HAL
open science

Caractérisation morphologique des agrégats mycéliens en fermentations. Application à deux souches de basidiomycètes produisant des métabolites à activités pharmacologiques

Gilles Durant

To cite this version:

Gilles Durant. Caractérisation morphologique des agrégats mycéliens en fermentations. Application à deux souches de basidiomycètes produisant des métabolites à activités pharmacologiques. Biotechnologies. Université Claude Bernard - Lyon I, 1994. Français. NNT : . tel-01066015

HAL Id: tel-01066015

https://theses.hal.science/tel-01066015v1

Submitted on 19 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° 234-94

THESE

Présentée devant
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

par

Gilles DURANT

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
DES MINES DE SAINT-ETIENNE
Bibliothèque du Centre SPIN

Caractérisation morphologique des agrégats mycéliens en fermentations :

Application à deux souches de Basidiomycètes produisant des métabolites à activités pharmacologiques

Soutenue à Saint-Etienne le 14 Novembre 1994

Composition du Jury

Messieurs	H. Brauer	Examinateur
	P. Formisyn	Examinateur
	J-J. Sanglier	Rapporteur
	C. Thomas	Rapporteur
	G. Valla	Examinateur
	J. Villard	Directeur de thèse

N° 234-94

THESE

Présentée devant
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

par

Gilles DURANT

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
DES MINES DE SAINT-ETIENNE
Bibliothèque du Centre SPIN

Caractérisation morphologique des agrégats mycéliens en fermentations :

Application à deux souches de Basidiomycètes produisant des métabolites à activités pharmacologiques

Soutenue à Saint-Etienne le 14 Novembre 1994

Composition du Jury

Messieurs	H. Brauer	Examinateur
	P. Formisyn	Examinateur
	J-J. Sanglier	Rapporteur
	C. Thomas	Rapporteur
	G. Valla	Examinateur
	J. Villard	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE	M. le Pr. G. FONTAINE
VICE-PRESIDENT FEDERATION SANTE Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales	M. le Pr. P. ZECH
VICE-PRESIDENT FEDERATION SCIENCES	M. le Pr. Y. LEMOIGNE
SECRETAIRE GENERAL	M. J. FLACHER

FEDERATION SANTE

UFR de MEDECINE LYON GRANGE BLANCHE	Directeur : Mme le Pr. H. PELLET
UFR de MEDECINE ALEXIS CARREL	Directeur : M. le Pr. J.C. EVREUX
UFR de MEDECINE LYON-NORD	Directeur : M. le Pr. L.M. PATRICOT
UFR de MEDECINE LYON-SUD	Directeur : M. le Pr. H. DEJOUR
I.S.P.B. FACULTE DE PHARMACIE	Directeur : M. le Pr. J. VILLARD
UFR d'ODONTOLOGIE	Directeur : M. le Pr. H. MAGLOIRE
INSTITUT de TECHNIQUES DE READAPTATION	Directeur : M. le Pr. M. EYSSETTE

DEPARTEMENTS FEDERATION SANTE

DEPARTEMENT de BIOLOGIE HUMAINE	Directeur : M. le Pr. P.A. BRYON
DEPARTEMENT d'INNOVATION et de COORDINATION PEDAGOGIQUE	Directeur : M. le Pr. M. LAVILLE

FEDERATION SCIENCES

INSTITUT des SCIENCES DE LA MATIERE	Directeur : M. le Pr. E. ELBAZ
INSTITUT des SCIENCES DE L'INGENIERIE ET DU DEVELOPPEMENT TECHNOLOGIQUE	Directeur : M. le Pr. J. DIMNET
INSTITUT de CHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRES ET CELLULAIRES	Directeur : Mme A. VARAGNAT - M.C.
INSTITUT d'ANALYSE DES SYSTEMES BIOLOGIQUES ET SOCIO-ECONOMIQUES	Directeur : M. le Pr. J.M. LEGAY
INSTITUT des SCIENCES ET DE LA TERRE, DE L'OCEAN, DE L'ATMOSPHERE, DE L'ESPACE ET DE L'ENVIRONNEMENT	Directeur : M. le Pr. S. ELMI
UFR des ACTIVITES PHYSIQUES ET SPORTIVES	Directeur : M. J. CAMY - M.C.
I.U.T. A	Directeur : M. le Pr. J. GIELLY
I.U.T. B	Directeur : M. le Pr. J. PIVOT
OBSERVATOIRE DE LYON	Directeur : M. le Pr. J.C. RIBES

DEPARTEMENTS FEDERATION SCIENCES

DEPARTEMENT de 1ER CYCLE PLURIDISCIPLINAIRE SCIENCES	Directeur : M. P. PONCET - M.C.
DEPARTEMENTS de 2EME CYCLE :	
- SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE	Directeur : M. le Pr. J.P. BLANCHET
- SCIENCES POUR L'INGENIEUR	Directeur : M. le Pr. G. ASCH
- SCIENCES DE L'ANALYSE ET DE LA MATIERE	Directeur : Mme le Pr. C. BARBIER-CHAPELET

A mon père

A Bénédicte

Préface

Les vertus délicieusement anesthésiantes du jour de la soutenance sont si fortes qu'elles permettent de laisser croire au public, mais parfois également au thésard, que le déroulement de son projet de recherche n'a été qu'une suite logique, parfaitement linéaire et programmée. Heureusement, il reste alors la rédaction des remerciements pour effacer cette illusion d'un jour et pour se rappeller qu'il n'en a rien été. Le parcours tortueux menant jusqu'à la thèse s'est composé d'errances, de doutes et de choix multiples qui, bien souvent, n'ont pu être surmontés qu'avec l'aide de personnes "providentielles". Les lignes suivantes vont tenter de leur exprimer toute ma gratitude.

Ce travail a été réalisé à l'Ecole des Mines de St Etienne et financé par une bourse du Ministère de l'Industrie. Il a été initié au sein de "l'ex-section" Génie Industriel et Biotechnologie puis poursuivi dans "l'ex-équipe" Bioprocédés pour enfin s'achever au sein du Laboratoire d'Ingénierie de l'Environnement (Centre SIMADE).

Je remercie Monsieur J. VILLARD, Professeur à La Faculté de Pharmacie LYON I, pour m'avoir conservé sa confiance tout au long de ces travaux et ce malgré notre modification des objectifs initiaux.

Je suis particulièrement reconnaissant à Monsieur P. FORMISYN, Chargé de recherche à l'Ecole des Mines, d'avoir su maintenir la continuité de ce projet de recherche et son bon déroulement matériel au milieu des réorganisations administratives intervenues pendant sa durée.

J'adresse de vifs remerciements à Messieurs G. VALLA, Maître de conférence à l'Université C. Bernard LYON I, et J-J. SANGLIER, Directeur de recherche chez SANDOZ AG., pour avoir accepter d'évaluer ce travail respectivement en qualité de membre du jury et de rapporteur.

Je tiens à exprimer ma gratitude à l'égard du Professeur H. BRAUER, de la Technische Universität Berlin, pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de thèse et offert l'opportunité de travailler au sein de son institut pour une durée de 10 semaines. Ce séjour a également pu être effectué grâce aux efforts de Messieurs P. FORMISYN et F. LANCELOT, respectivement pour son organisation et pour l'obtention d'un financement ERASMUS.

Mes plus vifs remerciements vont également au Dr. C.R. THOMAS, Directeur de recherche à l'univertité de Birmingham (Angleterre), pour avoir accepter d'être rapporteur de ces travaux et pour sa collaboration toujours efficace et précieuse à cette recherche. Cela a été pour moi à la fois très enrichissant et un grand honneur de travailler au sein de son laboratoire. Je souhaite que cette collaboration puisse se

poursuivre sur les projets que nous avons encore en cours. J'associe également à ces remerciements Monsieur P.W. COX qui a énormément contribué à la réussite de mon séjour à Birmingham.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Madame J. PEGUET-NAVARRO (INSERM U349), d'une part pour avoir accepter de réaliser les tests d'immunomodulation, d'autre part pour sa patience, sa disponibilité et sa gentillesse face à mes lacunes en immunologie.

Les personnes suivantes ont également largement contribué, chacune à leur façon, à faciliter le déroulement de cette thèse:

- *Hervé VAILLANT, qui a partagé avec moi les "tribulations" de l'équipe Bioprocédés, m'a permis de gagner un temps précieux en me faisant profiter de son expérience en chromatographie. En le remerciant vivement, je lui adresse tous mes voeux de réussite pour la suite de ses recherches;*
- *Satish, Helmut et Françoise, les "prédecesseurs" qui ont montré la "voie", et dont les nombreux encouragements et conseils ont fortement renforcé ma détermination à "aller au bout". Je souhaite de tout coeur que notre amitié résiste à l'éloignement;*
- *l'ensemble du personnel et thésards du 3ème étage pour leur disponibilité et notamment Anne-Marie DANNA, Marie-Claude BARTHOLIN, Henri BESSET, souvent sollicités mais toujours d'une aide précieuse et bienveillante;*
- *les stagiaires allemands, Andreas, Astrid, Christine, Mathias, Uli qui ont participé à différentes phases de l'étude. Une mention particulière est accordée à Christine pour sa brillante participation aux premiers balbutiements en analyse d'images;*
- *Axel, Birgit, Djohan, Jareen, Nora, Stephan, Bettina qui m'ont très amicalement accueilli lors de mon séjour à Berlin;*
- *Monsieur M. THOMAS (Centre SPIN), pour sa confiance accordée dès le début du projet analyse d'images;*
- *Messieurs F. GRUY et M. COURNIL (Centre SPIN), toujours suffisamment indulgents pour répondre à mes questions de néophyte en matière de modélisation;*
- *Monsieur M. DESAGE (LEACM - Faculté de Pharmacie -LYON I) pour l'analyse par CPG-MS des composés polysaccharidiques;*
- *les autres membres du personnel de l'Ecole des Mines (reprographie, atelier, service généraux) souvent mis à contribution.*

Parmi les personnes "providentielles" évoquées plus haut, deux ont joué un rôle particulièrement important.

La première d'entre elle est Mlle le Dr. Fabienne NUGIER à qui j'adresse ici mes plus affectueux remerciements ainsi que toute mon amitié. Elle a eu la lourde tâche de m'enseigner des rudiments de culture cellulaire et de virologie. Cette tâche s'est révélée d'autant plus ingrate que les résultats de nos essais antiviraux n'ont pas été à la hauteur de nos espérances. Malgré celà, Fabienne a toujours su garder un enthousiasme et une bonne humeur bien réconfortants. Caroline PREVOST, en effectuant son DESS sur ce thème, a également apporté une contribution particulièrement précieuse, pour Fabienne et moi-même, à la réalisation de ces essais. Qu'elle en soit ici très amicalement remerciée.

La seconde personne méritant incontestablement le qualitatif "providentielle" est le Dr. G.M. CRAWLEY, mieux connu par environ 92,28% de la population de St Etienne et des alentours sous son seul prénom, George. Les autres — les 7,72% restant — sont ceux qui de façon parfaitement inexpliquable ont réussi à ne pas le rencontrer pendant les 6 ans de sa présence dans la région !!!*

Un soir d'août 1992, lui et moi avons eu une discussion dans sa cuisine dont l'importance allait se révéler capitale (la discussion, pas la cuisine!). Cette discussion n'a probablement pas bouleversé le cours de l'Histoire de l'Humanité — du moins, à notre connaissance, aucun effet notable n'a encore pu être observé — mais elle a tout de même permis de reconstruire ma thèse. D'un point de vue purement égocentrique, je dois reconnaitre que cette dernière conséquence m'importait alors plus qu'un quelconque bouleversement de l'Histoire de l'Humanité !!!

Une autre conséquence inattendue de cette discussion fut sans doute une amélioration sensible du chiffre d'affaire de la pizzeria du cours Fauriel, alors que dans le même temps notre régime alimentaire se dégradait. Les soirées des semaines suivantes, nous les passâmes en effet devant l'écran d'un PC connecté à une machine au nom barbare, le Morphopericolor. Le programme d'analyse d'images était né....

Il me serait difficile, sans faire trop long, de lister ici l'ensemble des points pour lesquels l'aide de George m'a été précieuse. Toutefois, il est également trop réducteur de dire uniquement que ces talents informatiques ont rendu possible la réalisation de principes qui, sans lui, seraient restés confinés au rang de belles idées. Un compromis consiste donc à ajouter que notre même façon passionnée de pratiquer la recherche nous a rapproché et qu'ainsi, il a souvent été une source d'inspiration. Je suis fier d'être son ami et souhaite le rester longtemps encore.

En conclusion, je souhaite une sereine et gratifiante fin de thèse à tous ceux qui sont encore à la recherche du "Graal" et plus particulièrement à Kary et Sophie.

Saint-Etienne, décembre 1994.

** Sondage IF-RES auprès de 2 personnes représentatives*

SOMMAIRE

Introduction 1

I. LES BASIDIOMYCETES: PHYSIOLOGIE ET MÉTABOLISME 5

I.1. Classification 7

I.1.1. L'embranchement des Champignons 7

I.1.2. La classe des Basidiomycètes 7

I.1.3. L'ordre des Aphyllophorales 11

I.1.4. L'ordre des Agaricales 11

I.2. Physiologie - Mode de reproduction 13

I.2.1. Cycle de développement 13

I.2.2. La croissance hyphale 14

I.2.3. La formation du dicaryon 17

I.2.4. La formation du basidiocarpe 20

I.3. Les cultures de Basidiomycètes 21

I.3.1. Les champignons comestibles 21

I.3.2. Les cultures immergées 22

I.4. Le métabolisme secondaire des Basidiomycètes 24

I.4.1. Généralités 25

I.4.2. Les métabolites à activité biologique 27

I.4.2.1. Les composés aliphatiques 25
I.4.2.2. Les dérivés benzoïques 27
I.4.2.3. Les composés terpéniques 27
I.4.2.4. Les strobilurines 27
I.4.2.5. Les nucléosides 27
I.4.2.6. Les polysaccharides 27

Conclusion 32

II. DÉTECTION DE MÉTABOLITES À ACTIVITÉ PHARMACOLOGIQUE 33

II.1. Matériels et Méthodes 35

II.1.1. Cultures fongiques 35

II.1.1.1 Souches 35
II.1.1.2 Milieux 36
II.1.1.3 Conservation et entretien des souches 36
II.1.1.4 Mode de préparation de l'inoculum 37

II.1.1.5 Cultures de production en fioles agitées 37
II.1.1.6 Cultures en réacteurs classsiques 37
II.1.1.7 Paramètres suivis pendant les cultures 40

II.1.2. Tests d'activité anti-virus Herpès Simplex 41

II.1.2.1 Cultures cellulaires 41
II.1.2.2 Cultures virales 43
II.1.2.3 Antivirogrammes (Test ELISA) 44
II.1.2.4 Etude de la cytotoxicité 46

II.1.3. Préparation des extraits de culture de Macrocystidia cucumis 48

II.1.3.1 Surnageant de culture 48
II.1.3.2 Biomasse 50

II.1.4. Tests d'immunomodulation 51

II.1.4.1 Tests d'activité mitogénique sur les lymphocytes T 51
II.1.4.2 Cultures mixtes lympho-épidermiques (CMLE) 51

II.1.5. Extraction et purification des fractions polysaccharidiques de Fomes fomentarius 53

II.1.5.1 Extraction 53
II.1.5.2 Dosage des hexoses 53
II.1.5.3 Dosage des acides uroniques 54
II.1.5.4 Dosage des protéines 55
II.1.5.5 Chromatographie sur gel d'exclusion 55
II.1.5.6 Chromatographie d'échange d'ions 56
II.1.5.7 Hydrolyse acide 57
II.1.5.8 Dérivatisation TMS 57
II.1.5.9 Chromatographie en phase gazeuse (CPG) 57
II.1.5.10 Méthylation 58
II.1.5.11 CPG couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) 60

II.2. Détection de l'activité anti- herpès simplex virus dans les cultures de Macrocystidia cucumis 61

II.2.1. Mise au point du test ELISA anti-HSV 61

II.2.2. Lecture des résultats 61

II.2.3. Test des bouillons bruts 63

II.2.4. Irrégularité des résultats 67

II.2.5. Discussion - Conclusion 70

II.3. Activité immunomodulatrice des fractions isolées de Fomes fomentarius 72

II.3.1. Absence d'activité mitogénique des fractions seules 72

II.3.2. Inhibition de l'activité mitogénique de la concanavaline A sur les lymphocytes du sang périphérique 73

II.3.3. Inhibition de la réponse proliférative des lymphocytes T en culture mixte lympho-épidermique 75

II.4. Analyse des fractions polysaccharidiques de Fomes fomentarius 78

II.4.1. Détermination de la masse molaire par filtration sur gel 78

II.4.2. Influence de la solubilisation par sonication 80

II.4.3. Purification par chromatographie d'échange d'ions 81

II.4.4. Composition en monomères par chromatographie en phase gazeuse 84

II.4.5. Structure de la chaine polysaccharidique 86

II.5. Discussion sur les fractions polysaccharidiques de Fomes fomentarius 88

Conclusion 91

III. L'ANALYSE D'IMAGES: PRINCIPES ET APPLICATIONS À LA MORPHOLOGIE MYCÉLIENNE 95

III.1 L'analyse d'images 97

III.1.1. Principes de l'analyse d'images 97

III.1.2. La numérisation et notions de réseau 97

III.1.3. Rappels de morphologie mathématique 99

III.1.3.1. Principes 99

III.1.3.2. Opérations de Base du traitement d'images 100

III.1.4. Paramètres de mesures - Facteurs de forme 105

III.1.5. Amélioration de l'image 107

III.1.6. L'analyse d'images couleur 109

III.2 Application de l'analyse d'images en Biotechnologie 110

III.3 Application de l'analyse d'images aux microorganismes filamenteux 113

III.3.1. Influence de la morphologie mycélienne sur le métabolisme 113

III.3.2. La forme dispersée - l'analyse des hyphes 114

III.3.3. les pellets 119

III.3.4. la différenciation hyphale 123

III.3.5. les méthodes pour cultures en milieu solide 124

III.4 Apport de l'analyse d'images à l'étude des relations entre morphologie , conditions de culture et métabolisme. 125

III.4.1. Relations entre la biomasse et les propriétés rhéologiques du milieu 125

III.4.2. Etude de la concentration en biomasse et de ses propriétés physiologiques 127

III.4.3. Influence de l'agitation sur la morphologie de la biomasse 128

III.5 Méthodes indirectes d'études des variables morphologiques 131

III.5.1. Méthodes de filtration 131

III.5.2. Méthodes rhéologiques 132

III.5.3. Méthodes ultrasoniques 133

Conclusion 135

IV. DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE D'IMAGES POUR LA CARACTÉRISATION MORPHOLOGIQUE DES AGRÉGATS MYCÉLIENS 137

IV.1. Matériels et Méthodes 139

IV.1.1. Méthode de coloration 139

IV.1.2. Matériels (acquisition - traitement d'images) 140

IV.1.2.1. Caméra 140
IV.1.2.2. Analyseur d'images 140
IV.1.2.3. Conditions d'éclairage et d'exposition des échantillons 142

IV.1.3. Algorithme de traitement d'images monochrome 143

IV.1.4. Algorithme de traitement d'images couleur 147

IV.1.5. Présentation des résultats 150

IV.1.6. Statistiques 150

IV.2. Résultats et discussion 152

IV.2.1. Influence du temps de décoloration 152

IV.2.2. Reproductibilité 153

IV.2.2.1 Reproductibilité de l'échantillonnage 153
IV.2.2.2 Reproductibilité de la coloration 155
IV.2.2.3 Reproductibilité de la détection par un même opérateur 156
IV.2.2.4 Reproductibilité de la détection par deux opérateurs différents 157

IV.2.3. Influence de la résolution 157

IV.2.4. Comparaison avec l'algorithme de Cox et Thomas (1992) 161

IV.2.5. Comparaison traitement monochrome / couleur 165

Conclusion 169

V. APPLICATION AU SUIVI DES FERMENTATIONS 171

V.1 Propriétés morphologiques de Macrocystidia cucumis 173

V.1.1 Particularités culturales: essais préliminaires 173

V.1.1.1 Mode de préparation de l'inoculum 173
V.1.1.2 Conditions d'incubation 175

V.1.2 Evolution morphologique lors d'une culture type en réacteur 177

V.1.3 Inflluence de la limitation en oxygène 182

V.1.4 Influence des conditions d'agitation 188

V.1.5 Discussion 194

V.2 Propriétés morphologiques de Fomes fomentarius 199

V.2.1 Influence du milieu de culture sur la croissance et la production de polysaccahrides 199

V.2.2 Comparaison morphologique des culutres en fioles et en réacteur 202

V.2.3 Discussion *208*

V.3 Limites de la méthode **212**

Conclusion **221**

VI. PERSPECTIVES: MÉTHODE D'ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS DIFFUSIONNELLES DES PELLETS 223

VI.1. Méthode de coloration **225**

VI.2. Exploitation des résultats **226**

Conclusion **227**

Conclusion générale **229**

Références bibliographiques **231**

Introduction

Introduction

De nombreux procédés de fermentations industriels utilisent des champignons filamenteux pour des productions métaboliques variées (antibiotiques, enzymes, acides organiques, vitamines...). La plupart des souches utilisées appartiennent à la classe des Deutéromycètes au sein de laquelle les genres *Aspergillus* et *Penicillium* occupent une place prépondérante (Botton *et al.*, 1990). La demande toujours renouvelée de principes actifs d'origine naturelle par l'industrie pharmaceutique, soutenue par la disponibilité de nouveaux tests diagnostiques, provoque un élargissement des campagnes de "screening" à des classes de microorganismes jusqu'ici peu explorées (Berdy, 1989). Les Basidiomycètes figurent parmi ceux-ci.

Cette classe de "Champignons supérieurs" nous est pourtant familière puisqu'elle compte parmi ses 30000 espèces estimées, la plupart des champignons communs de nos campagnes comme par exemple les genres *Agaricus*, *Amanita*, *Boletus*, *Clavaria*, ou *Coprinus*.

La particularité physiologique majeure des Basidiomycètes réside dans leur mode de reproduction sexuée à l'origine de la formation d'un organe de fructification hautement différencié, le carpophore (Smith et Berry, 1974a). Ce dernier présente une importance économique particulière puisqu'il constitue la partie consommable des champignons comestibles Ainsi de nombreuses études ont été menées sur les procédés de culture de ces champignons sur substrat solide, dans le but, à la fois de maîtriser le déclenchement de la fructification et d'obtenir des inoculums adapté à l'ensemencement des composts de production (Zadrazil et Grabbe, 1983).

L'utilisation du mycélium en culture immergées, dans la majorité des études antérieures aux années 80, portait soit sur la valeur nutritive de ses protéines, soit sur l'obtention d'une biomasse dont les propriétés organoleptiques s'approchaient de celles du carpophore (Worgan, 1968). L'échec de ce dernier type de projet souligne la particularité physiologique et métabolique de l'organe de fructification par rapport au mycélium végétatif (Zadrazil et Grabbe, 1983).

Les Basidiomycètes se caractérisent également par leur faible taux de croissance dans les conditions habituelles de culture en laboratoire (boites de pétri, fioles) et par leur absence de spores asexuées qui contraint à conserver les souches sous une forme végétative qui généralement ne supporte ni la congélation ni la lyophilisation (Worgan, 1968; Anke, 1989).

Cet ensemble de particularité explique sans doute que les potentialités métaboliques du mycélium de ces champignons ont été longtemps négligées au profit de leur propriétés gustatives ou hallucinogènes et qu'il a fallu attendre des progrès dans les techniques de fermentations (notamment au niveau du contrôle de stérilité ou de la régulation des différents paramètres physico-chimiques) pour qu'on assiste à un développement des études en cultures immergées sur la production de métabolites secondaires.

