est étudiée. Pour plus de 5 facteurs contrôlés seule une fraction sélectionnée est examinée (plan factoriel fractionné). Pour les facteurs quantitatifs continus (facteurs nutritionnels et environnementaux), la relation peut être exprimée par un modèle linéaire de 1^{er} ordre :

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + e \quad \text{équation dans laquelle}$$

Y = réponse

x_i = variable expérimentale

b_0 = terme constant (moyenne)

b_i = coefficients des termes linéaires simples

e = erreur expérimentale

Dans un plan centré composé, les facteurs quantitatifs continus sont considérés à 5 niveaux et les résultats peuvent se décrire par un modèle quadratique. Le plan centré composé dérive du plan factoriel à 2 niveaux et se compose de 3 parties :

* un plan factoriel $2k$ ou $2k-1$ (niveaux codés -1 +1)

* $2k$ points axiaux (niveaux codés $-\alpha$, $+\alpha$)

* un point central (niveau codé 0)

La valeur du niveau α pour le plan centré composé rotatif vaut : $\alpha = 2 \frac{\sqrt{k-p}}{4}$

expression dans laquelle k est le nombre de facteurs expérimentaux et p le degré de fractionnement du plan factoriel de base. La répétition du point central permet d'estimer l'erreur expérimentale et d'obtenir une orthogonalité satisfaisante dans l'estimation des coefficients. Un plan centré composé permet d'établir par la méthode des moindres carrés un modèle quadratique.

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j + e \quad \text{équation dans laquelle}$$

Y = réponse

x_i = variable expérimentale

b_0 = terme constant (moyenne)

b_i = coefficients des termes linéaires simples

b_{ii} = coefficients des termes quadratiques

b_{ij} = coefficients des termes d'interaction de 1^{er} ordre

e = erreur expérimentale

Grâce à ce modèle, l'extremum du système et les effets des divers facteurs expérimentaux étudiés peuvent être déterminés (dérivés des différents x_i par rapport à Y).

3.16 Détermination du profil enzymatique (API ZYM)

L'établissement des profils enzymatiques met en œuvre des tests rapides. Celui-ci est réalisé avec le système API-ZYM (API systems) qui permet le criblage de 19 enzymes par hydrolyse du substrat et libération d'un groupement chromogène (1-naphtol ou naphtyamide). Le profil enzymatique (19 tests) est établi sur des fragments mycéliens d'une préculture et de la culture de différents espèces de *Claviceps*.

Obtention des fragments mycéliens

10^5 spores ou de mycélium (10 morceaux 1 cm d'une culture gélosée) sont introduites en milieu liquide et cultivés en fioles agitées (150 tours /min) pendant 7 jours (préculture) et 20 jours (culture). Le mycélium est récupéré, centrifugé 3 fois (5000 g, 10 min) avec une solution d'eau physiologique stérile contenant du tween 80 (10 ppm). Puis le mycélium est broyé (ultra-Turrax 10 000, 1 mn). L'inoculation a été réalisé à raison de 100 μ l par cupule et incubés pendant 8 heures. La révélation de la réaction colorée est effectuée selon les instructions du fabricant. Les résultats sont notés de manière semi-quantitative selon une échelle fournie pour les galeries API-ZYM.

RESULTATS ET DISCUSSION

4. PHYSIOLOGIE DE LA CROISSANCE DE *CLAVICEPS* EN FS_m

Introduction

Cette étude a été entreprise pour décrire la physiologie de croissance des espèces principales du genre *Claviceps*. L'objectif principal a été de sélectionner les meilleures souches capables de produire des alcaloïdes dans l'optique d'une application en fermentation solide.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'étude du développement des microorganismes en culture de surface. Deux aspects ont été plus particulièrement développés : la vitesse de croissance apicale et la description morphologique des souches.

Nous avons ensuite étudié l'effet de plusieurs facteurs sur la croissance et la production d'alcaloïdes par *Claviceps*, étant donné que la source de carbone, la source d'azote, ainsi que le rapport C/N sont parmi les principaux paramètres qui influencent fortement la biosynthèse de biomasse et de métabolites chez les champignons filamenteux (ROUSSOS, 1985). Enfin ce chapitre a été complété par une étude biochimique, basée sur la technique des galeries API-ZYM.

La conidiogénèse est une étape physiologique très importante chez les champignons filamenteux. A cet effet, l'étude de la sporulation de *C. purpurea* cultivé sur milieu gélosé a été réalisée sur des milieux de culture semi-synthétiques ou naturels. Les différentes formes de reproduction asexuée ainsi que les cinétiques de production de conidiophores de *Claviceps* ont été obtenues.

Enfin, une étude cinétique en milieu submergé a été réalisée pour étudier le comportement des souches sélectionnées. L'ensemble de ces études a permis de mieux cerner les caractéristiques et les paramètres de croissance des principales espèces de *Claviceps*, et plus particulièrement chez deux espèces productrices d'alcaloïdes : *C. purpurea* et *C. fusiformis*.

4.1- Sélection de souches performantes

Parmi les différentes espèces du genre *Claviceps* productrices d'alcaloïdes de l'ergot (*C. purpurea*, *C. microcephala*, *C. paspali* et *C. fusiformis*), les espèces de *C. purpurea* et *C. fusiformis* sont les plus fréquemment utilisées (REHACEK et SAJDL, 1990). Les souches que nous avons utilisées tout au long de cette étude, proviennent de différentes collections (c.f. Tableau 3.1). La plupart de ces souches ont été isolées et sélectionnées pour la culture submergée.

L'objectif de cette étude a été de sélectionner parmi les souches de collection, celles qui sont capables de produire des alcaloïdes et peuvent être utilisées dans les procédés de fermentation en milieu solide. Nous avons donc étudié les caractéristiques morphologiques de ces champignons filamenteux, la croissance apicale en culture de surface, la physiologie en milieu liquide, et l'effet des différents facteurs nutritionnels sur la production d'alcaloïdes. L'ensemble de ces études nous ont permis de caractériser les souches et de choisir les plus performantes pour la production d'alcaloïdes.

4.1.1- Croissance apicale sur milieux gélés

La croissance apicale a été définie comme étant l'aptitude d'un microorganisme à coloniser une surface solide (ROUSSOS, 1985). Le premier milieu utilisé est un milieu synthétique, M1 (SANGIER, 1977) et les trois autres sont des milieux "naturels" qui ne nécessitent pas d'apport complémentaire d'éléments minéraux (c.f. 3.2.4). Dans le milieu M1, le saccharose et l'acide succinique constituent les sources de carbone et d'énergie ; la source d'azote est fournie par l'ammonium.

Dans les Fig. 4.1 à 4.6, nous avons représenté la vitesse d'élongation apicale (exprimée en mm/h) pour chacune des souches cultivées sur les quatre milieux de culture. La croissance apicale varie selon le milieu de culture et la souche utilisée. Ainsi, la croissance apicale la plus faible a été observée pour *C. fusiformis* (HA) avec 0,02 mm/h pour le milieu M1 et 0,05 mm/h pour les trois autres milieux de culture. Au contraire, *C. purpurea* présente une croissance apicale beaucoup plus élevée de l'ordre de 0,11 mm/h.

Les vitesses d'élongation apicale sont corrélées à la morphologie du mycélium. Ainsi lorsque celui-ci présente des filaments courts, peu ramifiés et très vacuolisés, la croissance apicale est faible (*C. fusiformis*). En revanche, *C. purpurea* avec une croissance apicale moyenne de 0,13 mm/h, présente un mycélium plus allongé, mince et peu vacuolisé. Le Tableau 4.1 montre l'évolution des valeurs moyennes de la croissance apicale des différentes souches étudiées.

Tableau 4.1.- Croissance apicale de différentes souches de *Claviceps* sur milieux gélés cultivées pendant 240 h à 26°C.-

Souche	M1 (mm/h)	M2 (mm/h)	M3 (mm/h)	M4 (mm/h)
<i>Claviceps microcephala</i>	0,06	0,08	0,04	0,07
<i>C. purpurea</i>	0,11	0,11	0,12	0,10
<i>C. paspali</i>	0,09	0,09	0,13	0,09
<i>C. fusiformis</i> HA*	0,02	0,05	0,06	0,06
<i>C. fusiformis</i> (ICRISAT)*	0,08	0,09	0,10	0,06
<i>C. fusiformis</i> (LDH)*	0,05	0,08	0,09	0,10

* (c.f § 3.1)

Il est à noter que la croissance apicale des souches ne présente pas de différences significatives liées à la composition des milieux de culture. Au contraire, cette vitesse est variable selon les souches (Tableaux 4.2 et 4.3). Cette caractéristique morphologique ainsi que la description des conidies nous permettront par la suite de différencier ces souches entre elles.

En général, on observe que la moyenne des vitesses est variable pour l'ensemble des souches de *Claviceps* ; elle est environ dix fois plus faible que celle observée pour des souches de *Trichoderma* (1 mm/h) et d'autres champignons filamenteux (ROUSSOS, 1985).

4.1.2- Description morphologique des souches de *Claviceps*

La croissance apicale des différentes souches sur milieu gélosé à base d'extrait de malt 70 g/l (milieu M2) est reportée dans le Tableau 4.2. Les colonies sont blanches et le mycélium formé est dense et d'un aspect cotonneux. Il est très ramifié et cloisonné. Souvent, il y a production d'un pigment corrélée avec l'apparition des conidies. Les colonies sont légèrement convexes ; on peut observer sur les photos 4.1 et 4.2, une partie cratériforme d'environ 1 cm de diamètre avec des plissements radiaux. Les conidies sont hyalines, ellipsoïdales, à paroi mince et lisse ; elles se forment sur des conidiophores apparaissant tout le long des hyphes.

Les principales caractéristiques des souches cultivées sur milieu M2 sont résumées dans les Tableaux 4.2 et 4.3 et sur la figure 4.7. On observe que *C. purpurea*, *C. fusiformis* (HA) et *C. fusiformis* (ICRISAT) sont des souches intéressantes pour la production d'alcaloïdes. Des études physiologiques approfondies en milieu liquide nous ont permis de mieux cerner leurs caractéristiques et d'affiner encore plus notre sélection.

4.1.3- Screening en milieu liquide

Pour la sélection de souches de *Claviceps* productrices d'alcaloïdes, toutes les souches de notre collection ont été cultivées en milieu liquide. Les conditions opératoires choisies sont celles rapportées dans la littérature (c.f. 3.2.4). On a pu observer des différences significatives concernant leur capacité à synthétiser des alcaloïdes et la production de biomasse. Ces expériences nous ont permis de décrire et de classer les souches de *Claviceps* selon leur capacité à produire des alcaloïdes (Tableau 4.4). Dans ces conditions de culture, on observe que la souche de *C. fusiformis* (HA) produit la plus forte quantité d'alcaloïdes. Pour l'ensemble de nos souches, on note une croissance mycélienne importante en milieu liquide ; cette production élevée de biomasse est associée à une consommation de saccharose de plus de 50 % pour la plupart des souches.

Tableau 4.2.- Principales caractéristiques des souches de *Claviceps* cultivées sur d'extrait de malt à 26° C pendant 240 h.

Souche	Croissance apicale (mm/h)	Type de mycélium	Pigmentation	Conidiogénèse	Production d'alcaloïdes
<i>C. microcephala</i>	0,04	filamenteux	jaune	oui	+
<i>C. purpurea</i>	0,12	filamenteux	violette	oui	++++
<i>C. paspali</i>	0,13	filamenteux	aucune	oui	+
<i>C. fusiformis</i> (HA)	0,06	sclérotial	marron (+++)	non	++++++
<i>C. fusiformis</i> (ICRISAT)	0,10	filamenteux	marron (+)	oui	++
<i>C. fusiformis</i> (LDH)	0,09	filamenteux	aucune	oui	+

+ = minimum +++++ = maximum

Tableau 4.3.- Caractéristiques des conidies de souches de *Claviceps* cultivées sur milieu M2 à 26°

Souche	Caractéristiques des conidies		
	taille	forme	observations
<i>C. microcephala</i>	2-4 x 10-20 µm	allongée	1 ou 2 noyaux
<i>C. purpurea</i>	2,5 x 4 µm	ovale	1 noyau
<i>C. paspali</i>	2-4 x 10-25 µm	allongée	1 ou 2 noyaux
<i>C. fusiformis</i> (HA)	Chlamydospores-2,5 x 10,5 µm	allongée	granulations lipidiques
<i>C. fusiformis</i> (ICRISAT)	2 x 10 µm	allongée	1 ou 2 noyaux
<i>C. fusiformis</i> (LDH)	2 x 10 µm	allongée	1 ou 2 noyaux



Photo 4.1.- *Claviceps purpurea* cultivé sur milieu gélosé pendant 15 jours (x 400).



Photo 4.2.- *Claviceps fusiformis* cultivé sur milieu gélosé pendant 15 jours (x 400).

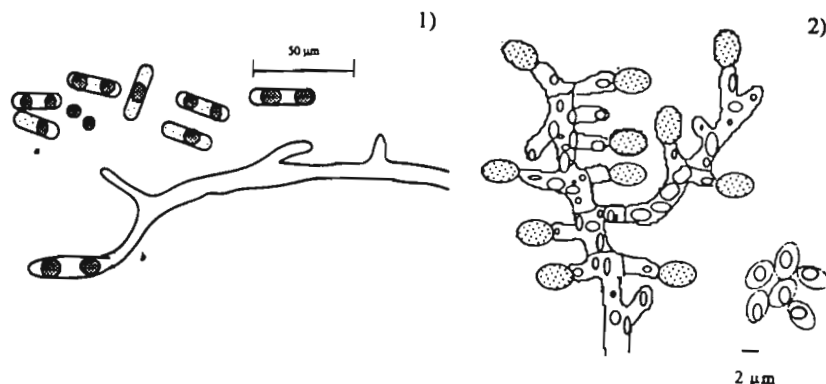


Fig. 4.7.- Aspects morphologiques de différentes souches de *Claviceps*. 1) *C. paspali*, *C. microcephala*, *C. fusiformis* (ICRISAT et LDH) : Conidies et germination de conidies ; 2) *C. purpurea* : Conidies et conidiophores.

Tableau 4.4.- Screening des souches de *Claviceps* cultivées en milieu liquide pendant 14 jours.

Souche	Alcaloïdes mg/l	Biomasse g/l	Sucres résiduels g/l	pH
<i>Claviceps fusiformis</i> (HA)	181,2	8,9	95	4,4
<i>C. purpurea</i>	125,4	13,61	88	3,1
<i>C. fusiformis</i> (ICRISAT)	40,1	5,59	110	4,3
<i>C. paspali</i>	20,9	6,45	108	6,1
<i>C. microcephala</i>	10,7	7,16	96	3,2
<i>C. fusiformis</i> (LDH)	5,8	9,45	74	4,5

Saccharose initial : 200 g/l ; à 26°C

On remarque qu'il n'existe pas de rapport entre la quantité de biomasse produite et la teneur en alcaloïdes relevée. Nous avons donc sélectionné trois souches intéressantes : *C. fusiformis* (HA), *C. purpurea* et *C. fusiformis* (ICRISAT). Des études physiologiques ont été ensuite réalisées avec ces souches pour déterminer les conditions optimales de culture pour la production d'alcaloïdes.

Parallèlement à ces études, nous avons réalisé une caractérisation biochimique rapide d'enzymes présentes dans la préculture et dans la culture des souches de *Claviceps*. Nous avons pour cela utilisé des galeries API-Enzyme ; le profil enzymatique est variable selon les souches étudiées (c.f. annexe A). Ceci nous a semblé important pour la caractérisation enzymatique des souches de *Claviceps*. Toutefois, la réalisation de l'ensemble des tests n'a pas permis d'isoler un certain nombre de caractères discriminants pour différencier les espèces de *Claviceps*.

Les résultats de ce test nous ont montré la présence de différentes activités enzymatiques. On a pu retrouver dans toutes les souches des activités enzymatiques concernant les phosphatases, β -glucosidase et la N-Acétyle- β -glucosaminidase dans le surnageant et le culot. Par contre, la présence de l'activité α -glucosidase a été uniquement constatée chez *C. purpurea*, *C. paspali* et *C. fusiformis*. L'activité de la leucine arylamidase a été retrouvée dans presque toutes les espèces à l'exception de *C. fusiformis*. Les activités α et β -galactosidase ont été présentes dans les espèces de *C. purpurea* et *C. paspali*. Enfin, la présence de l'activité valine arylamidase a été constatée seulement chez *C. purpurea*, *C. microcephala* et *C. fusiformis* ICRISAT.

Des études plus approfondies nous permettront de mieux cerner les différentes activités enzymatiques dans l'optique d'une identification des espèces par leur profil enzymatique.

4.3- Définition des facteurs essentiels pour la croissance de *Claviceps*

4.3.1- Effet de la source d'azote

La source d'azote joue un rôle fondamental dans la croissance et la biosynthèse des alcaloïdes au cours de la culture de *Claviceps*. L'azote doit être introduit dans le milieu de culture sous forme de composés pouvant aussi bien favoriser le développement du champignon que la synthèse d'alcaloïdes (REHACEK et coll., 1977).

Dans ce but, différentes sources d'azote ont été étudiées afin de déterminer la plus adaptée pour chacune des souches sélectionnées. Cinq sources d'azote ont été choisies : deux acides aminés (glutamine et asparagine) et trois sels d'ammonium (Acide succinique + ammonium ; oxalate d'ammonium + urée et sulfate d'ammonium+urée). Ces sources ont déjà été utilisées par d'autres auteurs lors de la culture de différentes souches de *Claviceps* (DESAI et coll., 1986a). Les souches ont été cultivées à 26°C pendant 7 jours en milieu liquide (c.f. 3.3.1) avec une concentration en azote de 2,5 g/l, et 200 g/l de saccharose comme source de carbone. Les résultats sont rapportés dans le Tableau 4.5 et la Fig. 4.8.

Le changement de la nature de la source d'azote modifie la morphologie et le taux de production des alcaloïdes pour chaque souche. En effet, on a observé qu'une production importante d'alcaloïdes était accompagnée d'une différenciation cellulaire évidente au niveau des hyphes, avec la libération d'un pigment violet dans le milieu de culture (Tableau 4.5). Ainsi, pour *C. purpurea*, la meilleure source d'azote qui favorise la biosynthèse des alcaloïdes est un mélange de sulfate d'ammonium et d'urée. Dans ces conditions, la production d'alcaloïdes est proche de 200 mg/l.

Tableau 4.5.- Effet de la source d'azote sur la production d'alcaloïdes, la croissance et la morphologie de trois souches de *Claviceps*.

Microorganisme	<i>Claviceps purpurea</i>				<i>Claviceps fusiformis</i> (HA)				<i>Claviceps fusiformis</i> (ICRISAT)			
	Biomasse		Alcaloïdes		Observations		Observations		Biomasse		Alcaloïdes	
	g/l	mg/l	Morphologie	Pigmentation	g/l	mg/l	Morphologie	Pigmentation	g/l	mg/l	Morphologie	Pigmentation
Succinate d'ammonium	22,13	75,1	myc. vacuolé	violette	24,4	85,8	C- Scler	marron/violette	25,3	56,2	myc. vacuolé très visqueux	violette
Oxalate d'ammonium + urée	24,23	118,7	myc. vacuolé C-Sclér.	violette	28,5	190,2	C- Scler	marron/violette	22,9	-	myc. lâche	aucune
Sulfate d'ammonium + urée	21,23	176,9	myc. vacuolé C-Sclér.	violette	29,8	256,6	C- Scler	marron/violette	21,35	50,5	myc. lâche	aucune
Glutamate	22,06	40,3	myc. vacuolé C-Sclér.	gris	29,6	210,2	C- Scler	marron/violette	25,18	59,6	myc. vacuolé très visqueux	violette
Asparagine	25,2	16,7	myc. vacuolé	aucune	28,42	95,3	myc. vacuolé C-Scler.	marron	25,3	48,6	myc. vacuolé très visqueux	violette

Source N : 2,5 g/l ; C.Sclér : cellules sclérotiales ; myc. : mycélium

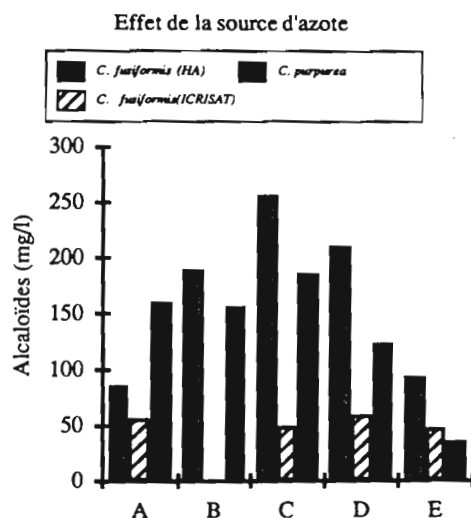


Fig. 4.8.- Effet de la source d'azote sur la production d'alcaloïdes : A. Succinate d'ammonium ; B. Oxalate d'ammonium+urée ; C. Sulfate d'ammonium+urée ; D. Glutamate et E. Asparagine.

On remarque pour chaque souche une succession de deux types de mycélium : l'un filamenteux, cloisonné et très vacuolé avec formation de conidiophores ; l'autre, constitué d'hyphes courts, cloisonnés, à parois épaisses, présentant une grande quantité de granulations dans le cytoplasme et formant des agrégats (Cellules Sclérotiales). On observe également la production d'un pigment violet. Ce pigment accompagne généralement l'apparition des alcaloïdes.

Dans le cas particulier de *C. fusiformis* (HA), le sulfate d'ammonium favorise la synthèse d'alcaloïdes (250 mg/l), de même que l'oxalate d'ammonium et le glutamate avec des teneurs en alcaloïdes proches de 180 mg/l. On constate également que la différenciation polymorphique des hyphes est plus marquée pour *C. fusiformis* que pour *C. purpurea*. Les hyphes s'agrègent entre eux, formant une structure semblable à celle observée dans les sclérotés (Fig. 4.7 et photo 4.3 et 4.4). Il faut signaler que cette souche ne produit pas de conidies. Néanmoins, lors de son développement, on relève la présence de cellules ovoïdes qui se forment à partir du mycélium, les chlamydospores (MANTLE et TONOLO, 1968 ; VORISEK et coll., 1974). On observe également la formation d'un pigment dans les milieux de culture. La couleur varie selon la souche et la nature de la source d'azote.



Photo 4.3.- Coupe transversale dans un sclérote de *Claviceps microcephala* (x 400).
Tissu sclérotial

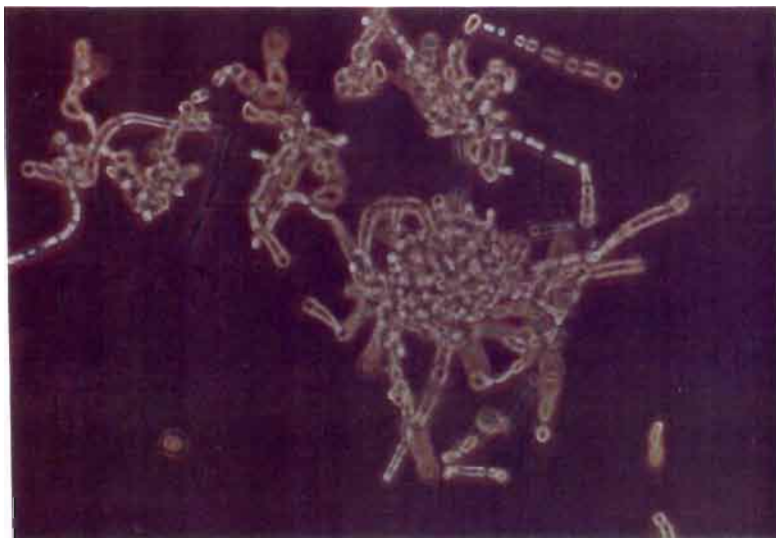


Photo 4.4.- *Claviceps fusiformis* cultivé sur milieu submergé pendant 7 jours (x 400).
Tissu type sclérotial

Contrairement aux deux précédentes souches, *C. fusiformis* (ICRISAT) est une souche sauvage qui a été isolée de grains de millet en Inde. Elle produit une faible quantité d'alcaloïdes et de biomasse. En revanche, une viscosité élevée du milieu de culture a été observée à partir du troisième jour d'incubation, provoquée par la formation de glucanes (REHACEK et SAJDL, 1990). Toutefois, la formation de polysaccharides a été corrélée avec la formation d'alcaloïdes (VORISEK et coll., 1974) et une faible pigmentation dans les milieux de culture contenant du succinate d'ammonium, du glutamate et de l'asparagine. Il apparaît que la biosynthèse de glucanes est inversement proportionnelle à la production d'alcaloïdes (TABER, 1967). Chez cette souche, le sulfate et l'oxalate d'ammonium favorisent la formation d'un mycélium lâche et filamenteux mais facilitent la production d'alcaloïdes qui reste faible.

On peut en conclure que les meilleures sources d'azote pour la production d'alcaloïdes sont les sels d'ammonium. Cette source d'azote est facilement assimilable et contribue à maintenir les valeurs du pH proches des conditions optimales de formation des alcaloïdes (pH : 4,8 à 6,5), Tandis que l'asparagine a montré un effet négatif pour les trois souches. Par ailleurs, l'asparagine favorise la conidiogénèse de *C. fusiformis* Lod. (SHARMA et coll., 1984) et permet l'obtention de rendements élevés en alcaloïdes de type clavine (1300 mg/l) chez *C. fusiformis* SD-58 (DESAI et coll., 1986a).

4.3.2- Influence de la source de carbone

Nous avons étudié en milieu liquide l'effet de cinq sources de carbone suivantes : saccharose, sorbitol, mannitol, glycérol+ glucose et amidon soluble. La concentration initiale du substrat carboné a été fixée à 200 g/l, avec un rapport C/N égal à 32. Dans le cas du milieu mixte glycérol et glucose, les concentrations utilisées ont été respectivement de 30 % et 70 %. Tous les milieux de culture ont été préparés avec la solution minérale décrite précédemment (c.f. 3.2.5).

Il est important de remarquer que l'utilisation d'une source de carbone dépend exclusivement de la souche utilisée. On peut observer que le mannitol, le sorbitol et le saccharose favorisent la biosynthèse d'alcaloïdes (Fig. 4.9 et Tableau 4.6). Par contre, dans le milieu où le glucose et le glycérol sont les sources carbonées, seule une faible production a été observée. Pour *C. purpurea*, on remarque une production significative d'alcaloïdes sur saccharose d'environ 190 mg/l et une faible production sur amidon. Pour le sorbitol et le mannitol, on enregistre une production similaire proche de 150 mg/l. Elle s'accompagne de la formation de mycélium de type sclérotial (agrégats d'hyphes courts) et par la pigmentation du milieu de culture. Toutefois, la présence de mycélium non différencié et la formation de conidiophores ont été observées dans la même culture.

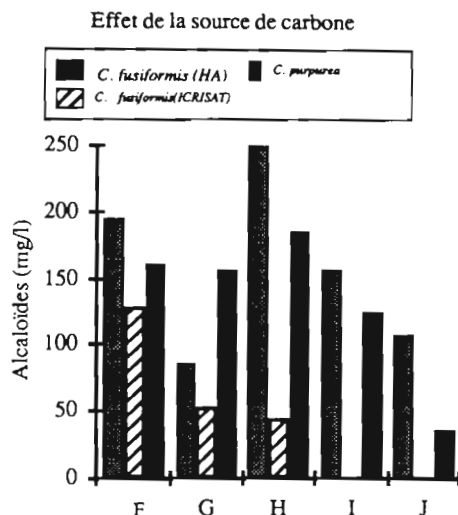


Fig. 4.9 .- Effet de la source de carbone sur la production d'alkaloïdes : F. Sorbitol ; G. Mannitol ; H. Saccharose. I. Glycérol+glucose ; J. Amidon soluble.

Une différenciation plus intense a été observée au cours de la culture de *C. fusiformis* (HA), sur saccharose. Des agrégats d'hyphes (mycélium de type sclérotial) et une forte pigmentation ont été également notés. Néanmoins, on constate différents comportements suivant la source de carbone utilisée. Un mycélium peu différencié a été observé sur sorbitol, amidon et glucose+glycérol. Une production maximale d'alkaloïdes d'environ 250 mg/l a été obtenue sur saccharose. Le sorbitol et le glycérol+glucose favorisent également la production d'alkaloïdes avec des teneurs proches de 200 mg/l. Tous ces résultats ont servi de base pour la suite de cette étude physiologique de *C. fusiformis* et *C. purpurea*. Ainsi, on a par la suite utilisé le saccharose comme source de carbone et un mélange de sulfate d'ammonium et d'urée comme source d'azote.

4.3.3- Effet du rapport C/N

Pour cette étude, les concentrations en saccharose et en urée ont été respectivement fixées à 200 g/l et 1,7 g/l (§ 3.2.5). Seule la concentration en sulfate d'ammonium a varié : 3,67, 6,83 et 9,60 g/l. Les valeurs d'azote total utilisées correspondent à 1,3, 2,0 et 2,5. Les rapports C/N sont alors de 60, 40 et 32 (Fig. 4.10A et 4.10B). Nous avons fait varier la concentration en azote tout en maintenant constante la concentration en sucres. Différents auteurs ont remarqué qu'une concentration limitante d'azote était nécessaire pour induire la synthèse d'alkaloïdes et favoriser l'accumulation de substances de réserve, et par voie de conséquence, des changements morphologiques au cours de la culture (DESAI et REHACEK, 1982).

Tableau 4.6.- Effet de la source de carbone sur la production d'alcaloïdes, la croissance et la morphologie de trois souches de *Claviceps*.

Microorganisme	<i>Claviceps purpurea</i>				<i>Claviceps fusiformis</i> (HA)				<i>Claviceps fusiformis</i> (ICRISAT)			
Source de carbone	Biomasse	Alcaloïdes	Observations		Biomasse	Alcaloïdes	Observations		Biomasse	Alcaloïdes	Observations	
	g/l	mg/l	Morphologie	Pigmentation	g/l	mg/l	Morphologie	Pigmentation	g/l	mg/l	Morphologie	Pigmentation
Sorbitol	20,1	160,5	myc. vacuolé	violette	22,3	195,2	myc. vacuolé	aucune	25,6	129,2	myc. vacuolé C-Sclér.	marron/violette
Mannitol	29,93	156,69	myc. vacuolé C-Sclér.	violette	29,2	186,9	C-Sclér.	marron/vio- lette	24,55	53,6	myc. vacuolé C-Sclér.	violette
Saccharose	23,71	198,2	myc. vacuolé C-Sclér.	violette	26,9	249,3	C- Sclér	marron/vio- lette	23,9	44,7	myc. vacuolé très visqueux	violette
Glyceraldéhyde + Glucose	25,28	35,6	myc. vacuolé	gris	12,7	86,7	myc. vacuolé C-Sclér.	marron	21,6	-	mycélium lâche ; conidies	aucune
Amidon	26,16	124,56	myc. vacuolé C-Sclér.	violette	25,6	107,6	myc. vacuolé C-Sclér.	marron	20,8	-	mycélium lâche ; conidies	aucune

Source C. 200 g/l ; C.Sclér : cellules sclérotiales ; myc. : mycélium

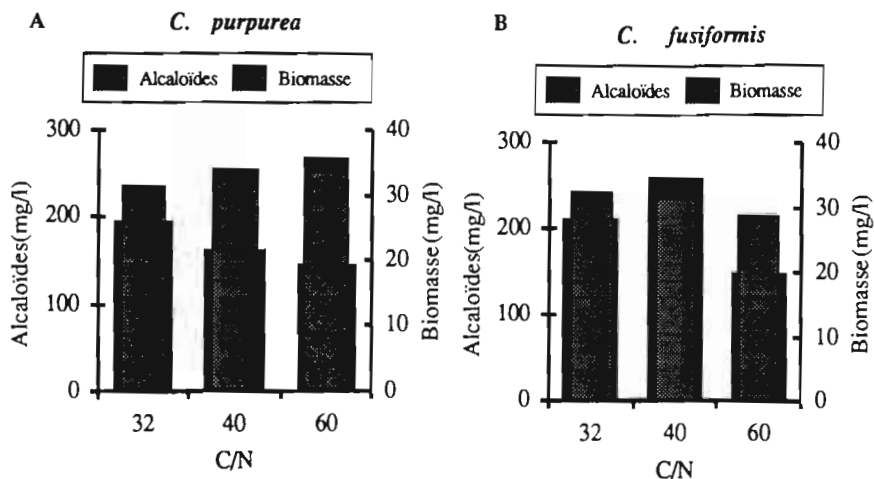


Fig. 4.10. - Effet du rapport C/N sur la croissance et la biosynthèse d'alcaloïdes lors de la culture de *C. purpurea* et de *C. fusiformis* en milieu liquide pendant 14 jours à 26°C. Rapport C/N : 32 ; 40 et 60. A : *C. purpurea* et B : *C. fusiformis*.

Selon les résultats obtenus (Fig. 4.10), on observe une diminution de la production d'alcaloïdes liée à l'accroissement du rapport C/N pour *C. purpurea*. Un effet contraire a été observé dans le cas de la biomasse. Celle-ci augmente parallèlement au rapport C/N. Il en est de même pour la biomasse de *C. fusiformis*. Un rapport C/N de 40 s'est montré le plus avantageux, avec un rendement proche de 7,7 mg/g de biomasse PS, pour la production d'alcaloïdes par *C. fusiformis*. En conditions limitantes d'azote, on a observé dans la plupart des cas, un grossissement du mycélium lié à une accumulation de réserves telles que lipides (SERRANO et coll., 1992), carbohydrates et autres métabolites secondaires, entraînant une augmentation de la biomasse estimée par le poids sec. Ce phénomène avait déjà été décrit dans la littérature pour différentes souches de *Claviceps* (MANTLE et TONOLO, 1968 ; REHACEK et KOZOVA, 1975 ; MANTLE et NISBET, 1976 ; DESAI et REHACEK, 1982).

Dans le cadre de ce travail, il nous a paru indispensable de réaliser une étude préliminaire sur la production d'inoculum pour les deux souches de *C. purpurea* et *C. fusiformis*. Pour cela, la méthode d'obtention d'inoculum en culture de surface a été utilisée.

4.4- Obtention de l'inoculum

Lorsque l'on veut disposer d'un inoculum suffisant pour un ensemencement massif du substrat solide en FMS, deux approches sont envisageables : la production de spores en concentration élevée, la production de mycélium en préculture.

En raison des différentes caractéristiques de croissance de nos souches, nous avons utilisé les deux approches : la première pour *C. purpurea* qui est capable de produire de fortes concentrations de conidies, et la deuxième pour *C. fusiformis* qui ne produit pas de conidies.

4.4.1- Sporulation de *Claviceps purpurea*

Le développement parasitique naturel de moisissures du genre *Claviceps* présente deux étapes : une phase sphacélicale avec multiplication végétative et conidiogénèse, et une phase sclérotiale aboutissant à la formation du sclérote. Les cellules de *Claviceps* peuvent suivre deux voies de différenciation : formation de conidies ou synthèse d'alcaloïdes dans des cellules plectenchymateuses. Le type de différenciation peut être s'exprimé sous des conditions environnementales bien différentes (SANGLIER, 1977).

Les souches du genre *Claviceps sp.* sont normalement capables de produire des conidies soit en milieu liquide agité, soit en milieu gélosé. Pour une culture de surface, la production des spores peut être réalisée sur un milieu à base d'agar enrichi avec des grains ou de la farine de céréales (Fig. 4.11). La production de conidies en surface sur un milieu solidifié, nous a semblé la plus appropriée dans le cadre de nos recherches, étant donné qu'on se rapproche des conditions naturelles du cycle de vie de *Claviceps*.

La souche de *C. purpurea* est capable de produire des conidies en milieu gélosé et en milieu liquide. Alors que pour une autre espèce, *C. fusiformis* (HA), la conidiogénèse est totalement réprimée. En effet, au cours de la croissance de *C. fusiformis*, on observe la formation d'un mycélium constitué d'hyphes courts avec des granulations lipidiques qui ressemblent aux cellules globuleuses retrouvées dans le sclérote (Fig.4.12 et photo 4.3). Ce type de morphologie a été observé par MANTLE et TONOLO (1968) et VORISEK et coll. (1974) lors de la culture de souches de *Claviceps*. Ils ont défini ces cellules comme étant des chlamydospores. Elles prédominent dans le milieu de culture lors de la synthèse des alcaloïdes. Les chlamydospores ont été observées dans des cultures âgées de champignons filamenteux du genre *Trichoderma* (ROUSSOS, 1985).

Afin d'étudier la physiologie de la sporulation de *C. purpurea*, nous avons suivi l'effet de deux variables. Nous avons d'abord abordé l'effet des différents substrats amylacés, puis l'effet de la température d'incubation sur la production des spores. Les milieux (préparés selon le § 3.3.2) ont été inoculés en masse avec une suspension de spores (10^4 à 10^5) ou avec du mycélium.

Les résultats sont présentés de deux façons différentes : par le nombre de spores produites par ml et par l'indice de sporulation qui est défini comme étant le nombre de spores produites par g de substrat carboné initialement présent dans le milieu de culture.