Le métabolisme secondaire de ces champignons semble pourtant présenter une grande diversité (Jong et Donovick, 1989). Elle a notamment été mise en évidence par les travaux du Professeur Anke et de son équipe qui ont isolé un grand nombre de métabolites couvrant une large gamme d'activité (antibiotique, antifongique, antivirale, cytotoxique, phytotoxique, ...) à partir de ces champignons (Anke, 1989). Parmi les différentes structures chimiques décrites, les polysaccharides représentent un groupe de composés fréquemment isolés (Kiho *et al.*, 1992 a-b; Hotta *et al.*, 1993) dont les activités antitumorales et immunomodulatrices ont fait l'objet de nombreuses études (Trnovec et Hrmova, 1993). Deux de ces polysaccharides, le lentinane et le schizophyllane, respectivement isolé de *Lentinus edodes* et de *Schizophyllum commune*, sont même utilisés cliniquement au japon pour leur propriétés antitumorales (Fachet et al., 1989; Furue, 1987).

Dans ce cadre, il nous a semblé interessant d'explorer quelques particularités culturales, métaboliques et morphologiques des Basidiomycètes, lors de leur utilisation en fermentation. Pour cela, nous traiterons l'exemple de deux souches appartenant aux deux ordres majeurs de cette classe, les Agaricales et les Aphyllophorales, et pour lesquelles des activités biologiques ont été soit détectées lors d'essais préliminaires, soit décrites dans la littérature.

La première souche appartient à l'espèce *Macrocystidia cucumis* (Agaricale -*Tricholomaceae*). Une activité anti-virus herpès simplex a été détectée dans son surnageant de culture lors d'un "screening" réalisé il y a quelques années au laboratoire de Mycologie de la Faculté de Pharmacie (LYON I). Ces premiers résultats n'ont cependant pas fait l'objet d'examens complémentaires.

La seconde souche appartient à l'espèce *Fomes fomentarius* (Aphyllophorale - *Polyporaceae*). Elle a été utilisée au laboratoire, dans le cadre d'un autre projet, pour ses capacités cellulolytiques. La production de polysaccharides exocellulaires visqueux a été détectée à cette occasion. Des polysaccharides isolées de cette espèce ont déjà été décrits pour des propriétés antitumorales (Jong et Donovick, 1989) et anti-virus de la Mosaïque du Tabac (Aoki *et al.*, 1993). Les propriétés immunologiques de ces composés n'ont à notre connaissance jamais été examinées.

Le projet comporte donc un double objectif:

- isoler des métabolites à activité pharmacologique à partir de deux souches sauvages de Basidiomycètes et entamer la caractérisation chimique de ces produits;
- définir les conditions fermentaires propices à leur production.

Dans le cadre de ce second objectif, l'absence de données concernant les propriétés morphologiques des Basidiomycètes en fermentation nous a conduit à développer une méthode d'analyse d'images adaptée à ce type de cultures et permettant d'étudier l'influence des paramètres culturaux sur la morphologie mycélienne et l'établissement de relations potentielles avec le métabolisme.

Ainsi, au cours de ce rapport, nous présenterons, dans une première partie, un rappel bibliographique sur les propriétés physiologiques et métaboliques des Basidiomycètes. L'activité anti-virus herpès simplex de *M. cucumis*, d'une part, et l'activité immunomodulatrice des fractions polysaccharidiques de *F. fomentarius*, d'autre part, seront ensuite examinées. A partir de ces données sur le métabolisme des souches étudiées, nous aborderons leur propriétés culturales à travers l'étude de leur morphologie en fermentation. Après un rappel bibliographique consacré aux principes de l'analyse d'images et à ses applications dans le domaine des microorganismes filamenteux, nous détaillerons le développement d'une nouvelle méthode destinée à la biomasse mycélienne sous forme agrégée. Enfin, nous traiterons de son application aux deux souches concernées et des caractéristiques morphologiques et physiologiques qu'elle permet de mettre en évidence.

Chapitre I

Les Basidiomycètes: Physiologie et métabolisme

Chapitre I

Les Basidiomycètes: Physiologie et métabolisme

Ce chapitre est consacré à un rappel bibliographique des particularités physiologiques et métaboliques des Basidiomycètes. Ainsi, après avoir situé cette classe au sein du règne des champignons et présenté les principales familles la composant, trois thèmes seront abordés:

- les spécificités de la croissance hyphale inhérentes au cycle de développement et de reproduction des Basidiomycètes,
- l'utilisation de ces champignons en cultures, plus spécifiquement immergées, et les contraintes particulières qu'ils imposent par rapport aux champignons filamenteux les plus fréquemment utilisés en fermentation (Deutéromycètes et Ascomycètes);
- les métabolites secondaires à activité pharmacologique qui en ont été isolés.

La formation de l'organe de fructification, qui revêt un intérêt économique tout particulier pour les cultures de champignons comestibles et dont le déclenchement est contrôlé par de nombreux facteurs (Zadrazil et Grabbe, 1983), ne sera traité ici que succinctement. Ce phénomène intervient, en effet, spécifiquement lors de cultures sur milieu solide alors que nous nous consacrerons tout au long de cette étude à l'utilisation des Basidiomycètes en cultures immergées. C'est donc la forme végétative mycélienne qui retiendra notre attention.

I.1. CLASSIFICATION

I.1.1. L'embranchement des Champignons

La diversité de formes et de modes de reproduction des Champignons rend difficile la définition de ce groupe qui est maintenant considéré comme un embranchement à part entière à côté des règnes animal et végétal (Ainsworth, 1973). Il est toutefois possible de définir les champignons comme des organismes **eucaryotes, hétérotrophes** (incapables de réaliser la photosynthèse) et dont la forme végétative, uni- ou pluri-cellulaire, ne possède pas d'organes différenciés à rôle nutritionnel (racines, tiges, feuilles). L'appareil végétatif est appelé **thalle** (Botton et al., 1990).

L'embranchement des Champignons (**Mycètes**) se scinde en deux sous-embranchements selon qu'il s'agit d'organismes plasmodiaux (masses protoplasmiques nuclées, dépourvues de paroi), les **Myxomycètes**, ou d'organismes non plasmodiaux généralement mycéliens, les **Eumycètes** (ou champignons vrais). Les Eumycètes (cf. Figure I.1) renferment eux-mêmes cinq classes différenciées par leur mode de reproduction et leur thalle (Ainsworth, 1973).

- Les **Mastigomycètes** et les **Zygomycètes** présentent un thalle non cloisonné (structure cœnocytique) et se reproduisent sexuellement par des œufs enkystés, respectivement **oospores** et **zygospores**, directement formés sur le mycélium.

- Les **Ascomycètes**, les **Basidiomycètes** et les **Deutéromycètes** (ou *Fungi imperfecti*) ont un thalle unicellulaire ou constitué de filaments régulièrement septés, les **hyphes**. Chez les deux premières classes, la reproduction sexuée est assurée par des spores formées, au sein d'organes de fructification différenciés, par des cellules spécialisées, respectivement les **asques** et les **basides**. Chez les Deutéromycètes, la reproduction sexuée n'est pas observée.

I.1.2. La classe des Basidiomycètes

Pendant longtemps, la description des Basidiomycètes a reposé sur un système de classification proposé par Fries (1877), basé sur des caractères essentiellement observables sur le terrain, sans moyen particulier. Ce système, malgré son intérêt pratique, qui a justifié sa longue utilisation, a été remis en cause et modifié à la suite d'observations microscopiques plus approfondies de la structure des organes de fructification et d'études de leur morphogénèse (Ainsworth, 1973). La classification présentée ici est fondée sur celle adoptée dans le "Dictionnary of Fungi" (Ainsworth, 1971) qui semble être acceptée comme référence (cf. Figure I.2).

La classe des basidiomycètes rassemble plus de 40 000 espèces, dont les **carpophores** -

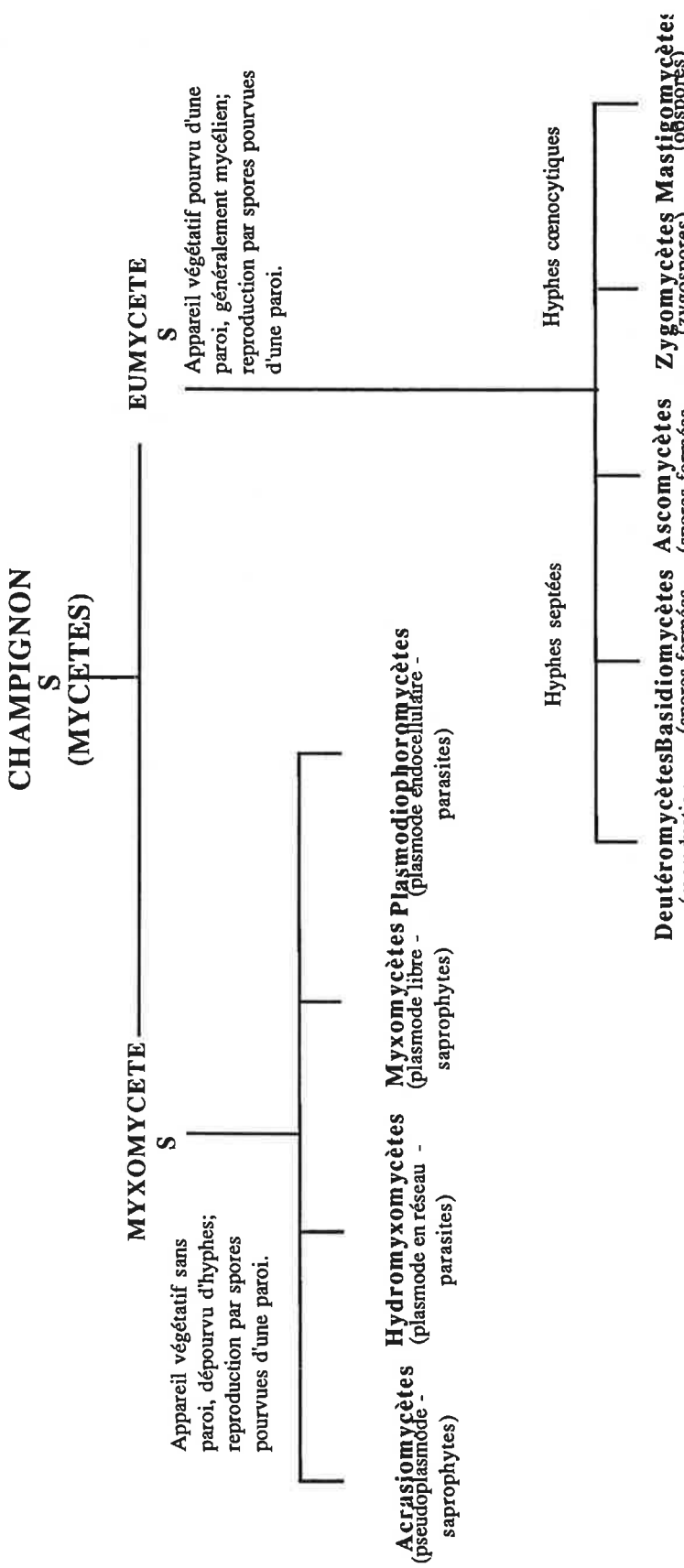


Figure I.1: Organisation du règne des Champignons (d'après Ainsworth, 1973)

organes de fructification permettant le plus souvent d'identifier le genre ou l'espèce - présentent une grande diversité de formes, de teintes, de toxicité et d'habitats (Heim, 1980).

La caractéristique de cette classe réside dans le mode de formation des spores sexuées, les **basidiospores**. Celles-ci proviennent d'une division méïotique réalisée au sein d'une cellule spécialisée, la baside, et sont portées par des excroissances allongées, appelées **stérigmates**, apparaissant à l'extérieur de la baside. Les Basidiomycètes se différencient en celà des Ascomycètes, chez lesquels les spores sexuées, les ascospores, sont formées à l'intérieur de petits conceptacles, les asques (Ainsworth, 1973; Heim, 1980).

La structure de l'organe de fructifications, le basidiocarpe, permet de distinguer trois sous-classes au sein des Basidiomycètes (Ainsworth, 1971).

- Les **Téliomycètes** ne présentent pas de basidiocarpes véritables. Ce sont des parasites des végétaux vasculaires et les spores (téliospores) sont réparties dans le tissu de l'hôte.
- Les **Gastéromycètes** (Gastérales) forment leur basides au sein d'un tissu hyphal enfermé (angiocarpe ou endocarpe).
- Les **Hyménomycètes** portent leurs basides dans un tissu hautement différencié, l'**hyménium**.

Ce dernier groupe est lui même divisé en deux sur-ordres selon que les basides sont:

- cloisonnées, généralement en quatre loges, où se répartissent les noyaux issus de la méïose. Ce sont les **Hétérobasidiomycètes** (ou Phragmobasidiomycètes) qui rassemblent les ordres des **Auriculariales**, **Trémellales** et **Septobasidiales**, différenciés par le mode de septation de la baside.
- non cloisonnées. Ils constituent le groupe des **Homobasidiomycètes** (ou Holobasidiomycètes) dans lequel on trouve les ordres les plus communs des Basidiomycètes comme notamment les **Aphyllophorales**, les **Agaricales** ou les **Bolétales**.

Heim (1980) adopte une classification quelque peu différente en considérant uniquement deux sous-classes sur la base du cloisonnment ou non des basides. Il rassemble ainsi, au sein des Hétérobasidiomycètes, non seulement les trois ordres définis par Ainsworth, mais également les Urédinales et Ustilaginales (les Téliomycètes selon Ainsworth). Il décompose, de même, les Homobasidiomycètes en espèces à basidiocarpe gymnocarpe ou semi-angiocarpe — les Hyménomycètes —, et en espèces à basidiocarpe angiocarpe — les Gastéromycètes.

Les souches utilisées lors de cette étude, *Fomes fomentarius* et *Macrocystidia cucumis*, appartiennent respectivement aux ordres des Aphyllophorales et Agaricales. Ceux-ci vont maintenant être présentés de façon plus détaillée.

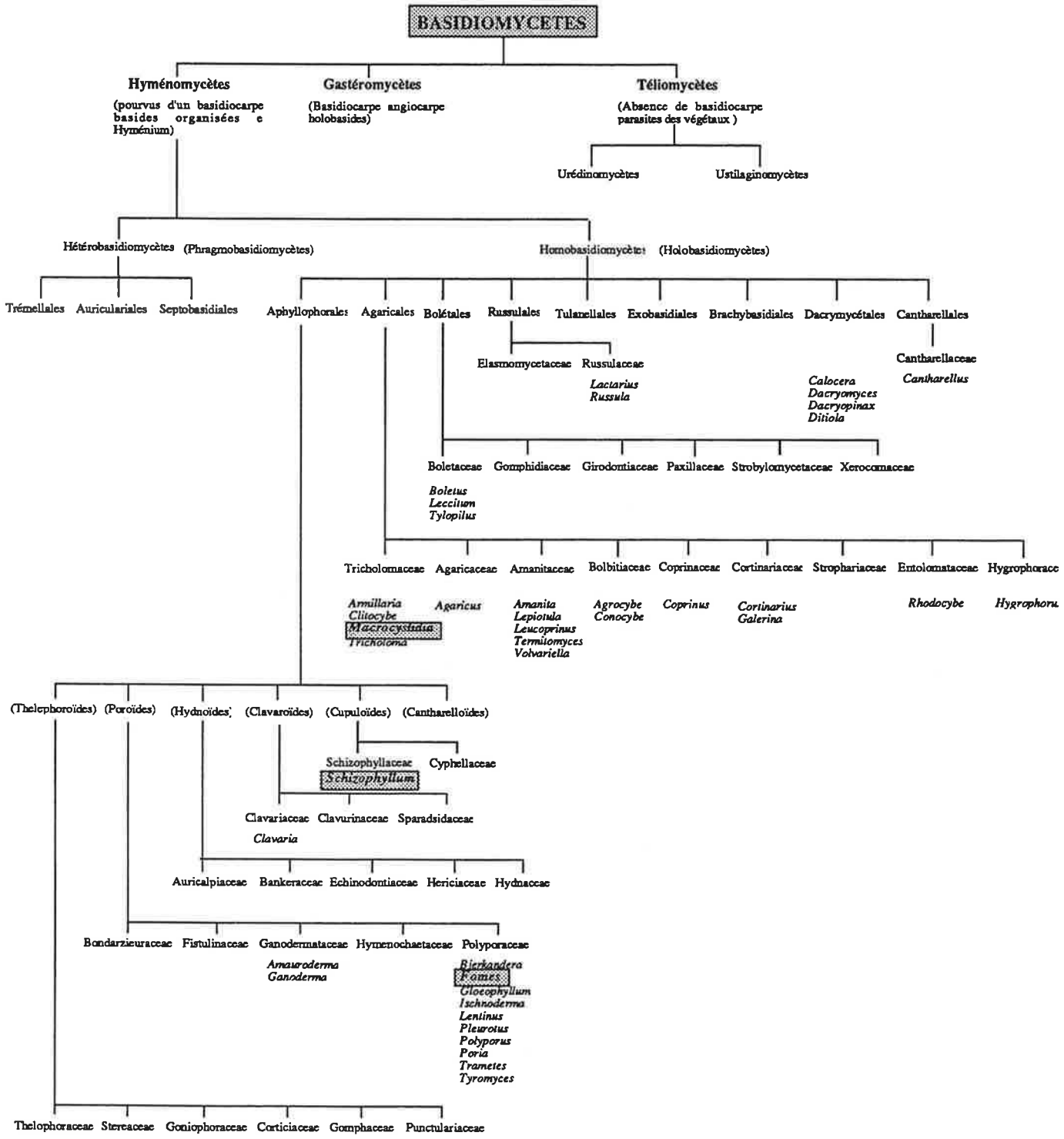


Figure I.2: Classification des Basidiomycètes (d'après Ainsworth, 1971).

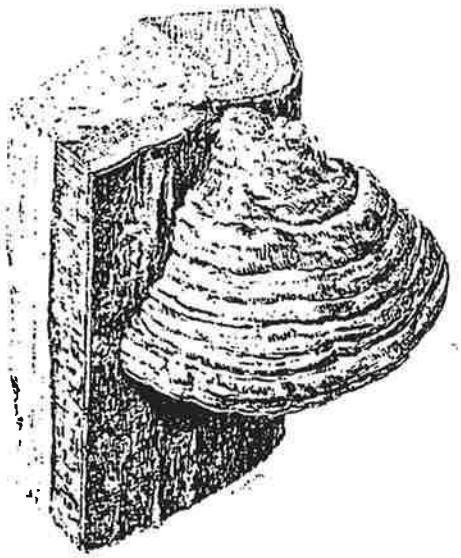


Figure I.3: carpophore de Fomes fomentarius (Hassebrauk et al., *1962).*

I.1.3. L'ordre des Aphyllophorales

La classification des Aphyllophorales est présentée sur la figure I.2. On y retrouve notamment la famille des *Clavariacées* au sein de laquelle le genre *Clavaria* (Clavaire) est apprécié pour ses qualités gustatives. Une autre famille importante est celle des *Polyporacées* (Polypores) qui rassemble les espèces dont l'hyménium est constitué de tubes. Ces champignons lignicoles (capables de dégrader la lignine) se développent souvent sur les troncs d'arbres.

Fomes fomentarius appartient à cette dernière famille. Le carpophore, gris brun, est de consistance ligneuse et peut atteindre une taille de 25 à 50 cm (Figure I.3). C'est une espèce très commune en Europe et en Amérique du Nord (Hassebrauk *et al.*, 1962).

I.1.4. L'ordre des Agaricales

Les Agaricales (ou Agarics - cf.Figure I.2) possèdent un carpophore charnu dont l'hyménium est organisé en lamelles rayonnantes à partir du pied (le **stipe**), sous le chapeau (le **pileus**). Le groupe qui se compose de 4000 espèces, comporte les familles les plus populaires. Ainsi, on y trouve notamment:

- les **Agaricacées** avec les espèces *Agaricus bisporus* et *A. campestris*, respectivement le "champignon de Paris" et le "rosée des prés",
- les **Amanitacées** avec les espèces vénéneuses telles que *Amanita phalloides*, *A. pantherina* (A. panthère), *A. verna* (A. printanière) ou *A. virosa* (A. vireuse) mais aussi des espèces comestibles comme *Volvariella volvacea* (Volvaire à volve),

Figure I.4: carpophore de Macrocystidia cucumis (Kühner et Romagnesi, 1984)

- les **Coprinacées** avec le genre *Coprinus*,
- les **Cortinariacées** avec le genre *Cortinarius*,
- les **Strophariacées** avec *Kuehneromyces nameko* (ou *Pholiota nameko*), champignon comestible très populaire au japon (Zadrazil et Grabbe, 1983),
- les **Tricholomacées** avec *Clitocybe dealbata*, espèce toxique produisant la muscarine.

Macrocystidia cucumis appartient à cette dernière famille. Il est classé dans la tribu des Orcellées dont le genre type est *Clitopilus* (Kühner et Romagnesi, 1984).

Le carpophore est de petite taille (diamètre du pileus 1-2 cm, stipe 2-5 cm x 1-4 mm). La couleur varie du fauve-ocre au brun-rouge. Le chapeau est conique ou campanulé (Figure I.4). Jeune, le champignon a une odeur de concombre (d'où son nom!), puis prend un odeur de poisson rance à maturation (Kühner et Romagnesi, 1984). Cette espèce, commune des forêts françaises, a également été répertoriée en Navarre espagnole (Perez Losantos et Bascone Carreterero, 1981) et en Israël (Binyamini, 1976), dans les deux cas associée à une forêt de Pins.

Aucune référence n'a pu être trouvée. concernant son utilisation en fermentation ou ses particularités métaboliques

I.2. PHYSIOLOGIE - MODE DE REPRODUCTION

I.2.1. Cycle de développement

Le cycle de développement des Basidiomycètes est présenté sur la figure I.5 à travers l'exemple d'un Agaricale. Il se décompose en deux phases, l'une haploïde, l'autre dicaryotique.

La phase haploïde débute par la germination d'une **basidiospore** (monocaryotique, haploïde) lorsque celle-ci se trouve dans un environnement favorable (humidité, température, nutriments...). La présence dans le milieu d'un métabolite déclencheur du processus de germination, comme l'acide isovalérique pour *Agaricus bisporus*, est parfois indispensable (Elliot, 1985). Le tube de germination initialement formé poursuit son développement pour donner les hyphes du **mycélium primaire**. Ce dernier est composé de cellules septées,

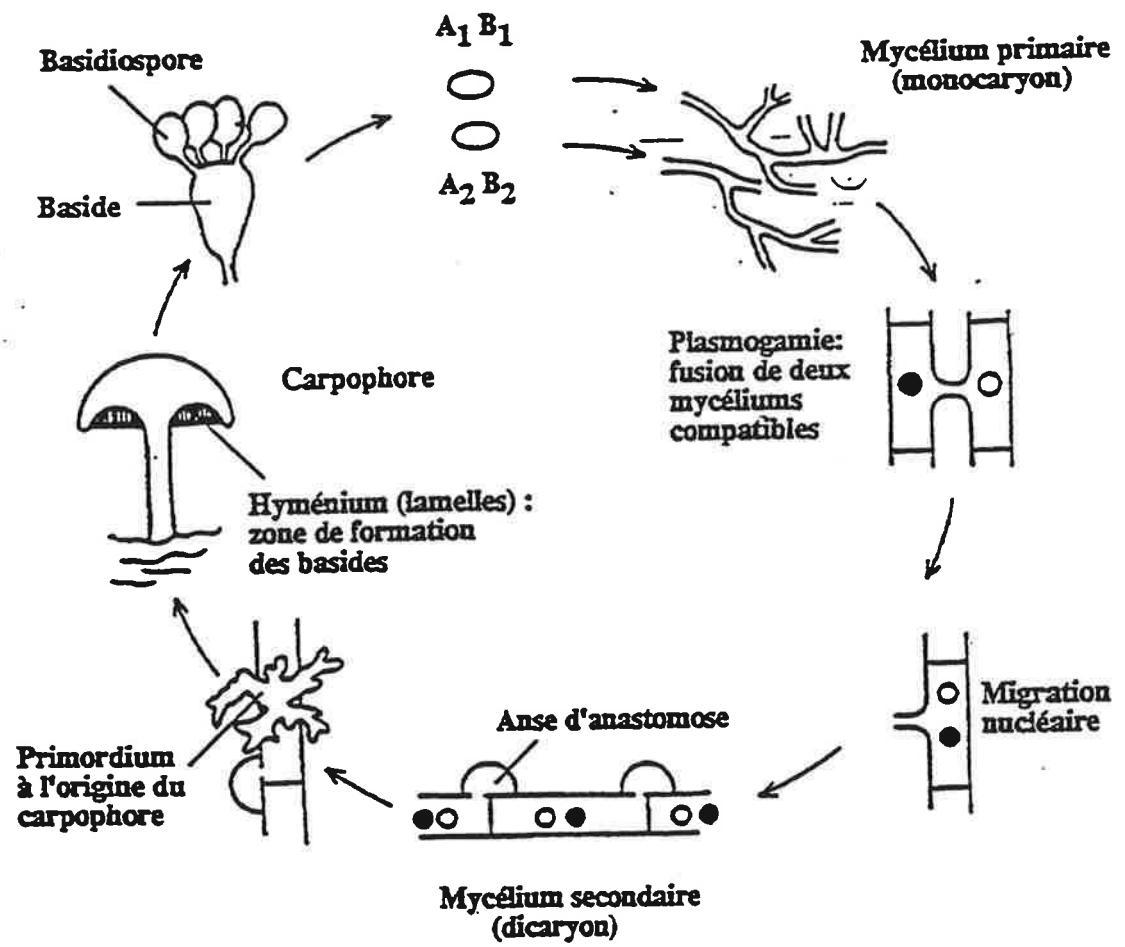


Figure I.5: Cycle de développement d'un Agaricale (Smith et Berry, 1974a).

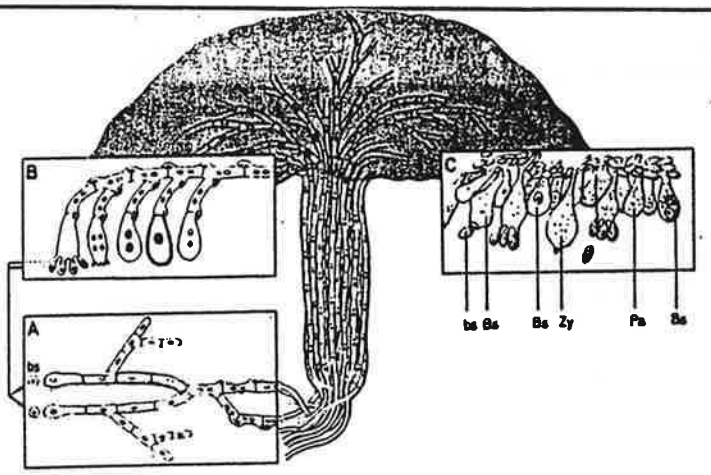


Figure I.6: Vue en coupe d'un carpophore A) Développement du mycélium primaire à partir des basidiospores (bs) et plasmogamie; B) Formation des basides (Bs) et basidiospores; C) Organisation de l'hyménium (Zy: cystide, Pa: paraphyse). (Schlegel, 1976)

monocaryotiques haploïdes. Il constitue la forme végétative du champignon. Chez les Basidiomycètes, le mycélium primaire ne produit qu'exceptionnellement des spores asexuées (Smith et Berry, 1974a).

La rencontre et la fusion (plasmogamie) de deux mycéliums primaires génétiquement compatibles marquent l'entrée dans la phase sexuée du développement et conduisent à la formation d'un **mycélium secondaire dicaryotique**. C'est à partir de ce mycélium secondaire que se développe, sous des conditions précises, l'organe de fructification, le **carpophore** ou **basidiocarpe**. Cette phase importante sera décrite de façon plus détaillée en I.2.3.

Le carpophore est un organe de reproduction hautement différencié (cf. Figure I.6). Sur sa face inférieure, un tissu hyphal, organisé en lamelles chez les Agaricales ou en tubes chez les Bolétales, se compose de cellules stériles, les cystides et les paraphyses, et de cellules terminales spécialisées, les **basides**. La baside est le siège de la caryogamie (fusion nucléaire) suivie immédiatement d'une méïose. Cette division méïotique conduit à la formation de quatre basidiospores (haploïdes) qui se répartissent dans des poches externes de la baside, les stérigmates (Heim, 1980, Smith et Berry, 1974a).

I.2.2. La croissance hyphale

Dans la nature, les deux formes de mycélium, primaire et secondaire, peuvent connaître une

longue phase de développement avant la transition vers la formation du dicaryon ou la formation du basidiocarpe. Cette phase de croissance du réseau filamenteux est une particularité des champignons et leur confère une grande capacité à coloniser des milieux très divers (Jennings, 1984). Le mode d'allongement des hyphes va maintenant être décrit.

L'allongement des hyphes est un processus exclusivement réalisé par les cellules apicales et qui se déroule au niveau de leur extrémité terminale, l'apex. Ceci est valable aussi bien pour l'hyphe principale que pour ses ramifications. Il n'y a pas de croissance intercalaire (Smith et Berry, 1974b). La croissance procède par synthèse d'une nouvelle paroi, entretenue par le déversement du contenu des vésicules cytoplasmiques dans l'espace périplasmique de l'apex. Ces vésicules sont formées dans le compartiment subapical, riche en composants protoplasmiques (mitochondries, ribosomes, reticulum endoplasmique, dictyosomes...),et sont libérées au niveau du pôle distal du dictyosome puis migrent vers l'apex où elles s'accumulent et fusionnent avec la membrane plasmique (Collinge et Trinci, 1974; Smith et Berry, 1974b). Leur contenu se compose de précurseurs des polymères constituant la paroi (Bartnicki-Garcia, 1973).

Le taux d'allongement de l'hyphe est ainsi directement lié au taux de production puis de fusion des vésicules cytoplasmiques à l'apex. Si le taux de production de ces vésicules dépasse celui de leur fusion avec la membrane plasmique, du fait de la polarité des transferts au sein du cytoplasme, elles tendent à s'accumuler en des points particuliers de l'hyphe — derrière l'apex ou derrière les septa. Cette accumulation crée les conditions d'une nouvelle synthèse de paroi . Il se forme alors une ramification (Trinci, 1974). A partir de ce mécanisme, Prosser et Trinci (1979) ont proposé un modèle de croissance et de ramifications des hyphes.

La structure de la paroi des Basidiomycètes est présentée sur la figure I.7. Elle est semblable sur le monocaryon et sur le dicaryon, et se différencie peu de celle des Ascomycètes (Smith et Berry, 1974b; Burnett, 1979). La surface des hyphes est recouverte d'un mucilage polysaccharidique (ß(1->3) glucane avec des ramifications composées d'une seule unité glucose) pénétrant la couche externe de la paroi . Au sein de la paroi elle-même, on peut distinguer deux zones. La couche externe, compacte, est composée de S-glucane, alkali soluble, lié en α(1->3), et formant une structure microcristalline fibrillaire. La couche interne contient des microfibrilles de chitine (polymère de N-acétylglucosamine) enveloppées dans une matrice de R-glucane. La chaine du glucane est maintenue par des liaisons de type ß(1->3) et ß(1->6) et contient des points de ramifications de type, ß(1->3),(1->6), dont la proportion varie selon les espèces (Wessels et Sietsma, 1979). Il peut également s'agir parfois d'un hétéroglucane contenant d'autres monomères osidiques tels que le mannose, le xylose ou le galactose ou de petites chaines peptidiques (Garcia-Mendoza, 1992).

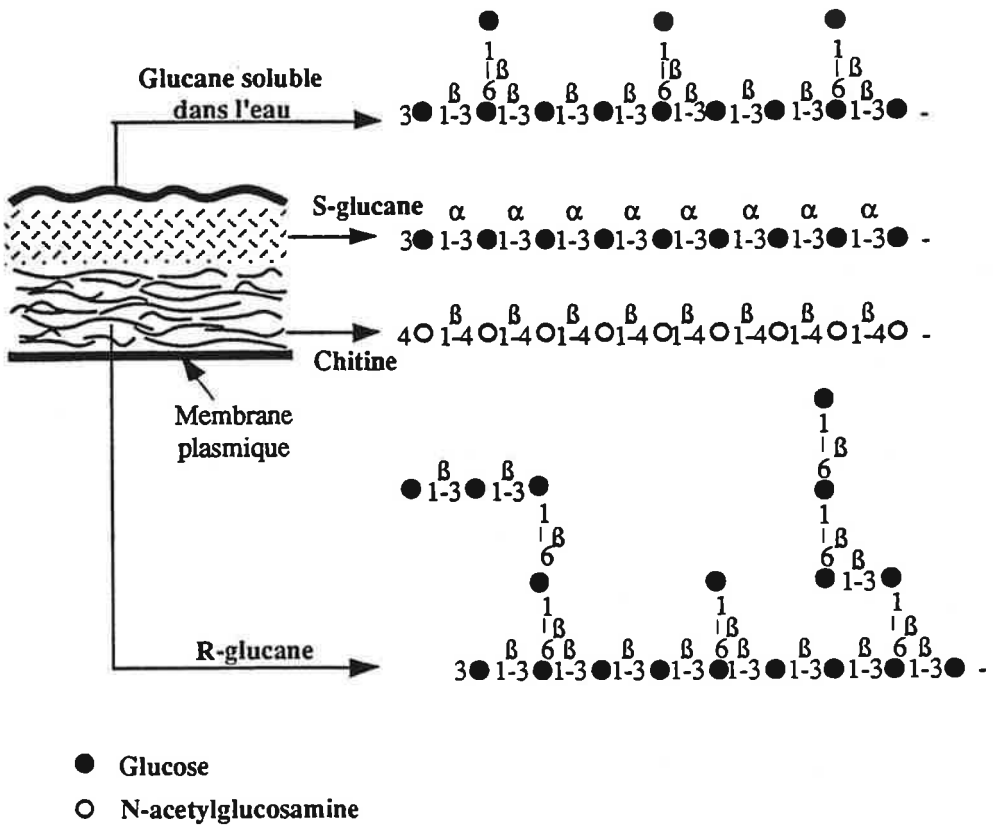


Figure I.7: Structure de la paroi hyphale chez S. commune (Wessels et Sietsma, 1979).

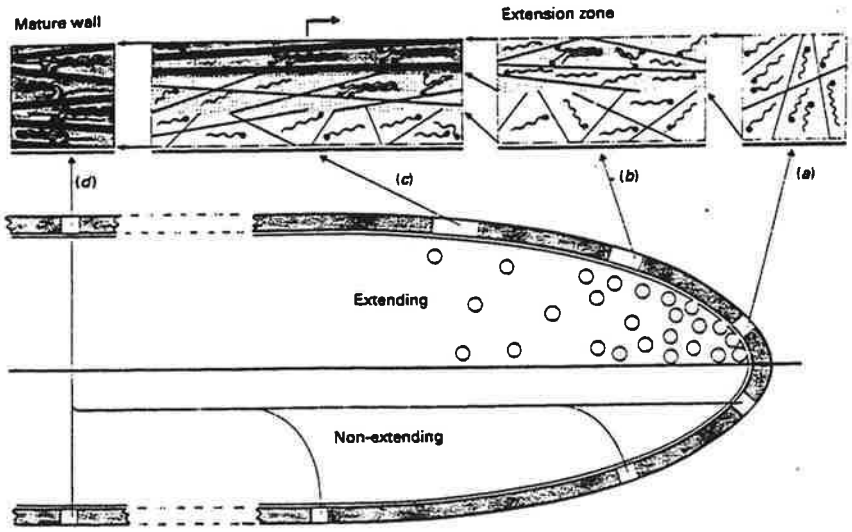


Figure I.8: Formation de la paroi lors de la croissance hyphale: modèle du "régime stationnaire" (Wessels, 1993).

Les connaissances actuelles concernant le processus de formation de la paroi en relation avec la croissance hyphale ont récemment été présentées dans une synthèse détaillée (Wessels, 1993). Selon le modèle du "régime stationnaire" qui y est exposé (Figure I.8), l'apex est le site d'une synthèse active de polymères pariétaux (chitine et glucane). Ces polymères sont assemblés par des enzymes (chitine et glucane synthases) contenues dans la membrane plasmique. Elles captent les monomères, apportés par les vacuoles du côté cytoplasmique, puis "extrudent" les polymères vers la paroi. A ce stade, l'absence de liaisons entre les chaines polysaccharidiques confère à ces polymères une structure amorphe et plastique (a). La pression de turgescence maintient cette zone apicale dans un état d'extension maximale et assure une croissance dans l'axe de plus faible résistance (l'apex). La formation d'un nouveau volume de polymères repousse les précédents vers l'extérieur de la paroi et vers la zone subapicale (b et c). Cette dernière n'est pas alimentée par le déversement des vacuoles cytoplasmiques et ne présente plus d'activité synthétique comparable à celle de l'apex. Les polymères, qui connaissent, depuis leur synthèse, un phénomène de maturation par lequel des ponts covalents s'établissent entre les différentes chaines, se rigidifient et deviennent en mesure de résister à la pression de turgescence (d). Une insolubilisation des glucanes est notamment observée lorsque ceux-ci se lient à la chitine.

La polarité du mécanisme de croissance s'explique donc par l'existence d'un flux permanent ("régime stationnaire") de polymères amorphes, entretenue par les synthases, dans un site très localisé, l'apex. Cette zone, plus plastique que les autres, peut alors être distendue sous l'action de la pression de turgescence.

I.2.3. La formation du dicaryon

Une des spécifités du cycle de développement des Basidiomycètes est l'alternance de deux phases, respectivement homocaryotique et dicaryotique, connaissant chacune une croissance indéfinie et indépendante. Les Basidiomycètes diffèrent en celà des Ascomycètes pour lesquels la forme dicaryotique est très courte et jamais complètement dissociée de la forme haploïde (Smith et Berry, 1974b).

Le **dicaryon** est le résultat de l'appariement de deux hyphes monocaryotiques compatibles génétiquement (cf. Figure I.9). Le processus débute par une plasmogamie, immédiatement suivie par la migration du noyau de l'une des cellules vers l'autre cellule. Cette migration peut être réciproque et se poursuivre simultanément chez les deux participants. Si les cellules fusionnantes ne sont pas les cellules apicales, la migration du noyau se poursuit jusqu'à l'extrémité de l'hyphe. La cellule apicale contient finalement deux noyaux qui vont rester individualisés — phase dicaryotique et non diploïde — mais qui se diviseront simultanément lors des mitoses intervenant pendant la croisssance du mycélium (Casselton et Economou, 1985).

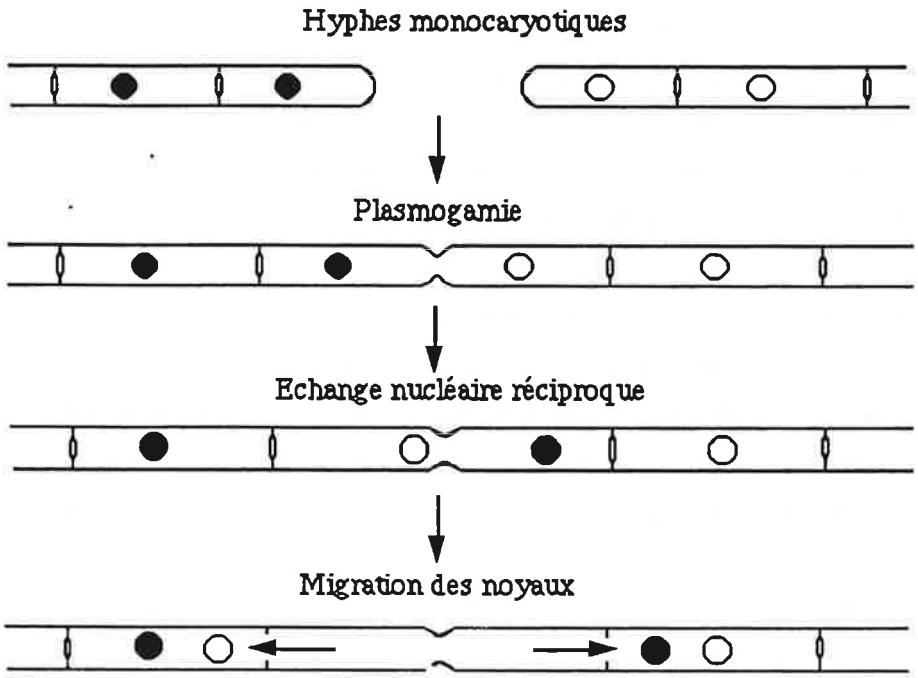


Figure I.9 Formation du dicaryon (Casselton et Economou, 1985)

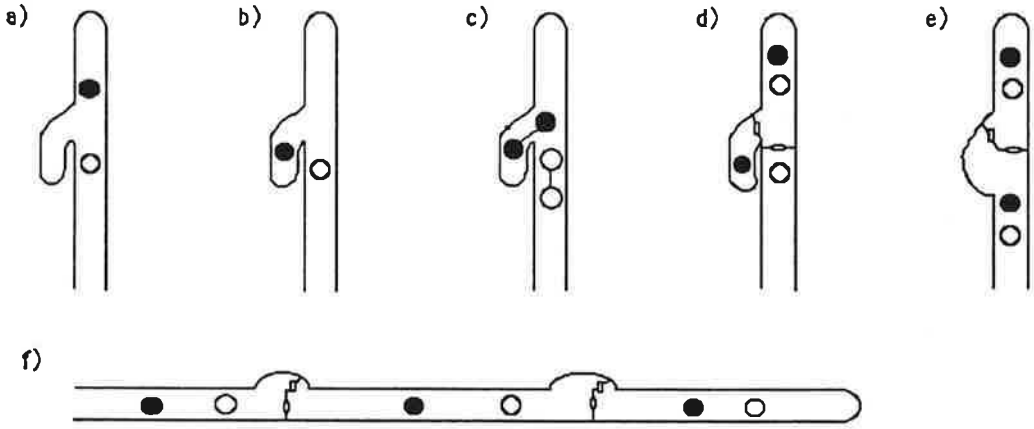


Figure I.10 formation des boucles d'anastomose lors de la division mitotique de la cellule apicale. a) et b) formation de la boucle ; c) division synchrone des deux noyaux; d) formation des nouveaux septa; e) fusion de la boucle avec l'hyphe; f) hyphe dicaryotique (Casselton et Economou, 1985).

Les gènes qui déterminent la compatibilité sexuelle de deux mycéliums monocaryotiques, les gènes d'appariement, contrôlent également le déroulement de la morphogénèse du dicaryon. Deux sytèmes génétiques, appelés respectivement bipolaire et tétrapolaire, ont été décrits (Elliot, 1985, Casselton et Economou, 1985). Le système **bipolaire** ne comporte qu'un gène unique d'appariement, A, présentant de multiples allèles. La compatibilité de deux hyphes n'est obtenue que si ces hyphes possèdent deux allèles différents du gène A. Dans le système **tétrapolaire**, deux gènes, A et B, eux aussi multi-allèliques, sont impliqués dans la formation du dicaryon. La compatibilité génétique nécessite dans ce cas que les allèles des deux gènes soient différents. Les conséquences en terme de maintien de la variabilité génétique obtenu par les deux systèmes sont précisés sur le tableau I.1.

Le processus intervenant lors des divisions mitotiques du mycélium secondaire est complexe et très spécifique des Basidiomycètes. Il conduit à la formation des **boucles d'anastomose** au niveau de chaque cloisonnement cellulaire (Smith et Berry, 1974b; Casselton et Economou, 1985). Ce processus est décrit sur la figure I.10. Les boucles d'anastomose sont une caractéristique morphologique importante et spécifique du mycélium secondaire. Toutefois leur présence sur chaque septum est variable selon l'espèce et l'âge du mycélium (Anderson, 1982; Butler, 1984).

Système	Appariements compatibles	Résultats de la méiose		Probabilité d'auto-compatibilité (%)	Potentiel de compatibilité externe		
					Nbre d'allèles		%
					A	B	%
Bipolaire	A1 X A2	0,5 A1	0,5 A2	50	2		50
					10		90
					20		95
Tétrapolaire	A1B1 X A2B2	0,25 A1B1	0,25 A2B1	25	2	2	25
		0,25 A1B2	0,25 A2B2		10	10	81
					20	20	90

Tableau I.1: Influence du nombre de gènes et du nombre d'allèles sur le contrôle de la compatibilité des mycéliums primaires (Casselton et Economou, 1985).

I.2.4. La formation du basidiocarpe

La formation du basidiocarpe, l'organe de fructification, à partir des hyphes indifférenciées qui composent le mycélium secondaire, constitue un exemple remarquable de différenciation cellulaire. Ce phénomème étant particulièrement important pour la production de champignons comestibles, les facteurs le déclenchant ont fait l'objet de nombreuses études (Zadrazil et Grabbe, 1983, liste de références). Ils sont variables selon l'espèce mais impliquent généralement le stade de développement de la colonie, la composition du substrat de croissance, les changements dans les conditions environementales. Notons toutefois immédiatement que ce type d'organe de fructification n'a jamais été observé en culture immergée même si la formation de basides et de basidiospores a déjà été obtenus dans des conditions spécifiques (Yamanaka et Sagara, 1990).

Chez *Schizophyllum commune*, une condition pour un rapide développement du basidiocarpe est une réduction de la croissance apicale compensée par la formation accrue de ramifications à partir des compartiments sub apicaux. Ceci favorise l'agglomération et les interactions inter-hyphales (Raudaskoski et Salonen, 1984). Ce raccourcissement des compartiments cellulaires est obtenu préférentiellement à une température de 25°C, et peut être induit par la lumière. En revanche, des teneur élevées en CO_2, témoin d'un métabolisme actif en présence de fortes concentrations de substrats carbonés, sont fortement inhibitrices. Ces facteurs environnementaux agiraient sur le niveau cellulaire d'AMP cyclique contrôlant lui-même l'activité des enzymes impliquées dans le catabolisme des sucres. L'induction à la lumière, et notamment l'alternance obscurité / lumière, en relation avec une baisse de la température sont également des facteurs prépondérants pour le déclenchement de la fructification de *Coprinus congregatus* (Robert et Durand, 1979).

Les phénomènes de croissance rythmique causés par des conditions de croissance non-homogène au sein d'une même colonie peuvent aussi être à l'origine d'une différenciation du mycélium secondaire en organe de fructification (Lysek, 1984). L'influence de la lumière et du taux d'oxygénation sur le "viellissement" des hyphes est ici imputée à une altération de la perméabilité membranaire et donc des flux ioniques qui la traversent.

Le développement du basidiocarpe s'accompagne et / ou est induit par des modifications de l'activité enzymatique des hyphes. Parmi celles-ci, l'activité des polyphénoloxidases — les laccases — chez *Schizophyllum commune*, augmente régulièrement jusqu'à la formation des premières fructifications puis chute rapidement. Il a été suggéré que ces enzymes favorisent l'établissement de liaisons chimiques entre les parois des hyphes et contribuent ainsi à la formation d'une structure tissulaire organisée. Chez *Agaricus bisporus*, l'activité des endocellulases extracellulaires est directement liée à la quantité de biomasse des fructifications suggérant ainsi l'existence d'une régulation des flux de substrats carbonés (Wood, 1985).

Certains métabolites secondaires, agissant comme inducteurs de la fructification, ont été isolés et

comparés dans leur activité à des agents hormonaux. Ainsi la basidifferquinone, produit par une souche de *Streptomyces*, induit la formation du basidiospore de *Flavolus arcularius* jusqu'à la formation du stipe (pied). La formation du pileus nécessite en complément une stimulation lumineuse. De même, un cérébroside isolé d'une souche de *Schizophillum commune* agit comme inducteur (autorégulateur) de différenciation cellulaire sur cette même souche (Beppu, 1992).