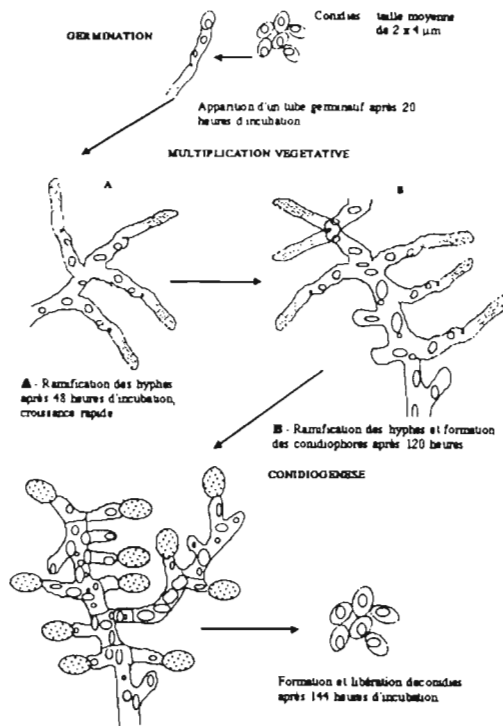
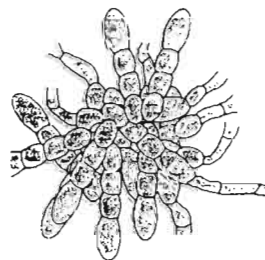
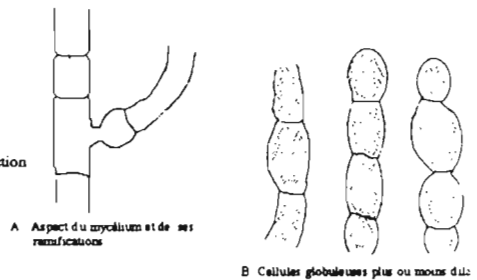


Fig. 411.- Principales étapes morphologiques de *C. purpurea* en fonction de son développement en culture submergée.



C. Formation de cellules de type sclérotal

Fig. 412.- Description morphologique de *Claviceps fusiformis* en fonction de sa croissance en milieu liquide.

Dans le tableau 4.7, on peut observer pour les milieux à base de céréales, une production de $8,6 \times 10^7$ spores/ml et un rendement de sporulation proche de $1,5 \times 10^9$ spores /g.

Tableau 4.7.- Production de conidies de *Claviceps purpurea* en surface sur différents milieux pendant 14 jours d'incubation à 26° C.

N°	Substrat	Nb. de spores/ml	Indice de sporulation
1	grains de blé concassés ¹	$8,6 \times 10^7$	$1,7 \times 10^9$
2	grains de seigle concassés ¹	$7,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^9$
3	Milieu MAFS	$6,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^9$
4	Milieu MAPT	$2,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$

¹ substrat à 50 % d'humidité ; MAFS : malt-agar-farine de seigle ; MAPT : malt-agar-pomme de terre

Sur ces milieux de culture, la conidiogénèse a démarré au 4^{ème} jour d'incubation dans les milieux 1 et 2 et aux 5^{ème} et 6^{ème} jour pour les milieux 3 et 4, respectivement. Les milieux 1 et 2 qui contiennent des céréales concassées sembleraient donc être les plus intéressants. Le meilleur rendement et la meilleure sporulation pour *C. purpurea* ont été obtenus sur grains de blé concassés.

Cependant, des difficultés ont été rencontrées lors de la récupération des spores. Après la croissance, le substrat devient mou et se désagrége facilement, ce qui rend difficile la séparation et le comptage des spores. Toutefois, cette technique reste très avantageuse pour l'obtention de quantités importantes de spores. Pour la suite de notre travail sur l'effet de la température, nous avons choisi d'utiliser le milieu 3, avec lequel la récupération des spores est plus aisée. Ensuite, et afin d'améliorer le rendement de sporulation, nous avons étudié l'effet de la température sur la conidiogénèse de *C. purpurea*.

La production de conidies de *C. purpurea* dépend de la température d'incubation. Elle présente un optimum à 26°C (cf Tableau 4.8). Cependant, la conidiogénèse est plus rapidement initialisée pour les températures élevées avec un rendement pratiquement similaire.

Tableau 4.8 - Production de conidies par *Claviceps purpurea* sur milieu MAFS pendant 14 jours.

Température (°C)	Nb. de spores/ml *	Début de la conidiogénèse (jours)
24	$5,6 \times 10^6$	6
26	$6,1 \times 10^7$	5
30	$1,2 \times 10^7$	4

Milieu de récupération : eau stérile + tween 80

Ceci nous semble intéressant pour la production en masse de spores pour les procédés de FMS, car dans ces procédés une inoculation importante est indispensable afin d'assurer la prédominance de la souche sélectionnée et en même temps réduire les risques de contaminations (RAIMBAULT, 1980 ; ORIOL et coll., 1988). Dans le cas de *C. fusiformis*, l'inoculation des cultures est obtenue par une préculture avec une concentration de biomasse PS d'environ 10-20 g/l (c.f. 3.2.3). La taille de l'inoculum est un paramètre qui influence directement la croissance et la production d'alcaloïdes.

4.4.2- Effet de la quantité d'inoculum de *C. fusiformis*

Nous avons étudié l'effet d'un inoculum liquide de *C. fusiformis*, sur le démarrage de la fermentation et la production d'alcaloïdes, ainsi que pour déterminer la taille optimale de l'inoculum. A partir d'une préculture de *C. fusiformis* contenant environ 10 g de biomasse sèche par litre, nous avons inoculé 100 ml de milieu de production avec 10, 15 et 20 % (v/v) de la préculture. Afin de tester l'effet de la taille de l'inoculum sur l'évolution de la biomasse et la production d'alcaloïdes, nous avons dosé ces paramètres au cours du temps.

On observe sur les fig. 4.13A que le démarrage de la fermentation est directement lié à la taille de l'inoculum. De même sur la fig. 4.13B on constate un effet différent de la quantité d'inoculum sur la production d'alcaloïdes. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 4.9. On observe un rendement de production (Y_p/x) proche de 8,46 mg par g de biomasse PS pour une inoculation de 15 %. Une faible production d'alcaloïdes a été obtenue avec 10 % d'inoculation. Nous avons estimé approximativement les taux de croissance spécifique à partir du logarithme de la biomasse en fonction du temps (Fig. 4.14).

Le taux de croissance reste pratiquement constant pour des tailles d'inoculum de 10 et 15 % alors qu'il est multiplié par deux avec une inoculation de 20 %. Toutefois, on a constaté dans ce cas que la phase stationnaire de croissance débute très tôt : ceci peut s'expliquer par l'épuisement rapide de nutriments dans le milieu de culture.

En ce qui concerne la biosynthèse d'alcaloïdes, on note qu'un taux d'inoculation de 10 % ne permet pas d'obtenir une production élevée d'alcaloïdes (Fig. 4.13B). Une inoculation très importante entraîne également un retard dans la biosynthèse des alcaloïdes. Il apparaît donc clairement qu'une taille d'inoculum de 15 % est préférable. Ce taux moyen d'inoculation permet de réduire la phase de latence tout en favorisant une production rapide d'alcaloïdes.

L'ensemble des résultats obtenus nous ont permis de mieux cerner les principaux paramètres de la culture saprophytique de *C. purpurea* et *C. fusiformis*. En particulier, nous avons mis en évidence l'effet de la température et de la source de carbone sur la production massive de conidiophores de *C. purpurea*.

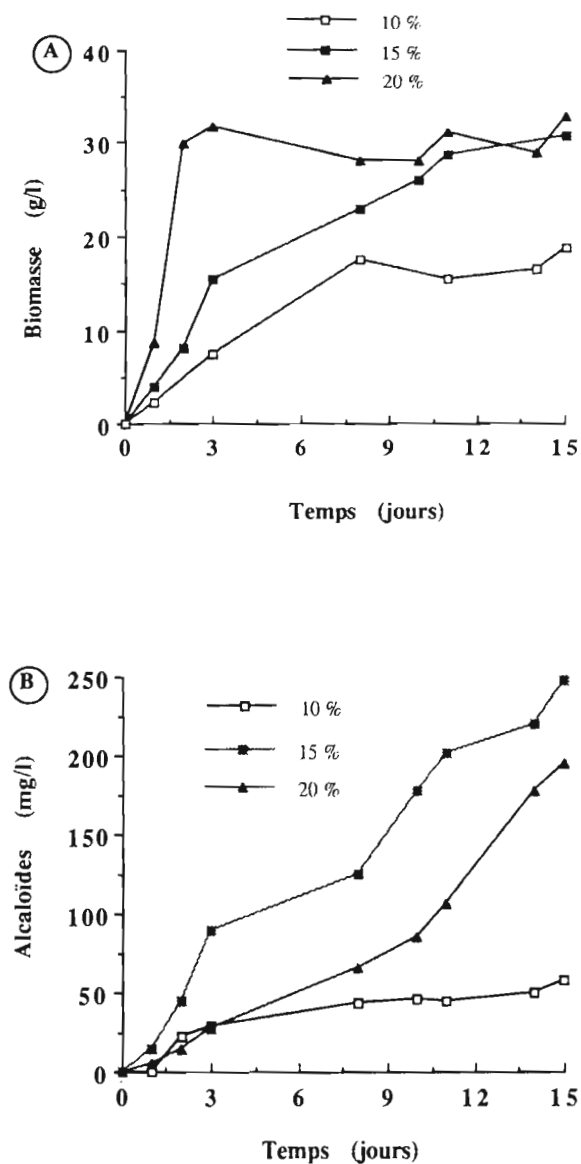


Fig. 4.13.- Effet de la taille de l'inoculum sur l'évolution de la biomasse (A), et sur la production d'alcaloïdes (B), au cours de la croissance de *C. fusiformis* cultivé en milieu liquide à 25°C. Taille de l'inoculum : 10 % ; 15 % et 20 %.

Tableau 4.9 .- Effet de la taille de l'inoculum sur les paramètres caractérisant le déroulement de la culture de *C. fusiformis* cultivé en milieu liquide à 26 °C pendant 15 jours.

Taille de l'inoculum % v/v	Biomasse g/l	μ jour ⁻¹	Alcaloïdes Totaux mg/l	Y p/x mg/g	Sucres totaux consommés %
10	17 ± 0,5	0,6	53 ± 0,5	3,11	38,75
15	30 ± 0,5	0,6	246 ± 0,1	8,46	46,25
20	33 ± 0,5	1,2	195 ± 0,1	6,08	71,25

Inoculum à 10 g/l ; pH final voisin de 6,5

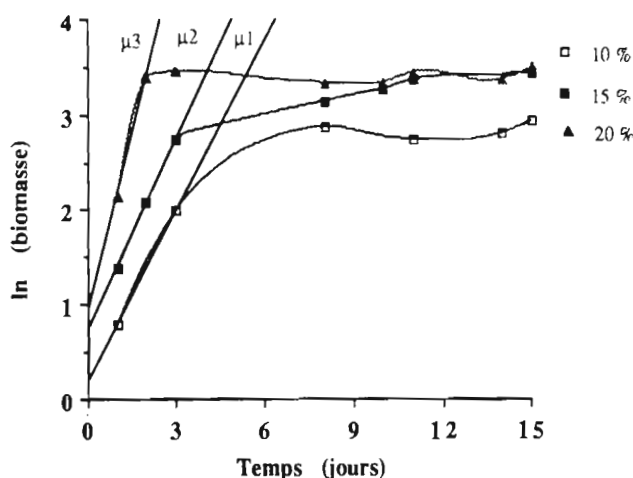


Fig. 4.14 .- Effet de la taille de l'inoculum sur l'activité spécifique de croissance (μ) de *C. fusiformis* cultivé en milieu liquide. Les activités spécifiques μ_1 , μ_2 et μ_3 correspondent à des tailles d'inoculum de 10, 15, et 20 % respectivement.

4.5- Etude physiologique de la croissance de *Claviceps* en milieu liquide

Une étude concernant l'optimisation de la production de métabolites secondaires chez les champignons filamenteux semble difficilement envisageable sans connaître et comparer les cinétiques de croissance et de production des métabolites recherchés. Ainsi, l'objectif de notre étude a concerné la physiologie de la croissance mycélienne des souches sélectionnées. A cet effet, différents paramètres ont fait l'objet d'un suivi au cours de cultures en milieu liquide agité à 26°C pendant 15 jours : biomasse, synthèse d'alcaloïdes, consommation de sucres, phosphate inorganique et pH.

Initialement, les milieux de culture pour *C. purpurea* et *C. fusiformis* contenaient respectivement 240 g/l et 200 g/l de saccharose. La source d'azote était constituée d'un mélange d'urée et de sulfate d'ammonium, avec un rapport C/N de 40 et 32 respectivement (la composition de la solution minérale est décrite au § 3.2.5).

4.5.1- Physiologie de la croissance et de la production d'alcaloïdes par *C. purpurea*

Les cinétiques de croissance et de production d'alcaloïdes par *C. purpurea* sont représentées sur la fig. 4.15. A partir de l'évolution de la biomasse, estimée par le poids sec (PS), on a mis en évidence les principales phases de la croissance mycélienne de *C. purpurea* : une phase de germination (0-48 h), une phase de croissance rapide (48-168 h) et une phase stationnaire qui commence à la 216^{ème} heure. Le poids sec maximum atteint 30 g/l après 216 heures de culture et reste relativement stable jusqu'à la fin de la culture.

La synthèse d'alcaloïdes commence à 60 h, pour se poursuivre de façon exponentielle jusqu'à 170 h environ. A partir de la 216^{ème} heure, on observe une diminution de la biosynthèse. A la fin de la fermentation, on peut noter que la production d'alcaloïdes rapportée à la biomasse produite, atteint une valeur de 6,23 mg/g biomasse PS. Ceci correspond pour *C. purpurea*, à une production totale de 203 mg/l pendant les 15 jours de fermentation.

Par ailleurs, la limitation en phosphate est en rapport étroit avec le développement du champignon et la synthèse d'alcaloïdes. En effet, la biosynthèse des alcaloïdes commence lorsque le phosphate inorganique devient limitant dans le milieu de culture. On constate une intensification de la production quand celui-ci a été complètement épuisé (5^{ème} jour de culture).

Il est important de remarquer que la quantité de phosphate présent dans le milieu doit être suffisante pour une croissance équilibrée durant la première phase, afin d'obtenir une quantité élevée de biomasse. Cependant, après cette période, le phosphate doit être limitant pour promouvoir la biosynthèse des alcaloïdes. La limitation du phosphate en présence d'un excès d'autres nutriments provoque une phase de transition, caractérisée par une croissance lente du mycélium et l'accumulation intracellulaire de métabolites de réserve tels que lipides (SERRANO et coll., 1992), polysaccharides (TABER, 1967 ; VORISEK et coll., 1974), etc... Ceci peut se traduire par une augmentation du poids sec de la biomasse, parallèlement à la biosynthèse des alcaloïdes.

L'accumulation de lipides en fin de fermentation a été d'environ 12 % par rapport au poids sec de la biomasse et confirme les résultats obtenus par d'autres auteurs (MANTLE et coll., 1969 ; DESAI et REHACEK, 1982 ; SHAH et DESAI, 1988).

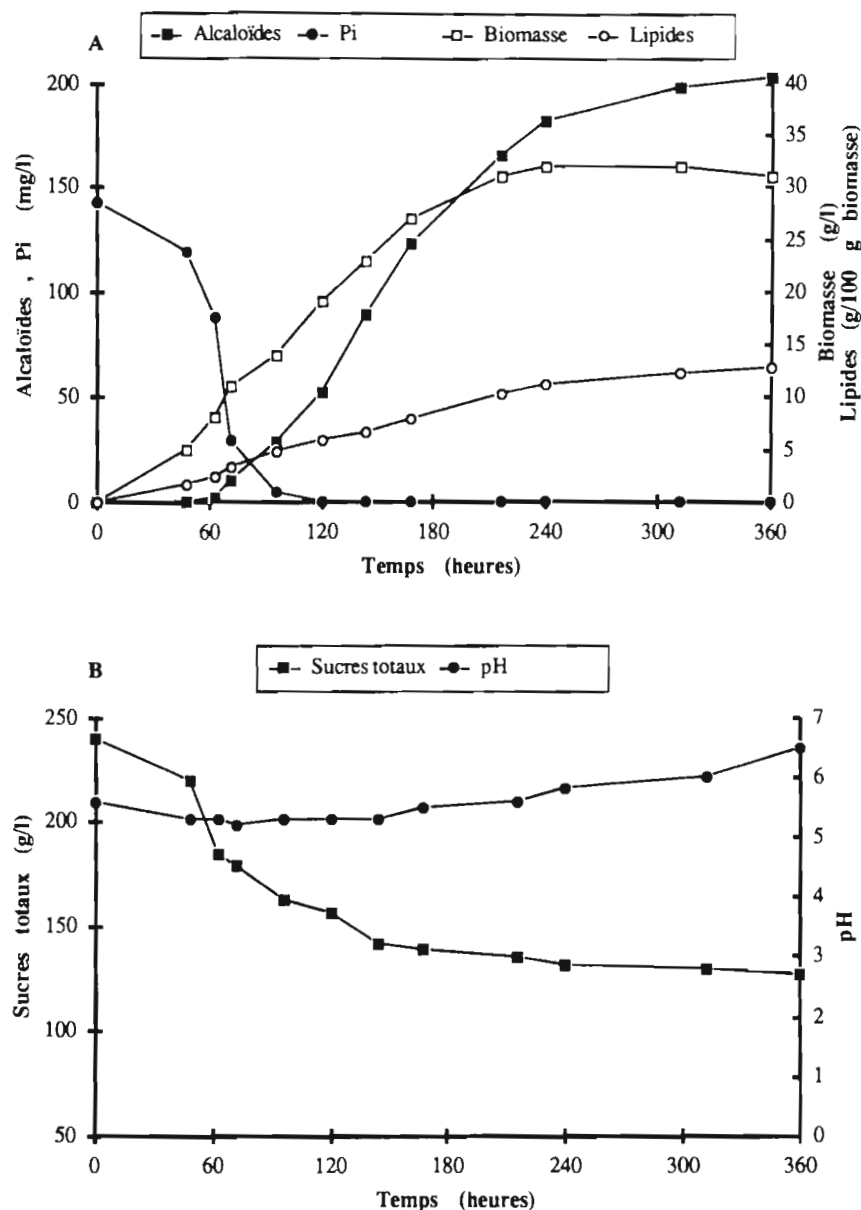


Fig. 4.15.- Evolution des différents paramètres de fermentation au cours de la croissance de *C. purpurea* en milieu liquide pendant 15 jours à 26°C. A. Biosynthèse des alcaloïdes, évolution de la biomasse en PS, des lipides et du phosphore inorganique ; B. Evolution des sucres totaux et du pH.

En ce qui concerne l'évolution des sucres, on remarque une consommation lente qui s'accompagne d'une légère diminution du pH durant les premières 100 heures de culture. On observe que la vitesse de consommation se ralentit à partir de la 168^{ème} heure, au moment où la vitesse de croissance diminue considérablement (phase stationnaire). La consommation totale de sucres correspond à peu près à 50 % de la quantité de sucres initialement présents dans le milieu (fig. 4.15.B).

4.5.2- Physiologie de la croissance et de la production d'alcaloïdes par *C. fusiformis* (HA)

Les différentes cinétiques obtenues sont représentées sur les fig. 4.16 (A et B). Le cycle asexué de croissance de *C. fusiformis* est constitué d'une phase exponentielle de 72 à 120 h, puis d'une phase de croissance linéaire aboutissant à une phase stationnaire après 216 h de culture. La biomasse (PS) atteint une valeur d'environ 29 g/l en fin de culture. Au début de la fermentation, la consommation des sucres est lente (25 % à 168 h). Elle est associée à une légère acidification du milieu de culture (pH 4,8). Cette consommation devient ensuite plus rapide et coïncide avec la phase de croissance linéaire du microorganisme. Enfin, pendant la phase stationnaire de croissance, on observe un ralentissement de la consommation des sucres. La consommation totale de substrat carboné a été d'environ 50 % (Fig. 4.16B). Contrairement à *C. purpurea*, l'utilisation du phosphate inorganique par *C. fusiformis* est plus lente. C'est seulement après 240 h, qu'on note un épuisement total de celui-ci dans le milieu de culture, alors que cet épuisement apparaît après 120 h pour *C. purpurea*.

L'augmentation parallèle des concentrations de biomasse et d'alcaloïdes dans le milieu suggère l'existence d'une étroite corrélation entre la croissance du microorganisme et la biosynthèse des alcaloïdes. La limitation du phosphate dans le milieu est également corrélée à une augmentation de la teneur en alcaloïdes effective dès le troisième jour de culture.

Comme pour la plupart des cas de production de métabolites secondaires par les champignons filamenteux, la fermentation comporte deux étapes. La première concerne une croissance rapide accompagnée d'une chute importante de la teneur en phosphate inorganique en début de culture. Durant la deuxième phase, la biomasse continue à augmenter, mais cette augmentation est essentiellement due à l'accumulation de substances de réserve. A ce propos, nous avons dosé les lipides présents dans la biomasse, une accumulation de lipides d'environ 7 % a été enregistrée en fin de fermentation. Ceci explique l'augmentation parallèle de la biomasse liée à la biosynthèse des alcaloïdes (DESAI et REHACEK, 1982 ; SHAH et DESAI, 1988).

En fin de fermentation, la production d'alcaloïdes rapportée à la biomasse produite, atteint une valeur d'environ 8,57 mg/g de biomasse (PS). Ceci correspond pour *C. fusiformis*, à une production totale de 247 mg/l pendant les 15 jours de culture.

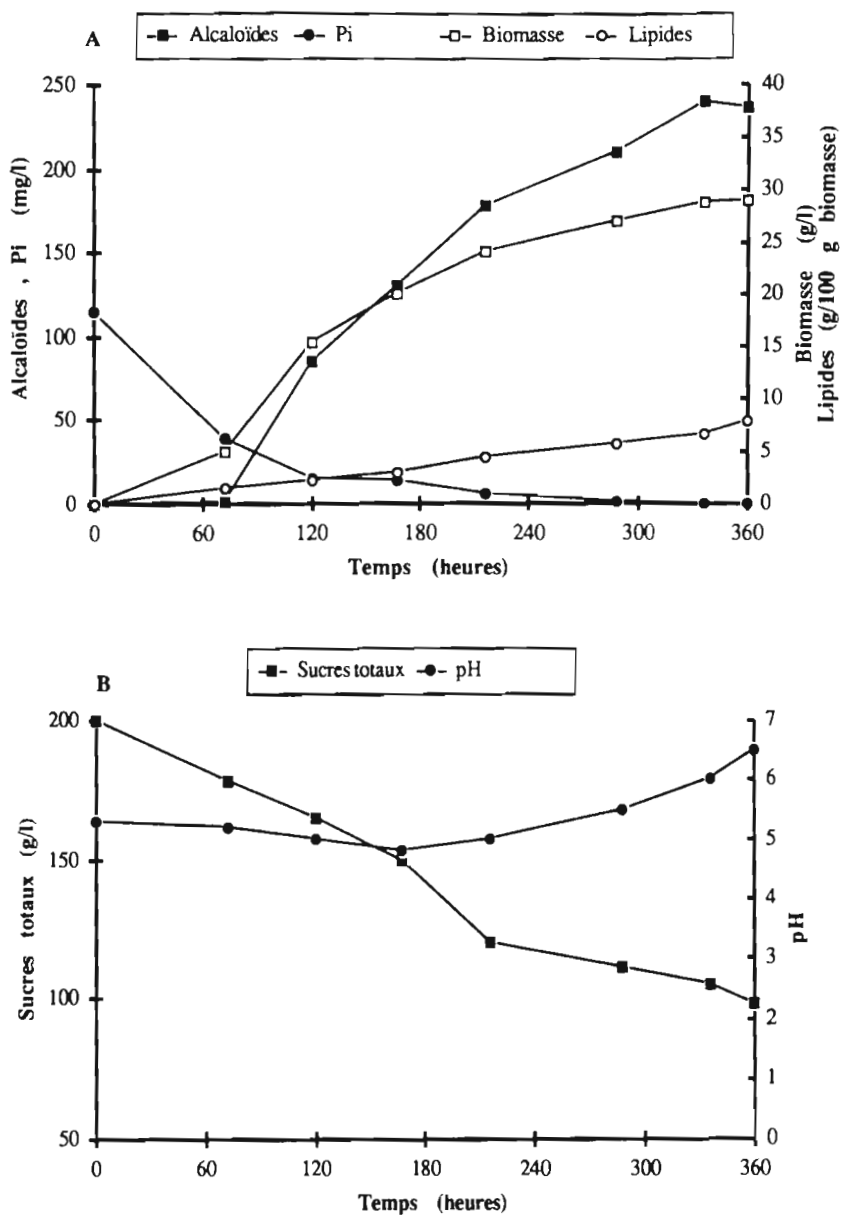


Fig. 4.16.- Evolution des différents paramètres de fermentation au cours de la croissance de *C. fusiformis* en milieu liquide pendant 15 jours à 26°C. A. Biosynthèse des alcaloïdes, évolution de la biomasse, des lipides et du phosphore inorganique ; B. Evolution des sucres totaux et du pH.

4.6- Conclusion

La sélection de souches de *Claviceps* à partir de notre collection a permis de retenir les deux meilleures espèces : *C. purpurea* et *C. fusiformis*. L'étude des facteurs primordiaux pour la croissance des champignons et la biosynthèse des alcaloïdes, nous a permis de mettre en évidence l'influence des sources d'azote et de carbone et du rapport C/N. Ainsi, les meilleures sources d'azote et de carbone sont respectivement les sels d'ammonium et le saccharose, le mannitol et le sorbitol.

Au cours de cette étude, nous nous sommes aperçus que la formation des alcaloïdes s'accompagne d'une différenciation mycélienne et de la formation d'un pigment violet ou/et marron.

L'étude de la sporulation de *C. purpurea* sur milieux naturels nous a permis d'obtenir une quantité élevée de spores dans un milieu de culture à base de farine de seigle et d'extrait de malt à 26°C en 14 jours d'incubation.

La taille de l'inoculum est un facteur important pour la culture de *C. fusiformis*. En effet, le démarrage de la fermentation est d'autant plus retardé que la taille de l'inoculum est faible. Une inoculation de 15 % (v/v) de préculture semble être optimale pour la biosynthèse des alcaloïdes.

Finalement, l'étude cinétique de la consommation des principaux nutriments et de la biosynthèse des alcaloïdes nous a permis de mettre en évidence le rôle du phosphate comme éventuel facteur limitant de la croissance et de la formation des alcaloïdes. Nous avons, d'autre part, constaté que la synthèse d'alcaloïdes commence au bout du troisième jour d'incubation et par la suite, augmente parallèlement avec la production de biomasse et l'accumulation de lipides.

Les connaissances acquises sur les facteurs essentiels qui influencent la croissance des *Claviceps* et la biosynthèse optimale d'alcaloïdes en milieu liquide, nous ont fourni les bases scientifiques nécessaires pour l'adaptation des souches sélectionnées à la culture en milieu solide. Cette étude fera l'objet des chapitres suivants.

5. CROISSANCE DE *C. PURPUREA* SUR SUBSTRAT AMYLACE

Introduction

Les *Claviceps* sont des parasites de graminées et céréales. Ils sont capables de se développer à l'intérieur de l'ovaire de fleurs de la plante hôte, où la source de nutriments est essentiellement de nature amylacée. Ils se développent par conséquent sur un substrat solide. De ce fait, la technique de FMS peut être mise en œuvre pour la culture saprophytique de ces champignons.

A partir de ces considérations, nous avons envisagé une approche totalement différente qui consiste à utiliser la technique de fermentation en milieu solide comme méthode de production de ces métabolites. Pour ce faire, nous avons dû tenir compte des caractéristiques du développement parasitique du champignon, ainsi que des caractéristiques inhérentes à la fermentation en milieu solide. Nous avons entrepris, dans un premier temps, l'étude de la croissance et du métabolisme de *Claviceps* sur des substrats amylacés.

Pour établir les mécanismes et les paramètres de la croissance de nos souches en FMS, il était également indispensable de connaître les conditions optimales de culture. A cet effet, nous avons étudié l'influence des facteurs environnementaux et nutritionnels.

Nous avons étudié la croissance de *Claviceps purpurea* sur différents milieux de culture à base de substrats naturels, assurant à la fois la fonction de support et la source de nutriments.

Nous nous sommes enfin également intéressés aux traitements de ces substrats afin de déterminer la taille optimale des particules du substrat, ainsi que le type de cuisson lui assurant une meilleure digestibilité.

5.1- Influence des facteurs de l'environnement

5.1.1- Influence de la teneur en eau

Dans la nature, la plupart des microorganismes sont capables de se développer sur des substrats solides, mais seuls les champignons filamenteux peuvent croître sur des substrats à de faibles humidités (KARANTH, 1991). En FMS, la teneur en eau joue un rôle capital, par son influence directe sur la croissance et sur la porosité du substrat. Celle-ci influence directement la diffusion de l'air à l'intérieur de la matrice solide (ORIOLE, 1987 ; ORIOLE et coll., 1988). L'importance de l'eau sur le métabolisme des microorganismes a été mise en évidence par de nombreux auteurs (c.f. § 2.3.4).

De ce fait, nous avons été amenés à étudier l'effet de l'humidité initiale sur la croissance de *C. purpurea*. Cette étude a été réalisée en utilisant comme substrat solide les grains de seigle concassés et conditionnés selon le traitement et les conditions décrites précédemment (c.f. 3.3.2). Les teneurs en eau testées ont été les suivantes : 40, 50 et 60 %. Au cours de cette étude, nous avons suivi la cinétique de croissance du champignon en continu par la détermination du CO₂ produit.

Les valeurs de la production totale d'alcaloïdes et des différents paramètres de la fermentation sont rassemblées dans le tableau 5.1 et la fig. 5.1. Les résultats de la production d'alcaloïdes, de la biomasse et d'autres paramètres de fermentation montrent que l'optimum de la teneur en eau initiale se situe à 50 %. La production d'alcaloïdes mesurée dans ces conditions est d'environ 37 mg/100 g MSI. Cette valeur est nettement supérieure à celles obtenues avec des teneurs en eau du substrat de 40 et 60 %.

Lorsque l'humidité initiale est de 40 %, la phase de germination est très longue suivie d'un ralentissement de la production du CO₂. Le taux d'alcaloïdes obtenu dans ces conditions est faible. Au contraire, avec des teneurs en eau supérieures à 60 %, la phase de germination des conidies est plus rapide, mais on observe une sporulation précoce. En particulier, on remarque qu'à ce taux d'humidité, l'eau a détruit la structure poreuse du substrat, ce qui conduit à la formation d'une pâte. Par conséquent, la diffusion de l'air est limitée à l'intérieur de la masse solide entraînant une croissance hétérogène et une faible production d'alcaloïdes.

Par ailleurs, on note une consommation de sucres plus élevée pour un taux d'humidité de 50 % suivie d'une production plus élevée en alcaloïdes. D'autre part, on observe une augmentation de l'humidification du substrat d'environ 9% au cours de l'incubation, qui peut être due à la libération d'eau au cours de la respiration du champignon et l'hydrolyse de l'amidon. Les différents résultats obtenus confirment l'importance de l'humidité des milieux de culture sur les activités métaboliques de *C. purpurea*. Une teneur en eau de 50 % a été appliquée pour la suite des études.

5.1.2- Le contrôle du pH

En FMS, le pH du milieu de culture est un facteur essentiel dans le déroulement de la fermentation. Toutefois, l'hétérogénéité et la faible teneur en eau du milieu de culture sont des obstacles pour la détermination directe du pH. De plus, il s'agit d'une culture de type statique dans laquelle aucune agitation ne peut être réalisée. Du fait de l'importance du pH sur les différentes activités métaboliques des microorganismes, plusieurs solutions ont été proposées. Ainsi, la régulation du pH peut être réalisée en agissant sur les valeurs de pH initial ou en utilisant des mélanges salins (sulfate d'ammonium et urée) qui permettent de maintenir le pH dans une plage favorable pour le développement des microorganismes (RAIMBAULT, 1980).

Tableau 5.1.- Influence de l'humidité initiale sur différents paramètres de la FMS de *C. purpurea* cultivé sur grains de seigle concassés à 26°C pendant 200 h.

Teneur en eau %			Sucres consommés	Alcaloïdes	Biomasse	Y x/s	pH final	CO2 dégagé
initiale	finale		g/100 g MSI	mg/100 g MSI	g/ g MSI			ml /g MSI
1	40	48,6	21,1	1,1	0,05	0,24	5,3	43,7
2	50	63,2	52,8	37,7	0,13	0,25	4,9	145,8
3	60	68,1	41,3	10,3	0,09	0,22	5,6	110,2

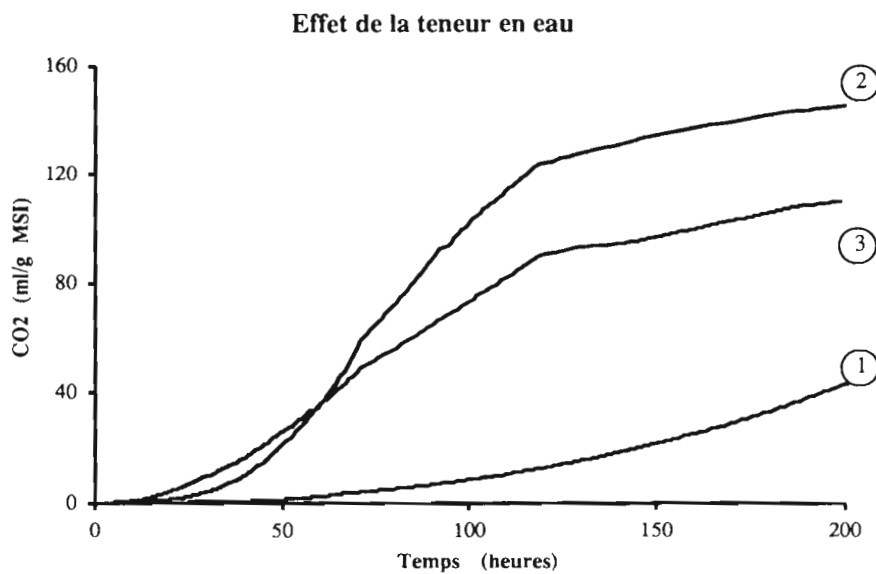


Fig. 5.1.- Effet de la teneur en eau sur la production du CO₂ au cours de la FMS de *Claviceps purpurea* sur grains de seigle concassés à 26°C. Teneurs initiales en eau : 40 % (1) ; 50 % (2) et 60 % (3).

Afin de pouvoir réguler le pH dans la culture solide de *Claviceps*, nous avons utilisé la dernière technique. Pour cela, nous avons évalué les proportions de sulfate d'ammonium et d'urée, les plus appropriées pour la croissance de *C. purpurea*. L'étude a été réalisée avec une teneur constante en azote et des proportions décroissantes en sulfate d'ammonium (Tableau 5.2), en utilisant la même solution saline et les conditions de travail décrites précédemment (c.f. § 3.3.2).

Tableau 5.2. - Effet du sulfate d'ammonium sur le pH et la production d'alcaloïdes après 200 heures de fermentation (pH initial 5.5, Humidité 50 % à 26°C).

% N-Sulfate	% N-Urée	pH final	alcaloïdes mg/100 gMSI	CO ₂ dégagé ml/g MSI
100	0	4	1,04	87,74
80	20	4,8	18,79	136,8
70	30	5	39,15	185,48
60	40	5,7	37,49	191,86
50	50	6	30,42	144,21

Azote total = 2,7 g pour 100 g de grains concassés

Ces résultats montrent une acidification du milieu de culture lorsque le sulfate d'ammonium est l'unique source d'azote. Cette acidification, provoquée par la libération des ions H^+ et SO_4^- , diminue au fur et à mesure que le pourcentage en urée augmente. Ceci permet de maintenir le pH proche des conditions de croissance optimale. Toutefois, un pourcentage supérieur à 40 % d'urée conduit à une alcalinisation du milieu qui peut favoriser les contaminations (Fig. 5.2). Il semble que l'addition de 30 à 40 % d'azote fourni par l'urée est plus favorable pour la croissance de *C. purpurea*, ainsi que pour la biosynthèse des alcaloïdes. Pour la suite de nos études, on utilisera le rapport sulfate d'ammonium-urée de 70-30.

5.1.3- Effet du taux d'inoculation

En FMS, l'inoculation homogène dans la masse du substrat est un facteur important pour la réussite d'une fermentation. Il est donc indispensable de déterminer le taux d'inoculation optimum pour accélérer le démarrage de la fermentation et assurer la prédominance de notre souche, de façon à éviter une éventuelle contamination. Afin de déterminer la quantité optimale d'inoculum, nous avons suivi l'évolution de la croissance par la production de CO_2 au cours de la culture de *C. purpurea* à différents taux d'inoculation : 2×10^6 , 2×10^7 et 2×10^8 spores/g SPS. Les conditions de travail sont celles décrites précédemment (c.f. §3.3.2) et sélectionnées dans les dernières études (c.f. 5.2.1 et 5.2.2).

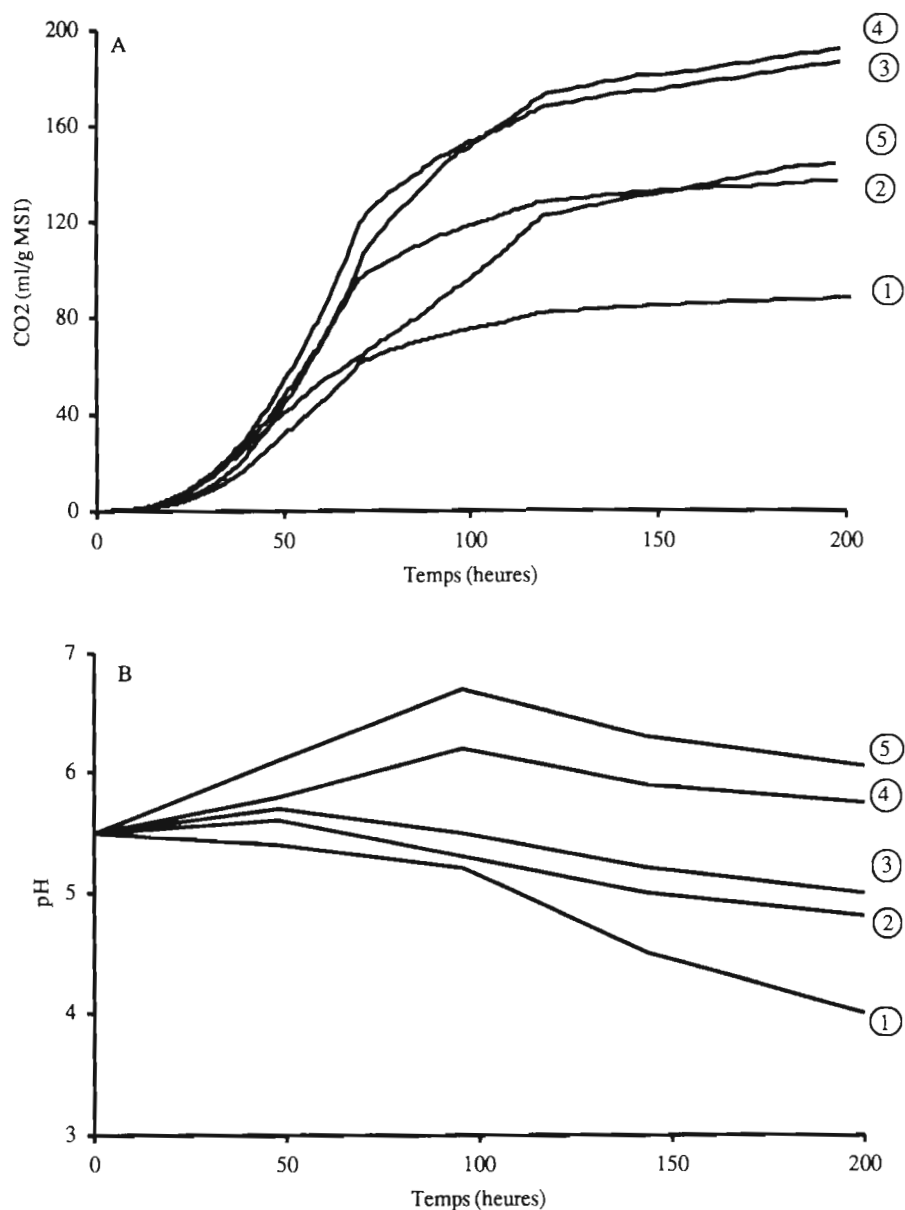


Fig. 5.2. - Effet des mélanges sulfate d'ammonium-urée sur la formation de CO₂ (A) et l'évolution du pH (B) au cours de la croissance de *C. purpurea* cultivé sur grains de seigle concassés, à 26°C. Les numéros 1, 2, 3, 4 et 5, correspondent respectivement aux pourcentages d'azote-sulfate/azote total de 100 %, 80 %, 70 %, 60 % et 50 %.

Selon les résultats rapportés sur la fig. 5.3, on constate que pour une concentration de spores de 2×10^8 g/SPS, la croissance démarre plus rapidement. Cependant, la formation de CO_2 atteint plus rapidement son maximum. Pour les taux d'inoculation de 2×10^6 et 2×10^7 spores/g SPS, les cinétiques de croissance en début de fermentation sont assez similaires. Néanmoins, la production de CO_2 est nettement plus forte pour un taux d'inoculation de 2×10^7 spores/g SPS. Pour cette inoculation, il y a eu une production d'alkaloïdes élevée de l'ordre de 43 mg/100 g MSI (Tableau 5.3).

Tableau 5.3. - Effet du taux d'inoculation sur la production d'alkaloïdes et la croissance après 200 heures de fermentation (pH 5.5, Humidité 50 % ; 26°C).

Taux d'inoculation	μ h^{-1}	Phase de latence h	alkaloïdes mg/100 g MSI	CO_2 dégagé ml/g MSI
2×10^6	0,08	15	29,5	228,4
2×10^7	0,09	16	43,9	312,2
2×10^8	0,12	13	26,4	272,3

Par ailleurs, des observations microscopiques du produit final révèlent qu'une proportion assez importante de spores n'a pas germé pour une inoculation de 2×10^8 spores/g SPS. Pour des inoculations inférieures, cette proportion est très faible. Des études réalisées avec une souche d'*Aspergillus niger* montrent que des phénomènes d'inhibition de la germination se présentent lorsque le taux d'inoculation est supérieur à 10^8 spores par g de matériel solide (ORIOL, 1987 ; BARRIOS-GONZALEZ et coll., 1989).

On observe que la phase de latence diminue au fur et à mesure que le taux d'inoculation augmente. Le taux de croissance spécifique (calculé en fonction du Ln de la production de CO_2) reste constant pour des inoculations de 2×10^6 et 2×10^7 spores/g SPS avec une valeur d'environ $0,09 \text{ h}^{-1}$. Avec une inoculation de 2×10^8 spores/g SPS, μ est égal à $0,12 \text{ h}^{-1}$ (Fig. 5.4).

Des taux d'inoculation optima de 10^6 à 10^7 spores/g ont été décrits pour la farine de manioc (RAIMBAULT, 1980 ; SOCCOL, 1992) et pour un autre support solide (ORIOL, 1987). Ainsi, la concentration de spores la plus favorable à la croissance de *C. purpurea* est de 2×10^7 spores/g SPS. Cette concentration a donc été adoptée pour la suite de nos études.

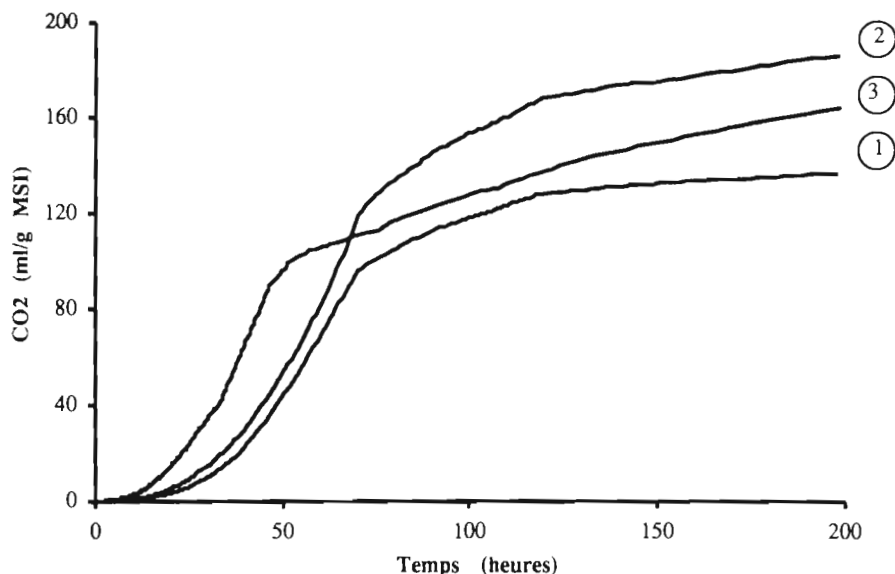


Fig. 5.3 Effet du taux d'inoculation sur la formation de CO_2 au cours de la croissance de *Claviceps purpurea* cultivé sur grains de seigle concassés, à 26°C . Les numéros 1, 2 et 3 correspondent respectivement aux taux d'inoculation suivants (spores/g de Substrat) : 2×10^6 , 2×10^7 et 2×10^8 .

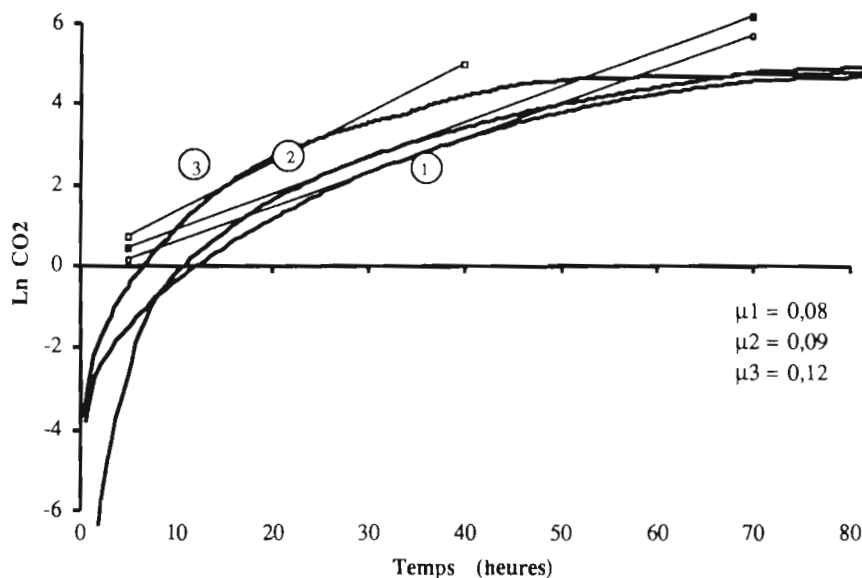


Fig. 5.4 Effet du taux d'inoculation sur l'activité spécifique (μ) de *C. purpurea* calculé à partir du Ln CO_2 . Les numéros 1, 2 et 3 correspondent respectivement aux taux d'inoculation suivants (spores /g de Substrat) : 2×10^6 ; 2×10^7 et 2×10^8 .

5.2- Définition des facteurs essentiels pour la croissance de *C. purpurea*

D'après les travaux précédents, les conditions physico-chimiques et environnementales semblent agir directement sur la production des métabolites secondaires. Ainsi, la combinaison et la qualité des sources carbonées et azotées, et leur rapport quantitatif, ont un rôle fondamental dans le métabolisme des souches de *Claviceps*. Les sucres lentement métabolisables comme le saccharose et le maltose, semblent être les plus favorables pour la production d'alcaloïdes (PUC et SOCIC, 1977 ; KOBEL et SANGLIER, 1986 ; FLIEGER et coll., 1988).

VINING (1970), REHACEK et MALIK (1971), ROBBERS et coll. (1972) et ERGE et coll. (1984) ont montré que l'addition de précurseurs tels que le tryptophane favorise la biosynthèse des alcaloïdes. D'autres facteurs peuvent également affecter la quantité et la qualité des métabolites finaux synthétisés, comme l'aération (MILICIC, 1989), la source d'azote minérale (DESAI et coll., 1986a), l'acide citrique (TABER, 1967 ; GLUND et coll., 1979) et l'addition de surfactants qui stimulent la production d'alcaloïdes (DESAI et coll., 1986b ; MATOSIC et coll., 1988). Le phosphate inorganique joue également un rôle très important dans la biosynthèse des alcaloïdes car il inhibe les enzymes responsables de la formation des alcaloïdes (ROBBERS et coll., 1972 ; KRUPINSKY et coll., 1976 ; VAIDYA et DESAI, 1982 ; LOHMEYER, et coll., 1990).

L'objectif de cette étude a été ainsi de mettre en évidence l'influence simultanée de différents facteurs sur la biosynthèse des alcaloïdes par *C. purpurea*. Pour cela, nous avons fait appel à la méthodologie des plans d'expériences. Cette méthodologie, très simple d'utilisation, nous a paru utile pour la détermination de l'effet d'un grand nombre de facteurs.

La méthode de planification expérimentale permet de réaliser un criblage d'un grand nombre de facteurs, de déterminer l'influence simultanée des paramètres retenus et d'optimiser une ou plusieurs réponses expérimentales en effectuant un minimum d'expériences (CHERUY et coll., 1989).

Au début d'une étude d'optimisation, ou de la détermination de l'effet de nombreux facteurs, il est souvent indispensable de considérer de nombreux paramètres dans un plan d'expérience. Le nombre de combinaisons d'un plan factoriel complet devient si considérable qu'il est impossible d'en exécuter l'ensemble (SANGLIER, 1977). Il est donc nécessaire d'utiliser des plans qui, avec un nombre restreint de combinaisons, permettent de déterminer les effets principaux. Pour cela, on peut aussi bien utiliser les matrices d'HADAMARD que des factoriels fractionnaires (cas particuliers des matrices d'HADAMARD) qui permettent d'obtenir avec un nombre minimum d'essais, le plus grand nombre d'informations.

Une matrice factorielle fractionnée, 2^k-1 (où k est le nombre de facteurs et 2^k le nombre de blocs dans lesquels le plan factoriel complet a été divisé), a été mise en œuvre afin de mettre en évidence les facteurs ayant un effet sur la fermentation. Néanmoins, les interactions entre facteurs restent confondues (DE MEO et coll., 1985).

Au cours de cette étude, nous avons testé l'influence de différents composés du milieu de culture, additionnés à 100 g MS de substrat amylacé. Ces composés ont été considérés comme étant des facteurs affectant la production d'alcaloïdes. Les conditions de travail sont celles décrites précédemment (§3.3.2). L'aération des milieux de culture a également été considérée comme un facteurs influent.

Ainsi, sept facteurs on été étudiés dans un plan factoriel fractionnaire : l'aération, le phosphate inorganique, l'acide citrique, le saccharose, l'addition de tween 80, de tryptophane et d'une source d'azote minérale. Cette dernière a été apportée sous forme de sulfate d'ammonium et d'urée avec un rapport de 70/30 (p/p). Ces 7 facteurs sélectionnés et leurs correspondants en valeurs réelles sont rapportés dans le tableau 5.3. La matrice d'expériences avec les valeurs codées est représentée dans le tableau 5.4. Les résultats obtenus avec le plan 2^{7-4} , après 200 h de culture, sont regroupés dans le tableau 5.5.

A partir des réponses obtenues sur la production d'alcaloïdes totaux, la formation de CO_2 et de biomasse, le rendement $Y_{p/x}$ et le spectre d'alcaloïdes pour les différentes expériences, l'effet des facteurs a été exprimé sous la forme d'un polynôme (DE MEO et coll., 1985).

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i$$

où Y est la réponse mesurée, b_0 est un terme indépendant, b_i représente les coefficients correspondant aux différents facteurs testés (X_i) et i est l'indice pour ces facteurs.

Afin d'évaluer les effets des différents facteurs sur les réponses, une transformation des polynômes est nécessaire. Cette transformation considère les rapports aux gradients normalisés des Y (HIMMELBLAU, 1969).

Le rapport est donné par :

$$\frac{\nabla Y}{\|\nabla Y\|}$$

où ∇Y est le gradient de Y et $\|\nabla Y\|$ est la taille du vecteur ∇Y . Le calcul est le suivant :

$$\frac{\nabla Y}{\|\nabla Y\|} = \frac{\sum b_i X_i}{[\sum b_i^2]^{1/2}} = \sum a_i$$

D'autre part, les effets relatifs des facteurs sur la production d'alcaloïdes totaux, la production de CO_2 , le pH final de la culture, ainsi que le pourcentage d'alcaloïdes individuels rapportés aux alcaloïdes totaux (ergonovine, ergotamine, lysergol et autres alcaloïdes DAL) sont décrits sur la fig. 5.5. L'effet de la composition des milieux de culture sur la production de CO_2 au cours des fermentations est représenté sur la fig. 5.6.

Tableau 5.3.- Matrice d'expériences avec valeurs codées des différents facteurs

Expérience No.	Niveau des facteurs n°						
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
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

Tableau 5.4.- Correspondance entre niveaux codés et niveaux réels (factoriel 2⁷⁻⁴)

Facteurs		Unité	Niveaux réels des facteurs	
			- 1	+ 1
X1 =	KH ₂ PO ₄	%	0,5	1
X2 =	Source d'azote minérale	%	0	1,4
	Urée-Sulfate d'ammonium			
X3 =	Tryptophane	%	0	0,1
X4 =	Tween 80	%	0	1
X5 =	Aération	ml/min/col	20	60
X6 =	Saccharose	%	0	20
X7 =	Acide citrique	%	0	1,5

60 g MS/colonne ; Humidité 50%

Tableau 5.5.- Résultats expérimentaux obtenus avec le plan d'expérience 2⁷⁻⁴ (à 200 h de fermentation)

Milieu n°	Alcaloïdes totaux mg/100 gMSI	CO ₂ dégagé à 7 jours ml/gMSI	Biomasse g/100g MSI	Y p/x mg/g	pH	% d'alcaloïdes totaux			Autres alcaloïd- DAL
						Ergotamine	Ergonovine	Lysergol	
1	6,3	89,5	13,0	0,5	5,9	0,0	40,4	1,3	58,3
2	30,5	113,1	13,0	2,3	6,5	0,0	40,0	1,7	58,2
3	8,7	220,3	28,0	0,3	6,3	0,0	36,7	29,5	33,7
4	53,3	157,6	25,0	2,1	5,1	1,9	57,7	10,4	30,1
5	49,6	211,4	25,0	2,0	6,3	3,1	38,3	0,3	58,2
6	19,5	117,0	21,0	0,9	5,7	1,0	45,2	2,3	48,6
7	65,2	123,6	14,0	4,7	5,4	5,1	57,1	2,1	34,9
8	12,5	83,3	17,0	0,7	6,4	0,0	38,9	9,8	51,2

DAL : Dérivés de l'Acide Lysergique

Discussion

Dans l'espace expérimental considéré, on remarque que le tryptophane et l'aération présentent des effets très significatifs. Le premier favorise la biosynthèse d'alcaloïdes par son rôle de précurseur et le deuxième présente un effet négatif sur la production d'alcaloïdes totaux et sur le spectre des alcaloïdes produits. On constate qu'une aération élevée est nécessaire à la formation de lysergol et d'autres alcaloïdes DAL. Une aération plus faible est requise pour la production d'ergonovine et d'ergotamine (Fig. 5.5).

Une aération trop élevée ou trop faible affecte notablement la production qualitative et quantitative d'alcaloïdes (MILICIC et coll., 1989). D'autre part, il est confirmé que les sels d'ammonium favorisent la production d'alcaloïdes. Dans la littérature, les sels d'ammonium sont très utilisés pour la culture submergée de la plupart des souches de *Claviceps*.

Dans le domaine expérimental considéré, le phosphate inorganique a présenté une influence négative sur les réponses étudiées, à l'exception de la biosynthèse de l'ergonovine. Ceci peut être dû à la présence de tryptophane dans le milieu de culture qui surmonte l'inhibition par le phosphate des enzymes responsables de la synthèse des alcaloïdes (Fig. 5.5A). Contrairement aux résultats attendus, la biosynthèse du lysergol semble être moins influencée par l'addition de tryptophane et de phosphate inorganique, ainsi que la présence de tween 80 et de saccharose. Pour l'ergotamine et l'ergonovine, le tryptophane a un effet significatif (Fig. 5.5C et D). On distingue également que la composition du milieu peut influencer la proportion des alcaloïdes produits. Ainsi, on observe des effets négatifs sur la formation de l'ergotamine et l'ergonovine (Fig. 5.5) dus à la présence de l'acide citrique, du tween 80 et de l'aération. Par contre pour la formation d'autres alcaloïdes DAL (dérivés de l'acide lysergique), ces facteurs montrent un effet positif à l'exception de la source d'azote minérale. En ce qui concerne le rendement $Y_{p/x}$, on observe que celui-ci est affecté positivement par le saccharose, le tryptophane et l'azote minéral et négativement par l'aération, le tween 80, l'acide citrique et le phosphate inorganique (Fig. 5.5B).

Par ailleurs, les cinétiques de production de CO_2 au cours des fermentations, présentent une phase de latence très large qui semble liée à la composition du milieu de culture. Ceci peut être dû à l'augmentation de la pression osmotique du milieu de culture provoquée par l'addition du saccharose, ce qui conduit à un ralentissement de la vitesse de croissance et par conséquent à une faible production de CO_2 . En effet, les cultures relatives aux expériences 1, 2, 7, et 8 présentent une phase de latence d'environ 60 h, quand le saccharose est présent. En l'absence du saccharose, les autres expériences ont une phase de latence d'environ 45 h seulement (Fig. 5.6). On constate qu'une production d'alcaloïdes élevée n'est pas forcément corrélée à la croissance et à la production de CO_2 , mais qu'elle dépend de la composition du milieu de culture utilisé et des conditions environnementales.

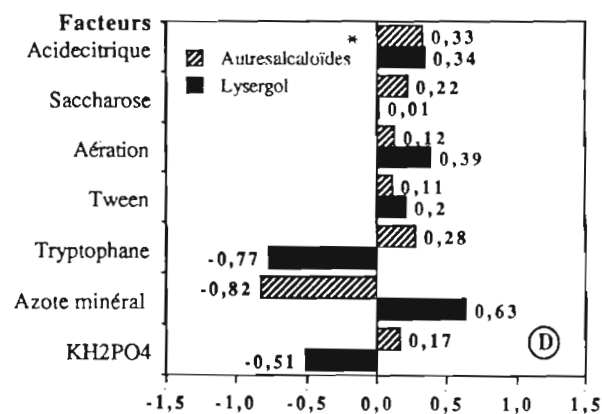
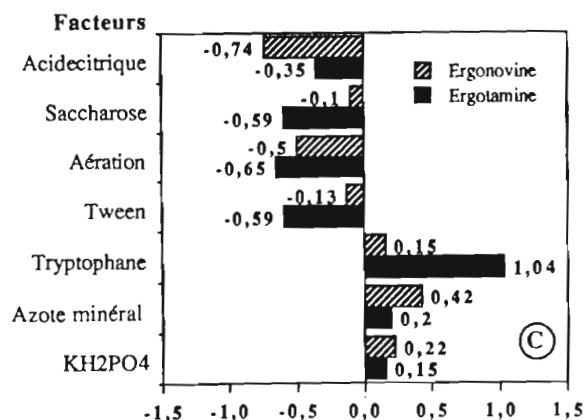
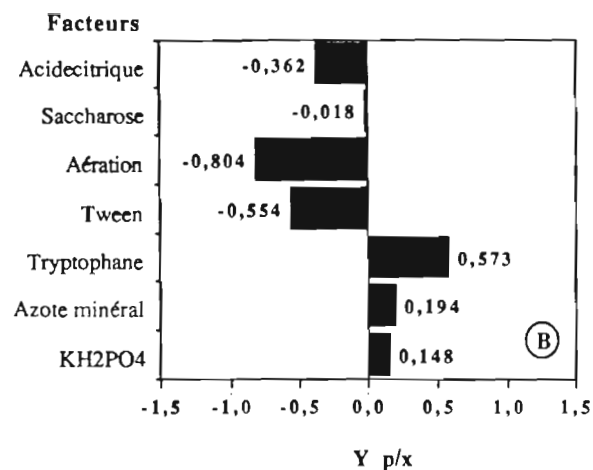
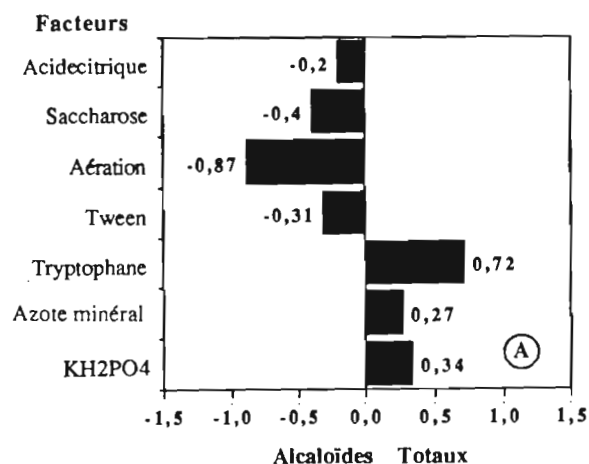


Fig. 5.5 - Représentation graphique de l'effet de différents facteurs sur :

A : Alcaloïdes totaux ; B : Rendement, Y p/x ; C et D : Alcaloïdes individuels * Autres alcaloïdes DAI.

Effet de la composition du milieu de culture

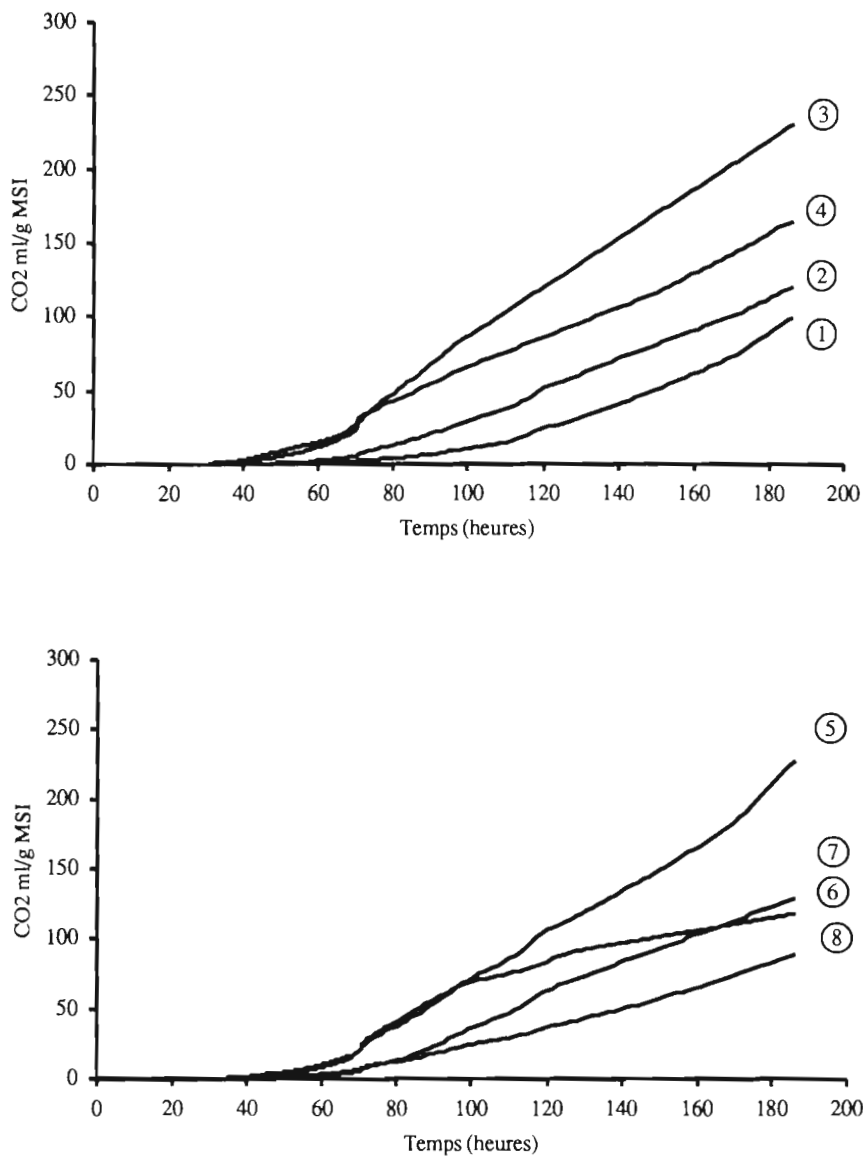


Fig. 5.5.- Effet de la composition de différents milieux de culture sur l'évolution du CO₂ au cours de la croissance de *C. purpurea* sur substrat amylacé. Les numéros (1 à 8) correspondent aux compositions des milieux de culture données dans les tableaux 5.4 et 5.5.

Il est confirmé le rôle du tryptophane comme précurseur dans la biosynthèse des alcaloïdes (ROBBERS et coll., 1978), ainsi que l'influence du phosphate inorganique, de la source de carbone et de l'aération. Finalement, les résultats obtenus lors de cette étude nous ont permis de définir un milieu optimum pour la culture de *C. purpurea* sur substrat amylicé. Pour cela nous avons considéré comme milieu de base, le milieu de culture de l'expérience numéro 7, en prenant en compte les influences négatives des facteurs, avec une diminution de la concentration du phosphate à 0,5 %, du saccharose à 5 %, de l'acide citrique à 0,5 % et sans addition de tween 80 ; les autres facteurs sont utilisés dans le niveau +1 (c.f. Tableau 5.4). La solution minérale et les conditions de travail sont décrites précédemment (§3.3.2).

5.3- Cinétique de la croissance de *C. purpurea* sur substrat amylicé

A partir des résultats obtenus précédemment, nous avons réalisé une étude cinétique pour mieux comprendre l'évolution des différents paramètres au cours de la croissance de *Claviceps purpurea* en FMS. Les résultats sont rapportés sur la fig. 5.7.

En FMS, contrairement aux cinétiques obtenues en culture submergée, on remarque que le rapport entre la biosynthèse des alcaloïdes et la formation de biomasse est moins étroit. En effet, la biosynthèse des alcaloïdes a lieu après la phase de croissance rapide et s'intensifie à partir de la 144^{ème} heure de culture, au moment où la biomasse atteint sa valeur maximale (13,5 g/100 g MSI). On observe également que l'évolution des lipides suit une cinétique similaire à celle de la biomasse, avec une valeur maximale proche de 9 %. L'ensemble s'accompagne d'une chute rapide de la teneur en phosphates durant les premières 72 h de culture. La consommation totale de sucres en fin de culture a été d'environ 69 %, avec une libération des sucres réducteurs d'environ 10 %. Le pH reste pratiquement constant tout au long de la fermentation.

D'après ces résultats, la croissance de *C. purpurea* présente donc deux phases. La première phase correspond à la germination des conidies suivie d'une croissance rapide avec accumulation de lipides. On observe une utilisation rapide du phosphate inorganique et une lente consommation des sucres. La deuxième phase, qui commence après la 72^{ème} heure, est caractérisée par la diminution de la vitesse de croissance et le déclenchement de la biosynthèse des alcaloïdes. Celle-ci est corrélée à une faible teneur en phosphate inorganique dans le milieu de culture. La teneur maximale en alcaloïdes totaux a été d'environ 69 mg/100 g MSI. Le rendement de production (Y_p/x), très variable au cours de la culture, a atteint une valeur maximale de 7 mg/g de biomasse en fin de fermentation. Pour le rendement d'utilisation du substrat (Y_x/s), la valeur finale calculée est égale à $0,14 \pm 0,008$.

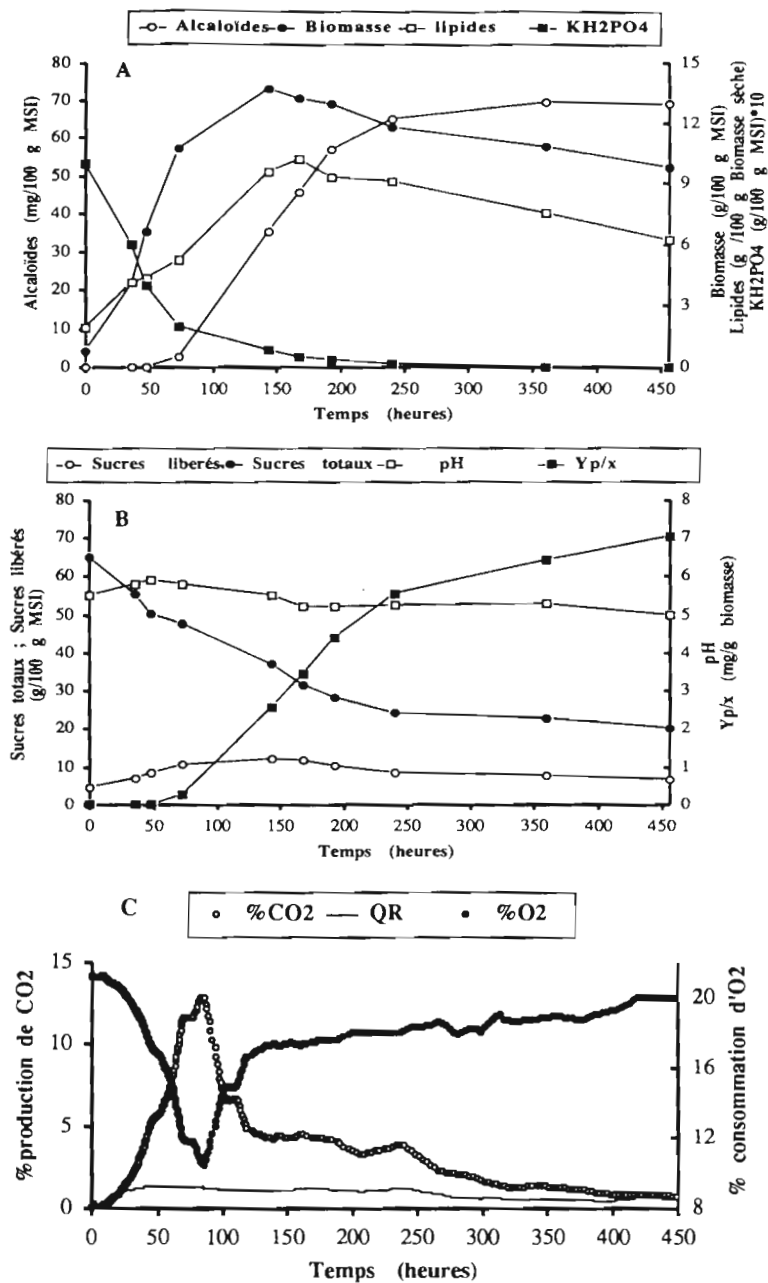


Fig. 5.7.- Evolution des différents paramètres de fermentation au cours de la croissance de *C. purpurea* sur substrat amylacé. Conditions de culture : Inoculum 2×10^7 spores/g S ; pH 5,5 ; Humidité 50 %. A : Evolution de la production d'alcaloïdes, de la biomasse, des lipides, et du KH₂PO₄ ; B : Evolution de sucres totaux et sucres réducteurs libres, et du pH ; C : Evolution des gaz.

Par ailleurs, il est important de noter que l'évolution de la consommation d'O₂ et de la production du CO₂, nous a permis de suivre en continu les activités métaboliques au cours de la fermentation. On observe une production maximale de CO₂ aux alentours de 100 h de fermentation. Le coefficient respiratoire (QR) reste constant dans la première partie et commence à diminuer vers la 250^{ème} heure de culture, atteignant une valeur approximative de 0,6. Ce changement coïncide avec la diminution de la teneur en lipides. D'après TABER (1985), l'utilisation des lipides comme source de carbone peut provoquer une diminution du coefficient respiratoire aux alentours de 0,75.

Le développement de *C. purpurea* sur des substrats amylacés a été étudié par McCREA (1931). Nos travaux confirment que les céréales sont un excellent substrat pour la croissance de *C. purpurea*. Toutefois, la quantité d'alcaloïdes obtenue est similaire à celle trouvée en milieu submergé pour la même souche (c.f. § 4.5.1). Aussi, dans le but d'améliorer la production d'alcaloïdes, nous avons étudié la croissance sur différents substrats solides.

5.4- Effet du milieu de culture sur la production d'alcaloïdes en FMS

Il est important de remarquer que dans les conditions de développement naturel, *Claviceps* a accès à une quantité importante d'eau provenant de l'environnement de la plante hôte. Ceci nous a conduit à proposer l'utilisation de matériaux lignocellulosiques ou de substrats solides ayant une capacité de rétention d'eau élevée. A cet effet, nous avons cultivé *C. purpurea* sur différents milieux solides à 26°C pendant 10 jours (Tableau 5.5). Pour tous les milieux de culture, le prétraitement des différents substrats, après addition de 50 % de la solution minérale, a été réalisé par autoclavage à 121°C pendant 30 min. Cette opération permet d'éliminer un grand nombre de microorganismes présents initialement sur ces matériaux, sachant que le procédé de FMS est réalisé en conditions non stériles. Dans le cas de l'utilisation de mélanges, le substrat amylacé apporte la source de carbone sous forme d'amidon et le matériel lignocellulosique peut avoir aussi bien la fonction de support pour la culture que d'absorbant d'un milieu liquide synthétique.

Dans cette étude, nous avons utilisé la bagasse de canne à sucre, matériel lignocellulosique capable d'absorber environ 5 à 6 fois son poids en eau. L'addition de la bagasse permet d'augmenter l'humidité initiale des milieux de culture dans lesquels la source de carbone est un substrat amylacé (ORIOLE, 1987). Ce matériel lignocellulosique a déjà été utilisé comme support de fermentation par imprégnation de milieux synthétiques pour l'étude du métabolisme de champignons et la production de métabolites (ROUSSOS, 1985 ; ORIOLE, 1987 ; DUFOUR, 1990 ; TREJO-HERNANDEZ et coll., 1991 ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, 1991).