I.3. LES CULTURES DE BASIDIOMYCÈTES

I.3.1. Les champignons comestibles

A l'exception des genres *Tuber* (*T. melanosporium*, Truffe) et *Morchella* (Morilles) qui sont des Ascomycètes, la quasi totalité des champignons comestibles cultivés sont des Basidiomycètes . La fraction consommable des champignons comestibles réside dans leur organe de fructification, le carpophore. Les techniques culturales ont donc pour objectif de favoriser le déclenchement de la phase de fructification et son développement optimal. Elles consistent exclusivement en des cultures sur substrats solides (Zadrazil et Grabbe, 1983). Ces méthodes ne seront pas décrites dans ce rapport.

Le tableau I.2 présente les volumes de production au niveau mondial des quatres espèces majeures. La valeur du marché annuel mondial est estimé à 7,5 milliards de dollars (Flandroy, 1993).

Les productions de champignons comestibles ont été passées en revue par Zadrazil et Grabbe (1983) ainsi que Hayes et Nair (1975), sous leur aspect technique, et par Chang et Miles (1991) puis Flandroy (1993), sous un aspect économique. Signalons simplement que les principales

Champignons (10^3 tonnes) / Producteurs	Agaricus	Pleurotus	Lentinus	Auricularia	Total*
Monde	1424	909	393	400	3763
Chine	170	800	210	360	1915
Etats-Unis	302	0,713	1,711	-	304
Japon	-	36	159	0,153	329
France	200	nc	nc	nc	nc

Tableau I.2 Production des principaux champignons comestibles par les plus importants producteurs mondiaux, en 1990. (Flandroy, 1993)
*(*le total tient compte d'espèces non citées dans le tableau. nc: non communiqué)*

espèces cultivées sont *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus spp.* et *Auricularia spp*, *Flammulina.velutipes*, *Tremella fuciformis*, *Pholiota nameko*, *Hericinium erinaceus*, *Hypsizigus marmoreus*, *Grifola frondosa* (Chang et Miles, 1991).

I.3.2. Les cultures immergées

De nombreuses espèces de Basidiomycètes ont été cultivées en milieu liquide de façon a obtenir à partir de la biomasse mycélienne:

- des protéines alimentaires (Worgan, 1968, Hofsten et Ryden, 1975; Solomons, 1975). Ce type d'étude, menées dans les années 70, n'est plus d'actualité comme la plupart des cultures de microorganismes pour les propriétés alimentaires de leur contenu protéique (les SCP, Single Cell Protein).
- la production d'enzymes telles que des cellulases (Nigam et Prabhu, 1991a et b), xylanases (Haltrich *et al.*, 1993), ligninases ou peroxydases (Kirk et Farrell, 1987; Archibald *et al.*, 1990). Ce domaine concerne essentiellement des espèces de la famille des Polyporacées (White rot fungi) comme *Phanerochaete chrysosporium*, ou *Coriolus versicolor*.
- des arômes (Gross et Asther, 1989);
- des substances à activité biologique (cf. § I.4);
- un inoculum liquide pour la culture de champignons comestibles sur substrats solides (Martin, 1983; Leatham, 1985; How Tan et Moore, 1992).

L'importance économique des champignons comestibles a orienté la majorité des recherches sur cette dernière application. Ceci explique que la plupart des résultats cités dans ce cas concernent essentiellement les facteurs favorisant la fructification et notamment les processus enzymatiques qui l'accompagnent (Leatham, 1985). En revanche, peu d'informations sont apportées sur les facteurs améliorant la croissance du mycélium ou son orientation vers le métabolisme secondaire.

Quelques études abordent toutefois les particularités culturales suivantes:

INOCULUM

La quasi-absence de spores asexuées chez les basidiomycètes impose la préparation de l'inoculum à partir de fragments prélevés dans la zone périphérique de colonies obtenues sur milieu gélosé (Worgan, 1968). Ces fragments sont ensuite dispersés par un homogénéiseur à lames (Song *et al.*, 1987; How Tan et Moore, 1992) ou par des billes de verres disposées en Erlenmeyer (Archibald *et al.*, 1990) puis incubés statiquement ou sous agitation. La culture liquide ainsi obtenue est à nouveau homogénisée et sert d'inoculum aux cultures de production.

MILIEU ET BESOINS NUTRITIONNELS

Si le glucose est généralement la source carbonée la mieux utilisée par les Basidiomycètes, ils sont également capables de se développer à partir de substrats carbonés très divers tels que le xylose, maltose, mannose, rhamnose, raffinose, galactose, fructose, des dextranes, xylanes, l'amidon, ou des composés ligno-cellulosiques pour certains (Worgan, 1968).

Chez les Basidiomycètes décomposant le bois ("White rot fungi" et "Brown rot fungi", essentiellement les Polypores), les sources inorganiques d'azote comme les chlorure, tartrate, nitrate, carbonate ou sulfate d'ammonium sont facilement utilisés. La présence d'acide succinique dans le milieu (10 $mg.l^{-1}$) favorise la croissance en présence de ses sources azotées inorganiques Valine, glutamine, acide glutamique, acide aspartique et arginine sont les acides aminés les mieux métabolisés alors que la lysine et l'alanine sont les moins bien utilisés (Worgan, 1968).

Song *et al.* (1987) ont testé un grand nombre de substrats carbonés et azotés pour définir les besoins nutritionnels de *Lentinus edodes*. Ceci leur a permis d'établir la composition d'un milieu synthétique permettant une bonne croissance du mycélium et l'utilisation cette culture liquide comme inoculum pour le développement et la fructification après transfert sur substrat solide (graines de cotons). Pour *L. edodes*, le glucose est la meilleure source carbonée, le chlorure d'ammonium et l'acide aspartique sont les meilleures sources azotées respectivement minérales et organiques. Ce champignon est incapable d'utiliser le nitrite de sodium, et n'utilise qu'avec peu d'efficacité les acides aminés tels que l'asparagine et la glutamine. L'extrait de malt et la molasse sont les composants complexes les plus favorables à la croissance.

Le fer, le zinc, le manganèse et le cuivre sont les éléments traces généralement cités comme indispensable, de même que la thiamine comme facteur de croissance (Worgan, 1968).

Le pH optimal de croissance est le plus souvent compris entre 5 et 5,5 (Worgan, 1968).

TAUX DE CROISSANCE

Song *et al.* (1987) ont obtenu des taux de croissance compris entre 0,0045 et 0,0205 h^{-1}, pour *L. edodes* cultivé en erlensmeyers et en réacteurs aérés et agités. Récemment, une culture continue de ce même champignon, maintenue pendant 70 jours, a été décrite avec des taux de dilution compris entre 0,005 et 0,04 h^{-1} (Fukushima *et al.*, 1993).

MORPHOLOGIE

La morphologie la plus fréquemment décrite pour les cultures en erlenmeyers est la forme "pellet", dont la taille moyenne est d'autant plus faible que le taux d'inoculum et la vitesse d'agitation sont plus grands (Song *et al.*, 1987; Archibald *et al.*, 1990; Martin, 1983; Michel *et al.*, 1992). En culture continue en réacteur, un inoculum sous forme de pellet évolue vers une forme pulpeuse d'autant plus rapidement que le taux de dilution est faible (Fukushima *et al.*,

1993).

Toutefois ces quelques exemples restent essentiellement qualitatif. En effet, aucune description morphologique quantitative d'une souche de basidiomycète en culture immergée (obtenue notamment à l'aide des techniques d'analyse d'images) n'a pu être trouvée.

I.4. LE MÉTABOLISME SECONDAIRE DES BASIDIOMYCÈTES

I.4.1. Généralités

On regroupe, sous le terme de métabolites secondaires, l'ensemble des produits du métabolisme non directement liés avec la croissance cellulaire et pour lesquels aucun rôle fonctionnel n'a été déterminé (Smith et Berry, 1974c). Toutefois, certaines de ces substances jouent probablement un rôle dans les phénomènes de différenciation cellulaire ou dans les relations de l'organisme avec son environnement (Beppu, 1992). Le métabolisme secondaire et le métabolisme primaire (responsable de la croissance) ne sont pas des phénomènes mutellement exclusifs ou incompatibles. Ils sont plutôt considérés comme des alternatives complémentaires, dont les voies biochimiques divergent et entrent en compétition au niveau de certains produits intermédiaires clés (Bu'lock, 1975; Moss, 1984).

Les produits issus du métabolisme primaire présentent une diversité de structure limitée et restent généralement identiques chez tous les individus d'un même ensemble taxonomique majeur. En revanche, les métabolites secondaires sont extrêmement diversifiés sur le plan moléculaire et se caractérisent par une grande spécificité génotypique (Moss, 1984; Bu'lock, 1975) - caractère d'espèce ou même de souche - et phénotypique dont la production fortement dépendante des conditions environnementales (Smith et Berry, 1974c; Claydon, 1985). Cette diversité structurale des métabolites secondaires trouve son origine dans une dérégulation des voies métaboliques primaires qui intervient notamment en fin de phase de croissance, lorsque des limitations en substrats apparaissent, et dans la moindre spécificité des enzymes mises en jeu dans les voies biochimiques secondaires (Smith et Berry, 1974c; Bu'lock, 1975).

Chez les champignons en général et chez les Basidiomycètes en particulier, le métabolisme secondaire est fréquemment associé au processus de différenciation cellulaire, soit parce qu'il en est la conséquence, soit parce qu'il le déclenche. Ainsi la structure polarisée des hyphes, en maintenant une moindre disponibilité du NADPH dans les zones subapicales, peut orienter le système enzymatique de synthèse des acides gras vers la production de dérivés phénoliques ou/et polycétoniques (Moss, 1984). La morphologie mycélienne, en provoquant des limitations diffusionnelles, peut être à l'origine du déclenchement du métabolisme secondaire (Braun et Vecht-Lifschitz, 1991). La formation de l'organe de fructification, exemple caractéristique de différenciation cellulaire, s'accompagne souvent de la production de métabolites spécifiques, non

retrouvés dans le mycélium immergé (Smith et Berry, 1974c). Ces composés, à propriétés aromatiques ou hallucinogènes, sont exploités dans les procédés de production des champignons comestibles (Zadrazil et Grabbe, 1983, Claydon, 1985). Inversement, certains métabolites secondaires ont été décrits comme déclencheurs de la fructification (Beppu, 1992).

I.4.2. Les métabolites à activité biologique

Sur environ 4000 antibiotiques d'origine microbiologique, connus à ce jour, environ 20% proviennent de champignons. Parmi ceux-ci, 75% appartiennent aux Deutéromycètes (*Fungi Imperfecti*) et seulement 10% sont des Basidiomycètes (Jong et Donovick, 1989). Pour les substances antitumorales et/ou antivirales, la proportion est quelque peu différente. Jong et Donovick (1989) ont en effet répertorié 220 antitumoraux et 42 antiviraux produits par des champignons au sein desquels on trouve respectivement 30 et 8% de Basidiomycètes.

Ces diverses proportions ne sont toutefois pas nécessairement représentatives des potentialités métaboliques de ces groupes taxonomiques dans la mesure où les Actinomycètes (bactéries mycéliennes comprenant notamment le genre *Streptomyces*) et les Deutéromycètes ont fait l'objet de screening plus systématique après la découverte de classes importantes d'antibiotiques (streptomycine et pénicilline par exemple) dans leur groupe (Anke, 1989).

Les principaux métabolites à activité biologique isolés chez les Basidiomycètes vont maintenant être présentés par classes de structure biochimique. Tout en montrant la diversité des activités biologiques manifestés par ces métabolites, on insistera particulièrement sur les antiviraux et antitumoraux qui représentent le type d'activité le plus fréquemment décrit pour ces champignons. Deux revues particulièrement détaillées ont servi de base à cette présentation: (Anke, 1989); (Jong et Donovick, 1989).

I.4.2.1. Les composés aliphatiques

Les composés aliphatiques notamment de type alcools sont très fréquemment libérés dans le milieu des cultures mycéliennes de Basidiomycètes. Si, généralement, ils sont isolés pour leurs propriétés aromatiques (Gross et Asther, 1989), ce type de métabolites à longues chaines carbonées, ramifiées ou linéaires, peut également présenter certaines activités biologiques. Ainsi, l'acide cubensique, un acide gras formé d'une chaîne en C_{22} polysubstituée et produit par *Xylaria cubensis,* a été décrit pour son activité antibiotique (Edwards *et al.*, 1991). La xéruline et ses dérivés, obtenus à partir du mycélium de *Xerula melanotricha* - espèce également productrice de strobilurine et d'oudemansine - est un inhibiteur de la biosynthèse du cholestérol (Kuhnt *et al.*, 1990). Enfin, l'acide podoscyphique, produit dans le milieu de culture de *Podoscypha species*, est un inhibiteur de la transcriptase reverse du virus de la leucémie murine (MuLV) et du virus de la myéloblastose aviaire (AMV) (Erkel *et al.*, 1991).

Métabolites	Champignons	Activité biologique	Références
Sesquiterpènes			
Illudine M et S	*Clitocybe illudens, Lampteromyces japonicus*	Antibiotique, cytotoxique, antitumorale (inhibition de la synthèse des acides nucléiques)	(Anke, 1989; Jong et Donovick, 1989)
6-deoxy-illudine M	*Pleurotus japonicus*		(Hara *et al.*, 1987)
Pilatine, Acide Marasmique	*Flagelloscypha pilatii*	Antibiotique, cytotoxique, antitumorale (inhibition de la synthèse des acides nucléiques)	(Heim *et al.*, 1988) (Anke, 1989)
Pleurotellol, ac. pleurotellique, hypnophylline	*Pleurotellus hypnophilus*	Antibiotique, cytotoxique, antitumorale (inhibition de la synthèse des acides nucléiques)	(Anke, 1989)
ac. phellodonique	*Phellodon melaleucus*		(Stadler *et al.*, 1993)
Ac. clavicoronique	*Clavicorona pyxidata*	Inhibiteur de la transcriptase reverse	(Erkel et al., 1992)
Incarnal	*Gloeostereum incarnatum*	Antibiotique	(Takazawa et Kashino, 1991)
Diterpènes			
Striatine A, B, C	*Cyathus striatus, C. poeppigii, C. limbatus, C. montagnei*	Antibiotique, cytotoxique, antitumorale (inhibition du transport de précurseurs métaboliques)	(Anke, 1989)
Crinipellines	*Crinipellis stipitaria*	Antibiotique, cytotoxique, antitumorale (inhibition du transport de précurseurs métaboliques)	(Anke, 1989)

Tableau I .3 Exemples de composés terpénoïdes isolés chez les Basidiomycètes.

I.4.2.2. les dérivés benzoïques

Les dérivés benzoïques, notamment les benzoquinones, sont des métabolites typiques des organes de fructifications du genre *Agaricus* (Claydon, 1985). Toutefois, en cultures liquides, chez *Lentinus adhaerens*, un tel dérivé benzoquinone, libéré dans le milieu, a été décrit pour son activité inhibitrice de l'agrégation plaquettaire. Il agit comme antagoniste des récepteurs du thromboxane A_2 (Lauer *et al.*, 1991). L'omphalone, autre benzoquinone, isolé du milieu de culture de *Lentillus omphalodes* possède des propriétés antibiotiques, cytotoxiques et phytotoxiques (Stärk *et al.*, 1991).

I.4.2.3. Les composés terpéniques

Le métabolisme secondaire des Basidiomycètes est riche en terpénoïdes, et plus particulièrement en sesquiterpénoïdes. Beaucoup d'entre eux possèdent une structure qui n'a été détectée, jusqu'alors, que dans cette classe de champignons. D'autres sont proches de certains composés produits par des plantes (Anke, 1989).

Quelques exemples de ces composés, leur activité et l'espèce productrice sont présentés dans le tableau I.3.

I.4.2.4. les strobilurines

Les strobilurines et oudemansines forment une classe de composés isolés chez de nombreuses espèces des genres *Strobilurus*, *Mycena*, *Oudemansiella*, *Hydropus*, *Cyphellopsis*, *Xerula* (Anke *et al.*, 1977; Backens *et al.*, 1988; Anke *et al.*, 1990). Ils ont une activité antifungique et antitumorale en bloquant le transfert d'électrons au niveau du cytochrome b (Anke, 1989).

I.4.2.5. Les nucléosides

Seuls quelques nucléosides ont été isolés de cultures de basidiomycètes. Ainsi, la 6-méthylpurine, la 6-Méthyl-9-ß-D-ribofuranosylpurine et la 6-hydroxyméthyl-9-ß-D-ribofuranosylpurine sont des analogues de nucléosides inhibant la multiplication du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) et manifestant une activité antifungique et cytotoxique (Leonhard *et al.*, 1987). Ils ont été isolés du bouillon de culture de *Collybia maculata*.

La clitocine, autre dérivé nucléosidique, a été isolée chez *Clitocybe inversa*, pour son activité insecticide (Kubo *et al.*, 1986).

I.4.2.6. Les Polysaccharides

Des polysaccharides ont été extraits de très nombreuses espèces de Basidiomycètes, à partir du bouillon de cultures, du mycélium ou des organes de fructification (Jong et Donvick, 1989; Trnovec et Hrmova, 1993). Des exemples de ces polysaccharides sont présentés dans le tableau I.4 avec leur type d'activité biologique. La structure de base la plus communément décrite est

Champignons	Polysaccharides	Activité biologique	Références
Armillaria tabescens			
- extrait à l'eau chaude des fructifications	Hétéroglucane: chaine principale: β (1->6) D-glucose et galactose; ramifications: β (1->3)-D-glucose avec un résidu mannose ou fucose terminal, 13% peptides	Antitumorale: inhibition du sarcome murin 180,	Kiho et al., 1992 a et b
- extrait alcalin	Homoglucane: α (1->3)-D-glucose	Immunomodulatrice: activation des macrophages.	
Grifola frondosa			
- mycélium en culture liquide	- β (1->3)-D-glucose avec ramifications liées en β (1->6) toute les trois unités glucosyl,	Antitumorale: inhibition du sarcome murin 180,	Ohno et al., 1986
- fructifications	- β (1->3) et α (1->4) glucose associés à des résidus acides	Immunomodulateur: proliférations cellulaires dans les organes lymphoïdes.	Suzuki et al., 1985
Omphalia lapidescens			
- fructifications	- β (1->3)-D-glucose avec 2 ramifications liées en β (1->6) toute les trois unités glucosyl,	Antitumorale: inhibition du sarcome murin 180 (forme ascitique), Immunomodulateur: activation de la réponse hématopoïtique.	Saito *et al.*, 1990 Ohno *et al.*, 1992 Ohno *et al.*, 1993
***Auricularia* species**			
- fructifications	- β (1->3)-D-glucose avec ramifications liées en β (1->6) - hétéroglucane acide: glucose, mannose, xylose, acide glucuronique.	Anti-inflammatoire.	Kiho *et al.*, 1985 Kiho *et al.*, 1991
Agaricus Blazei			
- fructifications	- Homoglucane neutre: β (1->3)-D-glucose avec ramifications liées en β (1->6), - Hétéroglucane acide: β (1->3)-D-glucose ramifié en β (1->6), et contenant des résidus galactose, mannose, xylose et acide glucuronique, - α (1->6)-(1->4)-D-glucose contenant des résidus galactose et acide glucuronique,	Antitumorale: inhibition du sarcome murin 180.	Mizuno *et al.*, 1990
Hypsizigus marmoreus			
- fructifications	- Hétéroglucane: β (1->3)-D-glucose associé à des résidus galactose (18%),	Antitumorale: inhibition du sarcome murin 180	Ikekawa *et al.*, 1992

Champignons	Polysaccharides	Activité biologique	Références
Glomerella cingulata - cultures liquides	- β (1->3)-D-glucose avec ramifications liées en β (1->6)		Gomaa *et al.*, 1991
Amanita muscaria - fructifications	- β (1->3)-D-glucose avec 2 ramifications liées en β (1->6) toutes les 7 unités glucosyl.	Antitumorale: inhibition du sarcome murin 180.	Kiho *et al*; 1992c
Agrocybe cylindracea -fructifiactions	- α -(1->3)-D-glucose linéaire	Antitumorale: inhibition du sarcome murin 180 par les dérivés O-carboxy-méthylés.	Kiho *et al.*, 1989
Lentinus edodes *- fructifications* *- extraits de milieu de culture solide riche en lignine*	- β (1->3)-D-glucose avec 2 ramifications liées en β (1->6) toutes les 7 unités glucosyl. - dérivés polycarboxylés de la lignine	Antitumorale (cf. texte) Antivirale (cf. texte)	Fachet *et al.*, 1989
Schizophyllum commune *- surnageant de culture*	-Schizophyllane: β (1->3)-D-glucose avec 1 ramification liée en β (1->6) toutes les 3 unités glucosyl.	Antitumorale (cf. texte)	Yanaki et al., 1983 a et b Furue, 1987
Fomes fomentarius *- surnageant de culture*	- fomentaran: polysaccharide neutre - BAS-F: polysaccharide acide sans résidu azoté.	Antivirale: inhibition systémique du virus de la Mosaïque du Tabac	Aoki *et al.*, 1993
Poria cocos - fructifications - mycélium	- Pachyman: β (1->3)-D-glucose avec ramifications liées en β (1->6) , - H_{11}: β (1->3)-D-glucose avec ramifications liées en β (1->6)	Antitumorale: inhibition du sarcome murin 180 (si les ramifications en β (1->6) sont éliminées pour le Pachyman).	Jong et Donovick, 1989
Coriolis versicolor - mycélium	- PS-K (Krestin): β (1->4)-D-glucose ramifié en C_3 et C_6 et associé à une fraction protéique	Immunomodulatrice.	Tmovec et Hrmova, 1993

Tableau I.4 Exemples de polysaccharides extraits chez les Basidiomycètes

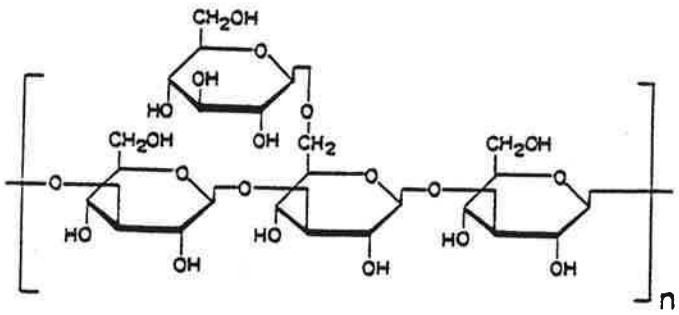


Figure I.11 Structure répétitive du schizophillane (Yanaki et al., 1983)

celle d'une chaîne de résidus D-glucose (glucopyranosyl) liés en ß-(1->3) et portant des ramifications ou quelques substitutions.

Le lentinane et le schizophyllane méritent toutefois une description plus détaillée dans la mesure où ils ont fait l'objet d'utilisation clinique.

Le Schizophyllane

Le schizophyllane est un homoglucane ramifié, soluble dans l'eau. Ce polysaccharide extracellulaire est produit en culture liquide par *Schizophyllum commune* en réacteurs agités classiques (Münzer, 1989; Rau *et al.*, 1990; Rau *et al.*, 1992) ou pulsés (Korn, 1993). Il est constitué d'une unité répétitive (Figure I.11) comprenant trois résidus D-glucose liés en ß-(1->3) sur l'un desquels vient s'attacher, en ß-(1->6), un autre unique résidu glucose (Yanaki *et al.*, 1983; Jong et Donvick, 1989). Les chaines s'associent en une structure en triple hélice qui peut être détruite par sonication. La réduction de la masse molaire moyenne (≈ 5.10^5 - 5.10^3 kDa) qui en découle peut entraîner une perte de l'activité (Yanaki *et al.*, 1983 a et b).

Il exerce une forte activité antitumorale *in vivo* contre divers type de tumeurs. En raison de son manque absolu de toxicité, il a été utilisé dans des essais cliniques de phase II chez des patients atteints de cancer des poumons, des organes digestifs ou de l'utérus (Furue, 1987). Dans ce dernier type de cancer, il est maintenant en usage clinique courant au japon (Hotta *et al.*, 1993). Son activité antitumorale repose sur une stimulation du système immunitaire de l'hôte par l'intermédiaire des lympocytes T-killers, des macrophages cytotoxiques ou de la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ADCC) (Furue, 1987). Résistant aux dégradations enzymatiques dans l'organisme, le schizophyllane n'est pas métabolisé et est notamment retrouvé inclus dans des granules lysosomales au sein des macrophages des organes lymphoïdes (Trnovec et Hrmova, 1993). Il a été montré récemment que ses propriétés d'activateur immunitaire permettent également d'inhiber le développement du virus de Sandaï chez la souris (Hotta *et al.*,1993).

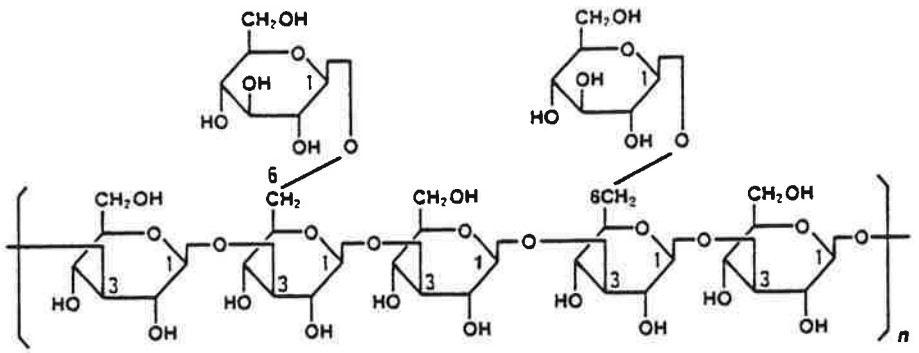


Figure I.12 Structure du lentinane (Kaneko et al., 1989)

Le Lentinane et autres polysaccharides de *Lentinus edodes*

Le lentinane est un homoglucane insoluble dans l'eau, extrait des fructifications de *Lentinus edodes* ou "Shiitake" (Chihara *et al.*, 1970). Il est constitué d'une chaîne de D-glucose liés en ß-(1->3) et ramifiés par deux résidus ß-(1->6)-D-glucosyl tous les cinq éléments de la chaîne principale (Figure I.12). Les chaînes sont également organisées selon une structure en triple hélice et ont une masse molaire comprise entre 4.10^5 et 8.10^5 daltons (Kaneko *et al.*, 1989).

Là encore son fort effet antitumoral, comparable à celui du schizophyllane, a été attribué à son action stimulatrice des réponses immunitaires de l'hôte, notamment par une activation des macrophages et des lymphocytes T (Kaneko *et al.*, 1989; Fachet *et al.*, 1989).

Un autre type de polysaccharides a été isolé du mycélium de *L. edodes* lorsque celui-ci est cultivé sur milieu solide, complexe et riche en lignine (de bagasse ou de son de riz) (Sugano *et al.*, 1982;). L'extraction à l'eau du milieu complet (biomasse et composés ligneux) fournit une fraction soluble brute, appelée LEM (*Lentinus edodes Mycelia*), composée d'hétéroglucanes (riche en xylose notamment), de lignine solubilisée (polycarboxylée) et de protéines (Sugano *et al.*, 1982; Suzuki *et al.*, 1990).

Outre leurs activités antitumorale et/ou immunostimulatrice (Sugano *et al.*, 1982 et 1985, Suzuki *et al.*, 1990), certaines fractions isolées du LEM exercent, *in vitro*, un fort effet inhibiteur contre le Virus d'Immuno-déficience Humaine (VIH) (Tochikura *et al.*, 1988; Suzuki *et al.*, 1989) et contre l'Herpès Simplex Virus (HSV) (Koga *et al.*, 1990 et 1991; Chiyokichi *et al.*, 1991; Sarkar *et al.*, 1993). Contrairement aux précédentes activités dues aux glucanes, la fraction active contre le HIV a été attribuée à un dérivé polycarboxylé de la lignine (Suzuki *et al.*, 1990). Pour l'herpes simplex, la nature de l'agent actif n'est pas précisée mais le même type de composé est suggéré (Sorimachi *et al.*,1990). Dans ce cas, il a été montré que l'inhibition de la réplication virale n'intervient pas au niveau de l'adsorption du virus sur les récepteurs cellulaires mais à un stade tardif en bloquant l'assemblage de la nucléocapside (Sarkar *et al.* , 1993).

CONCLUSION

Ce rappel bibliographique consacré aux Basidiomycètes nous a permis de dégager deux caractéristiques majeures de cette classe de champignons.

- A la différence des Deutéromycètes ou Ascomycètes, les Basidiomycètes développent une véritable forme végétative diploïde (et plus précisément dicaryotique). C'est même la forme la plus communément rencontrée dans la nature puisqu'elle donne naissance aux organes de fructifications qui représentent le moyen le plus simple — et souvent le seul — de détecter la présence d'une souche sauvage et de l'identifier. Elle est également la forme usuelle de conservation des souches en laboratoire car les spores asexuées sont inexistantes et la germination des spores haploïdes dépend de facteurs (température, humidité, milieu...) spécifiques à chaque espèce et souvent mal connus. Cette forme diploïde présente un mode de division mitotique spécifique (formation des anses d'anastomoses), des taux de croissance souvent faibles comparés à ceux des Deutéromycètes et peut conduire à une différenciation d'un haut niveau organisationnel. Elle se situe en effet à un niveau tissulaire (création d'un organe complexe et spécialisé, le carpophore) et non plus seulement au niveau cellulaire par la polarisation hyphale que l'on peut l'observer chez tous les champignons filamenteux septés . Cet ensemble de particularités ainsi que le temps de culture de tels champignons restreint certainement leurs applications fermentaires.

- La richessse du métabolisme secondaire de ces organismes se caractérise à la fois par la diversité des structures chimiques isolées et par celle des activités biologiques qui ont été révélées. Cette particularité associée au très grand nombre d'espèces que compte cette classe (plus de 40000) a certainement contribué au regain d'intérêt qu'ont suscité ces champignons depuis la fin des années 80 pour fournir une nouvelle source de métabolites même si les groupes jusqu'alors largement testés (Actinomycètes et Deutéromycètes) sont encore à l'origine de nombreuses nouvelles structures (Dreyfus et Chapelle, 1994; Sanglier *et al.*, 1993).

Dans le chapitre suivant nous présenterons deux exemples de métabolites détectés dans des cultures de souches appartenant aux ordres les plus caractéristiques des Basidiomycètes (Agaricales et Aphyllophorales) avant de nous consacrer aux propriétés culturales et morphologiques de ces souches en cultures immergées.

Chapitre II

Détection de métabolites à activité pharmacologique

Chapitre II

Détection de métabolites à activité pharmacologique

Afin d'illustrer les propriétés métaboliques des Basidiomycètes, mises en évidence au Chapitre I, nous exposons, dans cette partie, la recherche d'une activité antivirale d'une part, et d'une activité immunomodulatrice d'autre part, à partir de cultures immergées de deux souches de Basidiomycètes.

La première souche, *Macrocystidia cucumis* (Agaricale), a été détectée lors d'un screening d'activités pharmacologiques (antifungiques, antivirales, cytotoxiques, immunomodulatrices) réalisé au laboratoire de Mycologie de la Faculté de Pharmacie de Lyon, il y a quelques années. Un effet inhibant le développement, *in vitro*, du virus herpès simplex (HSV) avait alors été observé sur les surnageants de cultures effectuées en fioles agitées. Les priorités scientifiques du laboratoire, à cette époque, ayant concerné d'autres types de produits, ces premiers résultats n'avaient pas été approfondis. Par ailleurs, l'efficacité des traitements anti-herpétiques par l'aciclovir (ACV) a probablement contribué à freiner les études sur les potentialités de ces métabolites.

Ces dernières années, la demande accrue de nouvelles molécules antivirales, notamment dans le cadre des recherches sur le virus d'immunodéficience humaine (VIH responsable du SIDA), et l'émergence de souches virales herpétiques résistantes au traitement par l'aciclovir (Nugier, 1992; Nugier *et al.*, 1992) ont relancé l'intérêt pour ces métabolites fungiques et ont motivé leur étude. Ainsi, il nous a été demandé de vérifier l'activité et d'établir la nature des composés détectés lors des premiers tests.

Dans ce cadre, après un rappel des différentes techniques utilisées, nous présentons dans ce chapitre la mise au point d'un test ELISA permettant de détecter une inhibition *in vitro* du HSV et l'application de ce test au culture de *M. cucumis*. Les difficultés pour établir la nature de l'activité sont également discutées.

La seconde souche fungique étudiée, *Fomes fomentarius*, appartient aux Aphyllophorales, ordre important parmi les Basidiomycètes puisqu'il contient notamment la famille des polypores, très étudiée pour les productions enzymatiques (ligno-cellulolytiques) de ces membres (Kirk et Farrell, 1987; Archibald *et al.*, 1990). La souche de *F. fomentarius* est examinée ici pour ces capacités à produire des polysaccharides exocellulaires. Ces métabolites représentent en effet une classe de molécules souvent rencontrées dans les cultures immergées de Basidiomycètes et très étudiées pour leurs potentialités antitumorales exercées le plus souvent par une stimulation des défenses immunitaires de l'hôte (Jong et Donovick, 1989).

Déjà citée parmi les espèces productrices de polysaccharides à propriétés antitumorales (Jong et Donovick, 1989), *F. fomentarius* a fait également l'objet d'un article récent pour l'activité systémique de certaines de ces fractions polysaccharidiques contre le virus de la Mosaïque du Tabac (VMT) (Aoki *et al.*, 1993). Les propriétés immunologiques de ces polysaccharides n'ont , à notre connaissance, jamais été explorées alors que la recherche de molécules immunomodulatrices — polysaccharides (Trnovec et Hrmova, 1993) ou autres structures (Sanglier, 1993) — connait actuellement un grand essor.

Nous présentons ici les résultats de tests de prolifération lymphocytaire *in vitro,* en présence d'un agent mitogène (la concanavaline A) ou sous l'action d'une stimulation allogénique, réalisés à partir de fractions polysaccharidiques de *F. fomentarius*. La première phase de la caractérisation chimique des fractions est également exposée.

II.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1.1. Cultures fongiques

II.1.1.1. Souches

Les souches utilisées dans cette étude ont été isolées à partir de boutures de carpophores; elles sont donc sous la forme dicaryotique (mycélium secondaire). Elles ont été identifiées et sont conservées sur gélose inclinée, à la Mycothèque de la Faculté de Pharmacie de l'Université Claude Bernard, Lyon I - France.

Fomes fomentarius n° 1082 (Aphyllophorales)

- Groupe: Eucaryote
- Embranchement: Fungi
- Sous-embranchement: Eumycota
- Classe: Basidiomycète
- Sous-classe: Hyménomycéte
- Sur-ordre: Homobasidiomycète
- Ordre: Aphyllophorale
- Famille: Polyporacée
- Genre: *Fomes*
- Espèce: *fomentarius*

(cf. § I.1.pour une description plus complète)

Macrocystidia cucumis N°107 (Agaricales)

- Groupe: Eucaryote
- Embranchement: Fungi
- Sous-embranchement: Eumycota
- Classe: Basidiomycète
- Sous-classe: Hyménomycète
- Sur-ordre: Homobasidiomycète
- Ordre: Agaricales
- Famille: Tricholomaceae
- Genre: *Macrocystidia*
- Espèce: *cucumis*

(cf. § I.1. pour une description plus complète)

II.1.1.2. Milieux de culture

Milieu "Malt" (Conservation et inoculum pour *M. cucumis*)

Ce milieu est utilisé pour l'entretien de la souche et la préparation de l'inoculum.

Extrait de malt (Organotechnie)	*15*	*g/l*	
Agar-agar	*12*	*g/l*	*(pour le milieu solide uniquement)*

Ajustement du pH à 6,5 avant stérilisation par autoclavage (20 min, 121°C)

Milieu "SC" (Conservation et inoculum pour *F. fomentarius*)

Ce milieu classique est notammment décrit pour la production de polysaccharides par *S. commune* en réacteur classique (Rau *et al.*, 1990) ou pulsé (Korn, 1993).

Glucose	*30*	*g/l*	
Extrait de levure (bioMérieux)	*3*	*g/l*	
Phosphate de potassium (KH_2PO_4)	*1*	*g/l*	
Sulfate de magnésium ($MgSO_4$, $7H_2O$)	*0,5*	*g/l*	
Agar-agar	*12*	*g/l*	*(pour le milieu solide uniquement)*

Ajustement du pH à 5,3 avant stérilisation par autoclavage (20 min, 121°C)

Milieu "L" (Cultures de production de *M. cucumis*)

Ce milieu est utilisé pour la production des métabolites antiviraux par *M. cucumis*. C'est dans ce milieu que l'activité a été détectée lors des premiers tests.

Glucose	*15*	*g/l*	
Extrait de malt	*3,5*	*g/l*	
Tartrate d'ammonium (Sigma)	*0,35*	*g/l*	
L(+)Asparagine (Sigma)	*0,5*	*g/l*	
Hydrolysat de caséine (Biomérieux)	*0,5*	*g/l*	
Phosphate de potassium (KH_2PO_4)	*0,5*	*g/l*	
Sulfate de magnésium ($MgSO_4$, $7H_2O$)	*0,25*	*g/l*	
Agar-agar	*12*	*g/l*	*(pour le milieu solide uniquement)*

Ajustement du pH à 6,5 avant stérilisation par autoclavage (20 min, 121°C)

Milieu "FF" (Production de polysaccharide par *Fomes fomentarius*)

Ce milieu a été utilisé par Aoki *et al.* (1993) pour la production de polysaccharides par *F. fomentarius* et d'autres Basidiomycètes.

Glucose	*50*	*g/l*	
Extrait de malt	*10*	*g/l*	
Peptone (Bio-polytone - bioMérieux)	*2*	*g/l*	
Extrait de levure (bioMérieux)	*2*	*g/l*	
Phosphate de potassium (KH_2PO_4)	*5*	*g/l*	
Sulfate de magnésium ($MgSO_4$) $7H_2O$)	*2,5*	*g/l*	

Ajustement du pH à 5,3 avant stérilisation par autoclavage (20 min, 121°C)

II.1.1.3. Conservation et entretien des souches

Les souches sont conservées, à 4°C, sur gélose inclinée (Milieu "Malt" pour *M. cucumis*, milieu SC pour *F. fomentarius*) et repiquées tous les 3 ou 4 mois.

L'entretien des souches est assuré par repiquage sur milieu gélosé, en boites de pétri (respectivement les mêmes milieux que pour la conservation). Ce repiquage est réalisé à partir de colonies agées de 7 jours pour *F. fomentarius*, de 21 jours pour *M. cucumis*. Des morceaux (1cm de diamètre) sont prélevés à l'emporte-pièce dans la zone périphérique de la colonie (zone de croissance des hyphes) puis sont déposés face supérieure (mycélium aérien) contre la gélose. Les boîtes sont incubées à 24°C, à l'obscurité et en atmosphère humide (80%). Elles sont retournées après deux jours afin d'éviter la condensation d'eau sur la surface gélosée.

II.1.1.4. Mode de préparation de l'inoculum

La couronne périphérique d'une colonie de 4 à 5 cm de diamètre — obtenue après 7 jours pour *F. fomentarius*, après 21 jours pour *M. cucumis* — est prélevée puis transférée dans une fiole contenant 300 ml de milieu inoculum (respectivement "SC" ou "Malt"). La colonie est ensuite finement fragmentée par un homogénéiseur à pales tranchantes (1 min, 2000 t/min). Les fioles sont incubées à l'obscurité, à 24°C, sur une table d'agitation rotative (amplitude de rotation 5 cm, 120 rpm). La durée de culture de l'inoculum est de 3 jours pour *F. fomentarius*, et de 7 jours pour *M. cucumis*.

Pour *M. cucumis*, les cultures liquides de milieu "Malt", âgées de sept jours sont centrifugées (9000 tours/minute-15 minutes) afin d'éliminer le milieu, stérilement. Le culot constitué du mycélium est additionné d'eau stérile (environ 100 ml/erlen de 400 ml), puis broyé toujours stérilement. La concentration en biomasse humide est déterminée par pesée, après filtration, d'un échantillon du broyat. Cet inoculum est dilué de façon à obtenir un inoculum standard à 0,2 g humide /ml (≈ 4 mg sec/ml), utilisé dans les tests de définition des besoins nutritionnels.

II.1.1.5. Cultures de production en fioles agitées

Les cultures de production sont conduites en Erlenmeyers de 500 ml contenant 150 ml de milieu "L" ou "FF". Elles sont ensemencées à partir de la culture d'inoculum homogénéisée (1 min, 2000 t/min) à un taux de 8%. Les fioles sont incubées, à l'obscurité, à 24°C, sur une table d'agitation rotative (amplitude de rotation 5 cm, 120 rpm).

II.1.1.6. Cultures en réacteurs classiques

Deux réacteurs à cuves en verre à fond rond (Applikon - Hollande) ont été utilisés. Leur volume est respectivement de 3 et 7l — 2,5 et 5,5l utiles — avec un rapport hauteur (H) / diamètre (D) intérieur respectivement égal à 1 et à 2. Ils sont équipés d'un arbre d'agitation, fixé sur la platine de couverture par accouplement magnétique, sur lesquels on peut installer selon les configurations deux hélices marines (vortex / antivortex, $D_{hélice}$=4 cm, $D_{hélice}$ / $D_{réacteur}$ = 1/4) ou des turbines Rushton à pales droites. Dans les fermentations présentées ici, seules la première configuration (hélice marine a été utilisée notamment à cause de la meilleure capacité de pompage

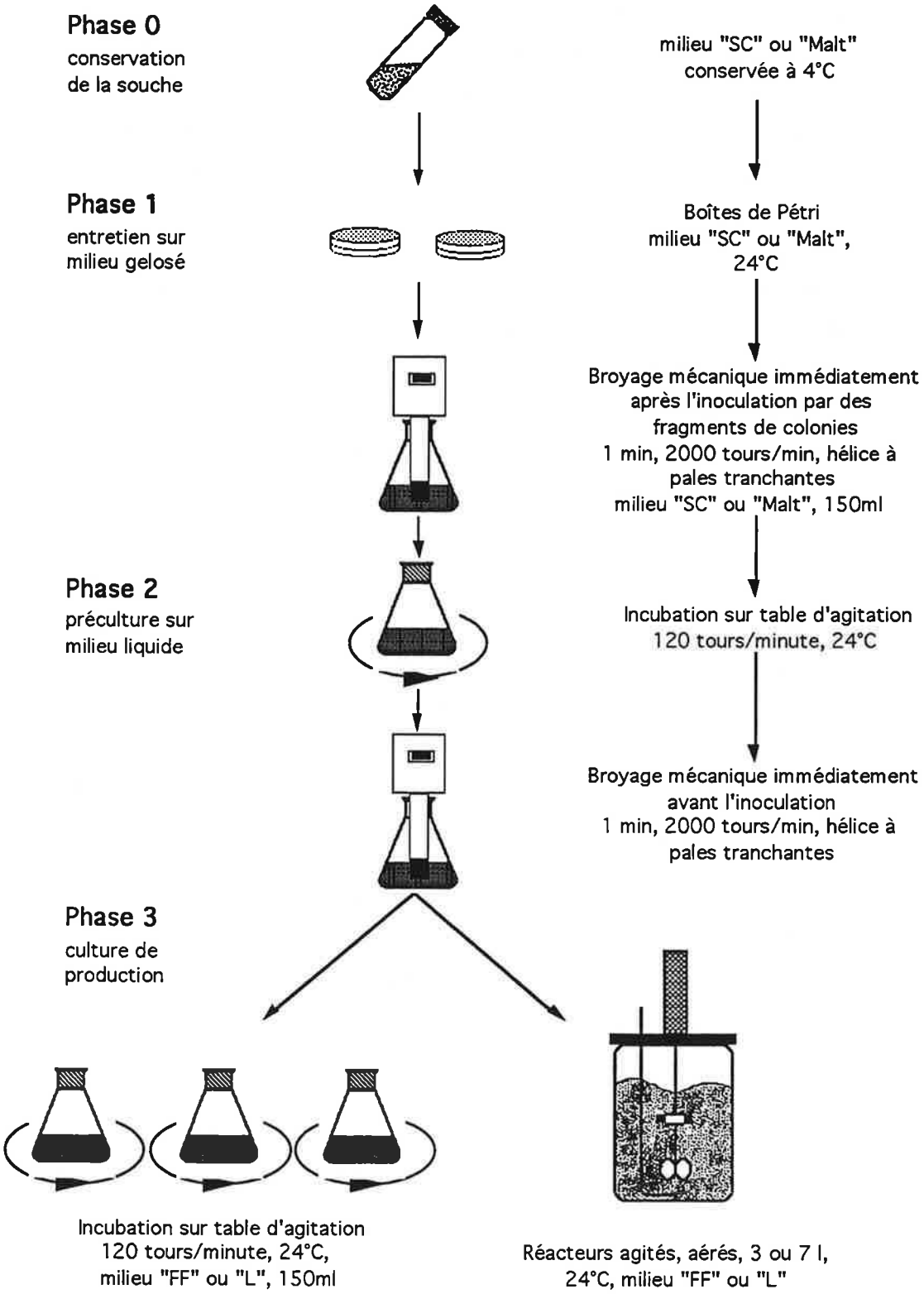


Figure II.1: Mode de préparation des cultures.

N° culture	Volume de milieu (l)	Milieu	Agitation rpm (m/s)	Aération (vvm)	pH
M. cucumis					
MC01	5,5	"L"	200 (0,52)	0,2	5,8 (régulé)
MC02	5,5	"L"	200 (0,52)	0,1	5,8 (régulé)
MC03	2,5	"L"	120 (0,31)	0,2	non régulé
MC04	2,5	"L"	200 (0,52)	0,2	non régulé
MC05	2,5	"L"	300 (0,78)	0,2	non régulé
F. fomentarius					
FR01	5,5	"SC"	200 (0,52)	0,2	non régulé
FR02	5,5	"FF"	300 (0,78)	0,2	non régulé

Tableau II.1 Conditions de culture des fermentations en réacteurs.

qu'elle a permis d'assurer dans le milieu visqueux obtenu lors de la production de polysaccharide. La vitesse de rotation est contrôlée par des moteurs ADI 1012 (Applikon) et leur boitier de régulation. Les contre-pales ont été supprimées pour limiter le développement de la biomasse sur les supports dans des zones de faible agitation.

L'aération est réalisée à partir d'un compresseur d'air. L'entrée d'air dans le fermenteur est assurée, après filtration stérilisante (Millex FG 50 - 0,2 µm), par un tube plongeant muni d'un sparger à son extrémité. Le débit d'air est fixé, selon les fermentations, à 0,1 ou 0,2 vvm (volume d'air.(volume de milieu)$^{-1}$. min^{-1}) et est maintenu constant.

Les prélèvements sont effectués à l'aide d'un tube plongeant de 10 mm de diamètre intérieur et dont la section d'ouverture est perpendiculaire au flux primaire de l'agitateur. Le soutirage du bouillon de culture est réalisé par surpression en fermant temporairement (1 à 2 min) la sortie d'air du fermenteur. Ce mode de prélèvement (large ouverture du tube permettant le passage des plus grosses particules et fort débit assuré par la surpression) permet de garantir une bonne représentativité des échantillons.

Le volume dans le réacteur est maintenu constant par ajout de milieu après prélèvement (environ 50 ml - 1% du volume totale). Le faible volume de milieu ajouté en remplacement permet de considérer que les cultures sont effectuées en mode "batch" et non "fed-batch".

La température est mesurée par une sonde PT 100 insérée dans un doigt de gant. Elle est régulée à 24°C par circulation d'eau thermostatée dans la double paroi du réacteur (réacteur de 3 litres) ou par une ceinture électrique chauffante (réacteur de 7 litres) connectée à un Bio Controller™ ADI 1030 (Applikon) assurant une régulation de type PID.