Afin de pouvoir comparer le métabolisme en FmS et FMS, nous avons utilisé la bagasse imprégnée avec deux milieux de culture, MI et MII. Le milieu MI est celui proposé par BANKS et coll. (1974) avec la solution d'oligoéléments décrite précédemment (§ 3.2.5). Le milieu MII (c.f. § 3.2.5) a été proposé par KOBEL et SANGLIER (1986).

Tableau 5.5 .- Composition des milieux de culture pour la croissance de *C. purpurea* en FMS à 26°C pendant 200 h.

n°	Milieu	Humidité initiale %
1*	Semoule de blé	60
2*	Son de blé	70
3*	Grains de blé + 5 % de bagasse	60
4*	Grains de seigle+ son de blé+bagasse (50+30+20)	70
5**	Bagasse imprégnée MI (c.f. 32.4)	70
6	Bagasse imprégnée MII	70

Aération : 60 ml/min/colonne ; Taux d'inoculation 2×10^7 spores/g S. carboné

* Solution minérale (c.f. 3.3.2)

** en g/l : Saccharose 200 ; Sulfate d'ammonium 11,8 ; urée 1,7 et KH₂PO₄ 0,25.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 5.6. L'évolution du CO₂ au cours de ces cultures est représentée sur la fig. 5.8. Cette analyse nous a permis de caractériser la croissance de *C. purpurea* sur ces différents substrats de culture en milieu solide. On observe que les milieux contenant de la semoule de blé et du son de blé (1, 2, 3 et 4 ; fig. 5.6) présentent une production de CO₂ très élevée par rapport aux autres cultures. Cette production de CO₂ est corrélée avec une forte augmentation de la biomasse, mais avec une faible biosynthèse d'alcaloïdes. On constate également que la production d'alcaloïdes la plus élevée a été obtenue sur les milieux synthétiques I et II absorbés sur bagasse, avec des rendements (Y_{p/x}) respectifs de 4,0 et 4,4 mg d'alcaloïdes totaux/g de biomasse PS. La consommation de sucres a été d'environ 60 à 80 %, indiquant que le substrat n'a pas été le facteur limitant de la croissance. Il est important de noter que le pH en fin de fermentation est trop acide et loin de sa valeur optimale pour la production d'alcaloïdes. En culture submergée, les valeurs de pH optima sont aux alentours de 5.2- 5.5 (c.f. chapitre 4).

On constate une production d'alcaloïdes totaux similaire pour les différents milieux de culture. Néanmoins, l'analyse de l'extrait de fermentation par HPLC, nous a permis de déceler des différences de production entre les divers alcaloïdes produits (Tableau 5.7). Ainsi, l'ergonovine constitue environ 32 à 90 % des alcaloïdes totaux dans les milieux à base de seigle. Dans le milieu à base de blé, la proportion d'ergonovine a été de 47 à 93 % avec des pourcentages en lysergol et d'autres alcaloïdes DAL d'environ 7 à 50 %, respectivement.

Tableau 5.6.- Résultats obtenus lors de la croissance de *C. purpurea* en FMS sur différents milieux de culture solides à 26°C pendant 200 heures.

Milieu N°	O ₂ dégagé à 7 jours ml/ g MSI	μ h ⁻¹	Biomasse g/100g MSI	Sucres consommés %	Alcaloïdes mg/100g MSI	Yp/x mg/g	pH
1	406,6	0,10	31 ± 0,5	87,6	25,3	0,8	2,7
2	428,3	0,13	35 ± 0,8	76,1	15,5	0,4	3,9
3	265,3	0,09	40 ± 0,5	86,1	28,7	0,7	2,6
4	352,7	0,12	22 ± 0,6	83,6	30,8	1,4	2,6
5	219,4	0,07	10 ± 0,5	62,9	38,1	4,0	2,3
6	247,9	0,15	10 ± 0,7	66,5	43,6	4,4	2,3

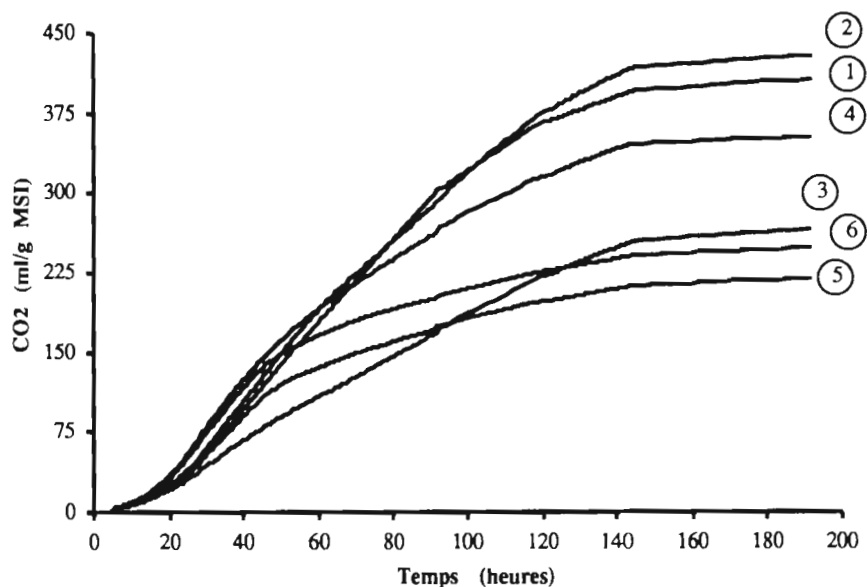


Fig. 5.6 .- Effet de l'utilisation des différents substrats solides sur la formation de CO₂ au cours de la FMS de *C. purpurea* suivie pendant 7 jours. Les numéros (1- 6) correspondent respectivement aux milieux de culture : 1, 2, 3, 4, 5 et 6 (c.f. § 5.).

Tableau 5.7. - Spectre d'alcaloïdes produits lors de la culture de *C. purpurea* sur différents milieux de culture solides à 26 °C pendant 200 heures

Milieu	Alcaloïdes totaux	Ergotamine	Ergonovine	Lysergol	Autres alcaloïdes DAL
	mg/ 100g MSI				
	% d'alcaloïdes totaux				
1	25,3	0,0	52,3	29,7	18,0
2	15,5	0,0	61,0	0,5	38,5
3	28,7	0,0	47,3	41,6	11,1
4	30,8	0,0	72,0	2,6	25,4
5	38,1	0,0	90,2	5,2	4,6
6	43,6	35,5	35,5	1,5	27,5
7	37,7	0,5	93,9	5,2	0,4

Milieux 1-6 (c.f. Tableau 5.5) ; 7 = Grains de blé concassés

En outre, un spectre d'alcaloïdes différent a pu être observé avec l'utilisation de la bagasse de canne à sucre imprégnée du milieu synthétique II contenant du saccharose comme source de carbone. L'ergotamine représentait environ 35 % des alcaloïdes totaux dans ce milieu de culture. Ceci nous a permis de montrer l'effet de la composition du milieu sur le spectre de production d'alcaloïdes ; ces différences de spectre sont essentiellement liées au milieu de culture utilisé (tableau 5.5) (TREJO-HERNANDEZ et coll., 1992a,b).

Il est à noter que l'ergotamine et l'ergonovine sont les alcaloïdes les plus estimés commercialement pour leurs actions pharmacologiques. Toutefois, les autres alcaloïdes DAL sont intéressants car ils servent de base pour la production de nouveaux alcaloïdes par semi-synthèse chimique (Chapitre 2.1).

5.5- Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons constaté que les substrats amylacés constituent une excellente source de carbone pour la croissance de *C. purpurea*. En effet, une croissance rapide et une production d'alcaloïdes importante ont été enregistrées lors de la culture de cette souche sur grains de seigle concassés. L'étude des facteurs environnementaux nous a permis d'obtenir de nombreuses informations concernant le développement de *C. purpurea* en milieu solide sur un substrat amylacé. La sensibilité de la souche à l'humidité initiale du substrat, l'influence du pH et l'auto-régulation de celui-ci par l'addition d'un mélange salin, ainsi que la nécessité d'une inoculation massive ont été d'une grande importance pour la croissance et la production d'alcaloïdes par *C. purpurea*.

Selon les résultats obtenus lors de l'étude nutritionnelle, on a mis en évidence l'influence de

différents facteurs sur la production d'alcaloïdes totaux et la formation de CO₂. Celle-ci a pu être suivie par l'analyse en continu des gaz par CPG. On a pu distinguer l'effet du tryptophane comme précurseur dans la biosynthèse des alcaloïdes, ainsi que l'influence de la source d'azote minéral sur la production d'alcaloïdes (KYBAL, 1973, 1974).

L'application de la méthodologie de contrôle de la FMS, basée sur l'analyse des gaz, nous a permis de suivre en continu le déroulement de la fermentation d'une manière fiable. L'analyse respirométrique pendant la culture permet de connaître l'état physiologique de cette culture à tout instant, sans prélèvement ni perturbation du milieu. De plus, la respirométrie permet également de caractériser la croissance d'une souche par rapport à la composition du milieu de culture et aux conditions environnementales. D'autre part, nous avons pu constater une influence très importante des activités respiratoires sur la croissance et la production d'alcaloïdes.

L'utilisation de bagasse de canne à sucre comme support solide, favorise notablement la culture de *C. purpurea* sur différents mélanges de substrats et permet de travailler avec des teneurs en eau variables. La diffusion des gaz est également nettement améliorée, ce qui se traduit par une croissance plus élevée. Selon les études réalisées par McCREA (1931), une humidité élevée est indispensable pour l'obtention d'une croissance typique de *C. purpurea*.

Dans ces conditions, la biosynthèse d'alcaloïdes est différente selon le milieu. En particulier, les analyses réalisées à partir des échantillons de fermentation nous ont permis de déceler des différences qualitatives et quantitatives au niveau du spectre d'alcaloïdes produit selon le milieu de culture utilisé. Ainsi, on a pu remarquer une production élevée d'ergonovine avec des pourcentages supérieurs à 72 % d'alcaloïdes totaux sur un milieu à base de grains de blé, tandis qu'un pourcentage d'ergotamine d'environ 35 % d'alcaloïdes totaux était obtenu sur milieu de culture synthétique contenant du saccharose comme source de carbone et imprégné sur de la bagasse de canne à sucre.

Ces résultats semblent originaux et la technique de culture sur support imprégné offre de nouvelles perspectives pour l'étude de la physiologie et du métabolisme des espèces de *Claviceps*. Nous avons particulièrement mis en évidence le rôle de l'aération, de l'humidité et de la source de carbone sur la croissance ainsi que l'effet précurseur du tryptophane pour la biosynthèse des alcaloïdes chez *C. purpurea*.

L'application de la technique de FMS avec support imprégné pour la production d'alcaloïdes par *C. purpurea* a fait l'objet des études rapportées dans le chapitre suivant.

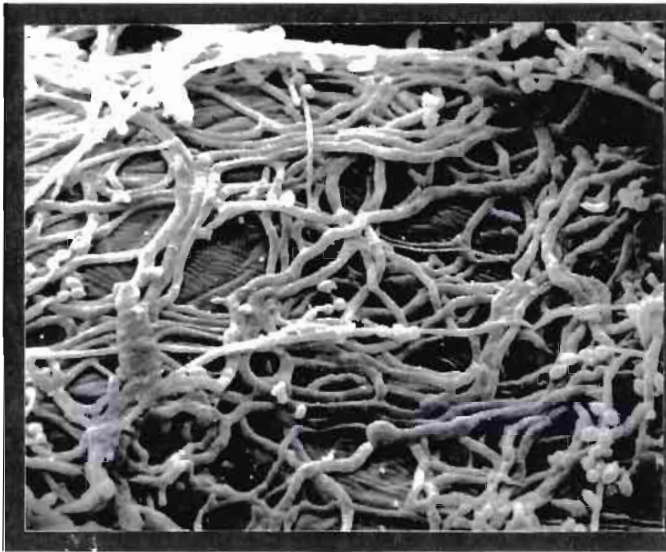


Photo 5.1.- *Claviceps purpurea* cultivé sur substrat amylicé durant 5 jours.
Microscopie électronique à balayage (x1000).



Photo 5.2.- *Claviceps purpurea* cultivé sur substrat amylicé durant 5 jours.
Microscopie électronique à balayage (x2000) (c.c. Annexe B).

6. BIOSYNTHESE D'ALCALOIDES PAR *CLAVICEPS PURPUREA* SUR SUPPORT IMPREGNE

Introduction

La croissance de *Claviceps* sur le seigle ou d'autres céréales dans la nature correspondrait aux conditions d'une culture en milieu solide. D'après les résultats obtenus sur la croissance de *C. purpurea* sur substrats amylacés (c.f. chapitre 5), nous nous sommes aperçus que l'addition d'un matériel lignocellulosique à forte rétention d'eau permettait de travailler à des teneurs en eau supérieures aux optima établis pour des matériaux amylacés.

Il nous a donc paru intéressant d'appliquer cette technique sur support imprégné. Elle nous permet d'utiliser un substrat à l'état dissous directement absorbable sur une matrice solide nutritionnellement inerte. La bagasse de canne à sucre, utilisée comme support inerte, permet de travailler avec des substrats solubles de composition déterminée. Ceci permet d'une part, de choisir des substrats simples non limitants pour la croissance, et d'autre part, de faciliter l'étude de l'influence de chaque constituant sur le métabolisme du microorganisme. Cette technique présente des avantages vis à vis de l'utilisation de substrats insolubles qui par leur complexité, ne permettent pas d'évaluer efficacement l'influence de chaque nutriment. Ainsi, cette méthodologie nous a permis d'étudier le métabolisme et la croissance de *C. purpurea* selon quatre étapes :

- L'étude du profil fermentaire pour connaître l'évolution des différents paramètres au cours de la culture de *C. purpurea* en FMS sur support imprégné.
- Le criblage à l'aide de plans d'expériences des principaux facteurs nutritionnels et environnementaux influençant la production d'alcaloïdes.
- L'étude selon un plan factoriel fractionnaire de l'effet des facteurs essentiels sur la production d'alcaloïdes et sur le rendement en alcaloïdes rapporté à la biomasse.
- Une étude cinétique de la production d'alcaloïdes sur le milieu de culture proposé.

6.1- Profil fermentaire au cours de la culture sur support imprégné

Pour l'étude cinétique de *C. purpurea* sur support imprégné, nous avons utilisé le milieu d'imprégnation décrit précédemment (c.f. § 3.2.4). Les conditions de culture ont été les suivantes : 70 % d'humidité, inoculum de 2×10^7 spores/g support, pH 5,2, température d'incubation de 26°C et durée de la fermentation de 15 jours (TREJO-HERNANDEZ et coll., 1992a).

Les résultats de l'étude cinétique sont regroupés dans la fig. 6.1. La biomasse de *C. purpurea* a été suivie par le dosage de la glucosamine. Cette méthode est la mieux adaptée pour la détermination de la biomasse en culture solide, car elle permet de doser quantitativement et sans interférences, la chitine (polymère de glucosamine) présente dans la paroi cellulaire du champignon (§ 3.7.1). Nous avons pu ainsi suivre l'évolution de la biomasse et mettre en évidence plusieurs phases de croissance. En particulier, nous avons observé une phase de croissance rapide à partir de 24 h d'incubation, puis une diminution nette de la teneur en biomasse après 140 h. La valeur maximale de la biomasse estimée par la glucosamine a été voisine de 10 g/100 g MSI.

On a pu également constater que la biosynthèse des alcaloïdes démarre après 60 h, lorsque la teneur en phosphate inorganique diminue de 70 % environ. Cette production d'alcaloïdes atteint un maximum lorsque le phosphate inorganique est totalement assimilé. VAIDYA et DESAI (1982) ont montré qu'une concentration élevée de phosphate dans le milieu de culture peut inhiber le complexe enzymatique nécessaire à la production d'alcaloïdes, mais la présence de phosphate est nécessaire à la croissance du champignon.

Nous avons constaté également une accumulation de lipides aux premières heures de la croissance (environ 6 %), puis une diminution de ceux-ci, corrélée à la production d'alcaloïdes. Le même phénomène a également été observé avec une autre souche de *C. purpurea* 129, lorsque le nitrate d'ammonium est utilisé comme source d'azote (DESAI et REHACEK, 1982). KREN et coll. (1984) ont considéré que la production de lipides, et plus particulièrement la synthèse de l'acide ricinoléique est un indicateur biochimique de la différenciation morphologique et biochimique du mycélium. Cependant, ils n'ont pas trouvé de corrélation avec la synthèse des alcaloïdes.

Par ailleurs, on a observé que l'humidité augmente légèrement entre la 48^{ème} et la 72^{ème} heure de fermentation pour se stabiliser autour de 77 %. Cette augmentation de l'humidité au cours de la croissance est essentiellement due à la libération d'eau par respiration du microorganisme. On a donc confirmé que la bagasse est capable d'adsorber davantage d'eau que la quantité initialement introduite (rapport maximum eau/bagasse p/p d'environ 6), (figure 6.1B). Une consommation de sucres totaux d'environ 62 % a été notée en fin de fermentation.

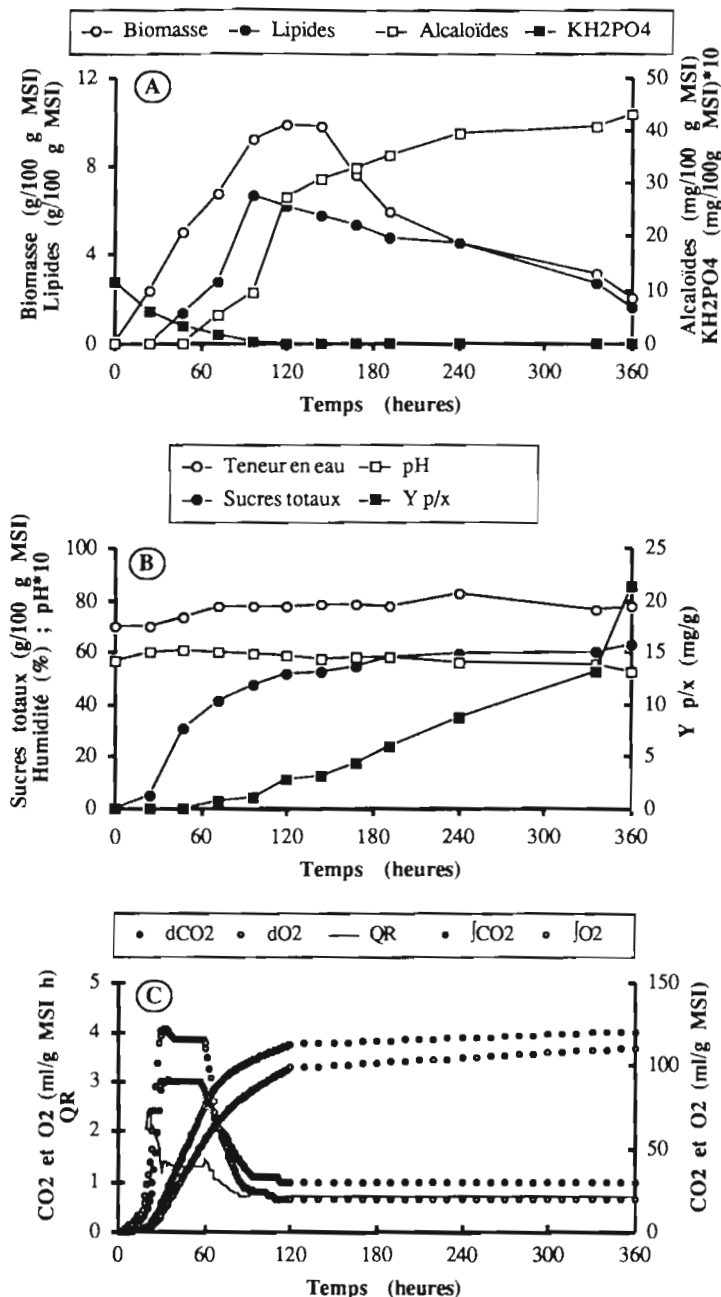


Fig. 6.1.- Evolution de différents paramètres de fermentation au cours de la croissance de *C. purpurea* sur support imprégné. Inoculum 2×10^7 spores/g support ; pH 5,5, Humidité 70 %. A : Evolution de la production d'alcaloïdes, de la biomasse, des lipides, et du KH_2PO_4 ; B : Evolution de sucres totaux, du pH, de la teneur en eau et du $Y_{p/x}$; C : Evolution des gaz.

Le pH de la fermentation reste presque constant tout au long de la culture, avec des valeurs proches de 5,6. Le suivi du métabolisme respiratoire réalisé par l'analyse en continu de O₂ et du CO₂ a permis d'identifier deux différentes phases au cours de la fermentation : une phase de croissance caractérisée par un coefficient respiratoire (QR) proche de l'unité, qu'on retrouve généralement lors de la respiration du glucose par les microorganismes, et une phase stationnaire avec un QR plus faible d'environ 0,7, qui est attribué à la respiration des lipides. Une valeur inférieure à l'unité a été obtenue par TABER (1985) lors de l'utilisation de lipides dans le développement du sclérote de *Claviceps purpurea*.

D'après cette étude cinétique, il semble donc que le comportement de *C. purpurea* en FMS sur support imprégné est similaire à celui rencontré pour la croissance sur substrats amylacés. Il est également confirmé que l'épuisement du phosphate est corrélé à la formation d'alcaloïdes. La production d'alcaloïdes obtenue sur support solide imprégné est bien inférieure à ce qu'on obtient sur les substrats amylacés. Toutefois, le rendement en alcaloïdes (21 mg d'alcaloïdes/g de biomasse PS) est nettement supérieur pour le même temps d'incubation. Ceci peut s'expliquer par une diminution de la biomasse de *C. purpurea* vers la 150^{ème} heure de fermentation.

Dans le but d'améliorer la production d'alcaloïdes et de déterminer l'influence de différents facteurs nutritionnels, nous avons réalisé une étude de leurs effets en utilisant la méthodologie des plans d'expériences. Cette démarche nous a permis de réaliser un criblage des facteurs et de connaître leur influence globale sur le métabolisme de *C. purpurea* cultivé sur support imprégné.

6.2- Criblage des facteurs intervenant dans la production d'alcaloïdes

A partir des résultats obtenus lors de l'étude nutritionnelle sur substrat amylacé (5.5), nous avons pu mettre en évidence les effets de différents facteurs sur la production d'alcaloïdes. Ainsi, le tryptophane, l'acide citrique, le phosphate, le saccharose et la source d'azote ont présenté des effets significatifs sur la production d'alcaloïdes. C'est pourquoi il a été indispensable de les inclure dans les facteurs pouvant influencer la biosynthèse des alcaloïdes de *C. purpurea* sur support imprégné. Afin de compléter cette étude, nous avons également pris en considération d'autres facteurs importants. Pour cela, nous nous sommes aidés des travaux rapportés à ce sujet dans la littérature, ainsi que de nos résultats obtenus jusqu'à présent.

Nous avons inclus dans cette étude de nouveaux facteurs nutritionnels comme le sulfate de magnésium, le nitrate de calcium, l'oxalate d'ammonium et des précurseurs d'alcaloïdes comme les acides aminés (valine et proline). KOBEL et SANGLIER (1978) ont en effet, rapporté que l'addition d'acides aminés peut influencer la proportion des alcaloïdes produits. La régulation de la

production d'alcaloïdes de type ergotoxine peut être induite par l'addition de valine (PUC et coll., 1987). De même, la proline et la valine (c.f. § 2.1) font partie des aminoacides que l'on rencontre dans la structure tripeptidique des alcaloïdes de type ergopeptidique.

Les facteurs sélectionnés ont donc été les suivants : la nature de la source de carbone naturelle (farine de seigle) ou synthétique (saccharose) ; la nature de la source d'azote (sulfate d'ammonium+urée et oxalate d'ammonium+urée) ; le phosphate inorganique ; l'acide citrique ; le tween 80 ; trois acides aminés : le tryptophane, la valine et la proline ; l'aération. Ces facteurs ont été étudiés simultanément avec la méthodologie des plans d'expériences. A cet effet, une matrice d'HADAMARD avec onze facteurs ($N=12$ expériences) a été utilisée. La matrice d'expériences est représentée dans le tableau 6.1. Les onze facteurs ont été étudiés à 2 niveaux (c.f. tableau 6.2).

Les résultats obtenus sur la production d'alcaloïdes totaux, la production de CO_2 , le rendement en alcaloïdes rapportés à la biomasse ($Y_{p/x}$), le pH et la distribution des alcaloïdes produits sont rapportés dans les tableaux 6.3 et 6.4. L'évolution du CO_2 tout au long de la fermentation est présentée sur la fig. 6.2. Les réponses obtenues ont été transformées selon la méthode de normalisation des coefficients décrite précédemment (§ 5.3) (Fig. 6.3 et 6.4).

Discussion

Dans cette étude, on constate que les paramètres de croissance et de production d'alcaloïdes de *C. purpurea* évoluent différemment en fonction des milieux testés. Le champignon a pu se développer dans tous les milieux proposés, mais la production d'alcaloïdes obtenue a été très variable (Tableau 6.3). De plus, les taux de croissance spécifique (μ) calculés à partir du Ln de la production de CO_2 , présentent des valeurs qui vont de 0.01 à 0.06 h^{-1} pour 4 milieux et de 0,1 à 0,17 h^{-1} pour les autres milieux. Ceci démontre l'effet très marquant de la composition des milieux de culture sur ces réponses.

Le pH final des différents milieux a été très variable (4,86 à 8,56). Ce phénomène peut être attribué aux différentes interactions entre les nutriments. L'utilisation des sources azotées et l'effet régulateur de l'acide citrique sur le pH, peuvent être responsables des variations importantes du pH final et par voie de conséquence, de celles enregistrées sur la croissance et la production d'alcaloïdes. La production d'alcaloïdes totaux se situe entre 2,5 et 25 mg/100 g MSI à 120 h de fermentation. C'est le milieu de culture n°10 qui a donné la production la plus intéressante, ainsi que le rendement le plus élevé.

Tableau 6.1.- Matrice d'expériences avec valeurs codées des différents facteurs

Expérience n°	Niveau des facteurs n°										
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	1
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Tableau 6.2.- Correspondance entre niveaux codés et niveaux réels

Facteurs	Unité	Niveaux réels des facteurs	
		- 1	+ 1
X1 = Source de carbone Farine de seigle ; Saccharose	g/l	Saccharose 200	Farine de seigle 200
X2 = Source d'azote Oxalate-NH3 ; Sulfate-NH3	g/l	Oxalate-NH3 2,5 azote total	Sulfate-NH3 2,5 azote total
X3 = KH2PO4	g/l	0,5	1
X4 = MgSO4 · 7 H2O	g/l	0,25	0,625
X5 = Ca(NO3)2	g/l	1	2,5
X6 = Ac. Citrique	g/l	5	10
X7 = Tween 80	g/l	5	10
X8 = Valine	mM/l	25	50
X9 = Proline	mM/l	25	50
X10 = Tryptophane	g/l	0,5	1
X11 = Aération	l/h/60 g support	2	4

Tableau 6.3.- Résultats expérimentaux obtenus avec matrice d'HADAMARD (N=12) pendant 120 heures de fermentation

Milieu No.	CO ₂ formé	μ	Alcaloïdes Totaux	Biomasse	Y _{p/x}	pH final
	ml / g MSI	h ⁻¹	mg / 100g MSI	g/100 g MSI	mg/g	
1	23,7	0,01	0,0	2,5	0,0	7,75
2	70,4	0,10	3,0	7,1	0,4	5,12
3	33,6	0,04	0,0	4,2	0,0	8,56
4	74,1	0,15	5,3	4,5	1,2	4,89
5	82,0	0,10	2,8	7,3	0,4	6,07
6	75,9	0,10	2,5	7,5	0,3	7,91
7	46,8	0,17	6,2	5,4	1,2	8,14
8	28,5	0,01	0,0	2,7	0,0	6,53
9	45,9	0,13	3,7	3,9	1,0	5,54
10	76,9	0,14	25,9	5,4	4,8	4,99
11	78,2	0,14	7,8	6,2	1,3	7,91
12	80,3	0,06	0,0	7,2	0,0	6,28

Tableau 6.4.- Spectre d'alcaloïdes produits lors de la croissance de *C. purpurea* cultivé sur différents milieux (Matrice d'HADAMARD N=12)

Milieu No.	spectre d'alcaloïdes, % d'alcaloïdes totaux			
	Ergotamine	Ergonovine	Lysergol	Autres alcaloïdes DAL
1	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,0	48,3	2,3	49,4
3	0,0	0,0	0,0	0,0
4	0,5	32,5	7,5	59,5
5	4,6	27,6	17,4	50,4
6	0,0	36,5	0,0	63,5
7	0,0	38,6	11,0	50,4
8	0,0	0,0	0,0	0,0
9	0,0	19,4	18,9	61,7
10	0,7	33,4	9,7	56,2
11	0,0	51,3	11,1	37,7
12	0,0	0,0	0,0	0,0

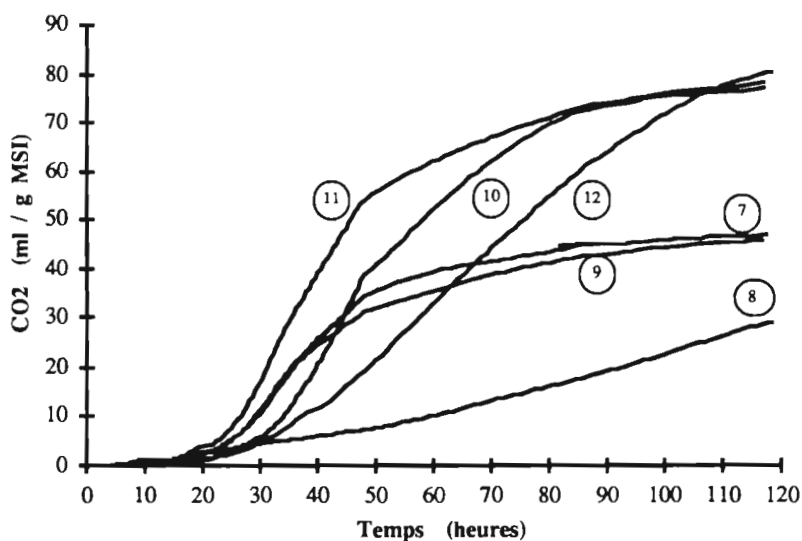
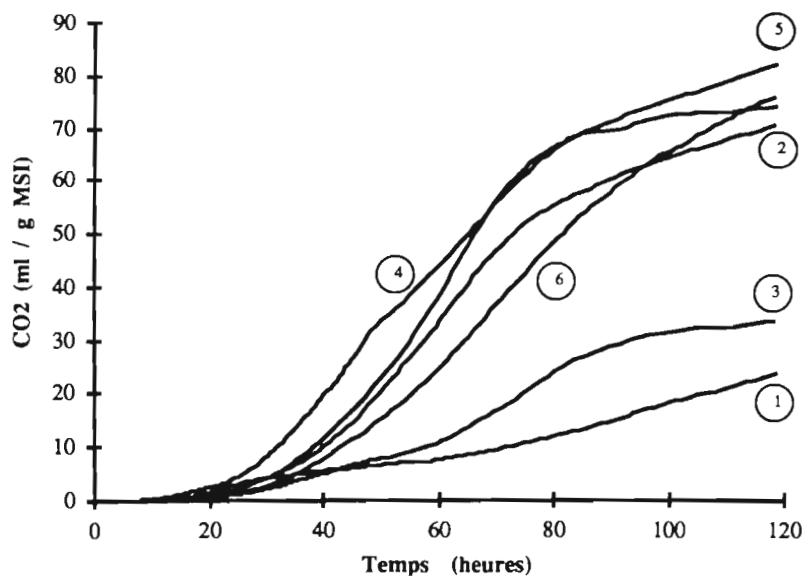


Fig. 6.2.- Effet de la composition de différents milieux de culture sur l'évolution du CO₂ au cours de la culture de *C. purpurea* sur support imprégné. Les numéros (1 à 12) correspondent aux compositions des milieux de culture données dans les tableaux 6.3 et 6.4.

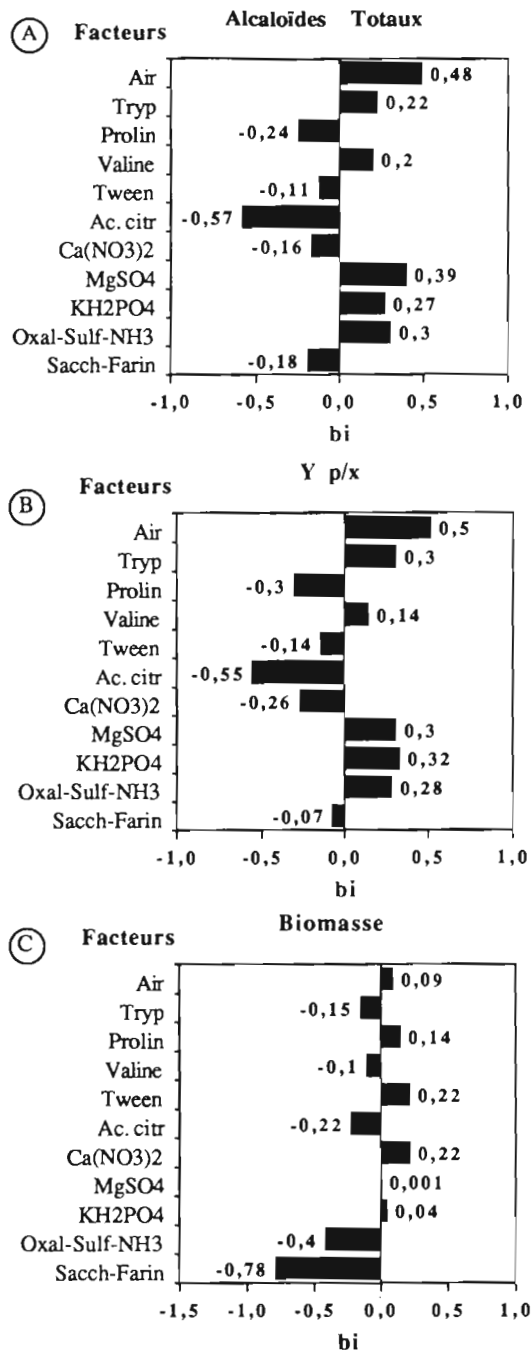


Fig. 6.3.- Analyse graphique des effets des facteurs sur A : la production d'alcaloïdes totaux ; B : Y p/x ; C : formation de la biomasse.

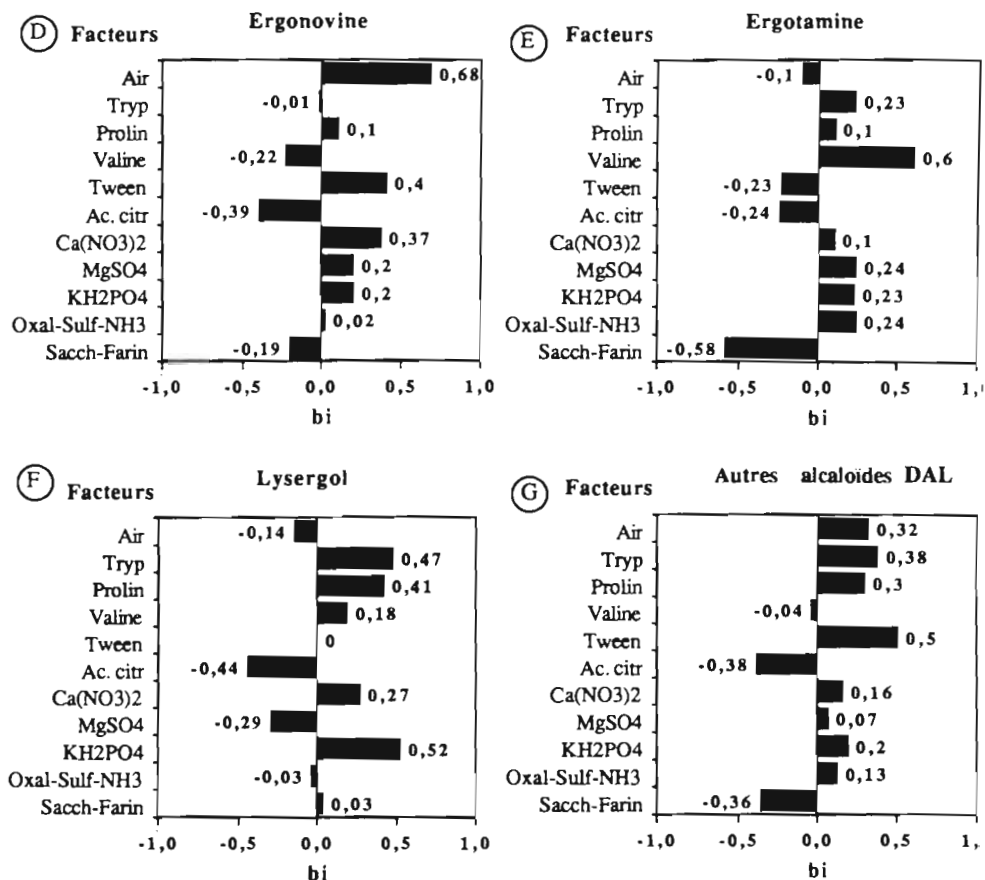


Fig. 6.4.- Analyse graphique des effets des facteurs sur la formation d'alcaloïdes individuels.
D : Ergonovine ; E : Ergotamine ; F : Lysergol et G : Autres alcaloïdes DAL.