Dans le réacteur de 7 litres, le pH est régulé par l'intermédiaire d'une sonde Fermprobe™ autoclavable (Broadley-James - USA), connectée au Bio Controller™ ADI 1030. Ce dernier actionne des pompes péristaltiques ajoutant NaOH (4 M) et HCl (4 M) selon une régulation de type PID autour de la consigne.

La concentration d'oxygène dissous est suivi par une sonde polarographique Ingold (Suisse) autoclavable. Après autoclavage la sonde est étalonné par saturation du milieu à l'air (100% de l'échelle de calibration) puis à l'azote (0%).

II.1.1.7. Paramètres suivis pendant les cultures

Biomasse

La concentration en biomasse est déterminée à partir de son poids sec. Selon les cas, les échantillons sont soit filtrés (membranes en nitrate de cellulose, porosité de 3 µm ou filtre papier 42 - Whatman) par aspiration, soit centrifugés (9000 x g, 15 min) puis rincés. Les échantillons riches en polysaccharides, particulièrement visqueux, sont préférentiellement centrifugés.

Le filtre ou le culot de centrifugation sont ensuite placés à 80°C jusqu'à poids constant (généralement pendant 12 à 15 h) puis pesés. Les résultats sont exprimés en gramme (g) de biomasse sèche par litre (l) de bouillon de culture.

Glucose et Maltose

Les dosages de substrats au cours des cultures sont effectués sur le surnageant obtenu lors de la préparation de la biomasse pour la mesure du poids sec. Ils sont effectués à l'aide de kits enzymatiques (Boehringer - Allemagne).

Le dosage du maltose nécessite son hydrolyse préalable en deux molécules de D-glucose par une α-glucosidase.

$$\text{Maltose} + H_2O \xrightarrow{\alpha\text{-glucosidase}} 2\ \text{D-glucose}$$

Le dosage du glucose repose ensuite sur les deux réactions enzymatiques présentées ci-dessous.

$$\text{D-glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Glucose-6-phosphate} + \text{ADP}$$

$$\text{Glucose-6-phosphate} + \text{NADP}^+ \xrightarrow[\text{déshydrogénase}]{\text{Glucose-6-phosphate}} \text{Gluconate-6-phosphate} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Ces réactions conduisent à la formation d'une molécule de NADPH par molécule de glucose initialement présente. La quantité de NADPH formé est lue au spectrophotomètre à 340 nm. La concentration en maltose est obtenue par différence entre la concentration en glucose total (maltose hydrolysé + glucose) et la concentration en glucose seul.

Ammonium

La concentration en ammonium est déterminée lors des cultures sur milieu "L". Là également, un test enzymatique (Boehringer) est utilisé. Il repose sur la réaction suivante au cours de laquelle une molécule de NADH est oxydée en NAD^+ pour chaque molécule de NH_4^+ présente initialement. La disparition du NADH est suivie par lecture de l'absorbance à 340 nm.

$$\text{2-oxoglutarate} + \text{NADH} + NH_4^+ \xrightarrow[\text{déshydrogénase}]{\text{Glutamate}} \text{L-glutamate} + NAD^+ + H_2O$$

II.1.2. Tests d'activité anti- virus Herpès Simplex

II.1.2.1. Cultures cellulaires

Lignée cellulaire

Les cellules utilisées sont des BHK21, lignée continue de cellules de rein de hamsters syriens âgés de un jour.

Milieu de croissance

Les cellules BHK21 sont cultivées en flacons, en milieu BHK21 Glascow MEM (Minimum Essential Medium - GIBCO) supplémenté en:

- *Sérum de veau foetal (SVF) 10%*

•Bouillon tryptose phosphate 10% (GIBCO)
•L-glutamine 2mM
•Bicarbonate de sodium 0,15%
•Pénicilline G-Streptomycine 1% (100U-100µg/ml)

Les cellules sont incubées sous atmosphère enrichie en CO2 (5%) à 37°C jusqu' à confluence de la nappe (3 à 4 jours).

Milieu de survie

Il diffère du précédent par la concentration en Sérum de Veau Fœtal (SVF) réduite à 2%. Il est utilisé lors de cultures de cellules infectées.

Conservation

Les cellules sont conservées en ampoules de 2 ml dans le milieu de culture additionné de DMSO 5% et de SVF 20%. Les ampoules sont d'abord placées une nuit à -80°C, puis conservées dans l'azote liquide (-180°C).

Entretien des cellules

Les cellules BHK21 sont entretenues par repiquages successifs une à deux fois par semaine en fonction de la vitesse de croissance. Avant le repiquage, la nappe cellulaire doit être dispersée. Cette opération, appelée trypsination, est une lyse enzymatique du collagène intercellulaire.

Elle est réalisée selon le protocole suivant:

- Elimination du milieu de culture.
- Rinçage de la nappe cellulaire à l'aide d'une solution saline destinée à éliminer le SVF du milieu, inhibiteur de la trypsine, utilisée dans la phase suivante.

Solution saline de rinçage

NaCl	*8g*
KCl	*0,4g*
Na2HPO4, 2H2O	*0,06g*
KH2PO4	*0,06g*
H2O	*qsp 1l*

Stérilisation à l'autoclave (10 minutes à 110°C).

- Après élimination de la solution de rinçage, un mélange versène/trypsine est ajouté quelques secondes puis éliminé partiellement, ne laissant qu'un mince film sur la nappe. La trypsine permet de digérer les ciments intercellulaires sans détériorer la membrane des cellules. Les cellules ainsi désolidarisées se décollent de la paroi du flacon par simple agitation.

Versène 0,02%

NaCl	*8g*
KCl	*0,2g*
NaH_2PO_4, 2 H_2O	*1,4375g*
KH_2PO_4	*0,2g*

Versène (poudre) *0,2g*
H_2O *qsp 1l*
Stérilisation à l'autoclave. Conservation à +4°C pendant environ 3 mois.

Trypsine
Solution mère à 25% diluée 100 fois dans le versène.

- Addition de 10 ml de milieu BHK21 à 10% de SVF aux cellules puis émulsion à la pipette afin de détruire les agrégats cellulaires.
- Un comptage des cellules est effectué à l'aide d'une cellule de Burker puis elles sont ensemencées selon le tableau II.2.

Surface de culture du flacon	Nombre de cellules	Volume de milieu de culture
25 cm^2	10^6	8 ml
75 cm^2	3.10^6	30 ml
175 cm^2	8 à 10^6	75 ml

Tableau II.2Taux d'ensemencement des flacons de cultures cellulaires.

II.1.2.2. Culture du virus

Caractéristiques de la souche

La souche virale utilisée, F-HSV-1, est un virus *herpes simplex* de type 1 (Roizman, 1991) de phénotype sauvage, isolé d'un herpès facial.

Culture et conservation du virus

Les cellules BHK21, lorsqu'elles sont en nappe confluente, sont infectées à raison de 5 unités formant plage par cellule en présence de milieu de survie. Elles sont incubées à 37°C jusqu'à l'obtention d'un effet cytopathique (ECP) complet avec décollement des cellules. Les suspensions virales obtenues sont récoltées, réparties en aliquotes et conservées à -80°C.

Détermination du titre viral infectieux

Des cellules BHK21 sont ensemencées en plaques de 24 cupules à raison de 2.10^6 cellules/puits. Après incubation pendant une nuit à 37°C, le milieu de culture est délicatement éliminé à la pipette et les cellules sont infectées avec 200 µl de dilutions de virus (10^{-1} à 10^{-6}) préparées en milieu de survie (milieu BHK21 à 2% de SVF) à raison de trois essais par dilution. Un témoin "cellule" est réalisé en remplaçant 200 µl de suspension virale par 200 µl de milieu. Après une heure d'adsorption à 37°C, les cultures infectées sont recouvertes de

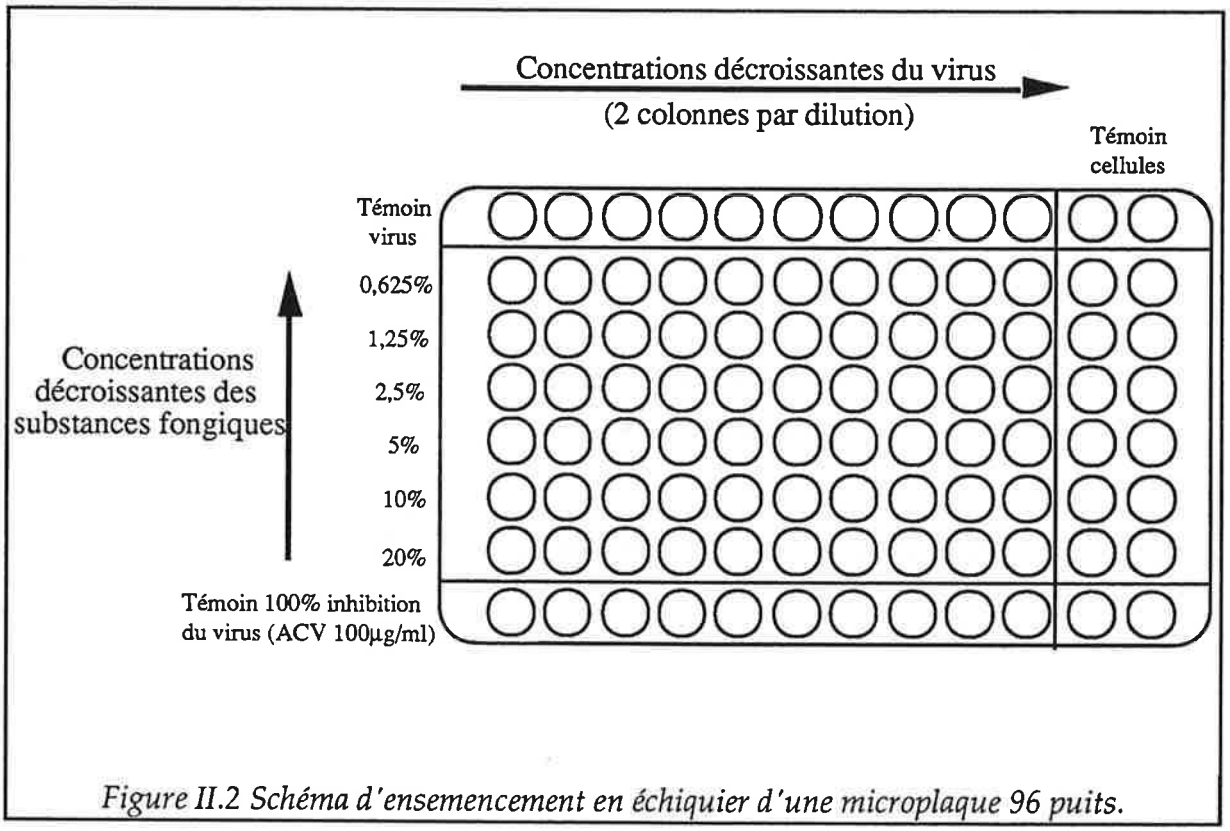


Figure II.2 Schéma d'ensemencement en échiquier d'une microplaque 96 puits.

milieu de survie (1,5 ml/cupule) additionné de 1% de carboxyméthylcellulose permettant la semi-solidification du milieu. Elles sont ensuite incubées 48 heures à 37°C pour permettre la formation de plages de lyse individualisées.

Au terme de l'incubation, les tapis cellulaires sont fixés dans une solution de PBS-formol (10%) pendant 10 minutes, colorés avec une solution de violet de méthyl 0,5%/méthanol 20% puis séchés.

Le titre infectieux du virus est alors évalué en unités formant plages (PFU) en comptabilisant, pour chaque dilution virale, le nombre de plages de lyse.

La suspension virale utilisée lors des tests antivirogrammes a un titre de 2.10^7 PFU.

II.1.2.3. Antivirogrammes (Test ELISA)

Une méthode de type ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) a été développée. Elle consiste à comparer le taux d'antigènes viraux synthétisés respectivement en l'absence et en présence de différentes dilutions du composé présumé antiviral. Elle se déroule sur 48 heures. Les contacts sont effectués en microplaques de 96 puits (cf. Figure II.2).

Inoculation

Les microplaques sont ensemencées de la façon suivante:

- 100 µl de milieu BHK21 à 2% de SVF dans toutes les cupules à l'exception de la dernière ligne.
- 100 µl d'ACV (aciclovir) à 100 µg/ml dans les cupules de la dernière ligne. L'acyclovir représente le témoin antiviral provoquant une inhibition complète du virus HSV à la concentration utilisée.
- 100 µl de la substance fongique à la dilution 20% (final) dans la ligne 20%.
- Emulsion à la pipette des cupules de cette ligne et cascade de dilutions jusqu'à 0,625%.
- La suspension cellulaire est préparée en milieu BHK21 à 10% de SVF à une concentration de 3 millions de cellules / 6 ml puis distribuée dans chaque puits (60 µl/puits soit 3.10^4 cellules / puits).
- Une série de dilutions au 1/10ème du virus est préparée en milieu BHK21 à 2% de SVF et distribuée dans chaque puits (40 µl) à l'exception des deux dernières colonnes (témoin cellules) dans lesquelles elles sont remplacées par du milieu à 2% de SVF.
- Une microplaque "témoin positif" est préparée de la même manière avec des dilutions d'ACV comprises entre 10 µl/ml et 0,16 µl/ml. Elle permet de contrôler le bon déroulement du test.

L'incubation des plaques a lieu à 37°C sous atmosphère enrichie en CO_2 (5%) pendant 48 heures.

Révélation

Elle comprend onze étapes:

- Fixation des cellules au fond des puits par addition de 50 µl de solution de PBS à 0,25% de glutaraldéhyde (Sigma). Le contact dure 30 minutes à température ambiante.

  Tampon PBS pH 7,2 (Phosphate Buffer Saline) concentré 10 fois

NaCl	*100g*
KCl	*2,5g*
Na2HPO4, 2H2O	*14,375g*
KH2PO4	*2,5g*
H2O	*1l*

  Stérilisation à l'autoclave (20 min, 121°C).

- 4 rinçages en PBS/Tween 0,05% (Sigma) afin d'éliminer l'excès de glutaraldéhyde.

- Mise en contact avec 200 µl/cupule de PBS/BSA 2% (Bovine Serum Albumine) pendant une heure à 37°C. La BSA sature tous les sites au fond des puits et évite ainsi l'adsorption non spécifique des anticorps.
- 4 rinçages en PBS/Tween 0,05%.
- Contact avec du sérum de lapin anti-HSV (Biorad) dilué 400 fois en PBS-Tween 0,05%/BSA 1% (100 µl/cupule). Incubation 30 minutes à 37°C.
- 4 rinçages en PBS/Tween 0,05%.
- Contact avec la protéine A, couplée à la péroxydase. La protéine A se fixe sur la partie Fc des IgG. Elle est diluée 2000 fois en PBS-Tween 0,05%/BSA 1% (100 µl/cupule). Incubation 45 minutes à 37°C.
- 4 rinçages en PBS/Tween 0,05%.
- Addition du substrat chromogène OPD (O-Phénylènediamine Dihydrochloride) de la péroxydase (50 µl/cupule). Incubation 20 à 30 minutes à l'obscurité, à température ambiante.

  Solution de substrat
  une tablette D'OPD (5mg) (SIGMA) dans 10 ml de tampon péroxydase
  Tampon péroxydase (phosphate-citrate buffer with uree hydrogen peroxyde tablets) (SIGMA)
  une tablette (SIGMA) dans 100 ml d'eau distillée
- Blocage de la réaction enzymatique par addition de 50 µl/cupule d'acide sulfurique 4N.
- Lecture de l'absorbance de chaque cupule au spectrophotomètre à une longueur d'onde λ=492nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-HSV fixés, c'est-à-dire à la quantité d'antigènes viraux produits.

II.1.2.4. Etude de la cytotoxicité

L'étude de la cytotoxicité est indispensable car elle permet de différencier la mortalité cellulaire liée au virus de celle provoquée par le produit testé. Pour réaliser les antivirogrammes, seules les dilutions non cytotoxiques de l'inhibiteur devront être considérées.

Quatre puits sont répliqués par dilution. Les plaques sont inoculées selon le schéma de la figure II.3.

Les témoins sont:

- un témoin cellules qui ne contient que des cellules et du milieu BHK21 à 2% de SVF (100% de cellules viables).
- un témoin bruit de fond ne contenant que du milieu à raison de 200 µl/puits (0% de cellules viables).

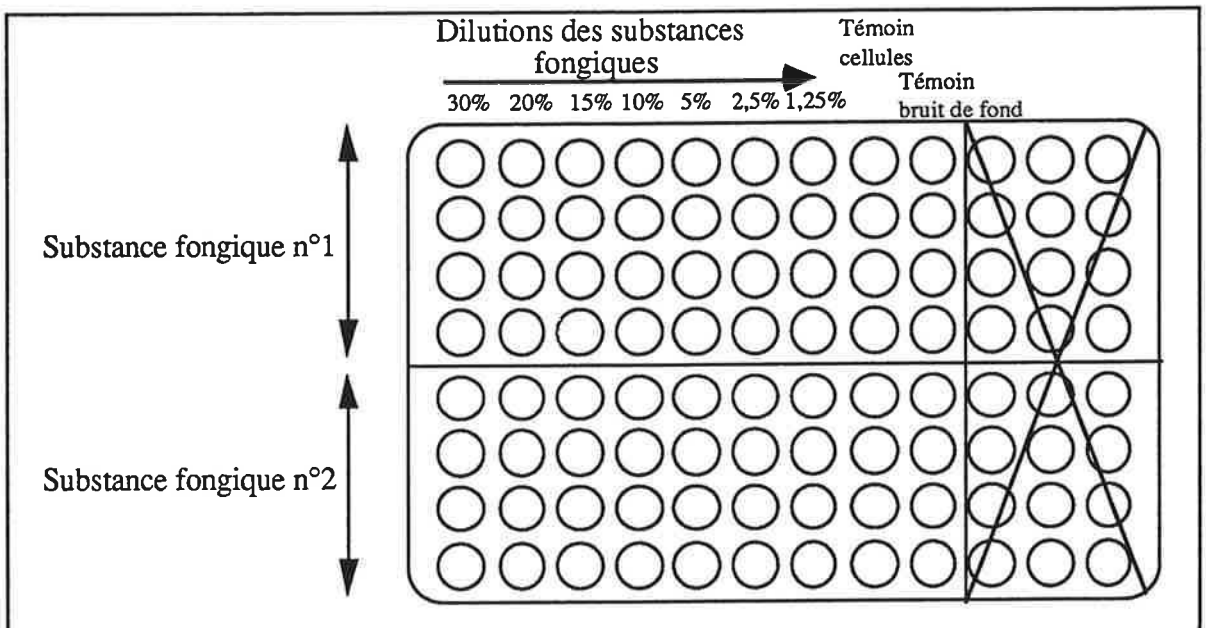


Figure II.3: Schéma d'ensemencement des plaques de cytotoxicité.

Les dilutions d'antiviraux (100 µl / puits) sont effectuées en cascade directement dans la microplaque puis additionnées de la suspension cellulaire (100 µl /puits) à raison de 3.10^4 cellules par puits .

Les plaques sont incubées 48 heures à 37°C.

Révélation

- Addition de 50 µl/cupule d'une solution de rouge neutre pendant 45 minutes à 37°C. Ce colorant vital pénètre sélectivement dans les cellules vivantes.

  Rouge neutre
  0,15% de rouge neutre en eau bidistillée additionnée de NaCl 0,9%.
  Filtration sur papier filtre. Ajustement du pH à 4,1.

- Essorage de la plaque.

- Lavage avec du tampon PBS pH 6,5 qui élimine le colorant en excès.

  Tampon PBS pH 6,5
  Solution A: KH_2PO_4 *9,08g/l*
  Solution B: Na_2HPO_4, 2 H_2O *11,88g/l*
  PBS pH 6,5: 62,7 ml A+ 37,3 ml B

- Essorage de la plaque.

- Addition de 100 µl de citrate/éthanol qui permet la libération dans le milieu du colorant contenu dans les cellules vivantes.

  Tampon citrate disodique/éthanol
  Solution A: citrate disodique 1M
  acide citrique,1H_2O *21g*
  NaOH 1M *200ml*
  H_2O *qsp 1l*

Solution B: HCl 0,1N
Solution (A+B): 153ml A+97ml B
Solution citrate/éthanol: 250ml solution (A+B)+250ml éthanol absolu

- Lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 540 nm. Elle est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. On évalue le pourcentage de cellules viables dans les cupules soumises au composé antiviral par rapport aux témoins 0% et 100% de cellules viables.

II.1.3. Préparation des extraits de culture de M.acrocystidia cucumis

Les prélèvements sont effectués à trois temps de culture différents (14, 21 et 28j), sur plusieurs erlenmeyers. Tous les échantillons sont conditionnés en flacons de verre de 5 ml préalablement stérilisés à l'autoclave, puis conservés à -20°C.

II.1.3.1. Surnageant de culture

Préparation

Le bouillon de culture, obtenu après élimination de la biomasse par filtration ou centrifugation, est séparé en deux fractions. L'une d'elles permet d'effectuer un prélèvement stérile qui sera conservé à -20°C.

Sur l'autre fraction, après séparation de la biomasse et du milieu de culture par centrifugation (9000 x g, 15 minutes, +4°C), le bouillon est filtré (Millipore HV, 3 µm), par aspiration. Sur le filtrat obtenu, trois protocoles sont pratiqués:

- filtration stérile sur filtre Millex 0,2 µm ou 0,45 µm (Millipore) puis congélation.
- congélation / décongélation du surnageant puis filtration à 0,2 ou 0,45 µm. Ce deuxième mode opératoire permet d'éliminer un composé polymérisé en suspension dans le milieu apparaissant parfois lors de la décongélation et d'en évaluer l'importance.
- le reste du bouillon est utilisé afin d'effectuer des précipitations à l'éthanol. Celles-ci permettent essentiellement de récupérer les polysaccharides du milieu et de les concentrer afin de pouvoir ensuite évaluer leur activité antivirale. Avant la précipitation, le milieu est partagé en trois parties:

  -pH naturel (4 à 5)

  -pH ajusté à 7 à l'aide de NaOH 1M

  -pH ajusté à 9

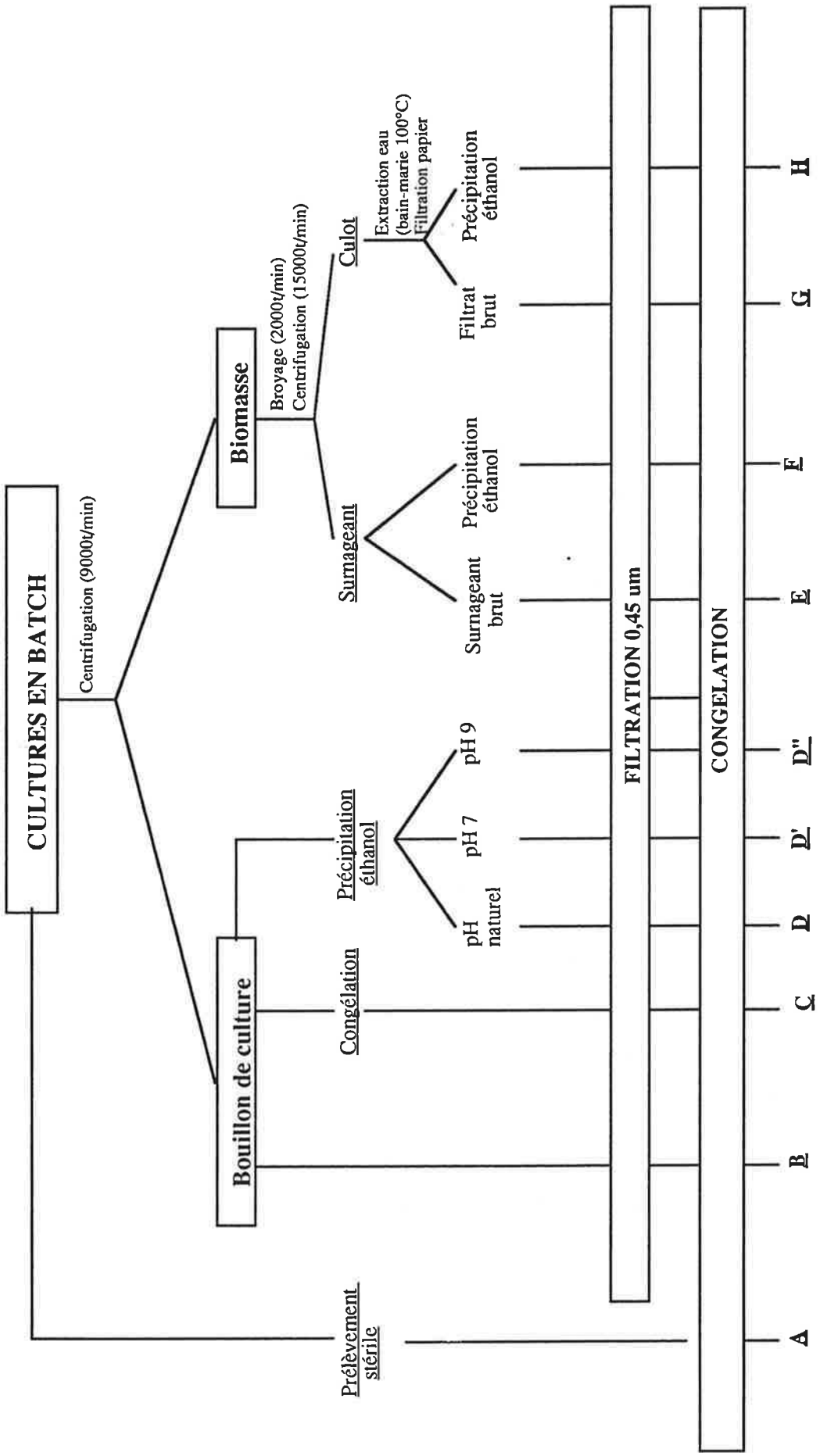


Figure II.3: Mode de préparation des extraits de culture de M. cucun.