En ce qui concerne la distribution des différents alcaloïdes produits, on distingue des différences significatives de spectres en fonction du milieu utilisé (tableau 6.4). On observe que la composition du milieu liquide imprégné influence directement l'obtention d'un alcaloïde recherché. C'est ainsi que l'ergotamine n'est produite que sur les milieux 4, 10 et 5. Ce dernier est nettement plus performant avec une proportion de 4,6 % d'ergotamine par rapport aux alcaloïdes totaux. On note également que le milieu 6 ne permet pas de synthèse de lysergol. Enfin, l'ergonovine et d'autres alcaloïdes sont présents en quantités importantes dans presque tous les milieux de culture. L'ergonovine et d'autres alcaloïdes DAL représentent respectivement de 19 % à 50 % et 37 à 60 % des alcaloïdes totaux.

Les graphiques d'analyse (fig. 6.3) des effets des 11 facteurs considérés, révèlent l'influence positive de 6 facteurs sur la production d'alcaloïdes : l'aération, le tryptophane, le sulfate de magnésium, le sulfate d'ammonium, le phosphate inorganique et le saccharose. Ces mêmes facteurs ont également une influence positive sur le rendement en alcaloïdes rapporté à la biomasse. Pour la biomasse, les facteurs qui présentent une forte influence sont l'aération, la proline, le tween, le nitrate de calcium et le phosphate inorganique. On constate que l'oxalate d'ammonium et le saccharose sont utilisés préférentiellement par rapport au sulfate d'ammonium et à la farine de seigle, respectivement.

Par ailleurs, l'addition des acides aminés a un effet plus marqué sur les alcaloïdes individuels (fig. 6.4). En effet, on constate que le tryptophane, la proline et la valine ont un effet significatif sur la formation de l'ergotamine, du lysergol et d'autres alcaloïdes. Pour l'ergonovine, une influence peu significative a été observée avec le tryptophane et la proline ; seule la valine a un effet négatif sur la formation de cet alcaloïde. Les sources d'azote et de carbone utilisées préférentiellement ont été respectivement le sulfate d'ammonium et le saccharose. D'autre part, l'acide citrique présente un effet fortement négatif sur la formation des alcaloïdes individuels. En outre, l'aération influence fortement la biosynthèse de l'ergonovine et d'autres alcaloïdes DAL.

Nous venons donc de mettre en évidence les effets des facteurs étudiés en constatant que le saccharose, l'aération, l'addition d'acides aminés affectent significativement la biosynthèse des alcaloïdes. Contrairement à des études réalisées en FSm (GLUND et coll., 1979 ; PAZOUTOVA et REHACEK, 1981), l'acide citrique affecte négativement la formation des alcaloïdes de *C. purpurea* 1029c en FMS. Ces résultats confirment les résultats obtenus lors de l'étude nutritionnelle sur substrat amylacé.

L'influence positive du saccharose a déjà été décrite. Ce sucre a, en effet été utilisé comme source de carbone dans la culture de la plupart des souches de *Claviceps* pour la production d'alcaloïdes. Il constitue la principale source de carbone pour le développement de *Claviceps* sous en conditions naturelles (CORBETT et coll., 1974).

L'aération a également été considérée comme un facteur très important pour la culture de ces souches. Elle peut influencer directement le spectre d'alcaloïdes produits (MILICIC et coll., 1989). D'autre part, l'effet stimulateur des acides aminés (valine, proline et autres) sur la biosynthèse d'alcaloïdes du type peptidique a fait l'objet de nombreuses études (KOBEL et SANGIER, 1978 ; BEACCO et coll., 1978 ; SPALLA et MINGHETTI, 1989). Le tryptophane présente la double fonction d'inducteur et de précurseur de la biosynthèse d'alcaloïdes (GROGER et coll., 1960 ; TYLER, 1961 ; VINING, 1970 ; ROBBERS et coll., 1972).

De notre étude, nous avons retenu l'influence prépondérante du tryptophane, de l'aération, du phosphate inorganique, du pH initial et du sulfate d'ammonium. En ce qui concerne la nature de la source de carbone, nous avons observé que pour la production d'alcaloïdes, le saccharose avait un effet plus significatif que la farine de seigle. Un deuxième plan d'expériences factoriel fractionnaire a été réalisé, pour déterminer les effets principaux des différents facteurs essentiels.

6.3- Etude des facteurs essentiels sur la production et le rendement Y p/x

A partir des résultats obtenus dans l'étude précédente, de nouvelles expériences ont été mises en place, afin de contrôler l'influence du saccharose et de la farine de seigle, du tryptophane, du phosphate inorganique, du sulfate d'ammonium, du pH et de l'aération. Pour cela, un plan factoriel 2^{7-1} a été réalisé (c.f.5.3). Le domaine expérimental considéré pour cette étude et la matrice d'expériences sont exposés dans les tableaux 6.5 et 6.6.

Les résultats concernant la production d'alcaloïdes totaux, le rendement Y p/x et la biomasse, ainsi que d'autres paramètres de la fermentation de *C. purpurea* sont reportés dans le tableau 6.7. Les cinétiques du CO₂ sont représentées dans la fig. 6.5. D'après les résultats expérimentaux, nous pouvons distinguer une production d'alcaloïdes allant de 0,4 à 77 mg/100 g MSI avec des rendements Y p/x qui varient de 0,1 jusqu'à 7.8 mg /g de biomasse sèche (tableau 6.7).

Différents profils de production de CO₂ ont été observés, en fonction du milieu de culture utilisé (fig. 6.5).

Tableau 6.5 .- Matrice d'expériences avec valeurs codées des différents facteurs

Expérience No.	Niveau des facteurs n°						
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
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

Tableau 6.6 .- Correspondance entre niveaux codés et niveaux réels

Facteurs	Unité	Niveaux réels des facteurs	
		- 1	+ 1
X1 = Farine de seigle	g/l	20	40
X2 = Saccharose	g/l	100	200
X3 = Tryptophane	g/l	0,6	1,2
X4 = sulfate d'ammonium+urée (azote total*)	g/l	80/20	70/30
X5 = KH ₂ PO ₄	g/l	1	2
X6 = pH		5,2	6
X7 = Aération	ml/min/colonne	40	80

60 g MS/colonne ; Humidité 70 % ; * 2,7 g/l

Tableau 6.7.- Résultats expérimentaux obtenus avec le plan d'expérience 2⁷⁻⁴ (à 200 h de fermentation)

Milieu n°	Alcaloïdes totaux mg/100 g MSI	CO ₂ dégagé à 5 jours ml/g MSI	Biomasse g/100g MSI	Y p/x mg/g	pH final
1	2,5	83,9	11,4	0,2	4,8
2	0,4	90,4	12,1	0,0	5,8
3	14,9	121,0	14,2	1,1	5,1
4	23,8	84,1	10,9	2,2	6,1
5	77,2	111,8	9,9	7,8	5,3
6	19,8	73,0	7,2	2,8	5,9
7	46,5	91,2	11,5	4,0	4,9
8	30,4	52,3	5,3	5,7	5,6

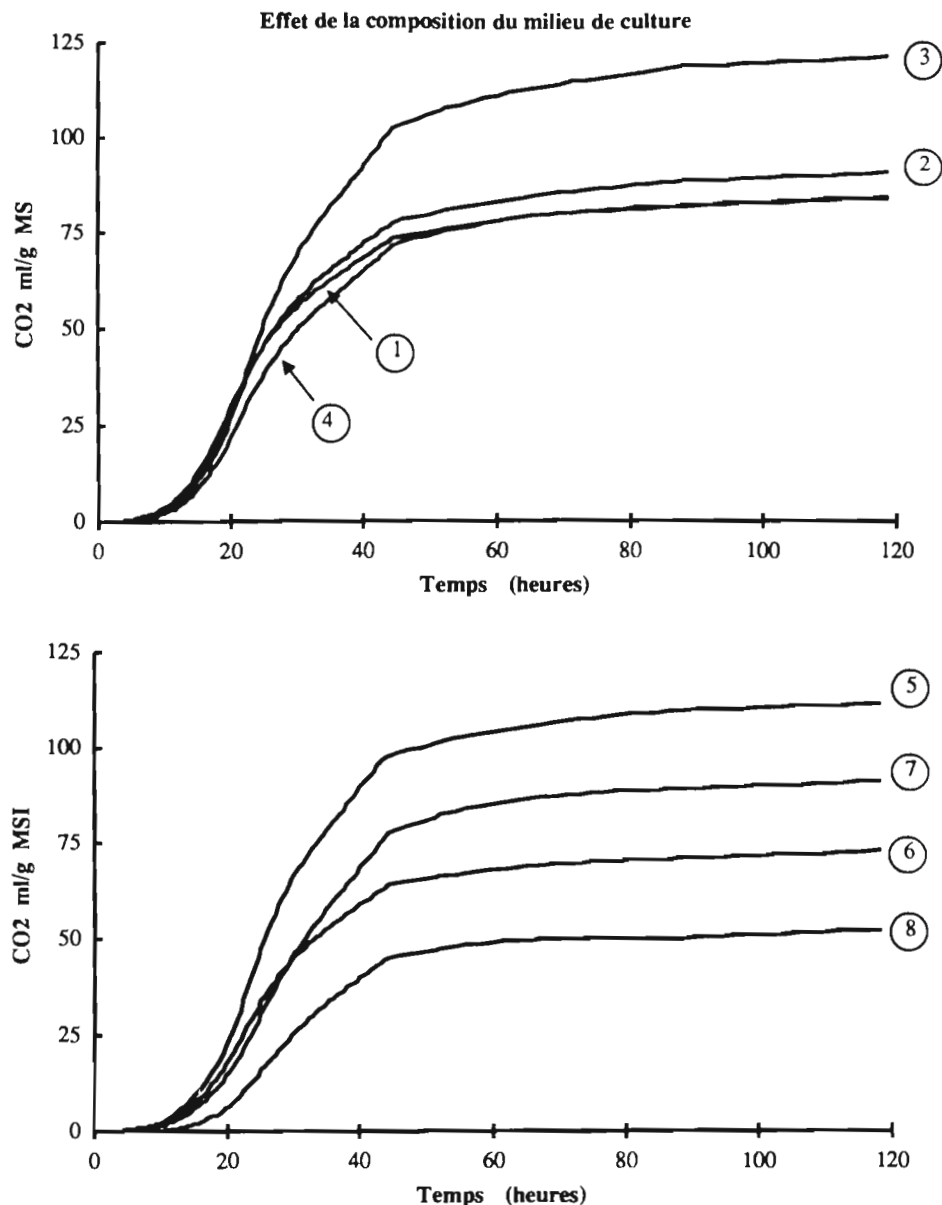


Fig. 6. 5.- Effet de la composition de différents milieux de culture sur l'évolution du CO₂ au cours de la croissance de *C. purpurea* sur support imprégné (Plan factoriel 2⁷⁻¹). Les numéros (1 à 8) correspondent aux compositions des milieux de culture données dans les tableaux 6.5 et 6.6.

Discussion

On remarque que dans les milieux où les concentrations en saccharose et farine de seigle étaient élevées (niveau + 1), la biomasse du champignon a été plus faible. On constate également que la phase de latence a été plus longue dans ce cas (expériences 8 et 4). Par contre, dans les milieux où la concentration de saccharose et de farine a été faible (niveau -1), la biomasse a été plus importante (expériences 5 et 3). Il est à noter que le milieu de l'expérience 5 présente une production d'alcaloïdes élevée.

A partir de l'analyse graphique des effets, nous pouvons constater l'influence positive de quatre facteurs importants sur la production d'alcaloïdes totaux : l'aération, la combinaison sulfate d'ammonium-urée, le tryptophane et le saccharose (fig. 6.6A). Ces facteurs ont été également positifs pour le rendement en alcaloïdes Y p/x (fig. 6.6B).

Des effets négatifs ont été observés avec le pH initial, le phosphate inorganique et la farine de seigle. Le phosphate inorganique en concentration élevée, a un effet négatif sur la biosynthèse des alcaloïdes en inhibant des enzymes responsables de la synthèse de ces alcaloïdes (WAART et TABER, 1960 ; ROBBERS et coll., 1972). On remarque qu'un pH initial de 5,2 est plus favorable au rendement et à la production d'alcaloïdes qu'un pH de 6. Par ailleurs, l'addition de farine de seigle présente un effet négatif sur les réponses étudiées.

Il est à remarquer que presque tous les facteurs étudiés présentent un effet négatif sur la formation de biomasse, dans le domaine expérimental considéré. On constate que les conditions de culture favorables à la production d'alcaloïdes ne sont pas nécessairement les meilleures pour la formation de la biomasse (Fig. 6.6C). En fonction des résultats obtenus, la composition du milieu de culture la plus favorable pour la production d'alcaloïdes a pu être établie en considérant les effets des différents facteurs. Ainsi, le milieu suivant dont la composition est donnée en g/l, peut être proposé :

Saccharose	200
Tryptophane	1
KH ₂ PO ₄ ,	0,625
MgSO ₄	0,625,
(NH ₄) ₂ SO ₄ -urée :	70/30 (azote total 2,5)
Sels minéraux complémentaires (c.f. 3.2.4)	
pH	5,2
Aération	60 ml/min/colonne

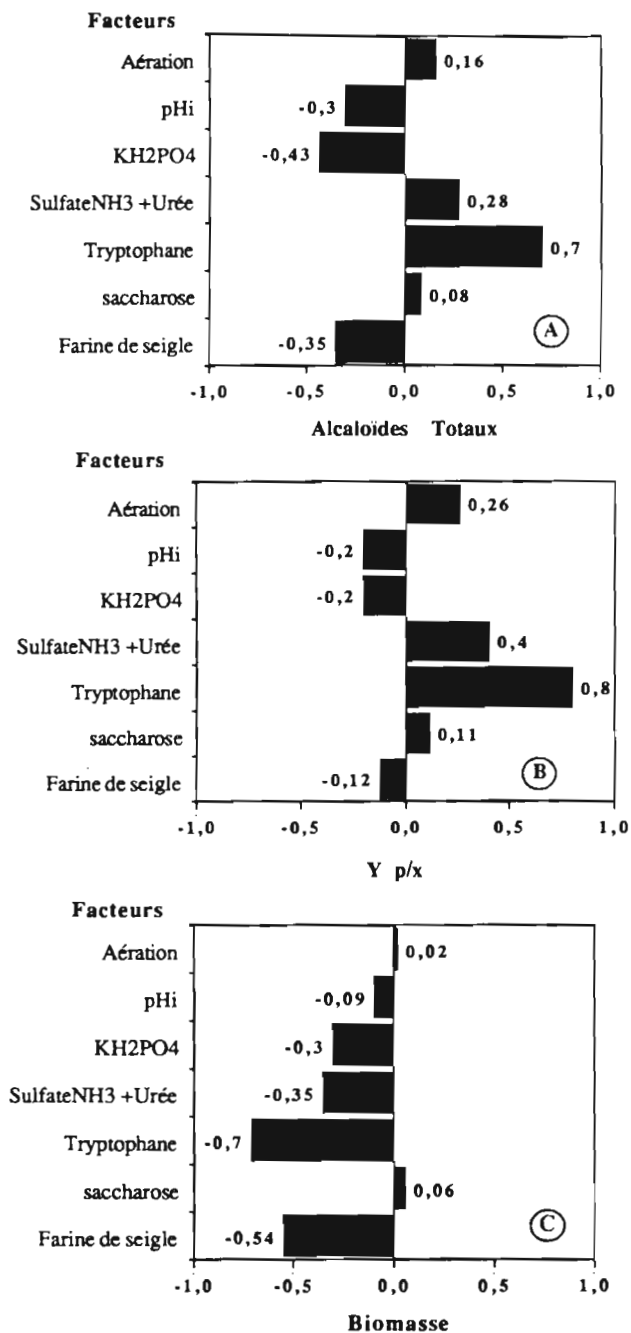


Fig. 6.6.- Analyse graphique des effets des facteurs sur : A Production d'alcaloïdes totaux ; B : Y p/x et C : Formation de biomasse. Résultats obtenus avec le plan factoriel fractionnaire 2⁷⁻⁴.

6.4- Cinétique de production d'alcaloïdes par *C. purpurea* sur support imprégné

Afin de constater si les niveaux des variables réelles préconisées sont proches de la réalité, une expérience de contrôle a été réalisée dans les mêmes conditions de culture en FMS. Pour cela, une étude cinétique de l'évolution de la production d'alcaloïdes, de la formation de la biomasse et du rendement en alcaloïdes a été menée dans les conditions préconisées en 6.3. Les résultats sont reportés sur la fig. 6.7.

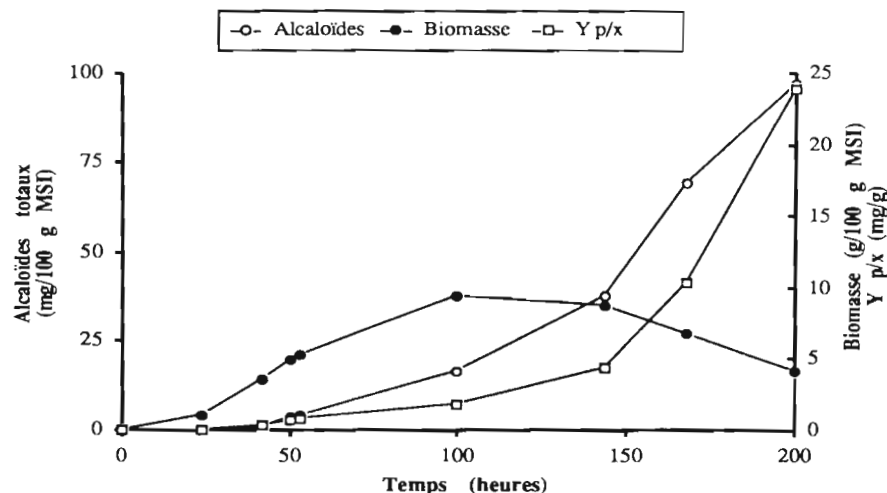


Fig. 6.7.- Evolution cinétique de différents paramètres de la croissance de *C. purpurea* en FMS sur support imprégné. Conditions : pH 5.2, Humidité 70 %, aération de 60 ml/min/60 g MH à 26°C. Evolution de la production d'alcaloïdes, de la formation de biomasse et du rendement $Y_{p/x}$.

La culture de *C. purpurea* en FMS sur support imprégné, a permis d'obtenir avec le milieu proposé une production d'alcaloïdes totaux d'environ 96,7 mg/100 g MSI et une biomasse d'environ 4,1 g/100 g MSI, soit un rendement en alcaloïdes d'environ 23 mg/g de biomasse PS. Le rendement obtenu avec ce milieu de culture est supérieur à ceux obtenus pour la culture de *C. purpurea* sur substrat amylacé et à celui obtenu en FSm pour le même temps d'incubation. Ces résultats sont donc encourageants, et montrent que la culture sur support imprégné permet d'obtenir une production élevée d'alcaloïdes de nature intéressante par les souches de *Claviceps*. Il est confirmé que celles-ci sont très sensibles aux variations de la composition du milieu de culture et au système de culture utilisé (KOBEL et coll., 1962 ; SPALLA, 1969 ; BREUEL et coll., 1982).

6.5- Conclusion

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons étudié les différents paramètres de fermentation de *C. purpurea*, cultivé en FMS sur support imprégné. Ceci nous a permis de constater que la production d'alcaloïdes est corrélée à une croissance lente, accompagnée de l'accumulation de lipides. L'ensemble des changements biochimiques de la culture, ont été liés à une chute rapide de la concentration de phosphate inorganique. En effet, le ralentissement de la croissance semble corrélé à l'appauvrissement du milieu en phosphate inorganique, et la biosynthèse d'alcaloïdes a lieu lorsque ce dernier est totalement épuisé. Ce comportement a été également observé lors de la croissance de *C. purpurea* sur substrat amylicé. Cependant, un rendement nettement supérieur a été obtenu lors de la croissance de *C. purpurea* sur support pour le même temps d'incubation (environ 21 mg d'alcaloïdes/g de biomasse sèche à 360 h de fermentation).

L'étude des facteurs nutritionnels et environnementaux nous a permis de déterminer les facteurs principaux qui ont une forte influence sur la production et le rendement en alcaloïdes. Ainsi, pour cette première étude, nous avons mis en évidence l'influence du tryptophane (comme inducteur de la biosynthèse), de la source d'azote, de la source de carbone, de l'aération, l'effet stimulateur des acides aminés ainsi que l'effet négatif du phosphate inorganique. En outre, cette étude nous a permis de confirmer l'influence des facteurs nutritionnels et physico-chimiques sur le spectre d'alcaloïdes produits. En effet, la qualité et la quantité des alcaloïdes changent en fonction de la composition du milieu de culture liquide imprégné et des conditions de culture.

Les résultats obtenus dans la deuxième étude confirment les connaissances sur la physiologie de la culture de *C. purpurea* en FMS. Ainsi, le saccharose, l'aération, le phosphate inorganique et le tryptophane ont été les principaux facteurs déterminants de la production d'alcaloïdes et du rendement en alcaloïdes ($Y_{p/x}$).

Ces résultats nous ont permis de proposer un nouveau milieu pour la culture de *C. purpurea* sur support. La culture de cette souche dans ce milieu a confirmé les résultats précédents. Une production d'alcaloïdes totaux d'environ 96 mg /100 g MSI et un rendement d'environ 23 mg d'alcaloïdes/g de biomasse sèche ont été obtenus après 200 h de fermentation. Ceci correspond bien à une productivité de 2,7 mg d'alcaloïdes /g de biomasse sèche/jour en FMS, soit plus de trois fois supérieure à celle obtenue en FSm (environ 0,7) .

Nos résultats sur la production d'alcaloïdes par *C. purpurea* 1029c montrent que la fermentation en milieu solide avec comme support la bagasse de canne à sucre, offre des alternatives intéressantes pour la production d'alcaloïdes.

Ces résultats sont très encourageants, mais dépendent également de la souche étudiée. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier une autre espèce productrice d'alcaloïdes : *C. fusiformis*. Comme *C. fusiformis* ne produit pas de conidies, nous avons été amenés à modifier légèrement le procédé de culture de FMS sur support imprégné.

7. BIOSYNTHESE D'ALCALOIDES PAR *C. FUSIFORMIS* EN FMS

Introduction

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la croissance de *C. fusiformis* en milieu solide. A cet effet, des études ont été entreprises afin d'adapter la culture de cette souche sur des substrats amylacés et sur des supports imprégnés. Dans le premier cas, les résultats obtenus pour la croissance du champignon sont négatifs. Malgré les efforts réalisés, nous nous sommes aperçus que les substrats amylacés ne permettent qu'une croissance lente de *C. fusiformis*, favorisant par la même les contaminations par d'autres microorganismes. Ainsi, l'étude de cette souche en FMS n'a été réalisée que sur support imprégné. Une étude cinétique en FMS sur bagasse de canne à sucre a permis de mieux connaître l'évolution des différents paramètres de la croissance de *C. fusiformis*. Des études concernant la source de carbone et le niveau d'aération ont été réalisées afin d'optimiser le développement de *C. fusiformis*.

Par la suite, nous avons étudié l'influence de la teneur en saccharose et en phosphate inorganique, du tryptophane et de l'aération sur le déroulement de la fermentation, en utilisant la méthodologie des plans d'expériences.

7.1- Etude cinétique de la croissance de *C. fusiformis* en FMS

Pour cette étude cinétique, nous avons utilisé le milieu d'imprégnation décrit par BANKS et coll. (1974) avec une solution minérale décrite précédemment (c.f.3.2.4). Les conditions de culture ont été les suivantes : inoculum 2×10^7 spores/g support ; pH 5,5 ; humidité 70 % ; température d'incubation 26°C et durée de fermentation 10 jours. Les résultats de l'étude cinétique sont rapportés sur la fig. 7.1.

Contrairement aux résultats obtenus au cours de l'étude cinétique en culture submergée, on observe en FMS que la corrélation entre la biosynthèse d'alcaloïdes et la formation de la biomasse (estimée par le dosage de la glucosamine) est moins étroite qu'en culture submergée (c.f.4.5.2). En effet, il existe un décalage entre la biosynthèse d'alcaloïdes et la croissance du champignon ; la première a lieu après la phase de croissance rapide et atteint un maximum vers la 240^{ème} heure de fermentation, alors que la deuxième atteint son maximum vers la 168^{ème} heure (7 g/100g MSI). Ceci s'accompagne d'une accumulation de lipides d'environ 6 % avec une cinétique similaire à celle de la biomasse.

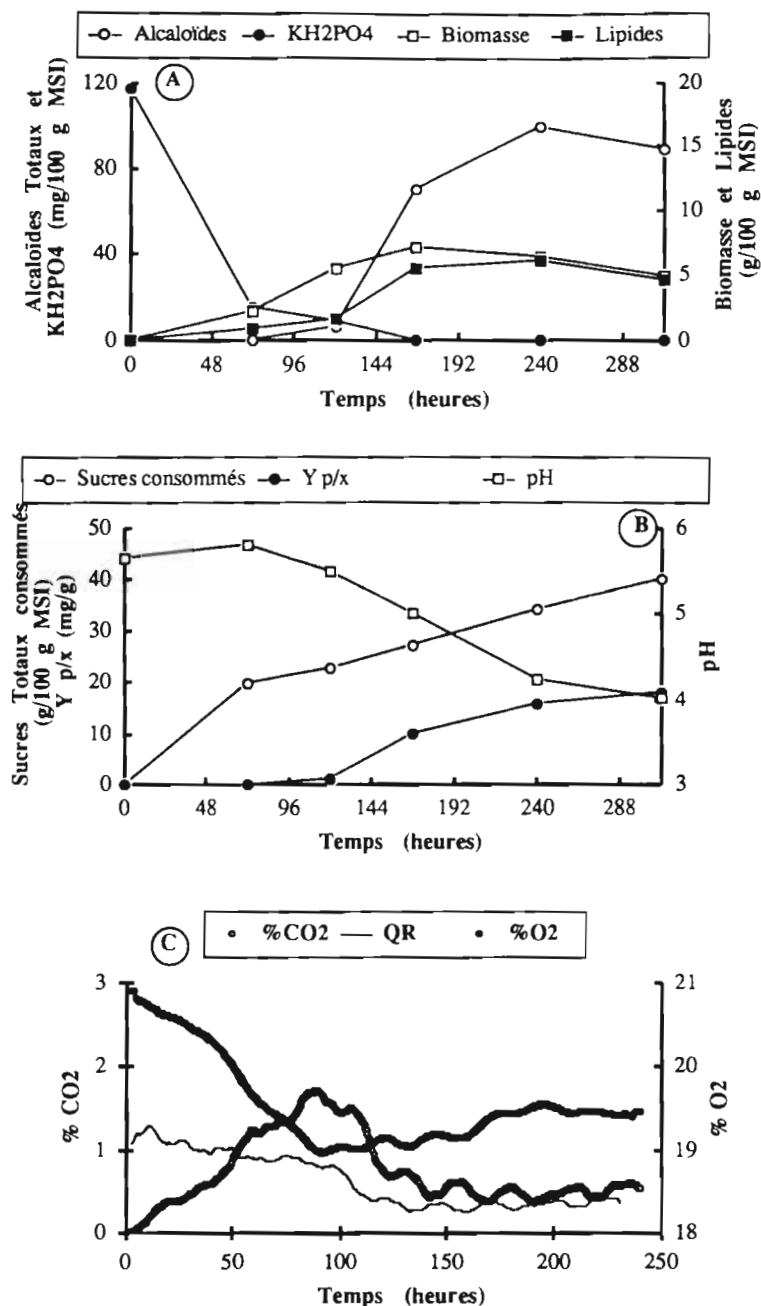


Fig. 7.1.- Evolution de différents paramètres de fermentation au cours de la croissance de *C. fusiformis* sur support imprégné. Inoculum 2×10^7 spores/g support ; pH 5,5, Humidité 70 %. A : Evolution de la production d'alcaloïdes, de la biomasse, des lipides, et du KH₂PO₄ ; B : Evolution des sucres totaux, du pH, et du Y_{p/x} ; C : Evolution des gaz.

En fin de fermentation, la production d'alcaloïdes rapportée à la biomasse produite atteint une valeur d'environ 18,02 mg/g de biomasse et une production totale de 127 mg/100 g MSI en 13 jours de culture. Sur le plan de la productivité, le rendement $Y_{p/x}$ est environ deux fois plus élevé en FMS qu'en FSm. On notera que *C. purpurea* présentait presque la même productivité en FMS qu'en FSm.

Quant à l'évolution du phosphate inorganique, on observe une diminution rapide pendant les premières heures de fermentation, et un épuisement total vers la 168^{ème} heure, corrélé à une diminution de la vitesse de croissance. En culture submergée, ce n'est qu'après 240 h qu'on note un épuisement total du phosphate inorganique dans le milieu de culture. Cependant, la formation d'alcaloïdes en FMS et en FSm commence quand la teneur en phosphate devient limitante.

La consommation des sucres est lente et s'accompagne d'une légère acidification du milieu dans les premières heures de fermentation. En fin de culture, seuls 40 % des sucres ont été consommés (valeur inférieure à celle observée pour la culture en milieu submergé). Le pH évolue ici aussi différemment : au début de la fermentation, il reste quasiment constant, puis il diminue lentement pour atteindre une valeur finale de 4. Cette acidification du milieu peut être évitée en augmentant la quantité d'urée dans le milieu de culture.

L'évolution du CO₂ et de O₂ est différente de celle observée pour *C. purpurea* en FMS. Au début de la fermentation, des cinétiques similaires sont observées pour la production de CO₂ et pour la consommation de O₂ avec un coefficient respiratoire proche de 1. Ensuite, on remarque que la consommation de O₂ est supérieure à la production de CO₂, indiquant un déséquilibre de la croissance qui se traduit par une diminution nette du coefficient respiratoire (proche de 0,5).

Par la suite, des études concernant le choix de la source de carbone et de l'aération ont été réalisées afin d'établir les meilleures conditions de culture et d'optimiser la composition du milieu de base pour la culture de *C. fusiformis*.

7.2- Effet de la source de carbone et de l'aération

Les travaux précédents ont montré l'importance de la source de carbone et de l'aération sur le métabolisme de *C. purpurea* 1029. Ceci nous a amenés à étudier ces paramètres pour *C. fusiformis*. La concentration des différentes sources de carbone a été fixée à 100 g/l avec un rapport C/N de 40, favorable pour la production d'alcaloïdes en FmS. Pour chaque essai, deux niveaux d'aération ont été testés : 20 et 40 ml/min/colonne (contenant 60 g de milieu solide MH).

D'après les résultats obtenus (c.f. Tableau 7.1), *C. fusiformis* est capable de produire des alcaloïdes en utilisant les différentes sources de carbone testées, mais c'est sur le saccharose qu'on obtient le meilleur rendement en alcaloïdes rapportés à la biomasse produite (soit environ 16,9 mg/g).

Le saccharose semble également correspondre à la source de carbone la plus favorable pour la production d'alcaloïdes de *C. fusiformis*. Il serait métabolisé suivant la séquence glycolytique ou suivant les réactions du cycle oxydatif des pentoses (REHACEK et SAJDL, 1990). D'autre part, on constate l'importance de l'aération sur la croissance et sur la production d'alcaloïdes. Une aération de 40 ml/min/colonne semble être la plus favorable.

Par ailleurs, l'évolution du CO₂ durant la fermentation nous a permis de caractériser la croissance sur ces différentes sources de carbone. Ainsi, on observe que pour le mannitol et glycérol+glucose, la quantité d'air introduite affecte fortement la production de CO₂ (une faible aération conduisant à une faible production de CO₂), alors que pour le saccharose et l'amidon, la production de CO₂ est presque identique quelque soient les niveaux d'aération.

Ainsi, pour les études postérieures, nous avons retenu le saccharose comme source de carbone et une aération de 40 ml/min/colonne.

Tableau 7.1 .- Effet de la source de carbone et de l'aération sur la production d'alcaloïdes par *C. fusiformis* en milieu solide imprégné à 26°C pendant 13 jours.

Source de carbone	Substrat g/l	Aération ml/min/colonne*	Alcaloïdes mg/ 100g MSI	Y p/x mg/g	CO ₂ formé ml/g MSI**
1 Mannitol (1)	100	40	50,4	9,1	92,7
		20	35,7	7,7	66,5
2 Saccharose(2)	100	40	73,5	16,9	114,4
		20	62,6	14,3	117,8
3 Amidon soluble	100	40	39,6	5,9	40,3
		20	31,6	4,1	51,9
4 Glucose + glycérol	(70+30) 100	40	28,4	5,3	85,6
		20	14,6	4,6	21,6

1. (DESAI et coll., 1983 ; GABERC-POREKAR et coll., 1987) ; 2. (ERGE et coll, 1984)

* 60 g MH/ colonne (c.f. 3.5.5) ; ** à 7 jours d'incubation

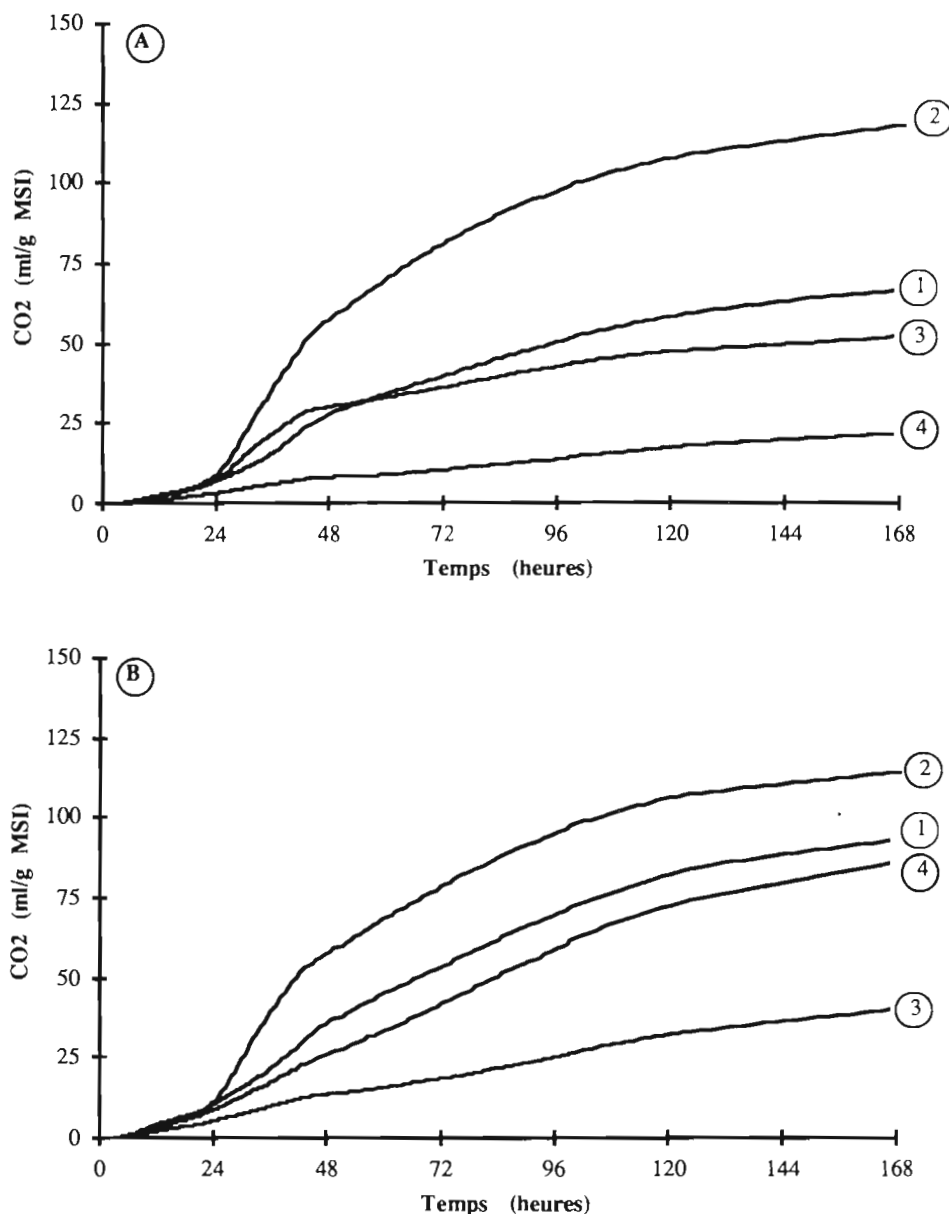


Fig. 7.2 - Effet de l'aération sur la formation de CO₂ au cours de la croissance de *C. fusiformis* sur bagasse imprégnée avec différentes sources de carbone. Les numéros 1, 2, 3 et 4 correspondent au mannitol, saccharose, amidon soluble et glucose+glycérol, respectivement.
A : 20 et B : 40 ml/min/colonne (60 g de MH) ; Humidité 70 % ; pH 5, 2 à 26°C pendant 7 jours.

7.3- Définition des facteurs essentiels pour la production d'alcaloïdes par *C. fusiformis*

Les résultats précédents ont démontré l'importance du saccharose, du phosphate inorganique et du tryptophane sur la biosynthèse des alcaloïdes. De même, nous avons remarqué l'influence de l'aération lors de la culture de souches de *Claviceps* en FMS (Chapitres 5 et 6).

Les effets de ces facteurs sur la production d'alcaloïdes par *C. fusiformis* et le rendement en alcaloïdes rapporté à la biomasse ($Y_{p/x}$) seront étudiés simultanément en utilisant la méthodologie des plans d'expériences. La croissance microbienne étant considérée comme une réponse complémentaire, l'objectif de cette étude a consisté à établir les effets de chaque facteur contrôlé dans le domaine expérimental considéré.

Pour cette étude, un plan centré composé rotatif a été utilisé (BOX et WILSON, 1951). Ce plan d'expérimentation comporte 5 niveaux pour chaque facteur. Les niveaux des facteurs ont été choisis en considérant les résultats précédemment obtenus pour *C. purpurea* et *C. fusiformis*. Les niveaux sont codés : -2, -1, 0, +1, et +2 pour lesquels le centre 0 représente la concentration en milieu de base (c.f. 3.2.4).

Dans les tableaux 7.2 et 7.3 sont représentés respectivement la correspondance des niveaux codés et réels et la matrice d'expérience pour un plan composé rotatif avec quatre facteurs contrôlés. Les résultats expérimentaux sur la production d'alcaloïdes totaux, le rendement $Y_{p/x}$ et la production de biomasse de *C. fusiformis* sont présentés dans le tableau 7.4. L'effet des facteurs est ainsi modélisé sous la forme du polynôme de second degré

$$Y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j + e$$

avec,

- Y = réponse
- b_0 = terme constant (centre)
- x_i = variables expérimentales (codées)
- b_i = coefficients des termes linéaires
- b_{ii} = coefficients des termes quadratiques
- b_{ij} = coefficients des termes d'interaction de 1^{er} ordre
- e = erreur expérimentale ou résidu

Grâce à ce modèle, les effets des facteurs sur les réponses et les niveaux optimaux des divers facteurs étudiés peuvent être déterminés (dérivées des facteurs x_i par rapport à Y). Le calcul des coefficients ainsi que l'analyse statistique à partir des résultats obtenus du plan centré composé, ont été effectués sur un ordinateur de type PC-compatible à l'aide du logiciel NEMROD (New Efficient for Research using Optimal Design) mis au point par la Société L.P.R.A.I., Aix-en-Provence, France (MATHIEU et PHAN TAN LUU, 1982).

Tableau 7.2 .- Correspondance entre les niveaux codés et réels des facteurs étudiés

Facteur	Niveaux codés des facteurs				
	Concentrations expérimentales (g/l)				
	-2	-1	0	1	2
X_1 = Saccharose	150	175	200	225	250
X_2 =KH ₂ PO ₄	0,2	0,6	1	1,4	1,8
X_3 = Tryptophane	0,2	0,4	0,6	0,8	1
X_4 = Aération *	20	30	40	50	60

* ml/mn/colonne ; Colonne : 60 g MH

Tableau 7.3 .- Structure du plan centré composé pour l'étude de 4 facteurs contrôlés.

Combinaisons (Nr.)	Niveaux codés des facteurs				
	X_1	X_2	X_3	X_4	
1	-	-	-	-	Plan factoriel 2^4
2	+	-	-	-	
3	-	+	-	-	
4	+	+	-	-	
5	-	-	+	-	
6	+	-	+	-	
7	-	+	+	-	
8	+	+	+	-	
9	-	-	-	+	
10	+	-	-	+	
11	-	+	-	+	
12	+	+	-	+	
13	-	-	+	+	
14	+	-	+	+	
15	-	+	+	+	
16	+	+	+	+	
17	-2	0	0	0	4 x 2 Points axiaux
18	2	0	0	0	
19	0	-2	0	0	
20	0	2	0	0	
21	0	0	-2	0	
22	0	0	2	0	
23	0	0	0	-2	
24	0	0	0	2	
25 à 36	0	0	0	0	Point central répété

Tableau 7.4 .- Résultats obtenus au cours de la croissance de *C. fusiformis* (Plan centré composé)

EXP. N°	Alcaloïdes mg/100 g MSI Y1	Y p/x mg d'alcaloïdes /g Biomasse Y2	Biomasse g/100g MS Y3
1	42,80	6,37	6,72
2	68,92	61,05	1,13
3	16,31	6,62	2,46
4	98,58	31,22	3,16
5	112,25	104,71	1,07
6	105,25	37,46	2,81
7	53,92	12,24	4,40
8	95,25	102,75	0,93
9	60,51	36,02	1,68
10	74,65	46,86	1,59
11	60,15	14,94	4,03
12	95,69	57,99	1,65
13	53,23	87,49	0,61
14	101,25	69,92	1,45
15	67,36	13,06	5,16
16	102,36	38,83	2,64
17	82,36	52,64	1,56
18	90,06	34,54	2,61
19	45,56	36,15	1,26
20	14,30	9,06	1,58
21	40,25	19,16	2,10
22	105,25	165,11	0,64
23	63,26	29,50	2,14
24	24,56	9,69	2,54
25	56,20	21,91	2,57
26	52,20	24,19	2,16
27	51,50	25,58	2,01
28	55,61	26,85	2,07
29	51,60	28,07	1,84
30	53,20	28,06	1,90
31	54,80	31,80	1,72
32	51,20	19,97	2,56
33	57,20	23,65	2,42
34	51,32	28,48	1,80
35	54,10	21,34	2,54
36	51,30	20,23	2,54

7.3.1- Analyse de la variance

D'après les analyses de la variance obtenues pour les réponses Y1 (alcaloïdes totaux) et Y2 (rendement Y p/x), il en résulte un rapport F (rapport entre le carré moyen de régression et le carré moyen résidu) de 4,43 ($P < 0,01$) et 4,29 ($P < 0,01$) respectivement (ci-dessous).

Réponse Y1

Source de variation	Somme de carrés	Degrés liberté	Carré moyen	Rapport F	P
Régression	16614,49	14	1186,749	4,43	< 0,01
Résidu	5625,069	21	267,8604		
Total	22239,56	35			

Coefficient de Regression multiple (R^2) 0,7471

Réponse Y2

Source de variation	Somme de carrés	Degrés liberté	Carré moyen	Rapport F	P
Régression	27858,39	14	1989,885	4,29	< 0,01
Résidu	9740,484	21	463,826		
Total	37598,87	35			

Coefficient de Regression multiple (R^2) 0,7409

La comparaison, en terme de rapport F, permet de tester la validité du modèle. Si ce rapport n'est pas significatif, c'est-à-dire ne dépasse pas une valeur seuil théorique en fonction des degrés de liberté et du seuil de probabilité choisi, la conclusion sera que les erreurs autour du modèle sont de la même grandeur que celles dans l'évaluation de chaque point. Le modèle est alors adéquat. Toutefois, pour notre travail nous avons fixé $P < 0,001$ et pour une meilleure adéquation du modèle, nous avons décidé d'éliminer quelques expériences. Pour cela, nous avons considéré la normée, qui est définie comme le rapport entre la différence ($Y_{exp.} - Y_{cal.}$) et l'écart type de l'estimation. Les valeurs de la normée dépassant l'unité sont donc celles où l'écart dû au modèle est plus important que la variance expérimentale.

Ceci peut aussi être représenté par les graphiques de résidus en fonction des réponses calculées à partir du modèle (Fig. 7.3). Les expériences ayant des résidus très éloignés de ceux calculés par les modèles, sont considérées par la suite comme des expériences supplémentaires (Tableau 7.6 et 7.7).

7.3.2- Analyse statistique

Après suppression de 5 expériences présentant un grand écart par rapport au modèle réjeté, l'analyse de la variance de chaque réponse étudiée montre une meilleure adéquation du modèle (ci-dessous). En effet, les nouveaux rapports F calculés représentent des seuils de probabilité inférieurs à 0,001. Le modèle est cette fois-ci validé.

Réponse Y1

Source de variation	Somme des carrés	Degrés liberté	Carré moyen	Rapport F	P
Régression	16592,7	14	1185,193	30,21	< 0,001
Résidu	627,7159	16	39,23224		
Total	17220,42	30			

Coefficient de Régression multiple (R^2) 0,9635

Ecart-type de l'estimation : 6,263

Réponse Y2

Source de variation	Somme des carrés	Degrés liberté	Carré moyen	Rapport F	P
Régression	18791,86	14	1342,27	25,32	< 0,001
Résidu	848,167	16	53,01044		
Total	19640,03	30			

Coefficient de Régression multiple (R^2) 0,9568

Ecart-type de l'estimation : 7,280

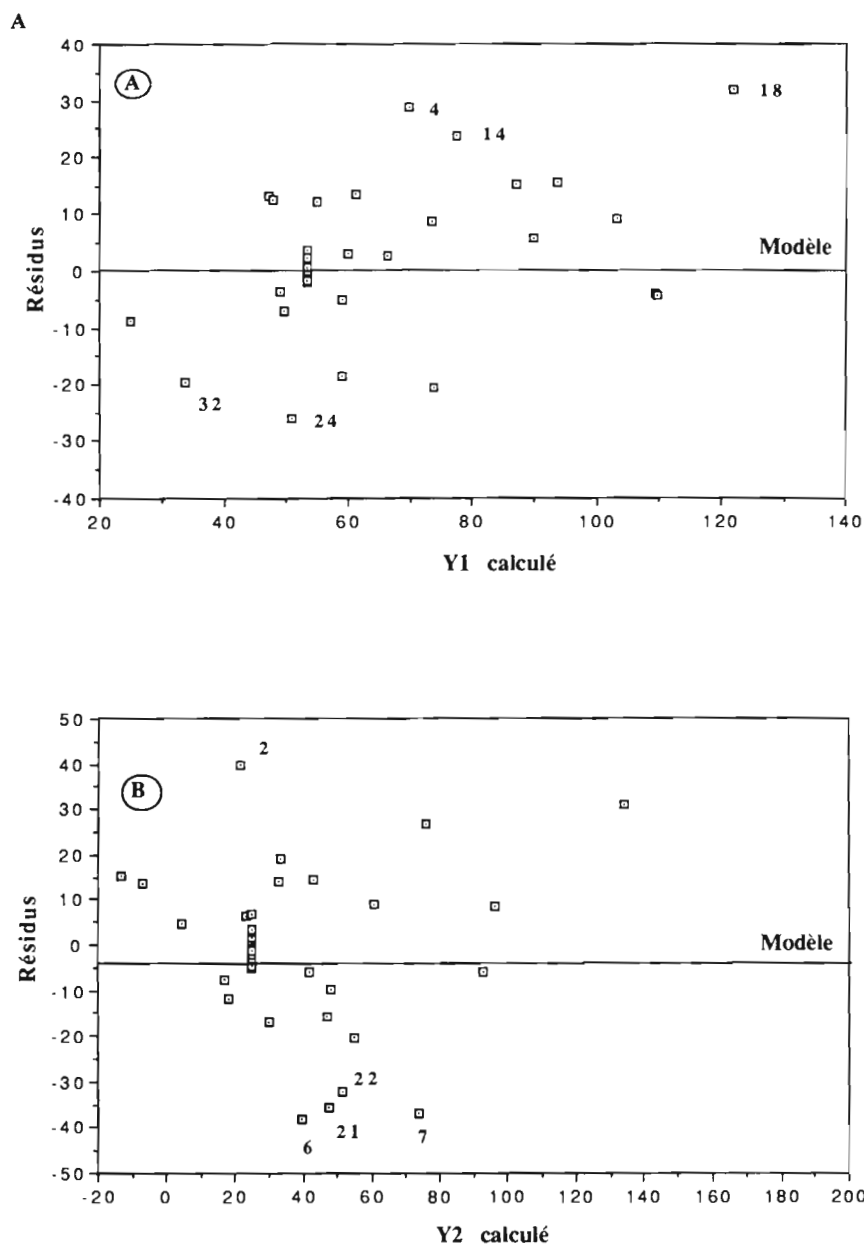


Fig. 7.3.- Etude graphique de résidus en fonction des réponses calculées à partir du modèle. A : Alcaloïdes totaux et B : Rendement Y p/x. Les numéros A et B correspondent aux expériences éliminées.

Le tableau 7.5 donne les coefficients calculés pour chaque réponse expérimentale après suppression des expériences signalées (c.f. Fig. 7.3).

Tableau 7.5 .- Coefficients des réponses étudiées calculés pour un modèle quadratique.

Coefficients du modèle	Facteurs	Alcaloïdes mg/100 g MSI	Y p/x mg alcaloïdes / g
		Y1	Y2
Terme constant			
bo		53,54 (***)	25,01 (***)
Termes linéaires			
b1	Saccharose	12,12 (***)	,55 (>10 %)
b2	KH ₂ PO ₄	-5,4 (**)	-4,63 (*)
b3	Tryptophane	14,21 (**)	25,31 (***)
b4	Aération	3,7 (*)	-3,28 (<10 %)
Termes quadratiques			
b11	Sac-sac	13,35 (***)	4,64 (**)
b22	PO ₄ -PO ₄	-5,85 (***)	-0,6 (>10 %)
b33	Try-Try	4,84 (***)	20,39 (***)
b44	Air-Air	4,4 (*)	-1,35 (>10 %)
Termes d'interactions			
b12	Sac-PO ₄	4,6 (*)	10,07 (***)
b13	Sac-TRY	-0,17 (>10 %)	-3,7 (>10 %)
b14	Sac-Air	0,32 (>10 %)	-8,4 (**)
b23	PO ₄ -Try	1,74 (>10 %)	4,67 (<10 %)
b24	PO ₄ -Air	11,45 (***)	-10,87 (***)
b34	Try-Air	-11,83 (***)	-18,62 (***)

Expériences éliminées : Y1 (4, 14, 18, 24, 32) ; Y2 (2, 6, 7, 21, 22)

Probabilité : * = < 5 % ; ** = < 1/100 ; *** = < 1/1000

La comparaison entre les résultats calculés par le modèle et ceux observés est reportée dans les tableaux 7.6 et 7.7. On constate que les points calculés selon le modèle ne sont pas très écartés (c.f. Y_{exp} - Y_{calc}) des résultats expérimentaux. Une analyse des effets individuels des différents facteurs étudiés est donc possible.

Tableau 7.6 .- Comparaison des résultats calculés selon le modèle quadratique avec les résultats observés

Milieu n°	Alcaloïdes mg/100 g MSI			
	<i>Y expérimental</i>	<i>Y calculé</i>	<i>(Yexp. - Ycalc.)</i>	<i>Normée</i>
1	42,80	51,79	-9,00	-1,44
2	68,92	63,54	5,37	0,86
3	16,31	8,07	8,24	1,32
5	112,25	103,55	8,69	1,39
6	105,25	114,59	-9,35	-1,49
7	53,92	61,12	-7,21	-1,15
8	95,25	90,91	4,34	0,69
9	60,51	56,60	3,91	0,62
10	74,65	75,32	-0,67	-0,11
11	60,15	58,68	1,47	0,23
12	95,69	96,13	-0,45	-0,07
13	53,23	61,10	-7,88	-1,26
15	67,36	64,48	2,87	0,46
16	102,36	101,24	1,12	0,18
17	82,36	82,72	-0,37	-0,06
19	45,56	40,91	4,64	0,74
20	14,30	19,30	-5,01	-0,80
21	40,25	44,50	-4,25	-0,68
22	105,25	101,36	3,89	0,62
23	63,26	63,62	-0,37	-0,06
25	56,20	53,54	2,65	0,42
26	52,20	53,54	-1,35	-0,22
27	51,50	53,54	-2,05	-0,33
28	55,61	53,54	2,06	0,33
29	51,60	53,54	-1,95	-0,31
30	53,20	53,54	-0,35	-0,06
31	54,80	53,54	1,25	0,20
33	57,20	53,54	3,65	0,58
34	51,32	53,54	-2,23	-0,36
35	54,10	53,54	0,55	0,09
36	51,30	53,54	2,25	0,36
Expériences supplémentaires				
4	98,80	38,55	60,02	9,58
14	101,25	79,11	22,13	3,53
18	90,06	131,12	-41,16	-6,57
24	24,56	78,76	-54,20	-8,65
32	51,20	53,54	-2,35	-0,37

Normée : rapport $(Y_{exp.} - Y_{calc.})$ et l'écart type de l'estimation.

Tableau 7.7 .- Comparaison des résultats calculés selon le modèle quadratique
avec les résultats observés

Milieu n°	Y p/x mg/g			
	Y expérimental	Y calculé	(Yexp.-Ycalc.)	Normée
1	6,37	3,22	3,14	0,43
3	6,62	12,49	-5,87	-0,81
4	31,22	31,81	-0,60	-0,08
5	104,71	115,46	-10,75	-1,48
8	102,75	95,33	7,42	1,02
9	36,02	46,29	-10,28	-1,41
10	46,86	44,00	2,86	0,39
11	14,94	12,08	2,86	0,39
12	57,99	50,09	7,89	1,08
13	87,49	84,03	3,46	0,48
14	69,92	66,90	3,01	0,41
15	13,06	15,91	-2,86	-0,39
16	38,83	39,11	-0,28	-0,04
17	52,64	42,48	10,15	1,39
18	34,54	44,69	-10,15	-1,39
19	36,15	31,87	4,28	0,59
20	9,06	13,33	-4,28	-0,59
23	29,50	26,16	3,33	0,46
24	9,69	13,02	-3,33	-0,46
25	21,91	25,01	-3,10	-0,43
26	24,19	25,01	-0,82	-0,11
27	25,58	25,01	0,57	0,08
28	26,85	25,01	1,84	0,25
29	28,07	25,01	3,06	0,42
30	28,06	25,01	3,05	0,42
31	31,80	25,01	6,79	0,93
32	19,97	25,01	-5,04	-0,69
33	23,65	25,01	-1,36	-0,19
34	28,48	25,01	3,47	0,48
35	21,34	25,01	-3,67	-0,50
36	20,23	25,01	-4,78	-0,66
Expériences supplémentaires				
2	61,05	17,76	43,29	5,95
6	37,46	79,64	-42,18	-5,79
7	12,24	90,82	-78,59	-10,79
21	19,16	55,96	-36,80	-5,05
22	165,11	157,20	7,90	1,09

Normée : rapport (Yexp.-Ycalc.) et l'écart type de l'estimation.

7.3.3- Analyse des effets individuels des facteurs

Afin de visualiser l'influence des facteurs sur la production d'alcaloïdes totaux et le rendement $Y_{p/x}$, des graphiques de réponses individuelles ont été établis. Ces graphiques correspondent à une représentation classique de la réponse en fonction de la concentration en nutriment.

Ainsi, la courbe de l'influence d'un facteur contrôlé sur une réponse peut être déterminée par le modèle quadratique, les autres facteurs étant fixés à un niveau constant (dans notre cas : au niveau central 0). La fig. 7.4 reporte les influences des facteurs sur les différentes réponses. Le tryptophane et le saccharose semblent être les facteurs les plus importants. Par contre, le phosphate et l'aération présentent des effets moins significatifs.

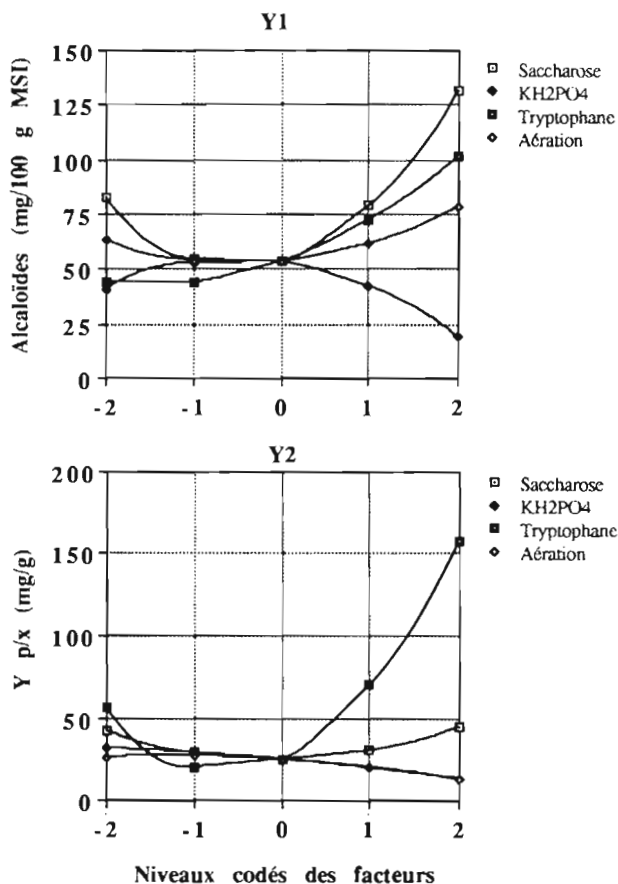


Fig. 7.4.- Graphiques des effets individuels centrés sur les réponses Y1 (Alcaloïdes totaux) et Y2 (rendement $Y_{p/x}$).

7.3.4- Recherche du chemin optimal

Après validation du modèle, le logiciel peut, grâce à un algorithme de type "Simplex", évoluer pas à pas vers une maximisation de la réponse, dans le domaine expérimental considéré. Pour cela, il construit un Simplex qui recherche les différentes combinaisons donnant la réponse la plus élevée, en établissant le chemin optimal pour chaque réponse. L'évolution des réponses en fonction du choix des niveaux des facteurs (chemin optimal) est représentée sur la fig. 7.5.

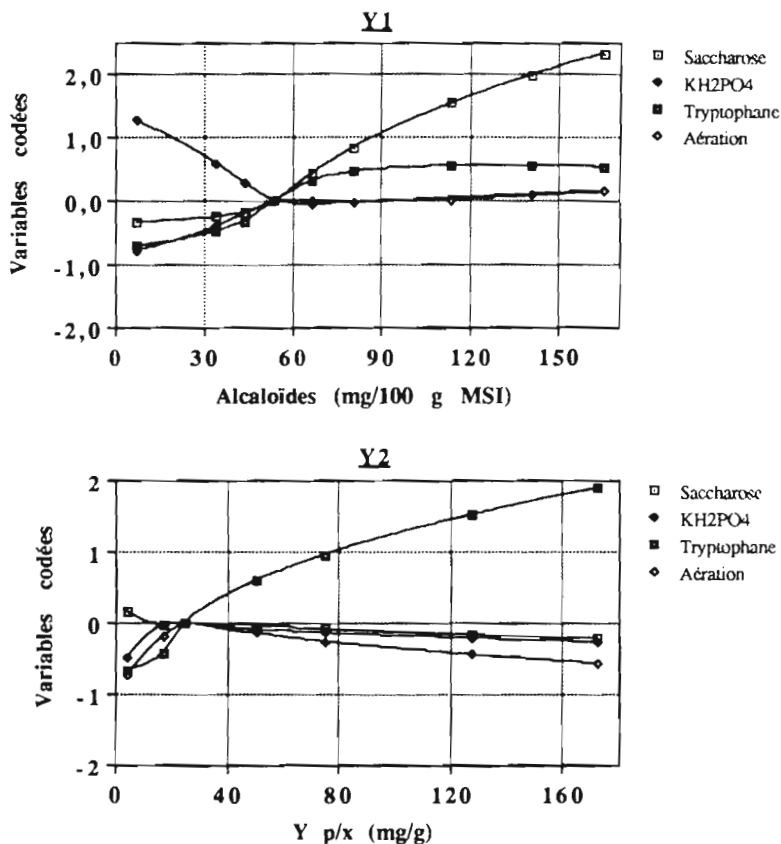


Fig. 7.5 :- Graphiques de recherche du chemin optimal pour la maximisation des réponses.
Y1 : Alcaloïdes et Y2 : Y p/x .

Il est à noter que les combinaisons faites pour le logiciel ne représentent pas toutes les combinaisons possibles, ni les meilleures, mais elles permettent d'établir une direction pour la réponse en considérant les niveaux des facteurs. En fonction des réponses calculées par le logiciel à partir du modèle, nous pouvons ainsi connaître les valeurs réelles des facteurs pour les points représentés (Fig. 7.5).

Y calculée.	Y1 = 140,18 mg/100 g MSI		Y2 = 164,25 mg/g	
	Variable		Variable	
Facteur	Codée	réelle	Codée	réelle
Saccharose	1,99	249,75	-0,23	194,38
KH ₂ PO ₄	0,11	1,04	-0,27	0,89
Tryptophane	0,55	0,71	1,88	0,98
Aération	0,08	40,83	-0,57	34,33

A partir de ces données on constate que les valeurs des variables réelles proposées sont différentes pour le maximum de chaque réponse. Ceci nous conduit à établir un compromis parmi les facteurs qui ont une forte influence et les autres qui demeurent constants, de manière à maximiser la ou les réponses prioritaires. La méthode du chemin optimal met en évidence l'importance des facteurs tryptophane, saccharose et air confirmant ainsi les résultats obtenus lors de l'analyse des effets individuels. Ce chemin optimal nous a donc permis de déterminer les effets des facteurs les plus importants pour chaque réponse et de fixer les valeurs constantes des variables codées à utiliser pour construire les courbes d'isoréponse.

7.3.5- Analyse graphique de surfaces d'isoréponse

Les courbes d'isoréponse sont construites en fonction de 2 facteurs (x_i , x_j), les autres étant maintenus constants. Dans les fig. 7.6 et 7.7 sont représentées les courbes d'isoréponse. Le couple tryptophane-saccharose a été analysé en maintenant constants les autres facteurs (x_2 au niveau (0) et x_4 au niveau (-2)).

A partir des graphiques d'isoréponse, il est possible de faire une analyse des principales influences des facteurs sur les différentes réponses, bien que les réponses maximales ne soient pas au centre du domaine expérimental.

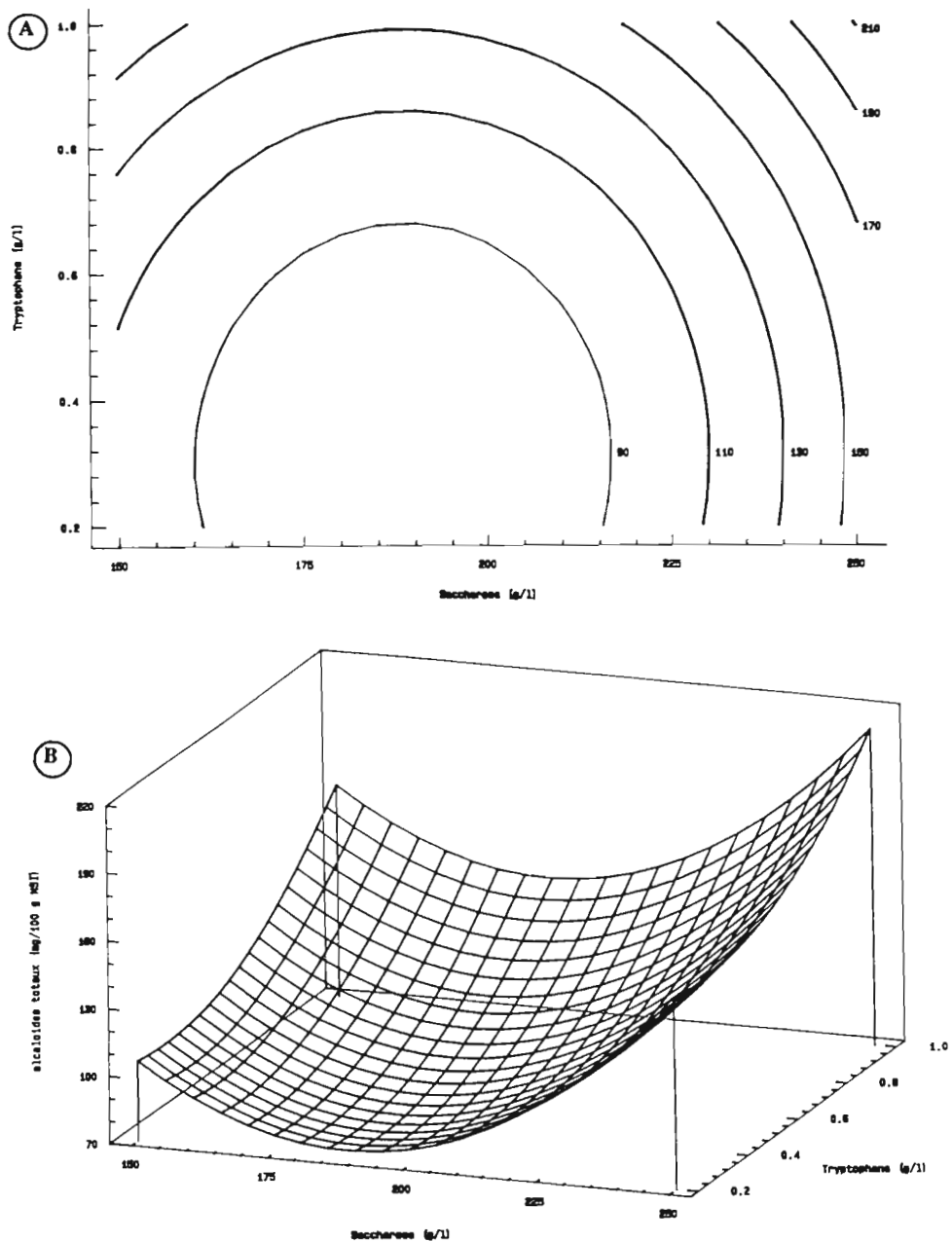


Fig. 7.6- Effet du tryptophane et du saccharose sur la production d'alcaloïdes (mg/100 g MSI).
 Courbes d'isoréponse. A : contour de la surface de réponse et B : surface de réponse.

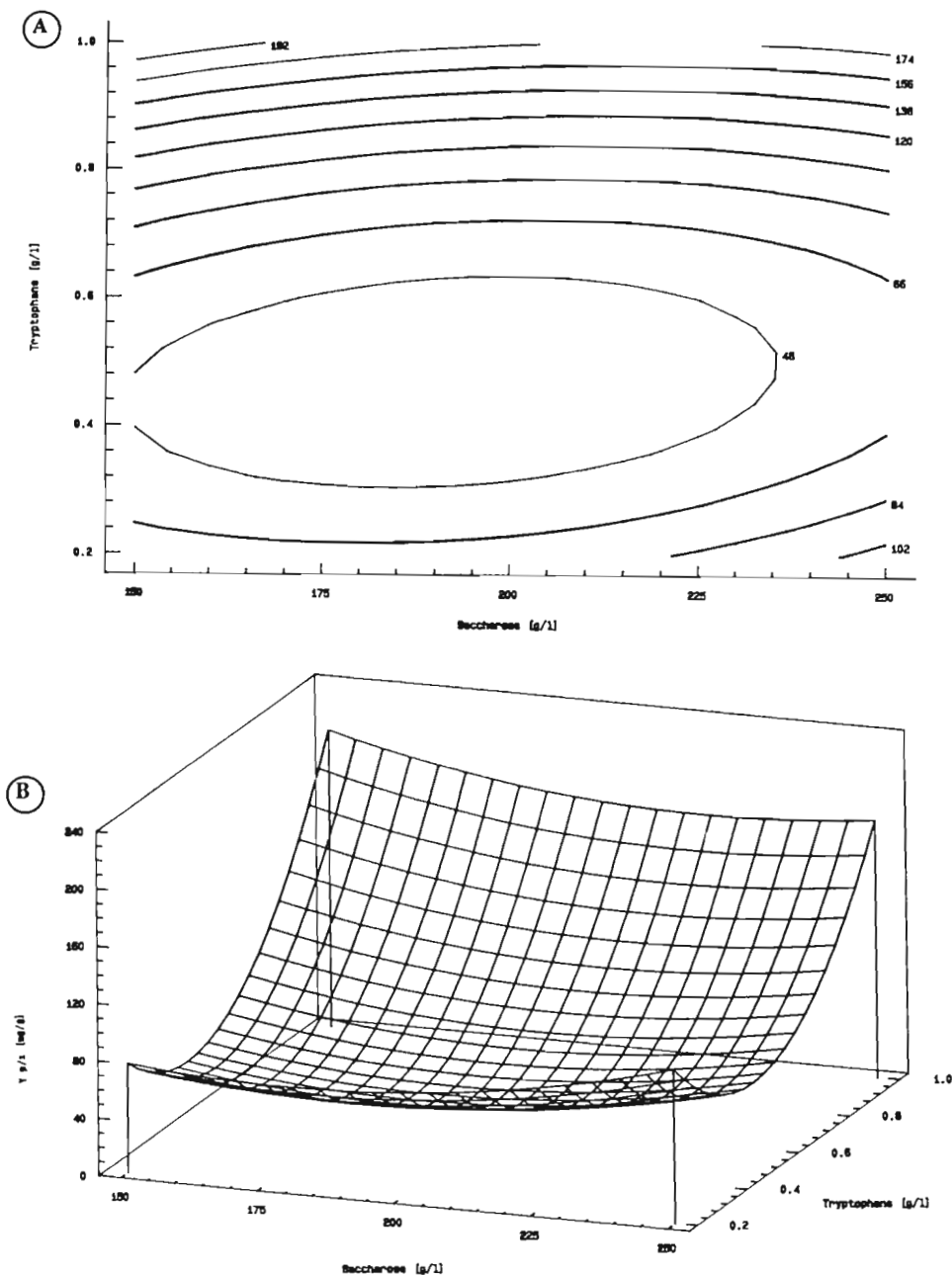


Fig. 7.7.— Effet du tryptophane et du saccharose sur le rendement en alcaloïdes Y p/x (mg/g).
Courbes d'isoréponse. A : contour de la surface de réponse et B : surface de réponse.

La fig. 7.6 considère l'effet du tryptophane et du saccharose simultanément. Elle indique clairement la direction à suivre pour maximiser la production d'alcaloïdes. Dans le cas présent, une augmentation de ces facteurs (tryptophane à 1 g/l (+2) et saccharose à 250 g/l (+2)) nous permettrait de resituer le domaine nécessaire à la détermination des optima.

En ce qui concerne le rendement d'alcaloïdes totaux rapportés à la biomasse ($Y_{p/x}$), l'effet le plus important est donné par le tryptophane (Fig. 7.7). Le saccharose peut être favorable au rendement en alcaloïdes entre 150 et 250 g/l, avec une concentration de 1 g/l de tryptophane. Toutefois ces considérations sont rapportées au domaine expérimental étudié. Il serait nécessaire, à partir de cette analyse, d'établir un nouveau domaine d'étude de manière à éviter des erreurs dans la détermination des optima.

Discussion

Il est bien connu que la biosynthèse d'alcaloïdes est sous le contrôle de l'information génétique (KOBEL et coll., 1962 ; SPALLA, 1969). Toutefois, ce processus peut être influencé par des facteurs physiques et chimiques, comme nous avons pu le montrer lors de l'étude des effets de la composition du milieu de culture et de l'aération (c.f chap. 7.3). Au cours de la présente étude, nous avons constaté une stimulation de la production par l'addition de L-tryptophane et de saccharose. L'effet stimulateur du L-tryptophane n'est pas un phénomène général pour toutes les souches de *Claviceps*. Dans le cas de *C. paspali* (GRÖGER et TYLER, 1963) et de *C. purpurea* (ERGE et coll., 1987), la production d'alcaloïdes diminue quand le tryptophane est additionné au milieu de culture. Par contre, le tryptophane induit la biosynthèse d'alcaloïdes au cours de la culture de *Claviceps* SD 58 (ERGE et coll., 1984 ; REHACEK et SAJDL, 1990).

TEUSCHER (1964) a montré que le mycélium de *Claviceps* est capable d'assimiler le tryptophane du milieu et qu'une corrélation existe entre la capacité de production des alcaloïdes par la souche d'alcaloïdes et sa capacité à transporter activement le tryptophane. Selon VINING (1970), le L-tryptophane augmenterait la production d'alcaloïdes par la souche de *Claviceps* HLX 123, en favorisant le développement d'un système enzymatique plus actif, lié au métabolisme secondaire (BU'LOCK et POWELL, 1965).

Par ailleurs, il a été constaté que durant la croissance rapide du champignon, le tryptophane s'accumule dans le mycélium, mais l'induction des enzymes responsables de la biosynthèse des alcaloïdes se déclenche lorsque le phosphate inorganique est totalement épuisé du milieu de culture (MATOSIC et coll., 1983 ; ERGE et coll., 1984 ; REHACEK et SAJDL, 1990). Toutefois, l'addition du tryptophane surmonte l'inhibition par le phosphate, de ces enzymes responsables de la biosynthèse des alcaloïdes (ROBBERS et coll., 1972, 1978).

Lors de cette étude, nous avons observé que le phosphate inorganique ne présentait pas d'effet significatif sur la production, mais qu'une concentration faible favorisait la production et le rendement en alcaloïdes. En outre, l'aération doit être minimale pour obtenir une production élevée d'alcaloïdes, mais suffisante pour permettre la croissance de *C. fusiformis*.