Les précipitations sont réalisées avec trois volumes d'éthanol à 95°. Après agitation, le mélange est laissé au repos une à deux heures à température ambiante afin de permettre l'apparition d'un précipité. L'ensemble est centrifugé (6500 x g, 15 min, +4°C). Le surnageant est éliminé et le culot repris dans un volume d'eau minimal (généralement concentration de 5 à 10 fois).

Une fraction de la solution obtenue est filtrée stérilement sur filtre 0,2 ou 0,45 µm et congelée à -20°C. L'autre fraction est conservée dans les mêmes conditions sans filtration préalable.

II.1.3.2. Biomasse

Broyage

La biomasse, récupérée par centrifugation, est resuspendue dans de l'eau (environ 70 g de biomasse humide dans 20 ml) puis broyée avec un homogénéiseur-disperseur Ultraturax (2min, 20000 t/min), à température ambiante. Le liquide obtenu, très épais, est centrifugé (12000 x g, 15 min).

Une partie du surnageant est ensuite filtrée stérilement à 0,22 ou à 0,45 µm puis congelée. L'autre partie est précipitée à l'éthanol selon le protocole décrit précédemment pour le bouillon de culture brut.

Extraction

Le culot de biomasse obtenu lors du broyage est pesé et repris dans de l'eau distillée (10g/200ml). Il est placé au bain-marie à 100°C pendant deux heures. Après filtration sur papier, une partie du filtrat est refiltrée stérilement (0,22 µm) puis congelée. L'autre partie est précipitée à l'éthanol selon le même protocole que précédemment.

II.1.4. Tests d'immunomodulation

Ces tests ont été réalisés au sein de l'unité INSERM 346 "Peau humaine et Immunité" (Hopital Ed. Herriot, Lyon - France) par Mme J. Péguet-Navarro et son équipe. Ils ont été appliqué aux fractions polysaccharidiques extraites des cultures de *F. fomentarius*.

II.1.4.1. Tests d'activité mitogénique sur les lymphocytes T

Ce test est réalisé dans le but de mettre en évidence une éventuelle activité mitogénique *in vitro* des fractions fongiques sur la prolifération des lymphocytes T du sang périphérique et de tester leur effet sur l'action d'un agent mitogène, la concanavaline A. Cette molécule se fixe sur les sites TcR des lymphocytes T, récepteurs de l'antigène présenté normalement par les monocytes ou lymphocytes B, et déclenche le processus de prolifération. Cette action proliferatrice n'intervient que s'il subsiste dans la culture des cellules présentatrices (lymphocytes B, monocytes ou cellules dendritiques) porteuses des molécules accessoires

(ICAM1, LFA3, CLII, B7) respectivement reconnus par les récepteurs LFA1, CD2, CD4 et CD28 des lymphocytes T.

Les cellules lymphocytaires du sang périphérique (LSP) sont obtenues par centrifugation (20 min, 400 x g) d'un sang traité à l'héparine, sur une solution Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Les cellules mononuclées (lymphocytes et monocytes) sont récupérées à l'interface.

Le test de prolifération lymphocytaire est réalisé en plaque 96 puits à fond rond. Les LSP sont ensemencées (10^5 cellules / puits) en milieu RPMI 1640 (Gibco), supplémenté en sérum humain AB (10%) et en antibiotiques, en présence de concanavaline A (2,5 µg/ml à 10 µg/ml) ou des substances à tester. L'incubation dure trois jours à 37°C avec un ajout de ^{3}H-thymidine (2 µCi / puits avec de la thymidine marquée à 2 Ci / mmole - Amersham) le deuxième jour. Les cellules sont ensuite récoltées sur filtre en fibres de verre sur lesquels le rayonnnement β, proportionnel à la thymidine tritié incorporé dans les acides nucléiques des lymphocytes, est lu directement (compteur Matrix-Packard). Les résultats sont exprimés en coups par minutes (cpm) à partir de la moyenne (± l'écart type) de trois puits répliqués.

II.1.4.2. Cultures Mixte Lympho-Epidermique (CMLE)

Ce test permet d'évaluer la prolifération *in vitro* de lymphocytes T, stimulés par des cellules présentatrices d'antigènes allogéniques — des cellules de Langerhans épidermiques — en présence ou non de substances mitogéniques. Le test est réalisé selon le protocole décrit par Péguet-Navarro *et al.* (1994).

Les lymphocytes T sont purifiés en deux étapes. La suspension de LSP (10^7 cellules / ml), obtenue comme décrit II.1.3.1, est répartie dans une boite de pétri en plastique et incubée 90 minutes à 37°C. Les cellules non adhérentes (lymphocytes B et T) sont récoltées avec le surnageant alors que les monocytes restent fixés au support. Une suspension de globules rouges de mouton, traités au 2-amino-ethylisothiouronium bromide hydroxybromide, est ensuite ajoutée à la suspension lymphocytaire. Les globules rouges traités présentent en surface des molécules antigéniques de type LFA-3 se fixant sur les récepteurs CD2 des lymphocytes T. Ils s'agglomèrent donc spécifiquement autour des lymphocytes T en formant des structures en rosettes. Ces agglomérats sont récupérés dans le culot de centrifugation (20 min, 400 x g) sur Lymphoprep (Flobio SA). Les rosettes sont resuspendues dans une solution hypotonique de NH_4Cl qui provoque la lyse des globules rouges et libère les lymphocytes T purifiés.

Les cellules de Langerhans sont isolées à partir de peau humaine, issue d'opération de chirurgie esthétique. La peau est dégraissée, découpée en lambeaux puis incubée 18 heures à 4°C dans une solution de trypsine (Difco) à 0,05 %. L'épiderme est alors séparé du derme avec de fines pinces. Il est agité en milieu HBSS (Gibco) suplémenté en serum de veau foetal (10%) puis filtré sur une gaz stérile pour recueillir les cellules épidermiques dissociées. Ces dernières

sont ensuite enrichies en cellules de Langerhans par centrifugations successives (20 min, 400 x g) sur Lymphoprep. Les cellules de l'interface sont récupérées et lavées. Elles se composent de 8 à 15% de cellules de Langerhans après la première centrifugation, de 30 à 50% après la seconde et de 60 à 90% après la troisième. La viabilité des cellules est controlée par un test d'exclusion au Bleu trypan.

Le test de prolifération lymphocytaire est réalisé en plaque 96 puits. Les lymphocytes T (10^5 cellules / puits) et les cellules de Langerhans allogéniques(10^3 cellules / puits) sont incubées ensemble à 37°C (5% CO_2) pendant 6 jours, en milieu RPMI 1640, supplémenté en sérum humain AB (10%) et en antibiotiques. Le 5ème jour, un solution de ^{3}H-thymidine (2 µCi / puits avec de la thymidine marquée à 2 Ci / mmole) est ajoutée. Après récolte des cellules sur filtre en fibres de verre, la lecture du rayonnement β est effectuée sur un compteur Matrix Packard. Les résultats sont exprimés en coups par minutes (cpm) à partir de la moyenne (± l'écart type) de trois puits répliqués.

II.1.5. Extraction et purification des fractions polysaccharidiques de Fomes fomentarius

II.1.5.1. Extraction

Fraction polysaccharidique du bouillon de culture

Le surnageant de culture, obtenu après élimination de la biomasse par filtration ou centrifugation, est précipité par trois volumes d'éthanol (95 °). Après agitation et quelques minutes pour permettre la formation complète du précipité, ce dernier est recueilli par centrifugation (6500 x g, 15 min). Le culot de centrifugation après précipitation à l'éthanol est repris dans l'eau et homogénéisé à l'ultraturax et / ou aux ultrasons.

Fraction polysaccharidique de la biomasse

Le culot de biomasse est traité comme décrit en § II.1.2. Le culot de centrifugation après précipitation à l'éthanol est repris dans l'eau et homogénéisé à l'ultraturax et / ou aux ultrasons.

Fraction polysaccharidique acide

Les polysaccharides contenant des résidus acides sont précipités sélectivement au cétyl-triméthyl-ammonium-bromide (CTAB) avant précipitation à l'éthanol. (Scott, 1965).

- Une solution aqueuse de CTAB (2%) est ajoutée goutte à goutte jusqu'à obtention d'un trouble maximal, dans le surnageant de centrifugation du bouillon de culture ou de la biomasse. Généralement, un ajout de 1% (v/v) de la solution de CTAB est suffisant. Le pH des surnageants est préalablement ramené à 7.

- Le mélange est agité à 30°C pendant 2h. Le précipité est recueilli par centrifugation (9000 g, 15 min).
- Le culot est repris dans un solution saline concentrée (NaCl 2M) puis agité pendant 24h à 30 °C.
- La fraction non solubilisée est éliminée par centrifugation (9000 g, 15 min).
- Le surnageant est précipité à l'éthanol (2 v/v) puis repris dans l'eau par homogénéisé à l'ultraturax. On obtient un culot incolore, translucide. Cette phase est renouvelée trois fois de façon à éliminer les traces de CTAB.

II.1.5.2. Dosages des hexoses

Dans chaque fraction polysaccharidique issue des précipitations ou collectée lors des chromatographies, la quantité de substances osidiques est dosée par une méthode colorimétrique, la méthode "phénol-acide sulfurique" (Dubois*et al.*, 1956).

Le dosage est réalisé selon le protocole suivant:

- Placer 0,5 ml de la solution de sucres à doser (10 à 70 µg/ml) dans un tube.
- Ajouter 12,5 µl de phénol 80%
- Ajouter rapidement 1,25 ml d'acide sulfurique concentré, directement à la surface du liquide pour obtenir un bon mélange. Celui-ci se colore en jaune à orangé. La coloration est stable plusieurs heures.
- L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 490 nm pour le dosage d'hexoses, à 480 nm pour des pentoses ou des acides uroniques.
- Le blanc est obtenu de la même manière en remplaçant la solution de sucres par 0,5ml d'eau distillée.
- Une gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'une série de dilutions d'une solution de glucose. Les résultats sont exprimés en équivalent glucose.

II.1.5.3. Dosages des acides uroniques

Le dosage des acides uroniques est effectué selon la méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973). Elle est basée sur la formation d'un chromogène lorsque les acides uroniques, chauffés à 100°C dans l'acide sulfurique concentré, sont mis en présence d'hydroxydiphényle.

- Placer 0,2 ml d'échantillon (2,5 à 100 µg d'acides uroniques / ml) dans un tube.
- Ajouter 1,2 ml de H_2SO_4 concentré contenant du tétraborate de sodium à 0,0125M.
- Agiter au vortex.

- Placer au bain marie à 100°C pendant 5 min
- Refroidir dans la glace.
- Ajouter 20 µl d'une solution de para-hydroxydiphényle à 0,15% dans NaOH (0,5%).
- Agiter au vortex.
- Lire l'absorbance à 520 nm contre un blanc ou le para-hydroxydiphényle a été remplacé par 20 µl de NaOH (0,5%).
- Une gamme d'étalonnage a été préparée à partir d'une série de dilutions d'une solution d'acide glucuroniques (1-100µg/ml).

Remarques:

- Ici le para-hydroxydiphényle a été utilisé en remplacement du méta-hydroxydiphénile, pour des raisons de facilité d'approvisionnement. Ceci nuit probablement à la sensibilité de la méthode (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973).
- Une concentration trop élevée en oses neutres peut nuire à la sensibilité du dosage par un brunissement intense de l'échantillon lors du chauffage en présence d'acide sulfurique concentré.

II.1.5.4. Dosages des protéines

Le dosage des protéines résiduelles est réalisée avec le réactif "Bio-Rad Protein Assay" (Bio-Rad). La méthode est un dosage colorimétrique, basé sur la variation du maximum d'absorption du bleu de Coomassie lorsque celui-ci se lie à des protéines (Bradford, 1976).

Le dosage est effectué selon la "microprocédure" décrite dans le kit:

- Placer 0,8 ml de l'échantillon (1-25 µg de protéines / ml) dans un tube.
- Ajouter 0,2 ml du réactif concentré.
- Agiter au vortex .
- Lire l'absorbance après 5 min, à 595 nm, contre un blanc où l'échantillon a été remplacé par 0,8 ml d'eau.
- Un gamme d'étalonnage a été réalisée à partir d'une série de dilution d'une solution d'albumine de sérum bovin (BSA).

II.1.5.5. Chromatographie sur gel d'exclusion

Le gel utilisé est l'Ultrogel™(Pharmacia) Aca 34 (3% acrylamide, 4% agarose). Sa limite d'exclusion est de 750 kDa.

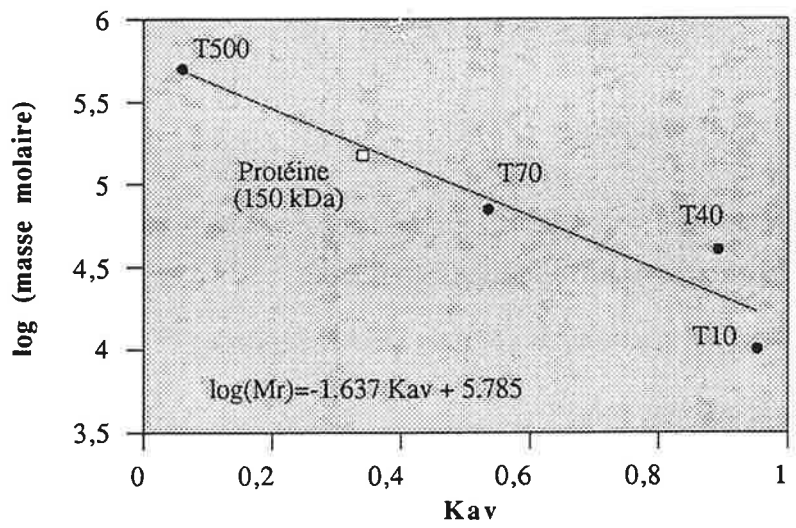


Figure II.5 Courbe de calibration de la colonne de chromatographie sur gel d'exclusion.

Les caractéristiques de la colonne sont:

- hauteur: 14,5 cm
- diamètre: 2,6 cm
- volume totale: 77 cm^3

- éluant: eau ou NaCl (0,1N) selon les échantillons
- débit: 0,5ml / min
- fraction: 5min (2,5 ml / fraction)

Le volume mort de la colonne a été déterminé à l'aide d'une solution de Bleu Dextran (MW = 2000 kDa) dont le front de progression peut être suivi visuellement. Il est de 35 cm^3.

Une solution standard composée de Bleu Dextran, de Dextranes de masses molaires connues, (T10, T40, T70 T500 respectivement de 10, 40, 70 et 500 kDa - Pharmacia), et d'une protéine (Alcool déhydrogénase - 150 kDa) a été utilisée pour calibrer la zone de fractionnement de la colonne.

La courbe de calibration est présentée sur la figure II.5. Le Kav exprime le volume d'élution relatif [2.1] et est corrélée de façon linéaire à la masse molaire des molécules éluées.

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
DES MINES DE SAINT-ETIENNE
Bibliothèque du Centre SPIN

$$Kav = \frac{Volume_{élution} - Volume_{mort}}{Volume_{total} - Volume_{mort}} \qquad [2.1]$$

avec: $Volume_{mort}$= 35 cm^3; $Volume_{total}$= 77 cm^3

II.1.5.6. Chromatographie d'échange d'ions

Le gel utilisé est un échangeur d'anions. Il s'agit de DEAE Sephadex™ A25 (Sigma).

Les caractéristiques de la colonne sont:

- hauteur: 20 cm
- diamètre: 1 cm
- volume total: 63 cm^3
- éluants: eau pour la fraction neutre / HCl 0,1N pour la fraction acide
- débit: 0,5 ml / min
- fraction: 5 min (2,5 ml / fraction)

II.1.5.7. Hydrolyse acide

Afin de déterminer la nature des monomères composant la chaîne polysaccharidique, celle-ci doit préalablement subir une hydrolyse acide.

Après lyophilisation, 10 mg de polysaccharide lyophilisé sont suspendus dans 10 ml d'acide trifluoroacétique (TFA) 2 M. A ce stade, un étalon interne est ajouté (1ml d'une solution de myo-inositol à 1mg/ml). Le pot est scellé par une capsule puis autoclavé (120°C, 1h).

Après refroidissement, l'acide est éliminé par évaporation sous pression réduite (Rotavapor - 40°C). Le dêpot est repris dans 1 ml d'eau puis lyophilisé en aliquot de 100 µl.

II.1.5.8. Dérivatisation TMS

L'analyse des composés osidiques en chromatographie en phase gazeuse nécessite leur transformation préalable en dérivés plus volatiles. La méthode utilisée ici est une transformation des sucres en dérivés triméthylsilyle éther (TMS) (Brobst, 1972). La disponibilité de réactifs commerciaux permettant de réaliser cette transformation en une seule étape en a fait l'une des techniques les plus communément utilisées.

Le réactif est le Sigma-Sil-A (Sigma), composé d'un mélange de triméthylchlorosilane, d'hexaméthyldisilazane et de pyridine dans le ratio 1:3:9 (v/v).

0,1 ml de réactif est versé directement sur le lyophilisat (0,1mg) issu de l'hydrolyse. Après agitation vigoureuse et 10 min de temps de réaction, les dérivés sont prêts à être analysés par chromatographies.

II.1.5.9. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

L'analyse des dérivés TMS est réalisée par chromatographie en phase gazeuse.

- Chromatographe: Hewlett-Packard 5890A
- Colonne capillaire: Permabond SE 52 (25 m x 0,25 mm; 0,25 µm (Macherey-Nagel)
- Gaz porteur: Hélium
- Débit: 0,74 $ml.min^{-1}$
- Température de l'injecteur: 250°C
- Split ratio: 1/40
- Détecteur: FID à 300°C
- Programme de température de la colonne: T°initiale 70°C, gradient de 5°$C.min^{-1}$, T°finale 270°C pendant 5 min.
- Les données sont recueillies sur PC par le programme d'acquisition HPChem. (Hewlett-Packard).

II.1.5.10. Méthylation

L'analyse des liaisons de la chaîne polysaccharidique requiert une méthylation préalable à l'hydrolyse pour permettre une identification des groupements impliqués dans les liaisons glycosidiques. Cette méthylation a été réalisée selon le protocole détaillé ci-dessous et proposé par Harris *et al.* (1984) pour des composés insolubles dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO). L'ensemble de la réaction peut s'effectuer dans un même tube, en verre borosilcaté, muni d'un bouchon à vis avec capsule intérieure en Téflon.

- Fin broyage (ultraturax ou broyeur à billes) de 1 à 2 mg de polysaccharide lyophilisé.
- Ajout de 50 à 200 µl de DMSO sous atmosphère d'argon. (Le maintien d'une atmosphère inerte tout au long de la réaction est extrêment important car certains produits, notamment le méthylsulfphinyle carbanion, sont très réactifs avec l'oxygène. L'argon est préféré à l'azoté à cause de sa plus grande densité qui permet de le maintenir au fond du tube.)
- Ajout de 20 µl de méthylsulfphinyle carbanion. (La préparation de ce réactif est présentée ci-dessous.)

- Agiter (vortex) et refroidir dans la glace.
- Ajouter 5 µl de idométhane glacé.
- Agiter.
- Ajouter 60 µl de méthylsulfphinyl carbanion.
- Agiter et refroidir dans la glace.
- Ajouter 15 µl de iodométhane glacé.
- Agiter.

Ces deux "pré-méthylations" permettent normalement de solubiliser des produits insolubles dans le DMSO et ne sont donc nécessaires que dans ce cas. Signalons que la phase de broyage initial conditionne fortement la réussite de la solubilisation. La suite du protocole concerne indifféremment les produits solubles et insolubles dans le DMSO.

- Ajouter 200 µl de méthylsulfphinyl carbanion.
- Agiter sous argon.
- Après 10 min, refroidir le tube dans la glace.
- Ajouter 150 µl de iodométhane glacé (0°C).
- Réchauffer jusqu'à température ambiante en agitant.
- Après 10 min, ajouter 3 ml d'un mélange 2:1 (v/v) chloroforme / méthanol.
- Ajouter 2 ml d'eau et agiter.
- Centrifuger (200 g - 1 min)
- Eliminer le surnageant par aspiration sans troubler l'interface.
- Répéter ce lavage 4 fois avec 2 ml d'eau.
- Après l'aspiration finale, ajouter 2 ml de 2,2 diméthoxypropane; 20 µl d'acide acétique glacial (18 M) et 2 à 3 granules anti-ébullition.
- Agiter et placer au bain-marie à 90°C jusqu'à évaporation du solvant (il doit rester environ 200 µl dans le fond du tube).
- Eliminer le reste sous un flux d'argon. Le résidu est huileux.

Ces composés méthylés peuvent se conserver congéler sous atmosphère d'argon ou sont prêt à subir une hydrolyse au TFA (§ II.1.4.7) suivie d'une dérivatisation TMS (§ II.1.4.8).

La préparation du méthyl sulfinyl carbanion se déroule selon le protocole suivant. Ici également, la réalisation des différentes étapes sous atmosphères d'argon est requise ainsi qu'une grande précaution dans les manipulations à cause de la forte réactivité des produits.

- 5 g d'une suspension huileuse d'hydrure de potassium (KH) (soit environ 1 g de KH).
- 4 lavages avec 20 ml d'hexane suivi de centrifugations (2 min- 500x g) pour éliminer le solvant (en laisssant toujours une fine couche).
- Reprendre le résidu dans 20 ml d'hexane et laisser décanter dans une ampoule à décantation.
- Aspirer le surnageant d'hexane, refroidir dans la glace et éliminer le reste de l'hexane sous un flux d'argon.
- Ajouter 13 ml de DMSO.
- Agiter jusqu'à température ambiante.
- Après 30 min, transférer dans des tubes en verre boro-silicaté avec bouchon en téflon.
- Centrifuger (1500xg - 3min). Le surnageant est une solution limpide gris / vert.
- Cette solution se conserve à -20°C sous atmosphère d'argon.