En ce qui concerne le métabolisme du saccharose par *C. fusiformis*, ce sucre, présent dans le milieu en concentration élevée, est lentement métabolisé et entraîne une faible croissance qui peut être due à la pression osmotique du milieu de culture. Toutefois, l'influence des facteurs étudiés, révélée lors de la culture de *C. fusiformis* en FMS, semble confirmer les données physiologiques connues pour *Claviceps* sp. cultivé en milieu submergé (SPALLA et coll., 1978).

D'après les résultats obtenus, des concentrations élevées en saccharose et en tryptophane permettraient d'augmenter la production d'alcaloïdes et le rendement $Y_{p/x}$. C'est pourquoi nous proposons d'utiliser le milieu de base suivant pour la production d'alcaloïdes par *C. fusiformis* : saccharose 250 g/l, tryptophane 1 g/l, phosphate inorganique 1 g/l. Combiné à une aération de 20 ml/min/colonne, ce milieu devrait permettre d'obtenir d'après notre modèle, une concentration en alcaloïdes proche de 234,5 mg/100 g de MSI et un rendement en alcaloïdes d'environ 271,2 mg/g de biomasse PS.

Une expérience de contrôle destinée à vérifier le modèle défini, a été réalisée. A cet effet, nous avons fixé les valeurs des variables codées comme suit : saccharose (+1) ; phosphate inorganique (-1) ; tryptophane (+2) et aération (-2) ; la solution minérale a été décrite précédemment (§3.2.4). Dans ces conditions, la production et le rendement en alcaloïdes seraient théoriquement de 197 mg d'alcaloïdes/100 g de MSI et de 210 mg/g de biomasse PS, respectivement. L'expérience nous a permis d'obtenir une production de 208 mg/100 g MSI et un rendement de 187 mg/g de biomasse PS, ces résultats confirmant ainsi la validité du modèle proposé.

7.4- Conclusion

L'étude des différents paramètres de croissance de *C. fusiformis* nous a permis de faire une comparaison entre sa croissance en FMS et en FSm. En FMS, le rendement en alcaloïdes rapportés à la biomasse est deux fois supérieur à celui observé en FSm. De même, on a remarqué qu'en FMS la croissance et la biosynthèse des alcaloïdes présentaient un rapport moins étroit qu'en FSm.

L'étude de la source de carbone et de l'intensité de l'aération au cours de la fermentation, nous ont permis de fixer les conditions optimales pour la culture de cette souche. Toutefois, la démarche classique d'étude de ces facteurs ne permet pas de connaître leurs effets

simultanés sur la production d'alcaloïdes. Mais la méthodologie des plans d'expériences nous a permis de mettre en évidence les influences prépondérantes du tryptophane et du saccharose sur la production d'alcaloïdes et le rendement $Y_{p/x}$. L'aération présente également un effet significatif sur le rendement.

Ainsi, le saccharose peut être utilisé en concentrations allant de 150 à 250 g/l, le tryptophane à 1 g/l et l'aération peut être comprise entre 20 et 40 ml/min par colonne ; ces valeurs dépendant de la réponse souhaitée mais également de la rentabilité du procédé.

Grâce à l'application du plan centré composé et du modèle quadratique, nous avons essayé de mettre en évidence les variables critiques et leurs interactions, et de considérer ainsi ce système dans une partie de sa complexité, bien que ces modèles demeurent des approximations empiriques plus au moins adaptées pour la description de phénomènes biologiques assez complexes.

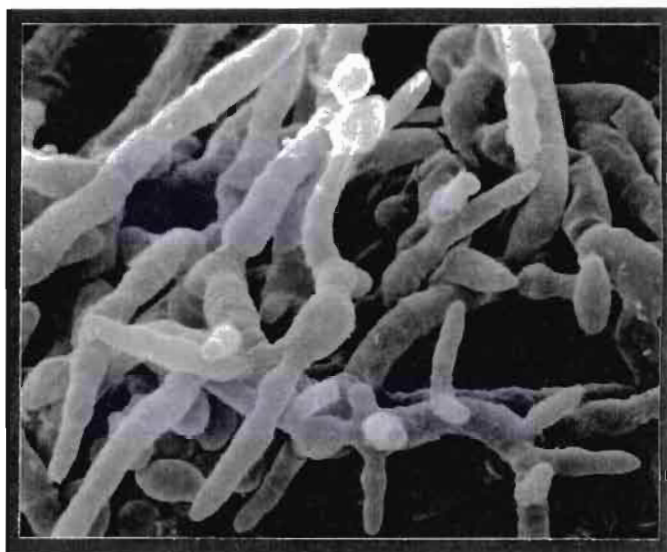


Photo 7.1.- *C. fusiformis* cultivé sur substrat amylicé durant 7 jours.
Microscopie électronique à balayage (x2000).

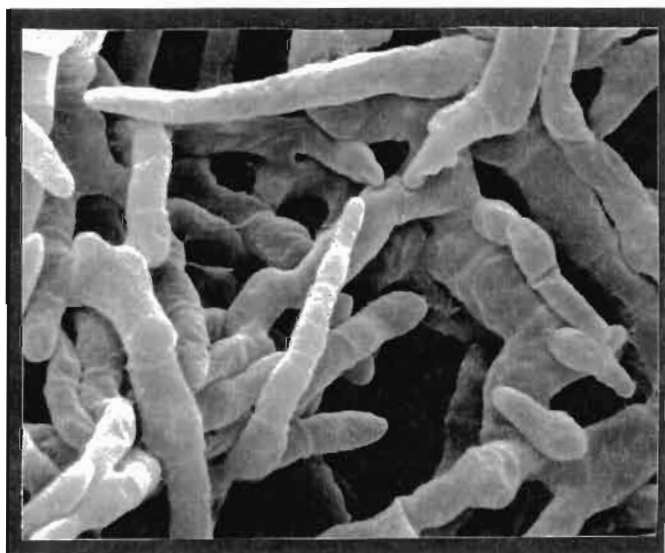


Photo 7.2.- *C. fusiformis* cultivé sur bagasse imprégnée durant 7 jours.
Microscopie électronique à balayage (x2000) (c.f. Annexe B).

8. COMPARAISON DES PERFORMANCES DE LA FMS ET DE LA FSm POUR LA PRODUCTION D'ALCALOÏDES

A titre comparatif, nous avons rassemblé sur le Tableau 8.1 les résultats obtenus lors de la culture de *C. purpurea* et de *C. fusiformis* en FMS et en FSm.

Tableau 8.1 - Comparaison des différents paramètres de fermentation de *C. purpurea* et *C. fusiformis* en FMS et FSm 200 heures de culture à 26°C, pH 5.2.

Paramètre	Milieu submergé		Milieu solide imprégné	
	A	B	A	B
Substrat consommé, g/l	127,10	98,20	112,71	97,50
Biomasse, g/l	31,10	29,54	17,57	4,75
Alcaloïdes totaux, mg/l	203,10	236,20	414,43	891,86
Rendement Y x/s, g/g de substrat consommé	0,24	0,30	0,16	0,05
Rendement Y p/x, mg/g biomasse sèche	6,54	7,99	23,58	187,76
Rendement Y p/s, mg/g de substrat consommé	1,60	2,41	3,67	9,14

A : *C. purpurea* 1029c : B : *C. fusiformis* ATCC 26019.

Saccharose initial : 200 g/l pour *C. purpurea* et 225 g/l pour *C. fusiformis*

La production d'alcaloïdes par ces souches est nettement plus élevée en FMS. En effet, on relève des productions en alcaloïdes par FMS deux fois supérieures pour *C. purpurea* et quatre fois supérieures pour *C. fusiformis* par rapport à celles obtenues en FSm. Un autre avantage de la FMS réside dans l'obtention de produits plus concentrés, comme c'est le cas pour de nombreux métabolites fongiques (LONSANE et coll., 1985 ; RAIMBAULT et coll., 1989).

Par ailleurs, nous avons remarqué que la croissance de ces souches en culture solide a été plus faible qu'en culture submergée. Cependant, le rendement en alcaloïdes totaux exprimé par rapport à la biomasse a été plus élevé en FMS, d'un facteur de 3 pour *C. purpurea* et d'un facteur de 10 pour *C. fusiformis*. Ceci peut être dû à l'interaction substrat/microorganisme/support qui rend le système intéressant pour la biosynthèse de métabolites secondaires, mais limite la production de biomasse. On peut supposer que la biomasse s'est fixée au support, ce qui a empêché sa récupération totale. De toute manière la production globale d'alcaloïdes est bien supérieure en milieu solide qu'en milieu liquide.

En ce qui concerne la consommation de substrat, nous avons constaté qu'elle a été sensiblement identique pour les deux souches, quelque soit le type de fermentation. Par conséquent, le rendement en alcaloïdes rapporté au substrat consommé a été plus élevé en FMS qu'en FSm (Tableau 8.1).

Les résultats obtenus montrent que la technique de FMS semble être plus intéressante pour les 2 souches sur le plan de la productivité, que la technique de FSm. On peut envisager d'utiliser ce système de fermentation pour la synthèse d'autres métabolites secondaires ou pour la bioconversion de molécules.

Par ailleurs, les résultats obtenus indiquent des changements significatifs dans le spectre des alcaloïdes produits lors de la culture de ces souches en FMS par rapport à la FSm (fig. 8.1). En effet, l'ergonovine et l'ergotamine sont synthétisées en quantités supérieures lorsque les souches sont cultivées en FMS. Par contre, la proportion de lysergol est plus faible en FMS pour *C. purpurea*.

Cette différence de comportement en fonction des conditions de culture a déjà été rapportée par BREUEL et coll. (1982) qui ont constaté que le spectre d'alcaloïdes produits est non seulement une conséquence du génotype de la souche étudiée, mais qu'il dépend également des conditions environnementales et nutritionnelles utilisées.

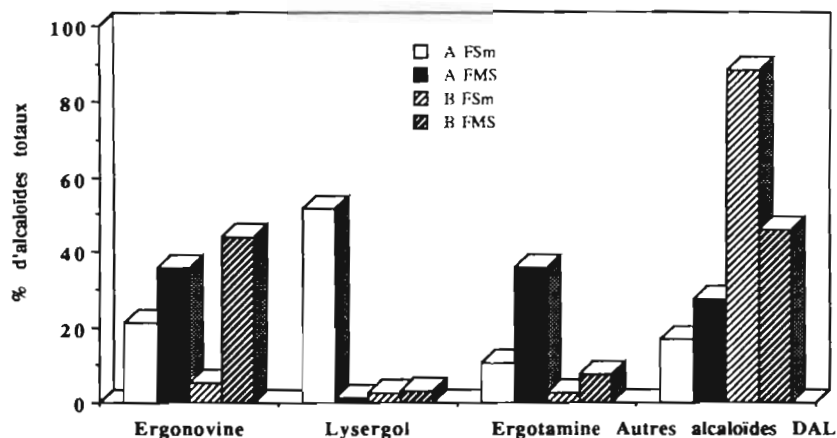


Fig. 8.1.- Spectre d'alcaloïdes obtenus lors de la culture de *C. purpurea* (A) et *C. fusiformis* (B) en FMS et FSm. Conditions (c.f. tableau 8.1).

DAL : Dérivés de l'acide lysergique

Des changements de spectre peuvent être provoqués par des traitements mutagéniques (KOBEL et SANGIER, 1973 ; MARNATI et coll., 1975). De même, il a été démontré que les substrats utilisés, ainsi que l'addition d'acides aminés ou d'analogues dans le milieu, peuvent altérer la distribution et le spectre des alcaloïdes synthétisés (BEACCO et coll., 1978 ; KOBEL et SANGIER, 1978).

La technique de FMS est donc une alternative avantageuse pour la production d'alcaloïdes de l'ergot. En effet, la production d'alcaloïdes et les rendements de croissance obtenus témoignent de la performance de ce type de fermentation pour la culture de souches de *C. purpurea* et de *C. fusiformis*. En outre, les différences dans le profil des alcaloïdes, mises en évidence lors de ces cultures par FMS ou FSm, démontrent l'importance de la technique de culture sur les activités métaboliques des microorganismes.

CONCLUSIONS

9. CONCLUSION

L'analyse bibliographique nous a permis de souligner l'importance des alcaloïdes de l'ergot du seigle en pharmacologie et en médecine. Notre étude nous a conduits à appliquer la FMS à la culture de souches de *Claviceps* pour la production des alcaloïdes de l'ergot. La fermentation en milieu solide est proche des conditions naturelles de développement de ce champignon. Dès lors, il convient d'utiliser cette technique pour sa culture. Cette approche s'inscrit dans le cadre de la valorisation biotechnologique de sous-produits tropicaux par FMS, pour l'obtention de métabolites fongiques à haute valeur ajoutée. L'ensemble travaux décrits dans ce mémoire sont originaux. En effet, tous les travaux sur la production d'alcaloïdes ont été réalisés jusqu'à présent soit en culture parasitaire au champ, soit en fermentation submergée (FSm).

La production des alcaloïdes par ce microorganisme dépend directement des conditions environnementales mais aussi de la composition du milieu de culture. Dès lors, nous avons axé nos travaux sur l'amélioration et l'optimisation de ces paramètres. Au terme de cette étude, il nous a été possible de caractériser la biosynthèse des alcaloïdes et la croissance de *C. purpurea* et de *C. fusiformis* aussi bien en FSm qu'en FMS.

Dans un premier temps, notre recherche s'est focalisée sur l'étude de la culture des souches en milieu gélosé et en milieu liquide. Cette connaissance acquise, il nous a alors été possible d'adapter ces souches à la culture en milieu solide en prenant nous aidant de plans d'expériences et de divers outils statistiques.

Une croissance élevée et une production en alcaloïdes (comparable à celle retrouvée en FSm) ont été obtenues dans ces conditions. Toutefois, la nature du substrat influençait largement le spectre des alcaloïdes produits. Par ailleurs, le tryptophane, la source d'azote minéral et l'aération avaient un effet significatif sur la biosynthèse des alcaloïdes, les activités respiratoires et la croissance.

La bagasse de canne à sucre a été choisie comme support solide d'imprégnation, en raison de son grand pouvoir de rétention d'eau (environ cinq fois son poids). D'autre part, le fait de pouvoir imprégner un milieu de culture de composition connue nous a permis de réaliser un criblage aisé de différents facteurs influençant la production d'alcaloïdes (nutriments et conditions culturelles).

L'influence prépondérante du tryptophane, du saccharose, du phosphate inorganique et de l'aération sur la biosynthèse quantitative et qualitative des alcaloïdes a été constatée. Plus précisément, l'effet du tryptophane comme précurseur de la biosynthèse d'alcaloïdes, a été largement confirmé au cours de nos études. De même, l'effet stimulateur du saccharose et l'effet positif de l'aération sur la production ont pu être établis en FMS sur support imprégné.

Grâce à l'application de plans d'expérience et à l'aide de la méthodologie des surfaces de réponses, nous avons pu montrer l'effet de différents facteurs. Dans ce même contexte, nous avons validé un modèle quadratique et proposé un nouveau domaine d'étude dans la perspective d'une optimisation postérieure.

Les différentes conditions de culture en milieu solide pour la croissance de *C. purpurea* et *C. fusiformis*, permettent d'assurer un rendement global de production d'alcaloïdes d'environ 24 et 188 mg d'alcaloïdes/g de biomasse, respectivement. Nous avons également pu démontrer que le changement de la composition en alcaloïdes produits par les *Claviceps* est directement lié à la composition du milieu et à la technique de culture utilisée (TREJO-HERNANDEZ et coll., 1992a-b).

Des études sur l'amélioration des conditions de culture restent nécessaires afin d'optimiser le procédé. L'intérêt de ce travail est d'abord de suggérer que les méthodes employées permettaient de définir la validité des facteurs pris en compte pour optimiser la production. Les plus importants ont été analysés. Il serait judicieux d'étudier aussi d'autres facteurs également importants pour affiner ce travail.

Les perspectives de ces travaux sont fort nombreuses. Elles suggèrent tout un ensemble de recherches sur de nouvelles souches de champignons filamenteux hyperproductrices d'alcaloïdes en FMS. Ce procédé est sous-évalué industriellement, pourtant les rendements obtenus en FMS par rapport à la fermentation en milieu submergé sont meilleurs. Cette technique ouvre donc des alternatives pour la biosynthèse de métabolites secondaires.

La méthodologie développée pour le suivi de la fermentation par l'analyse du flux gazeux est un outil fondamentalement important pour le choix des conditions de culture et pour le suivi en ligne des FMS. À terme, il permettrait d'étudier l'influence des échanges gazeux sur l'orientation du métabolisme secondaire en milieu solide. Une étude plus approfondie du métabolisme et des signaux induisant cette modification serait à considérer.

La caractérisation des enzymes intervenant dans la biosynthèse d'alcaloïdes ainsi que l'utilisation des marqueurs radioactifs dans l'incorporation des différents précurseurs des alcaloïdes permettrait de mieux connaître les voies métaboliques impliquées. De même, l'identification des principales molécules synthétisées par la spectrophotométrie atomique de masse serait une approche riche en enseignements pour l'élaboration d'un meilleur procédé de production.

Enfin, l'application d'un tel procédé à une échelle industrielle représenterait un bon moyen de valorisation de la bagasse de canne à sucre, résidu de la transformation de ce produit important au Mexique et dans d'autres pays tropicaux, en l'utilisant comme support de culture pour la production de métabolites à haute valeur ajoutée.

Les résultats obtenus sont originaux et présentent des perspectives intéressantes pour l'application de la FMS à des souches fortement productrices d'alcaloïdes (TREJO-HERNANDEZ et coll., 1992c-e).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- ABE M. (1948) Separation of an active substance and its properties. J. Agric. Chem. Soc. Jap., 22, 2-7.
- ABE M., YAMANO T., KOZU Y., KUSUMOTO M. (1951) Production of ergot alkaloids in submerged cultures. J. Agric. Chem. Soc. Jap., 24, 416-422.
- AIDOO K.E., HENDRY R., WOOD J.B. (1982) Solid substrate fermentation. Adv. Appl. Microbiol., 28, 201-237.
- AMICI A. M., MINGHETTI A. (1967) Ergotamine Production in Submerged Culture and Physiology of *Claviceps purpurea*. Appl. Microbiol., 5, 597-602.
- AMICI A. M., MINGHETTI A., SCOTTI T., SPALLA C., TAGNOLI L. (1969) Production of peptide ergot alkaloids in submerged culture by three isolates of *Claviceps purpurea*. Appl. Microbiol., 18, 464-468.
- ARCAMONE F., CASSINELLI G., FERNI G., PENCO S., PENNELLA P., POL C. (1970) Ergotamine Production and metabolism of *Claviceps purpurea* strain 275 FI in stirred fermenters. Can. J. Microbiol., 16, 923-931.
- ARCAMONE F., CHAIN E.B., FERRETTI A., MINGHETTI A., PENNELLA P., TONOLO A. (1961) Production of a new lysergic acid derivative in submerged culture by a strain of *Claviceps paspali* Stevens et Hall. Proc. Roy. Soc. (London) B, 155, 26-54.
- ARIMA K. (1964) Microbial enzyme production. In : Global impact of applied microbiology. Starr M.P. (Ed.). John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 277-294.
- AURIA A., HERNANDEZ S., RAIMBAULT M., REVAH S. (1990) Ion exchange resin : a model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. Biotechnol. Tech., 4, 391-396.
- BAJRACHARYA R., MUDGETT R.E. (1980) Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. Biotechnol. Bioeng., 22, 2219-2235.
- BANKS G.T., MANTLE P.G., SZCZYRBAK C.A. (1974) Large-scale production of clavine alkaloids by *Claviceps fusiformis*. J. Gen. Microbiol., 82, 345-361.
- BARRIOS-GONZALEZ J., MARTINEZ C., AGUILERA A., RAIMBAULT M. (1989) Germination of concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*. Biotechnol. Lett., 11, 551-554.
- BARRIOS-GONZALEZ J., RODRIGUEZ G.M., TOMASINI A. (1990) Environmental and nutritional factors controlling aflatoxin production in cassava solid state fermentation. J. Fern. Bioeng., 70, 329-333.
- BARSTOW L.M., DALE B.E., TENDERDY R.P. (1988) Evaporative temperature and moisture control in solid substrate fermentation. Biotechnol. Tech., 2, 237-242.
- BEACCO E., BIANCHI M.L., MINGHETTI A., SPALLA C. (1978) Directed biosynthesis of analogues of ergot peptide alkaloids with *Claviceps purpurea*. Experientia, 34, 1291-1293.
- BEKESY N. V. (1938) Ueber parasitische mutterkorn-versuche. Zentralbl. Bakteriell., 99, 321-332.
- BEKESY N. V. (1956) Ein beitrag zur biologie des mutterkons. Phytopath. Z., 26, 49-56.
- BERDE B., SCHILD H. O. (Eds.) (1978) Ergot alkaloids and related compounds. Handbook of experimental pharmacology, Vol. 49. Springer Verlag, Berlin.

- BERDE B., STÜRMER E. (1978) Introduction to the pharmacology of ergot alkaloids and related compounds. In : Ergot alkaloids and related compounds, Berde B., Schild O. (Eds.) Vol. 49, Springer Verlag, pp. 1-28.
- BETHKE H., DELZ B., STICH K. (1976) Determination of the content and purity of ergotamine preparations by means of High-Pressure Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, 123, 193-203.
- BIANCHI M., MINGHETTI A., SPALLA C. (1976) Production of β -ergokryptine by a strain of *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. in submerged culture. *Experientia*, 32, 145-146.
- BLAHA G., PARIS N. (1987) Examen en microscopie électronique de l'aspect externe des cabosses du cacaoyer saines ou infectées par *Phytophthora megakarya*. *Café, Cacao et Thé*, 31, 23-34.
- BOVE F. J. (1970) The story of ergot. S. Karger (Ed.). Basel-New York., 134 p.
- BOX G.E.P., WILSON K.B. (1951) On the experimental attainment of optimum conditions, *J. Royal Stat. Soc. B.*, 13, 1-45.
- BRETEAU M., DE LA TOUR DU PIN F. (1981) Initiation à la pharmacologie des alcaloïdes de l'ergot de seigle. Services informations Scientifiques, SANDOZ. Faculté de Pharmacie, Tours.
- BREUEL K., BRAUN K., DAUTH CH., GRÖGER D. (1982) Qualitative changes in peptide alkaloid biosynthesis of *Claviceps purpurea* by environmental conditions. *Plant. Med.*, 44, 121-122.
- BU'LOCK J. D. (1974) Secondary metabolism in fungi and its relationship to growth and development. In : Industrial Mycology. The filamentous fungi. Smith J. E., Berry D. R. (Eds.). Edward Arnold, London, Vol. 1, pp. 33-75.
- BU'LOCK J. D. , POWELL A.J. (1965) Secondary metabolism as explanation in terms of induced enzyme mechanisms. *Experientia*, 21, 55-56.
- CARRIZALEZ V., RODRIGUEZ H., SARDINA I. (1981) . Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 321-333.
- CASTAGNOLI N., MANTLE P. G. (1966) Occurrence of D-Lysergic acid and 6-methyl-8-ergolene -8-carboxylic acid in cultures of *Claviceps purpurea*. *Nature*, 211, 859-890.
- CHAPLIN M.F. (1976) The use of ninhydrin as a reagent for the reversible modification of arginine residues in proteins. *Biochem. J.*, 155, 457-459.
- CHERUY A., DUMENIL G., SANGLIER J. J. (1989) Optimisation et modélisation. In : Biotechnologie des antibiotiques. Larpent J. P., Sanglier J. J. (Eds.). Masson, Paris, pp. 289-338.
- COCHET N., TYAGI R.D., GHOSE T.K., LEBEAULT J.M. (1984) ATP measurement for cellulase production. control. *Biotechnol. Lett.*, 6, 155-160.
- CORBETT K., DICKERSON A.G., MANTLE P.G. (1974) Metabolic studies on *Claviceps purpurea* during parasitic development on rye. *J. Gen. Microbiol.*, 84, 39-58.
- DEMAIN A.L. (1972) Cellular and environmental factors affecting the synthesis and excretion of metabolites. *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 22, 345-348.
- DE MEO M., LAGET M., PHAN-TAN-LUU R., MATHIEU D., DUMENIL G. (1985) Application des plans d'expériences à l'optimisation des milieux et des conditions de culture en

fermentation. Bio-Sciences, 4, 17-20.

DESAI J.D., DESAI A.J., PATEL H.C. (1983) Effect of biotin on alkaloid production during submerged cultivation of *Claviceps* sp. strain SD-58. Appl. Environ. Microbiol., 45, 1694-1696.

DESAI J.D., PATEL H.C., DESAI A.J. (1986 a) Alkaloid production during the cultivation with shaking of *Claviceps* sp. : effects of asparagine. J. Ferment. Technol., 64, 339-342.

DESAI J.D., PATEL H.C., DESAI A.J. (1986 b) Effect of tween series surfactants on alkaloid production by submerged cultures of *Claviceps species*. J. Ferment. Technol., 64, 499 - 501.

DESAI J.D., REHACEK Z. (1982) Clavine-alkaloid production & cell-lipid accumulation during the submerged cultivation of *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.. Indian J. Exper. Biol., 20, 181-183.

DOELLE H.W. (1985) Biotechnology of Solid Substrate fermentation in the production of Food. Asean Food J., 1, 10-14.

DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28, 350-356.

DUFOUR D. (1990) . Production de pectinases dans un milieu adsorbé sur bagasse. Contribution à l'étude de la physiologie des champignons pectolytiques, cultivés en milieu solide, en relation avec la respiration et la synthèse de pectinases. Thèse Doctorat, Université de Technologie de Compiègne, 262 p.

DUMENIL G., SANGLIER J. J. (1989) Physiologie de la production d'antibiotiques. In : Biotechnologie des antibiotiques. Larpent J.P., Sanglier J. J. (Eds.) Masson, Paris. pp. 195-217.

DURAND A., CHEREAU D. (1988) A new pilot reactor for solid state fermentation : application to the protein enrichment of sugar beet pulp. Biotechnol. Bioeng., 31, 476-486.

EL REFAI A. M., SALLAM L. A. R., NAIM N. (1970) The alkaloids of fungi. Studies of the biosynthesis of alkaloids in *Geotrichum candidum*. Pakistan J. Biochem., 3, 8-13.

ELSON L.A., MORGAN W.T.J. (1933) A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. Biochem. J., 27, 1824-1829.

ENGLER A., PLANTL K. (1897) Die naturalischen Pflanzenfamilien. Teil. 1. Abt. 1. 513, pp. 293, figs. Wilhelm Engelmann, Leipzig. Brefeld.

ERGE D., MAIER W., GROGER D (1973) Untersuchungen über die enzymatische Umwandlung von Chanoclain-I. Biochem. Physiol. Pflanzen., 164, 234-247.

ERGE D., SCHUMANN B., GROGER D. (1984) Influence of tryptophan and related compounds on ergot alkaloid formation in *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.. Z. Alleg. Mikrobiol., 24, 667-678.

ERGE D., WENZEL A., GROGER D. (1972) Zur physiologie der alkaloidbildung bei *Claviceps* arten. Biochem. Physiol. Pflanzen., 163, 288-290.

ERNI F., FREI R.W., LINDNER W. (1976) A low-cost gradient system for HPLC. Quantification of complex pharmaceutical raw materials. J. Chromatograph., 125, 265-274.

ESSER K., TUDZYNSKI P. (1978) Genetics of the ergot fungus *Claviceps purpurea* I. Proof of a monoecious life and segregation patterns for mycelial morphology and alkaloid production. Theor. Appl. Genet., 53, 145-149.

FLIEGER M., VOTRUBA J., KREN V., PAZOUTOVA S., RYLKO V., SAJDL P. (1988) Physiological control and process kinetics of clavine alkaloid production by *Claviceps*

purpurea. Appl. Microbiol. Biotechnol., 29, 181-185.

FLOSS H.G. (1980) The biosynthesis of ergot alkaloids (or the story of unexpected). In : Indole and biogenetically related alkaloids. Phillipson J. D., Zenk M. D. (Eds.). Academic Press, London 249 p.

GABERC-POREKAR V., SOCIC H., PERTOT E., MILICIC S. (1987) Metabolic changes in a conidia-induced *Claviceps paspali* strain during submerged fermentation. Can. J. Microbiol., 33, 602-606.

GERVAIS P., BAZELIN C. (1986) Development of solid state fermentor allowing the control of the substrate water activity. Biotechnol. Lett., 8, 191-196.

GERVAIS P., BAZELIN C., VOILLEY A. (1986) Patterns of aeration in a solid substrate fermentor through the study of the residence time distribution (RTD) of a volatile tracer. Biotechnol. Bioeng., 28, 1540-1543.

GERVAIS P., BELIN J.M., GRAJEK W., SARETTE M. (1988a) Influence of water activity on aroma production by *Trichoderma viride* TS growing on a solid substrate. J. Ferment. Technol., 66, 403-407.

GERVAIS P., BENSOUSSAN M., GRAJEK W. (1988b) Water activity and water content : comparative effects on the growth of *Penicillium roqueforti* on solid substrate. Appl. Microbiol. Biotechnol., 27, 389-392.

GERVAIS P., FASQUEL J.P., MOLIN P. (1988c) Water relations of fungal spore germination. Appl. Microbiol. Biotechnol., 29, 586-592.

GERVAIS P., MOLIN P., GRAJEK W., BENSOUSSAN M. (1988d) Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. Biotechnol. Bioeng., 31, 457-463.

GERVAIS P., SARRETTE M. (1990) Influence of age of mycelium and water activity of the medium on aroma production by *Trichoderma viride* grown on solid substrate. J. Ferm. Bioeng., 69, 46-50.

GIRAUD E., BRAUMAN A., KELEKE S., LELONG B., RAIMBAULT M. (1991) Isolation and physiological studies of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 379-383.

GLUND G., SCHLEE D., REINBOTHE H. (1979) Citric acid cycle during alkaloid production in *Claviceps purpurea*. Biochem. Physiol. Pflanzen, 174, 660-671.

GONZALEZ-BLANCO P., SAUCEDO-CASTANEDA G., VINIEGRA-GONZALEZ G. (1990) Protein Enrichment of Sugar Cane By-Products Using Solid-State Cultures of *Aspergillus terreus*. J. Ferm. Bioeng., 70, 351-354.

GORDON T.R., WEBSTER R.K. (1984) Evaluation of ergosterol as an indicator of infestation of barley seed by *Drechslera graminea*. Physiol. Biochem., 74, 1125-1127.

GRAJEK W. (1988) Production of protein by thermophilic fungi from sugar-beet pulp in solid-state fermentation. Biotechnol. Bioeng., 32, 255-260.

GRÖGER D., MOTHES K., SIMON H., FLOSS G., WEYGAND F. (1960) Über den einbau von mevalonsäure in das ergolinsystem der clavin-alkaloids. Z. Naturforsch. 15, 141-143.

GROGER D., TYLER J.R. (1963) Alkaloid production by *Claviceps paspali* in submerged culture. Lloydia, 26, 174-191.

- HELSELTINE C.W. (1972) Solid state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 14, 517-532.
- HELSELTINE C.W. (1977a) Solid State Fermentation - Part 1. *Process. Biochem.*, 4, 24-27.
- HELSELTINE C.W. (1977b) Solid State Fermentation - Part 2. *Process. Biochem.*, 6, 29-32.
- HELSELTINE C.W. (1987) Solid state fermentation-an overview. *Intern. Biodeterioration*, 23, 79-89.
- HIMMELBLAU D.M. (1969) *Process Analysis by Statistical Methods*. John Wiley (Ed.), New-York, 463 p.
- HOFMANN A. (1961) Recent developments in ergot alkaloids. *Australian J. Pharmacy*, 42, 7-18.
- HOFMANN A., TSCHERTER H. (1960) Isolierung von lysergsäure-alkaloiden aus der mexikanischen Zauberdrogue Ololiuqui (*Rivea corymbosa* (L.) Hall. f.). *Experientia*, 16, 414 p.
- HUERTA-OCCHOA S. (1984) Efecto de la transferencia de masa y la acumulación del calor metabólico en la fermentación de cultivos sólidos. Tesis de Maestría en Ciencias, Ingeniería Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, 147 p.
- JACOBS W. A., GOULD R. G. (1937) Ergot alkaloid synthesis. *J. Biol. Chem.* 120, 141.
- JERMINI M.F.G., DEMAINE A.L. (1989) Solid state fermentation for cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus* and *Cephalosporium acremonium*. *Experientia*, 45, 1061-1065.
- JUNG M., STALL E., ROCHERLMMEYER H. (1957) Zur frage der einoder mehrkernigkeit der konidiosporen von *Claviceps purpurea* Tul. (Mutterkorn). *Naturwiss.*, 44, 95-97.
- KARANTH N.G. (1991) Definition and characteristics of solid state fermentation. In : Short term course on Solid State Fermentation. Karanth N.G. (Ed.), Central Food Technological Research Institute. Mysore, p. 12.1-12.2.
- KIDRIC J., KOCJAN D., HADZI D. (1986) The biologically active conformation of ergot alkaloids. *Experientia*, 42, 327-328.
- KILLIAN M.C. (1919) Sur la sexualité de l'ergot de seigle, le *Claviceps purpurea* (Tulasne). *Bull. Soc. Mycol. France*, 35, 182-197.
- KELLER U. (1986) Ergot peptide alkaloid synthesis in *Claviceps purpurea*. In : Regulation of secondary metabolite formation. Kleinkauf E. (Ed.) *Proceedings XVI Workshop Conference Moenchst.*, pp. 157 -172.
- KOBEL H., BRUNNER R., BRACK A. (1962) Vergleich der Alkaloidbildung von *C. purpurea* in parasitischer and saprophytischer kultur. *Experientia*, 18, 140-141.
- KOBEL H., SANGLIER J.J. (1973) Quantitative changes in the alkaloid spectrum of *Claviceps purpurea* after mutation. In : Genetics of industrial microorganisms. Vaněk Z., Hostalek Z., Cudlin J. (Eds.). Vol. 2, Academia Prague., pp. 423-425.
- KOBEL H., SANGLIER J.J. (1976) Procédé de fabrication d'alkaloïdes du groupe de l'ergotoxine par fermentation combinée. French patent 2 307 870.
- KOBEL H., SANGLIER J.J. (1978) Formation of ergot alkaloids by fermentation and attempts to control their biosynthesis. In : Antibiotics and others secondary metabolites., Hütter R., Leisinger T., Nüesch J., Wehrli W. (Eds.). Academic Press, London, pp. 223-242.
- KOBEL K., SANGLIER J.J. (1986) Ergot alkaloids. In : Biotechnology. Microbial products II.

Rehm H.J., Reed G. (Eds.) Springer-Verlag. Weinheim, Vol. 4, pp. 569-609.

KOBEL H., SCHREIER E., RUTSCHMANN J. (1964) 6-Methyl- 8,9-ergolen-8-carboxylic acid, a new ergoline derivative from a culture of *Claviceps paspali* Stevens et Hall. Helv. Chim. Acta, 47, 1052-1064.

KOPP B., REHM H.J. (1983) Alkaloid production by immobilized mycelia of *Claviceps purpurea*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18, 257-263.

KOPP B., REHM H.J. (1984) Semicontinuous cultivation of immobilized *Claviceps purpurea*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 19, 14-145.

KREN V., LUDVIK J., KOFRONOVA O., KOZOVA J., REHACEK Z. (1987) Physiological activity of immobilized cells of *Claviceps fusiformis* during long-term semicontinuous cultivation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 26, 219 - 226.

KREN V., MEHTA P., RYLKO V., FLIEGER M., KOZOVA J., SAJDL P., REHACEK Z. (1987) Substrate regulation of ergochlorine formation by some saccharides. Zentralbl. Mikrobiol., 142, 71-85.

KREN V., REHACEK Z. (1984) Feed forward regulation of phosphofructokinase in a submerged culture of *Claviceps purpurea* producing clavine alkaloids. Specul. Sci. Technol., 7, 223-226.

KREN V., PAZOUTOVA S., RYLO V., SAJDL P., WURST M., REHACEK Z. (1984) Extracellular metabolism of sucrose in a submerged culture of *Claviceps purpurea* : formation of monosaccharides and clavine alkaloids. Appl. Microbiol. Biotechnol., 48, 826-829.

KRUPINSKI V.M., ROBBERS J.E., FLOSS H.G. (1976) Physiological study of ergot: induction of alkaloid synthesis by tryptophan at the enzymatic level. J. Bacteriol., 125, 158-165.

KUMAR P.K.R., LONSANE B.K. (1987 a). Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberellic acid. Biotechnol. Lett., 9, 179-182.

KUMAR P.K.R. and LONSANE B.K. (1987 b) Gibberellic acid by solid state fermentation : consistent and improved yields. Biotechnol. Bioeng., 30, 267-271.

KYBAL J. (1963) Response of ergot fungus to the nutrition available from the host plant. Phytopathological Notes, p. 363.

KYBAL J. (1964) Changes in N and P content during growth of ergot sclerotia due to nutrition supplied by rye. Phytopathol., 54, 244-245.

KYBAL J., KOMERSOVA M.I., WANI W.D. (1968) Phosphorus content during development of *Claviceps purpurea*. Phytopathol., 58, 647-650.

LARPENT J. P., SANGLIER J. J. (1989) Biotechnologie des antibiotiques. Larpent J.P., Sanglier J.J. (Eds.). Masson, Paris. 481 p.

LINDENFELSER L.A., CIEGLER A. (1975) Solid substrate fermentation for ochratoxin-A production. Appl. Microbiol., 30, 30-35.

LOHMEYER M., DIERKES W., REHM H.J. (1990) Influence of inorganic phosphate and immobilization on *Claviceps purpurea*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 196-201.

LONSANE B.K., GHILDYAL N.P., BUDIATMAN S., RAMAKRISHNA S. V. (1985) Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme Microbiol. Technol., 7, 258-265.

- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- LUCKNER M. (1984) Secondary metabolism. In : *Microorganisms, plants and animals*. Springer-Verlag (Eds.) Berlin, pp. 395- 399.
- LUCKNER M. (1985) Regulation of alkaloid metabolism. In : *Biochemistry of alkaloids*. Mothes K., Schütte H.R., Luckner M. (Eds.). Springer-Verlag. Berlin., pp. 37-41.
- MAIER W., ERGE D., GROGER D. (1981) Studies on the cell-free biosynthesis of ergopeptides in *Claviceps purpurea*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 12: 143.
- MANTLE P.G. (1974) Industrial exploitation of ergot fungi. In : *Industrial Mycology. The filamentous fungi*. Smith J. E., Berry D.R., (Eds.). Edward Arnold, London. Vol. 1, pp. 281-300.
- MANTLE P.G. (1969) Development of alkaloid production in vitro by a strain of *Claviceps purpurea* from *Spartina townsendii*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 52, 381-392.
- MANTLE P.G., MORRIS L.J., HALL S.W. (1969) Fatty acid composition of sphaerial and sclerotial growth forms of *Claviceps purpurea* in relation to the production of ergoline alkaloids in culture. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 53, 441-447.
- MANTLE P.G., NISBET L.J. (1976) Differentiation of *Claviceps purpurea* in axenic culture. *J. Gen. Microbiol.*, 93, 321-334.
- MANTLE P.G., TONOLO A. (1968) Relationship between the morphology of *Claviceps purpurea* and production of alkaloids. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 51, 499-505.
- MARNATI M.P., MINGHETTI A., SPALLA C. (1975) Abstracts conference on medicinal plants with international participation. *Marianske Lazne*, p. 68.
- MATCHAM S.E., JORDAN B.R., WOOD D.A. (1985) Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 108-112.
- MATHIEU D., PHAN TAN LUU R. (1982) Logiciel NEMROD LPRAI. Université d'Aix-Marseille, Marseille.
- MATOSIC S., BASIC V., LISNJIC M. (1984) Biosynthesis of ergot alkaloids by means of fungus *Claviceps paspali* Stevens and Hall. *Acta Bot. Croat.*, 43, 59- 64.
- MATOSIC S., HAJEK Z. (1983) Morphological differentiation of *Claviceps paspali* Stevens and Hall in biosynthesis of ergot alkaloids in submerged culture. *Acta Bot. Croat.*, 42, 45-50.
- MATOSIC S., KUNCIC J., TAMBURASEV G. (1983) Influence of concentration of phosphorus on biosynthesis of ergot alkaloids in culture of *Claviceps paspali*. *Prehrambeno-tehnoloska revija, PTRVB.*, 21, 151-154.
- MATOSIC S., MEHAK M., ERCEGOVIC L., BRAJKOVIC N. (1988) Effects of surfactants on biosynthesis of ergot alkaloids by means of immobilized mycelium of *Claviceps paspali*. 8th International Biotechnology symposium, Paris, July 17-22, Société Française de Microbiologie.
- Mc CREA A. (1931) The reactions of *Claviceps purpurea* to variations of environment. *Amer. J. Bot.*, 18, 50-78.
- MILICIC S., KREMSER M., GABERC-POREKAR V., DIDEK-BRUMEC M., SOCIC H. (1987) Correlation between growth and ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea* batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 117-120.
- MILICIC S., KREMSER M., GABERC-POREKAR V., DIDEK-BRUMEC M., SOCIC H.

(1989) The effect of aeration and agitation on *Claviceps purpurea* dimorphism and alkaloid synthesis during submerged fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, 134-137.

MILLER G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem., 31, 426-428.

MISRA M.C. (1991) Monitoring and control of parameters in solid state fermentation. In : Short term course on Solid State Fermentation. Karanth N.G. (Ed.), Central Food Technological Research Institute, Mysore, pp. 12.1-12.2.

MITCHELL D.A., LONSANE B.K. (1991) Definition, types and characteristics. In : Solid substrate cultivation. Doëlle H.W., Mitchell D.A., Rolz C.W. (Eds). Elsevier Science Publishers, Essex, England, (in press).

MOO-YOUNG M. (1980) Immobilized live cells. In : Advances in Biotechnology. Linko P. (Ed.). Vol. I, Pergamon Press, London. pp. 711-716.

MOO-YOUNG M., BLANCH H.W. (1982) Biochemical reactor design. Adv. Biochem. Eng., 19, 1-8.

MOO-YOUNG M., MOREIRA A.R., TENDERDY R.P. (1983) Principles of solid substrate fermentation. In : The filamentous fungi. Fungal technology. Smith J.E., Berry D.R., Kristiansen B. (Eds.). Edward Arnold Publisher, London. Vol. 4, pp. 117-144.

MOTHES K., WEYGAND F., GRÖGER D., GRISEBACH H. (1958) Biosynthesis of ergot alkaloids. Z. Naturforsch., 13b, 41-44.

MOWER R. L., HANCOCK J. G. (1975) Sugar composition of ergot honeydews. Can. J. Bot., 53, 2813-2825.

MUDGETT R.E. (1986) Solid-state fermentation. In : Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Demain A.L., Solomon N.A. (Eds.). American society for microbiology, Washington, pp. 66-84.

NARAHARA H., KOYAMA Y., YOSHIDA T. (1982) Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. J. Ferment. Technol., 60, 311-319.

NARAHARA H., KOYAMA Y., YOSHIDA T., ATTHASAMPPUNNA P., TAGUCHI H. (1984) Control of water content in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. J. Ferment. Technol., 62, 453-459.

NARAYAN V., RAO K.K. (1982) Factors affecting the fermentation of ergot alkaloids by *Aspergillus fumigatus* (Fresenius). Biotechnol. Lett., 4, 193 -196.

NEUMANN N. (1985) Storage of alkaloids. In : Biochemistry of alkaloids. Mothes K., Schütte H.R., Luckner M. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin., pp. 49-54.

NISHIO N., TAI K., NAGAI S. (1979) Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. Eur. J. Appl. Microbiol., 8, 263-270.

OGUR M., ROSEN G. (1950) Nucleic acids of plants tissues (I) Extraction of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. Arch Biochem., 25, 265-276.

ORIOLE E. (1987) Croissance d'*Aspergillus niger* sur milieu solide ; Importance de l'eau et de l'activité de l'eau. Thèse de Doctorat en Microbiologie, INSA de Toulouse, 133 p.

ORIOLE E., RAIMBAULT M., ROUSSOS S., VINIEGRA-GONZALES G. (1988) Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 27, 498-503.

- ORIOLE E., SCHETTINO B., VINIEGRA-GONZALEZ G., RAIMBAULT M. (1988) Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. J. Ferment. Technol., 66, 57-62.
- PACIFIC L.R., KELLEHER W.J., SCHWARTING A.E. (1962) Production of lysergic acid derivatives in submerged culture. I. Fermentation studies. Lloydia, 25, 37-45.
- PANDEY A. (1991) Aspects of fermenter design for solid state fermentations. Process Biochem., 26, 355-361.
- PANDEY A. (1992) Recent process developments in solid state fermentation. Process Biochem., 27, 109-117.
- PAZOUTOVA S., POKORNY V., REHACEK Z. (1977) The relationship between conidiation and alkaloid production in saprophytic strains of *Claviceps purpurea*. Can. J. Microbiol., 23, 1182-1187.
- PAZOUTOVA S., REHACEK Z. (1981) The role of citrate on the oxidative metabolism of submerged cultures of *Claviceps purpurea* 129. Arch. Microbiol., 129, 251-253.
- PAZOUTOVA S., REHACEK Z. (1984) Phosphate regulation of phosphatases in submerged cultures of *Claviceps purpurea* 129 producing clavine alkaloids. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 389-392.
- PAZOUTOVA S., REHACEK Z., VORISEK J. (1980) Induction of sclerotial-like mycelium in axenic cultures of *Claviceps purpurea* producing clavine alkaloids. Can. J. Microbiol., 26, 363-370.
- PAZOUTOVA S., SLOKOSKA L.S., NIDOLOVA N., ANGELOV T.I. (1982) Sugar phosphate metabolism and alkaloid production phases in submerged cultures of two *Claviceps* strains. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 16, 208-211.
- PENALOZA W., MOLINA M., GOMEZ R., BRESSANI R. (1985) Solid-state fermentation : an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. Appl. Environ. Microbiol., 49, 388-393.
- PERTOT E., CADEZ J., MILICIC S., SOCIC H. (1984) The effect of citric acid concentration and pH on the submerged production of lysergic acid derivatives. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 29-32.
- PERTOT E., ROZMAN D., MILICIC S., SOCIC H. (1988) Morphological differentiation of immobilized *Claviceps paspali* mycelium during semi-continuous cultivation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 209-213.
- PUC A., MILICIC S., KREMSEK M., SOCIC H. (1987) Regulation of ergotamine biosynthesis in *Claviceps purpurea* submerged fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 449-452.
- PUC A., SOCIC H. (1977) Carbohydrate nutrition of *Claviceps purpurea* for alkaloid production related to the osmolarity of media. Eur. J. Appl. Microbiol., 4, 283-287.
- RAIMBAULT M. (1980) Fermentation en milieu solide. Croissance de champignons filamenteux sur substrat amylacé. Thèse d'Etat. Univ. Paul SABATIER, Toulouse, 291 p.
- RAMSTAD E., GJERSTAD G. (1955) The parasitic growth of *Claviceps purpurea* (fries) tulasne on rye and its relation to alkaloid formation. J. Amer. Pharm. Assoc., 12, 741-743.
- RATHBUN B.L., SHULER M.L. (1983) Heat and mass transfer effects in static-substrate fermentations chambers. Biotechnol. Bioeng., 25, 929-938.

- REHACEK Z. (1983) New trends in ergot alkaloid biosynthesis. *Process Biochem.*, 18, 22-29.
- REHACEK Z. (1984) Biotechnology of ergot alkaloids. *Trends Biotechnol.*, 2, 166-172.
- REHACEK Z., SAJDL P. (1990) Ergot alkaloids. Elsevier (Eds.) Amsterdam., 383 p.
- REHACEK Z., KOZOVA J. (1975) Production of alkaloids and differentiation in a submerged culture of *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.. *Folia Microbiol.*, 20, 112-117.
- REHACEK Z., KOZOVA J., SADIL P., VORISEK J. (1974) The Physiology of conidial formation in submerged cultures of *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. Producing alkaloids. *Can. J. Microbiol.*, 20, 1323-1329.
- REHACEK Z., MALIK K. A. (1972) Physiological status of submerged *Claviceps* during enzymatic assembly of ergot alkaloids. *Folia Microbiol.*, 17, 490-494.
- REHACEK Z., MALIK K.A. (1971) Cell-pool tryptophan phases in ergot alkaloid fermentation. *Can. J. Microbiol.*, 16, 359-363.
- REHACEK Z., PAZOUTOVA S., KREN V., RYLKO V., KOZOVA J., SAJDL P. (1986) Czech. Pat. 252 603.
- REVAH S., LEBEAULT J.M. (1988) . Cheese flavours by solid state fermentation. *Proceedings of Solid State Fermentation in bioconversion of agro-industrial raw materials. ORSTOM-Montpellier*, 53-61.
- ROBBERS J.E., JONES L.G., KRUPINSKI V.M. (1974) Ergot physiology. The production of ergot alkaloids in saprophytic culture by a homokaryotic strain of ergot. *Lloydia*, 37, 108 -111.
- ROBBERS J. E., EGGERT W. W., FLOSS H.G. (1978) Physiological studies on ergot : time factor influence on the inhibitory effect of phosphate and the induction effect of tryptophan on alkaloid production. *Lloydia*, 41, 120-129.
- ROBBERS J. E. (1984) The fermentative production of ergot alkaloids. In : *Advances. Biotechnological Process.* Alan R.L. (Ed.). Liss, Inc., New York, Vol. 3, pp. 197-239.
- ROBBERS J.E., ROBERTSON L.W., HORNEMANN K.M., JINDRA A., FLOSS H. G. (1972) Physiological studies on ergot. Further studies on the induction of alkaloid synthesis by tryptophan and its inhibition by phosphate. *J. Bacteriol.*, 112, 791-796.
- ROUSSOS S. (1985) Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide : Physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse de Docteur Es-Sciences Naturelles, Université de Provence, 193 p.
- ROZMAN D., PERTOT E., KOMEL R., PROSEK M. (1989) Production of lysergic acid derivatives with immobilized cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 5-10.
- RYOO D., MURPHY V.G., KARIM M.N., TENDERDY R.P. (1991) Evaporative temperature and moisture control in a rocking reactor for solid substrate fermentation. *Biotechnol. Tech.*, 5, 19-24.
- SANGLIER J.J. (1977) Contribution a l'étude de la différenciation conidienne chez *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.. Thèse Docteur de Spécialité (3ème cycle) de Biochimie et Biologie Appliquée, Université Clermont-Ferrand II, 99 p.
- SATO K., NAGATANI M., NAKAMURA K., SATO S. (1983) Growth estimation of *Candida lipolytica* from oxygen uptake in a solid state culture with forced aeration. *J. Ferment. Technol.*, 61, 623-629.
- SATO K., YOSHIZAWA K. (1988) Growth and growth estimation of *Saccharomyces*

cerevisiae in solid state ethanol fermentation. J. Ferment. Technol., 66, 667-673.

SAUCEDO-CASTAÑEDA G. (1991) Contrôle du métabolisme de *Schwanniomyces castellii* cultivé sur support solide. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 212 p.

SAUCEDO-CASTAÑEDA G., GUTIERREZ-ROJAS M., BACQUET G., RAIMBAULT M., VINIEGRA-GONZALES (1990) Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. Biotechnol. Bioeng., 35, 802-808.

SAUCEDO-CASTAÑEDA G., TREJO-HERNANDEZ M-R., LONSANE B.K., ROUSSOS S., DUFUOR D., RAIMBAULT M. (1992) Analyse et contrôle des gaz en fermentation solide. III Congrès de la Société Française de Microbiologie. Lyon, France, 21-24 Avril.

SEITZ L., POMERANZ Y. (1983) Ergosterol, ergosta-4,6,8 (1-4), 22-tetraen-3-one, ergosterol peroxide, and chitin in ergosty barley, rye, and others grasses. J. Sci. Food Agric., 31, 1036-1038.

SEITZ L.M., SAUER D.B., BURROUGHS R., MOHR H.E., HUBBARD J.D. (1979) Ergosterol as a measure of fungal growth. Physiol. Biochem., 69, 1202-1203.

SERRANO-CARREON L., BAUDRON S., BENSOUSSAN M., BELIN J.M. (1992) A simple protocol for extraction and detection of pyrazines produced by fungi in solid state fermentation. Biotechnol. Techn., 6, 19-22.

SERRANO-CARREON L., HATHOUT Y., BENSOUSSAN M., BELIN J.M. (1992) Lipid accumulation in *Trichoderma species*. FEMS Microbiol. Lett., 93, 181-188.

SHAH S.R., DESAI J.D. (1988) Alterations in lipid content during submerged cultivation of *Claviceps sp.* strain SD 58. Indian J. Exper. Biol., 26, 34 -36.

SHARMA R.K., VERMA O.P., PATHAK V.N. (1984) Some physical and nutritional factors for growth and sporulation of *Claviceps fusiformis* Lov. Cryptogamie Mycologie, 5, 269-216.

SILMAN R.W., CONWAY H.F., ANDERSON R.A., BAGLEY E.B. (1979) Production of aflatoxin in corn by a large scale solid substrate fermentation process. Biotechnol. Bioeng., 21, 1799-1808.

SIRE B., SANGLIER J. J., DAVID L. (1989) Biosynthèse des antibiotiques. In : Biotechnologie des antibiotiques. Larpent J.P., Sanglier J. J. (Eds.). Masson, Paris. p. 139-179.

SMITH P.R. (1980) The determination of chitin - A short literature review in relation to quantification of mould growth. The British food manufacturing industries research association, 124, 1-11.

SOCCOL C. (1992) Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L (+) lactique. Thèse de Doctorat, UTC Compiègne, 218 p.

SOLOMON B.B., ERICKSON L.E., YANG S.S. (1983) Estimation of biomass concentration in the presence of solids for the purpose of parameter estimation. Biotechnol. Bioeng., 25, 2469-2477.

SPALLA C. (1969) Genetic problems of production of ergot alkaloids in saprophytic and parasitic conditions, 4. Internationales Symposium. Biochemie und Physiologie der Alkaloide, Abhandlungen der deutschen akademie der wissenschaften zu Berlin.

SPALLA C. (1973) Genetics problems of production of ergot alkaloids in saprophytic and parasitic conditions. In : Genetics of industrial microorganisms. Vanek Z., Hostalek Z., Cludlin J. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, Vol. 2, pp. 393-403.

- SPALLA C., MINGHETTI A. (1989) Nitrogen regulation of the alkaloid formation in *Claviceps* sp. In : Nitrogen source control of microbial processes. Sanchez Esquivel, (Ed.) CRC Press, Inc., Florida, pp. 151-167.
- SPALLA C., FILIPPINI S., GREIN A. (1978) A hypothesis on the regulation mechanisms governing the biosynthesis of alkaloids in *Claviceps*. Folia Microbiol., 23, 505-508.
- SPILSBURY J. F., WILKINSON S. (1961) The isolation of festuclavine and two new clavine alkaloids from *Festuca*. J. Chem. Soc., 2085-2091.
- STADLER P.A., GUTTMANN S., HAUTH H., HUGHENIN L.R., SANDRIN E., WERSIN G., WILLEMS H., HOFMANN A. (1969) Die synthese der alkaloiden der ergotamin-gruppe. Helv. Chim. Acta, 52, 1549-1564.
- STOLL A., BRACK A., KOBEL H., HOFMANN A., BRUNNER R. (1954) Die alkaloiden eines mutterkornpilzes von *Pennisetum typhoides* Rich. und deren bildung in saprophytischer kultur. Helv. Chim. Acta, 37, 1815-1825.
- STOLL A. (1920) Verfahren zur isolierung des reinen kristallisierten hautalkaloids aus *Secale cornutum*. Swiss Patent. Nr. 86321.
- STOLL A., HOFMANN A. (1943) Partial synthese von alkaloiden typus des ergobasins. Helv. Chim. Acta, 26, 944-965.
- STOLL A., BRACK A. (1944) Zum feldmässigen anbau von mutterkorn. Pharm. Act. Helv., 19, 272-280.
- SUGAMA S., OKAZAKI N. (1979) Growth estimation of *Aspergillus oryzae* cultured on solid media. J. Ferment. Technol., 57, 408-412.
- SZEPESY L., FEHER I., SZEPESI G., GAZDAG M. (1978) High-Performance Liquid Chromatography of ergot alkaloids. J. of Chromatogr., 149, 271-280.
- TABER W.A. (1967) Fermentative production of hallucinogenic indole compounds. Lloydia, 30, 39-66.
- TABER W. A., VINING L. C. (1958) The influence of certain factors on the in vitro production of ergot alkaloids by *Claviceps purpurea* (Fr) Tul., Can. J. Microbiol., 4, 611-626.
- TABER W. A., VINING L. C. (1981) Role of krebs cycle acids in promoting ergot alkaloid production by *Claviceps species*. Proc. N. S. Inst. Sci., 31, 237-249.
- TABER W.A. (1964) Sequential formation and accumulation of primary and secondary shunt metabolic products in *Claviceps purpurea*. Appl. Microbiol., 12, 321-326.
- TABER W. A., VINING L. C. (1959) The effect of homogenizing the inoculum on the in vitro production of ergot alkaloids. Can. J. Microbiol., 5, 418-421.
- TABER W. A. (1985) Biology of *Claviceps*. In : Biology of industrial microorganisms. Demain A.L., Solomon N.A. (Eds.). Benjamin Cumming, London, pp. 449-481.
- TANRET Ch. (1875) Sur la présence d'un nouvel alcaloïde, l'ergotamine, dans le seigle ergoté. C.R. Acad. Sci., 81, 896-897.
- TEUSCHER E. (1964) Influence of auxins on the production of ergot alkaloids in saprophytic cultures. Phytochem., 4, 341-343.
- TAUSSKY H., SHOOR E. (1953) A colorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. J. Biol. Chem., 202, 675-685.

- THIERRY A., CHICHEPORTICHE R. (1988) Use of ATP bioluminescence measurements for the estimation of biomass during biological humification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 199-202.
- THOMAS R., BASSET R.A. (1972) The biosynthesis of ergot alkaloids. In : *Progress in Phytochemistry*. Reinhol L., Liwschwitz Y. (Eds.). Vol. 3, Interscience, London, pp. 47-111.
- TONOLO A. (1966) Production of peptide alkaloids in submerged culture by a strain of *Claviceps purpurea*. *Nature*, 209, 1134-1138.
- TREJO HERNANDEZ M.R. (1986) Producción de enzimas pécicas por fermentación en cultivo sólido. Tesis de licenciatura, Universidad Autonoma de México, 106 p.
- TREJO-HERNANDEZ M.R., LONSANE B.K., RAIMBAULT M., ROUSSOS S. (1992a) Spectra of ergot alkaloids produced by *Claviceps purpurea* 1029c in solid-state fermentation system : influence of the composition of liquid medium used for impregnating sugar-cane pith bagasse. *Process Biochem.*, 27, (in press).
- TREJO-HERNANDEZ M.R., LONSANE B.K., RAIMBAULT M., ROUSSOS S. (1992b) Solid substrate mediated changes in ergot alkaloid spectra in solid state fermentation system. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 15, (in press).
- TREJO HERNANDEZ M.R., ORIOL E., LOPEZ-CANALES A., ROUSSOS S., VINIEGRA-GONZALEZ G., RAIMBAULT M. (1991) Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. *Micol. Neotrop. Apl.*, 4, 49-62.
- TREJO-HERNANDEZ M., RAIMBAULT M., ROUSSOS S., LONSANE B.K. (1992c) Potential of solid state fermentation for production of ergot alkaloids. *Letters in Appl. Microbiol.*, (in press).
- TREJO-HERNANDEZ M.R., RAIMBAULT M., ROUSSOS S., LONSANE B.K. (1992d). Production d'alkaloïdes de l'ergot du seigle par *Claviceps purpurea* en fermentation solide sur support. III Congrès de la Société Française de Microbiologie. Lyon, Francia 21-24 de Abril, 1992.
- TREJO-HERNANDEZ M.R., LONSANE B.K., RAIMBAULT M., ROUSSOS S. (1992e). Changes in the spectra for utilisation of the differents substrates. VI International Symposium on Microbial Ecology. Barcelona, España 6-11 de Septiembre de 1992.
- TYLER V. E. (1961) Biosynthesis of ergot alkaloids. *J. Pharm. Sci.*, 50, 629-638.
- VAIDYA H.C., DESAI J.D. (1982) Effect of phosphate on growth, carbohydrate catabolism & alkaloid biogenesis in *Claviceps sp.* strain SD 58. *Indian J. Exper. Biol.*, 20, 475-478.
- VENN R. D. (1978) Clinical pharmacology of ergot alkaloids in senile cerebral insufficiency. In : *Ergot alkaloids and related compounds*. Berde B., Schild O. (Eds.). Vol. 49, Handb Exp. Pharmacol., Springer Verlag, Berlin, p. 533.
- VINING L.C., NAIR P.M. (1966) Clavine formation in submerged cultures of a *Claviceps species*. *Can. J. Microbiol.*, 12, 915-931.
- VINING L.C. (1970) Effect of tryptophan on alkaloid biosynthesis in cultures of *Claviceps species*. *Can. J. Microbiol.*, 16, 473-480.
- VINING L. C. (1973) Physiological aspects of alkaloid production by *Claviceps species*. In : *Genetics of industrial microorganisms. Actinomycetes and fungi*. Vanék, Z., Hostalek S., Cudlin J. (Eds.) Elsevier New York., Vol. 2, pp. 405-419.

VORISEK J., REHACEK Z. (1978) Fine structural localization of alkaloid synthesis in endoplasmic reticulum of submerged *Claviceps purpurea*. Arch. Microbiol., 117, 297-302.

VORISEK J., LUDVIK J., REHACEK Z. (1974) Morphogenesis and ultrastructure of *Claviceps purpurea* during submerged alkaloid formation. J. Bacteriol., 120, 1401-1408.

WAART C., TABER W.A. (1960) Some aspects of phosphate metabolism of *Claviceps purpurea*. Can. J. Microbiol., 6, 675-678.

WAIBLINGER K., GRÖGER D. (1972) On the production of ergoline alkaloids and fatty acid composition of the mycelium in submerged cultures of various *Claviceps species*. Biochem. Physiol. Pflanzen., 163, 468-476.

WINKLER K., GRÖGER D. (1962) Neue arbeiten zur biosyntheses der mutterkorn alkaloids. Pharmazie., 17, 658-670.

YAMAUCHI H., AKITA O., OBATA T., AMACHI T., HARA S., YOSHIZAWA K. (1989) Production and application of a fruity odor in a solid state culture of *Neurospora sp.* using pregelatinized polished rice. Agric. Biol. Chem., 53, 2881-2886.

YANG S.S., LING M.Y. (1989) Tetracycline production with sweet potato residue by solid state fermentation. Biotechnol. Bioeng., 33, 1021-1028.

Liste de publications issues de cette thèse

TREJO-HERNANDEZ M-R, LONSANE B;K., RAIMBAULT M. ROUSSOS S. (1992). Spectra of ergot alkaloids produced by *Claviceps purpurea* 1029c in solid-state fermentation system : influence of the composition of liquid medium used for impregnating sugar-cane pith bagasse, Process Biochem., sous presse

TREJO-HERNANDEZ M-R., LONSANE B.K., RAIMBAULT M., ROUSSOS S. . Solid substrate mediated changes in ergot alkaloid spectra in solid state fermentation system, Chem. Mikrobiol. YTechnol. Lebensm, 15, sous presse.

TREJO-HERNANDEZ M-R., RAIMBAULT M., ROUSSOS S., LONSANE B.K. (1992). Potential of solid state fermentation for production of ergot alkaloids, Letters in Appl. Microbiol., sous presse.

ANNEXE A

ANNEXE B

Techniques de fixation pour la microscopie électronique à balayage

Les échantillons destinés à la microscopie électronique doivent être fixés dans le but d'éviter toute déformation des structures suite à la déshydratation nécessaire pour obtenir une métallisation homogène. Tous les échantillons doivent être traités simultanément. Pour établir une cinétique de croissance il est donc nécessaire de prévoir des inoculations échelonnées dans le temps, afin de pouvoir en disposer au même moment. Deux techniques de fixation différentes ont été utilisées : l'une au formaldéhyde et l'autre au glutaraldéhyde (BLAHA et PARIS, 1987).

• Fixation au formaldéhyde

La composition du fixateur est la suivante : Aldéhyde formique (FAA) à 40 %, 10 ml ; Acide acétique pur ; 10 ml et éthanol pur ; 85 ml. Les échantillons sont introduits dans des petits paniers grillagés et immergés dans le fixateur FAA pendant 12 h sous vide dans une petite enceinte close (dessiccateur branché sur une trompe à vide), afin d'éliminer les bulles d'air de la bagasse et faciliter la pénétration du fixateur au sein de l'échantillon.

Les paniers sont passés dans quatre bains successifs d'éthanol à 80 %, d'une demi-heure chacun. Le vide est rétabli entre chaque changement de bain. Les paniers séjournent ensuite dans 2 bains successifs d'alcool à 95 % et 2 bains d'éthanol absolu. Les échantillons sont conservés dans de l'alcool absolu jusqu'à la métallisation qui est réalisée au Laboratoire de Microscopie Electronique à l'Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc (UM II).

• Fixation au glutaraldéhyde

La composition du fixateur est la suivante : Glutaraldéhyde à 25 % ; 1 ml ; Tampon cacodylate, 4 ml et eau distillée, 1 ml. Le glutaraldéhyde utilisé est du glutaraldéhyde très pur (grade I) à 25 % en solution aqueuse pour la microscopie électronique (SIGMA G-5882). Le tampon cacodylate est préparé avec l'acide cacodylique à 16 g/l à pH 7,5.

Les échantillons sont placés dans des petits paniers grillagés et immergés dans le fixateur pendant 12 h, sous vide. Le bain de fixateur est renouvelé 2 fois à une demi-heure d'intervalle avec mise sous vide ; puis ils sont rincés dans 2 bains de tampon cacodylate (avec mise sous vide de 10 min entre chaque bain). Les échantillons sont ensuite portés 12 h sous vide dans du tampon cacodylate. Une fois fixés, on procède à la phase de déshydratation. Les échantillons sont transférés dans des bains successifs d'alcool de concentrations croissantes 10, 20, 40, 60, 80, 95 % et enfin dans de l'éthanol absolu. Pour chaque concentration, 2 bains avec mise sous vide d'une demi-heure, sont réalisés. Quelle que soit la méthode utilisée, les échantillons sont conservés dans de l'alcool absolu jusqu'à la métallisation à l'or.

La métallisation des structures est réalisée après élimination totale de l'alcool. Pour ce faire, les petits paniers contenant les échantillons sont introduits dans un appareil à déshydratation par la méthode du point critique (Balzers). Du CO₂ liquide recouvre les échantillons et remplace totalement l'alcool. Le CO₂ est dégazé à pression atmosphérique et les échantillons desséchés sont prêts pour la métallisation. Ceux-ci sont déposés sur du ruban adhésif double face et montés sur des plots disposés dans un appareil à pulvérisation cathodique. Une fine pellicule d'or d'environ 200-250 Angstroms est vaporisée pour rendre les préparations conductibles (Polaron, Model E 5000).

Les échantillons sont alors prêts pour l'observation au microscope électronique à balayage. L'examen par balayage a été effectué à l'aide d'un microscope électronique JEOL J.S.M.35. Les analyses ont été effectuées grâce à la collaboration de M. ROSSI et M.DATAS de l'UM II.

RESUMEN

El estudio del crecimiento y de la producción de los alcaloides del cornezuelo del centeno de dos cepas de *Claviceps* (*C. purpurea* y *C. fusiformis*) fue realizado en cultivo en medio sólido y en cultivo en medio sumergido. La biosíntesis de los alcaloides fue estudiada en función de las condiciones y de la composición del medio del cultivo. Los factores estudiados presentaron un efecto importante tanto en la biosíntesis de los alcaloides como sobre el rendimiento de producción y sobre la proporción de los alcaloides producidos.

El análisis de los gases de la fermentación se reveló como una herramienta importante para evaluar de la adaptación de las cepas en medio sólido. Esta técnica permitió establecer las diferentes condiciones de cultivo en FMS y de evaluar en continuo la evolución de la fermentación por medio del análisis del CO₂ producido.

La metodología de diseño experimental, nos permitió determinar la influencia de los diferentes factores ambientales y nutricionales estudiados. Así, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, la aereación, la concentración de fosfato inorgánico y la adición de precursores (triptófano, valina y prolina) fueron los factores que presentaron los efectos más significativos sobre la biosíntesis de los alcaloides. Por una parte, se confirmó la importancia del triptófano como precursor y el efecto favorable de la concentración elevada de la sacarosa en el medio de cultivo en la biosíntesis de los alcaloides. Por otra parte, se demostró que la proporción de los diferentes alcaloides producidos está directamente relacionada con la composición del medio, así como a la técnica de cultivo utilizada.

El rendimiento en alcaloides totales con respecto a la biomasa fue más elevado en cultivo en medio sólido que en medio sumergido de un factor 3 por *C. purpurea* (23,58 mg/ g de biomasa peso seco) y de 10 por *C. fusiformis* (187,76 mg/ g de biomasa peso seco) después de 200 horas de cultivo. La fermentación en medio sólido (FMS) sobre bagazo de caña impregnado se reveló interesante en el estudio de metabolitos secundarios de alto valor agregado. En efecto, se observó que la producción en alcaloides en FMS es dos veces más elevada para *C. purpurea* (414,43 mg/l) y 4 veces más elevada para *C. fusiformis* con respecto a los resultados obtenidos en cultivo en medio sumergido. Estos resultados constituyen una contribución a la producción de los alcaloides de cornezuelo del centeno por vía biotecnológica y a la valorización de los subproductos tropicales por medio de la fermentación en medio sólido.

ABSTRACT

The study of the growth and the production of ergot alkaloids by *Claviceps purpurea* and *Claviceps fusiformis* cultured in liquid (SmF) and solid state fermentation (SSF), was the main objective of this work. Different growth conditions were tested in order to evaluate the alkaloids biosynthesis by *Claviceps* sp. These parameters influenced the production yields and the profile of alkaloids produced.

Gas analysis (CO₂ and O₂) of solid state cultures was the preferred method of evaluating the microbial growth. This procedure determined the best conditions for the culture development and continuous monitoring of fungal growth.

The influence of different culture parameters on the alkaloid biosynthesis by *Claviceps* sp. were evaluated by the experimental design methodology. The main parameters affecting alkaloid production were the nature of carbon and nitrogen sources, the aeration rate, the inorganic phosphate concentration and the presence of precursors (tryptophan, valine, proline). In particular, the role of tryptophan as precursor of the alkaloid biosynthesis was confirmed, as well as the stimulant effect of the sucrose content in the culture medium. Indeed, it was demonstrated that the variations observed on the spectra of alkaloids were directly related to the culture medium composition and to the culture system used (solid and liquid).

The alkaloid productivity of both strains was found to be higher in SSF than in SmF; for *C. purpurea* and *C. fusiformis* the alkaloid content was 3 times (23.58 mg/g of biomasse DW) and 10 times (187.76 mg/g of biomasse DW), respectively. The SSF on impregnated support produced interesting high value secondary metabolites. It was observed that alkaloid production on SSF was 2 times higher on *C. purpurea* (414.43 mg/l) and 4 times higher on *C. fusiformis* (891.86 mg/l) compared to those obtained on SmF. These results constitute a contribution to the biotechnological processes of ergot alkaloids using tropical by-products by the means of SSF systems.

RESUME

Dans le cadre de ce travail, nous avons comparé la croissance et la production d'alcaloïdes de l'ergot du seigle par *Claviceps purpurea* et *Claviceps fusiformis* en cultures en milieu solide (FMS) et en milieu submerge (FSm). L'étude de la biosynthèse d'alcaloïdes par ces souches a été réalisée en variant les conditions environnementales et la composition du milieu de culture. Ces facteurs se sont révélés très importants lors de la biosynthèse d'alcaloïdes, aussi bien sur les rendements de production que sur le profil d'alcaloïdes produits.

L'analyse des gaz a constitué un outil performant pour évaluer l'adaptation des souches à la culture en milieu solide. Cette technique nous a permis d'établir les conditions de culture en FMS et de suivre en continu l'évolution de la croissance en fonction du CO₂ dégagé.

L'utilisation de la méthodologie des plans d'expériences, nous a permis de préciser l'influence des différents facteurs étudiés. Ainsi, la source de carbone, la source d'azote, l'aération, le phosphate inorganique et l'addition de précurseurs (tryptophane, valine, proline) se sont révélés comme les facteurs principaux ayant des effets prépondérants sur la biosynthèse d'alcaloïdes. En particulier, le rôle du tryptophane comme précurseur de la biosynthèse d'alcaloïdes a été amplement confirmé, de même que l'effet stimulateur du saccharose. Il a été clairement mis en évidence que les variations observées dans le spectre d'alcaloïdes produits sont directement liées à la composition du milieu de culture et à la technique de culture utilisée.

Le rendement en alcaloïdes totaux exprimé par rapport à la biomasse est plus élevé en fermentation en milieu solide qu'en milieu submergé, d'un facteur 3 pour *C. purpurea* (23,58 mg/g de biomasse PS) et 10 pour *C. fusiformis* (187,76 mg/g de biomasse PS) après 200 heures de culture.

La culture en FMS sur support imprégné s'est avérée très intéressante pour la production de métabolites secondaires à haute valeur ajoutée. On a en effet observé des productions en alcaloïdes par FMS deux fois plus élevées pour *C. purpurea* (414,43 mg/l) et quatre fois pour *C. fusiformis* (891,86 mg/l) que celles obtenues en culture submergée. Ces résultats constituent donc une contribution à l'amélioration de la production des alcaloïdes de l'ergot du seigle par biotechnologie et à la valorisation des sous-produits tropicaux par le biais de la FMS.

MOTS CLEFS : *Claviceps purpurea*, *Claviceps fusiformis*, alcaloïdes de l'ergot du seigle ; fermentation en milieu solide (FMS) ; support solide inerte ; bagasse de canne à sucre ; substrats amylicés ; caractéristiques de croissance.