II.1.5.11. CPG couplée à la Spectrométrie de masse

Les polysaccharides méthylés, hydrolysés et transformés en dérivés TMS ont ensuite été analysés en CPG couplée à un spectromètre de masse. Ces analyses ont été réalisées au Laboratoire Etude Analytique et Cinétique du Médicament (LEACM - faculté de Pharmacie Lyon I), sous la direction de Mr. Desage.

L'appareillage utilisé présente les caractéristiques suivantes:

- Chromatographe: 5890A série II
- Colonne capillaire: HP1 (12 m x 0,2 mm; 0,33 µm- Hewlett-Packard)
- Gaz porteur: Hélium (Pression 60 kPa)
- Split ratio: 1/100
- Programme de température de la colonne: T°initiale 70°C, gradient de 5°C.min^{-1}, T°finale 270°C pendant 5 min.
- Détection par Spectromérie de masse: MS HP 5989

- mode: impact électronique
- énergie: 70 eV
- Balayge (gamme de masse): 35-700 (15 scan/s)
- Les données sont recueillies sur station SUN par le programme d'acquisition Chemstation 59979. (Hewlett-Packard).

II.2. DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ ANTI-HERPÈS SIMPLEX VIRUS DANS LES CULTURES DE *MACROCYSTIDIA CUCUMIS*

II.2.1. Mise au point du test ELISA anti-HSV

Le test ELISA a été choisi pour évaluer l'activité anti-HSV des bouillons de cultures de *M. cucumis* après l'avoir comparé à deux autres types d'antivirogramme.

Le premier est une méthode colorimétrique évaluant l'effet cytopathique du virus (ECP), par incorporation d'un colorant vital, le rouge neutre, dans les cellules restées viables après infection (Langlois *et al.*, 1986). Cependant, il présente une faible spécificité puisque l'évaluation de la viabilité cellulaire ne permet pas de différencier l'effet cytopathique dû au virus d'un potentiel effet cytotoxique lié aux produits testés.

Le second est le test de réduction des plages de lyses (Collins *et al.*, 1982). Après infection, les cellules sont cultivées en milieu semi-solide (carboxy-méthyl-cellulose) qui assurent un développement des foyers viraux sous forme de plages individualisées. Une coloration permet ensuite de différencier les trous dans la nappe cellulaire dus à la cytotoxicité des plages de lyse. Ces dernières sont comptées et leur nombre est comparé à celui obtenu sur un témoin sans antiviral. Ce test, généralement considéré comme la méthode de référence, est cependant particulièrement lourd et parfois subjectif dans la phase de lecture des résultats.

Nous avons donc préféré utiliser une méthode d'une plus grande spécificité (mise en évidence de la production d'antigènes viraux) autorisant une lecture automatisée des résultats.

Le test ELISA (§ II.1.1.3) a nécessité une longue phase de mise au point. Les concentrations et les temps de contacts des réactifs intervenant dans la phase de révélation ont été définis par des titrages en échiquier. Ce mode de préparation des plaques permet de tester simultanément deux réactifs à différentes concentrations. Un exemple de titrage en échiquier est présenté sur la figure II.6.

Les paramètres dont les valeurs optimales ont été déterminées sont rassemblés dans le tableau II.3.

II.2.2. Lecture des résultats

Un exemple de courbe type est présentée sur la figure II.7. Elle exprime le taux d'antigènes viraux produits à différentes dilutions virales et pour différentes concentrations d'acyclovir. L'acyclovir est actuellement l'anti-herpétique dont l'utilisation clinique est la plus répandue

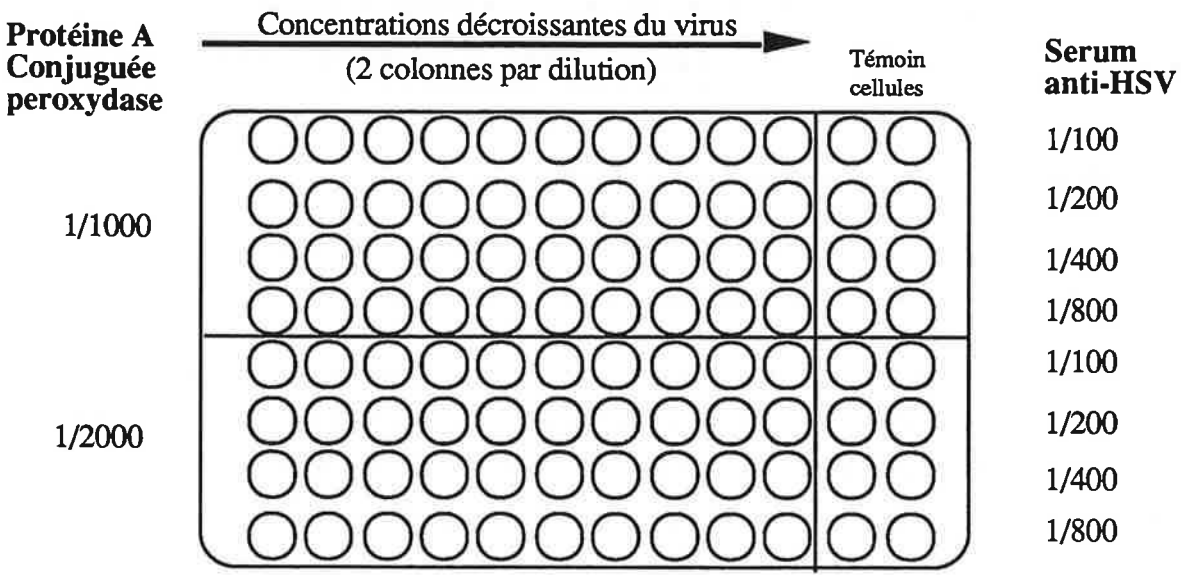


Figure II.6 Titrage en échiquier pour déterminer les concentrations optimales des réactifs du test ELISA.

Nature du paramètre testé	Valeurs testées	Protocole final
Substrats cellulaires	Vero / BHK 21	BHK 21
Temps d'incubation des cellules infectées	24h / 48 h	48h
Fixation de la napppe cellulaire au glutaraldéhyde	avant / après élimination du milieu	avant élimination du milieu
Serum anti-HSV type 1		
nature	Humain / Lapin	Lapin (polyclonal - Dako)
concentrations	1/100, 1/200, 1/400, 1/800	1/400
Temps de contact	1h - 37°C / 1h - 25°C / 30 min - 37°C / 30 min - 25°C	30 min - 37°C
Protéine A conjuguée à la peroxydase		
concentrations	1/1000 à 1/32000	1/2000
Temps de contact	1h - 37°C / 1h - 25°C / 30 min - 37°C / 30 min - 25°C	45min - 37°C

Tableau II.3 Paramètres de mise au point du test ELISA antivirogramme.

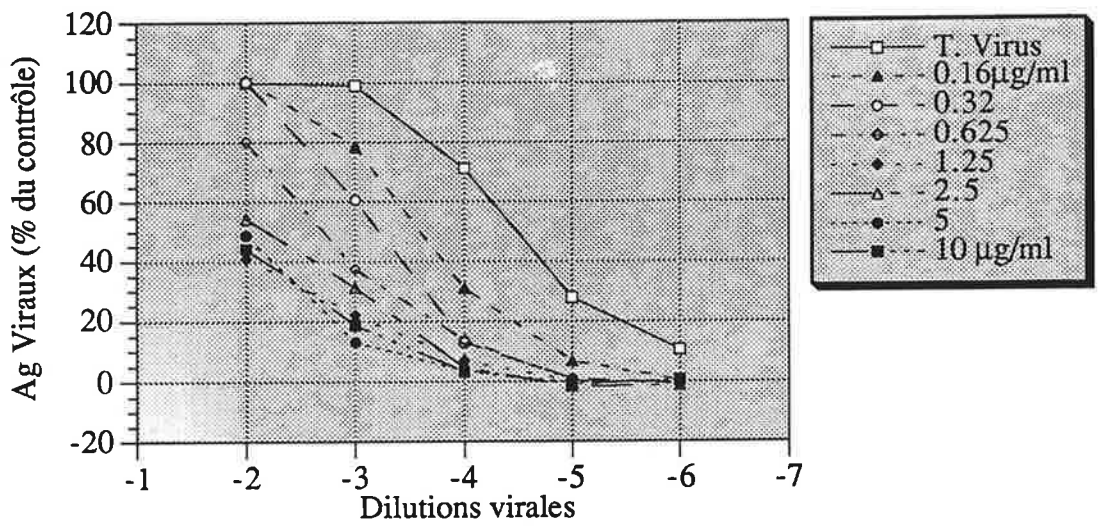


Figure II.7 Titrage ELISA sur une plaque témoin à différentes concentrations d'Acyclovir

même si des phénomènes de résistances ont été décrits pour certaines souches virales (Nugier *et al.*, 1991; Nugier *et al.*, 1992). La production d'antigènes viraux est exprimé en pourcentage de la valeur du témoin dans lequel les cellules sont infectées en absence d'antiviral, à la plus grande concentration virale. Même si l'inhibition de la réplication virale est complète, au delà d'une certaine concentration virale, le taux d'antigènes résiduels n'est pas nul. Ceci explique l'allure de la courbe pour les concentrations maximales d'acyclovir.

La concentration correspondant à une inhibition virale de 50% (CI_{50}), est obtenue par interpolation linéaire entre le point 50% sur la courbe d'inhibition complète (concentration d'acyclovir 10 µg/ml) et le point 50% sur la courbe d'inhibition minimale (Témoin virus sans acyclovir). La courbe exprimant la concentration virale à laquelle l'inhibition de 50% est obtenue, en fonction de chacune des concentrations d'acyclovir, est une sigmoïde. En plus de son utilité pour le calcul de la CI_{50}, la réalisation du test avec plusieurs dilutions virales permet de limiter l'influence des variations de virulence des différents stocks viraux utilisés.

II.2.3. Tests des bouillons bruts

L'activité anti-herpétique sur les cultures de *M. cucumis* a été décelée à la suite d'un screening d'activités biologiques réalisé sur des souches de Basidiomycètes de la mycothèque de la faculté de Pharmacie de Lyon. Ces premiers tests effectuées à la fin des années 80 avaient révélés un effet anti-virus Herpès Simplex type 1, *in vitro,* des surnageants de culture de *M. cucumis* cultivées en fioles agitées, sur milieu "L".

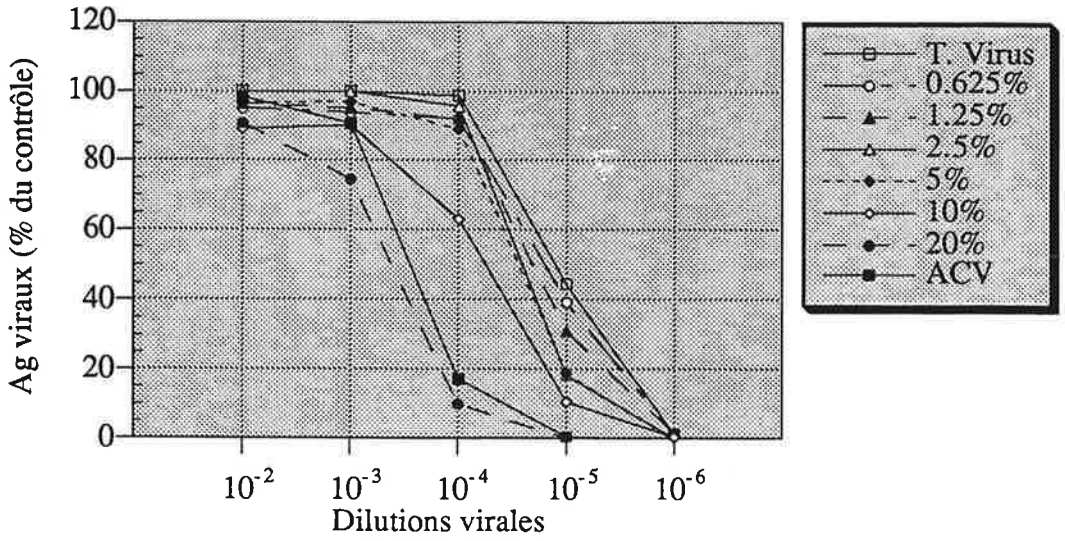


Figure II.8 Réduction du taux d'antigène viraux par le surnageant S_1.

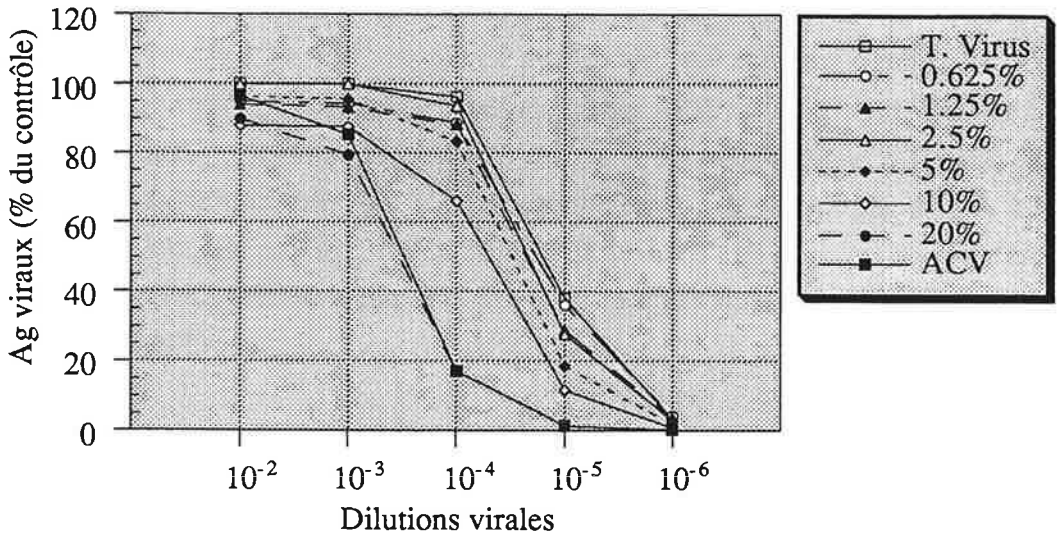


Figure II.9Réduction du taux d'antigènes viraux par le surnageant S_2.

Nos premiers travaux ont consisté à répéter le type de cultures sur lesquelles l'activité a été découverte, de façon à nous fournir des échantillons nécessaires à la mise au point et à la standardisation du test de détection en routine. Lors de cette première phase, 6 cultures indépendantes ont été réalisées avec la mise en évidence d'une activité sur seulement deux d'entre elles. Les figures II.8 et II.9 montrent les résultats des tests ELISA effectués avec ces deux surnageants de cultures, S_1et S_2. Ils proviennent tous les deux de cultures de 21 jours, sur milieu "L", incubées à 25°C en fioles agitées et inoculées à partir de fragments de colonies obtenues sur milieu "L" gélosé. Ils ont été filtrés stérilement (0,22 µm), puis congelés avant utilisation.

Les deux surnageants montrent une réduction du taux d'antigènes viraux, comparable à celle obtenue avec le témoin ACV (10 µg/ml), lorsqu'ils sont utilisés dilués à 20% dans les puits. La CI_{50} est de 11% pour les deux surnageants. Ces résultats ont été confirmés lors d'un second test indépendant effectués à partir des mêmes aliquotes conservées congélées. Toutefois, plusieurs cycles de congélation / décongélation provoque la perte de l'activité, de même qu'une lyophilisation ou une conservation à 4°C.

L'activité mise en évidence n'est pas liée à la cytotoxicité des produits testés puisque celle-ci ne se manifeste qu'à une concentration supérieure à 20% pour S_2 et à 30% pour S_1 (Figure II.10).

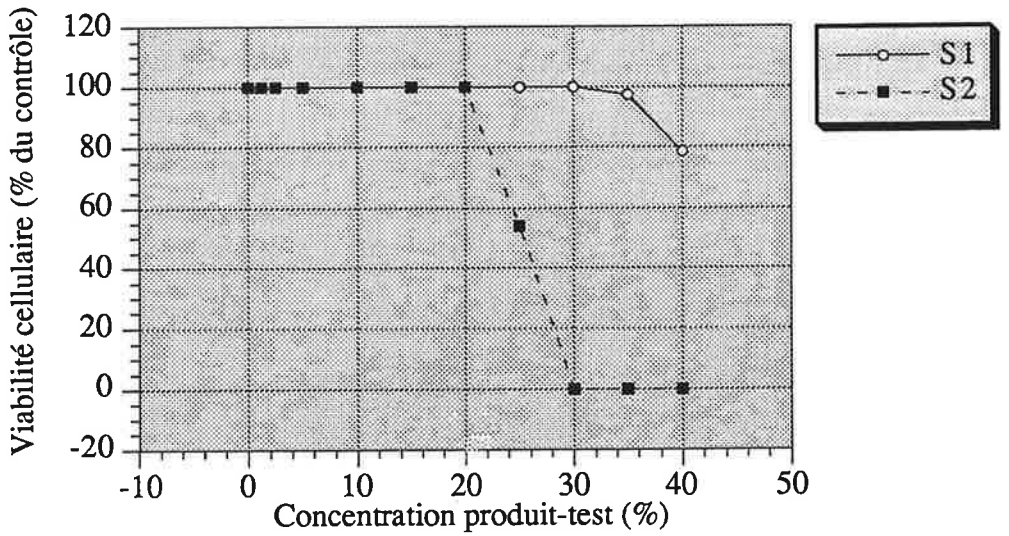


Figure 10 cytotoxicité de S1 et S2 .

Type de cultures	Nombre
Fioles agitées	
25 ml de milieu "L", inoculation par fragments de colonies:	**10**
dont : avec prélèvements échelonnés dans le temps ,	1
avec prélèvements sur la biomasse	2
avec des échantillons préparés selon §II.2.2	2
150ml de milieu "L", inoculation par préculture liquide:	**8**
dont: avec prélèvements échelonnés dans le temps	3
avec prélèvements sur la biomasse	3
avec des échantillons préparés selon §II.2.2	3
Réacteurs agités (3 et 7l, milieu "L")	**7**
dont: avec prélèvements échelonnés dans le temps	2
avec prélèvement en phase stationnaire	5
Modifications du milieu (fioles agitées)	
Milieu "Malt"	**1**
Plan d'expériences	**9**
Total	**35**

Tableau II.4 Cultures utilisées lors des tests d'activité anti-HSV.

II.2.4. Irrégularité des résultats

Les résultats de la première phase ont révélé une mauvaise reproductibilité de l'activité antivirale qui s'est ajoutée aux difficultés de conservation évoquées ci-dessus. Pour expliquer la production ou la détection erratique des agents antiviraux, les hypothèses suivantes ont été proposées:

- forte dégradabilité (enzymatiques ou autres) des métabolites antiviraux,
- période de production au cours de la culture très réduite dans le temps et ne correspondant pas aux périodes de prélevements,
- métabolites endocellulaires relargués dans le milieu seulement sous certaines conditions précises,
- concentration des métabolites antiviraux dans le bouillon de culture inférieure au seuil de détection du test ELISA et masquage de leur activité par la cytotoxicité des autres produits du métabolisme,
- perte lors de la préparation des échantillons (adsorption sur les membranes de filtration, précipitation au froid, oxydation ...).

Avant de poursuivre la caractérisation de l'agent actif et dans le but de vérifier les hypothèses formulées ci-dessus, nous avons explorer diverses conditions de cultures et de préparations des échantillons susceptibles d'expliquer la perte de l'activité. Ainsi, le tableau II.4 présente la nature et le nombre des cultures réalisées.

Par ailleurs, le mode de préparation des échantillons (§II.1.2) nous a permis de tester les hypothèses concernant une perte potentielle de l'activité lors de leur préparation pour les antivirogrammes. A titre d'exemple, les figures II.11a-f montrent les résultats des antivirogrammes réalisés à partir des échantillons obetnus à partir d'une culture de 21 jours, en fioles aigtées. Aucun des essais réalisés dans cette deuxième phase de l'étude n'a permis de mettre en évidence une activité anti-HSV 1 et donc de valider l'une des hypothèses.

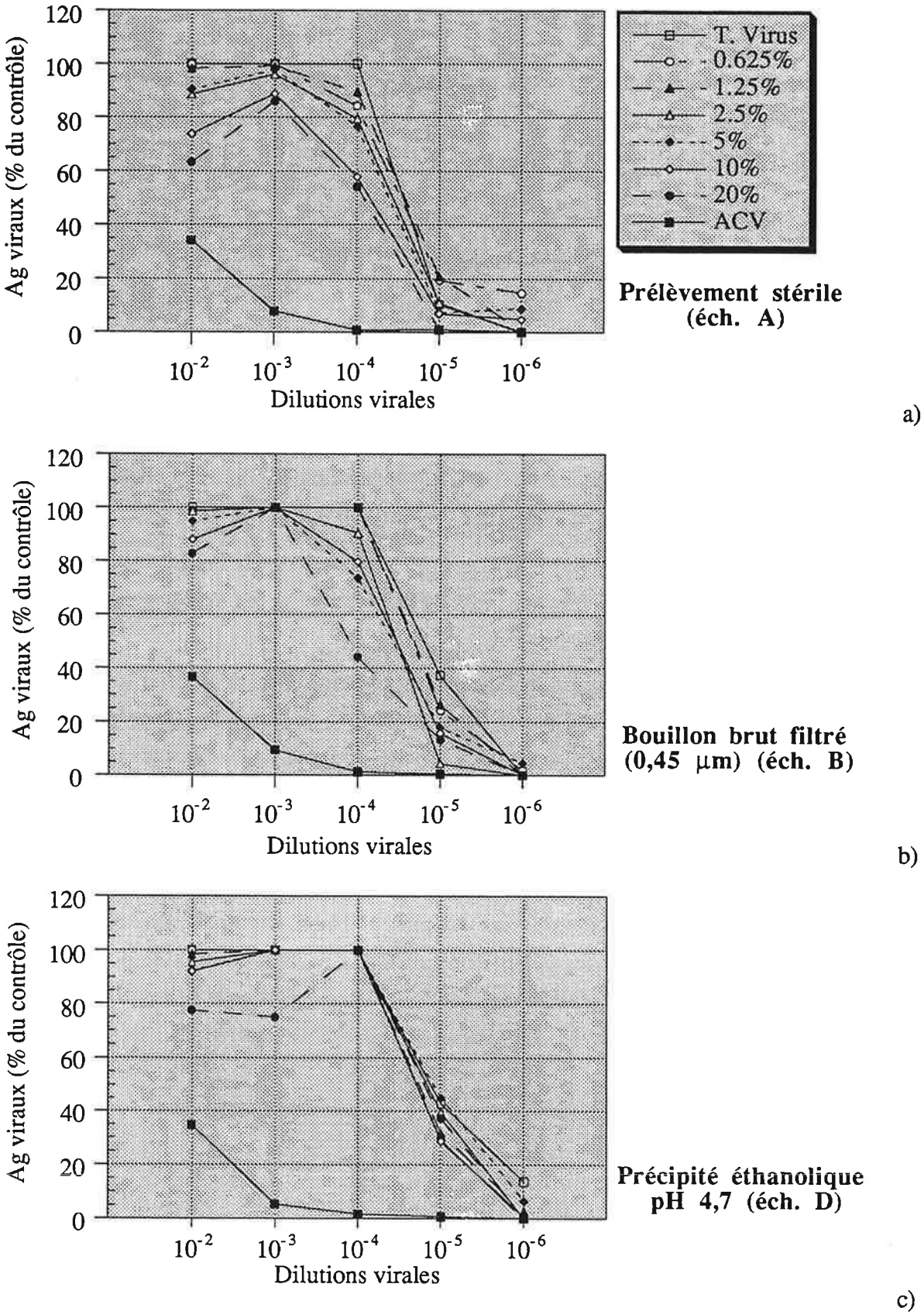
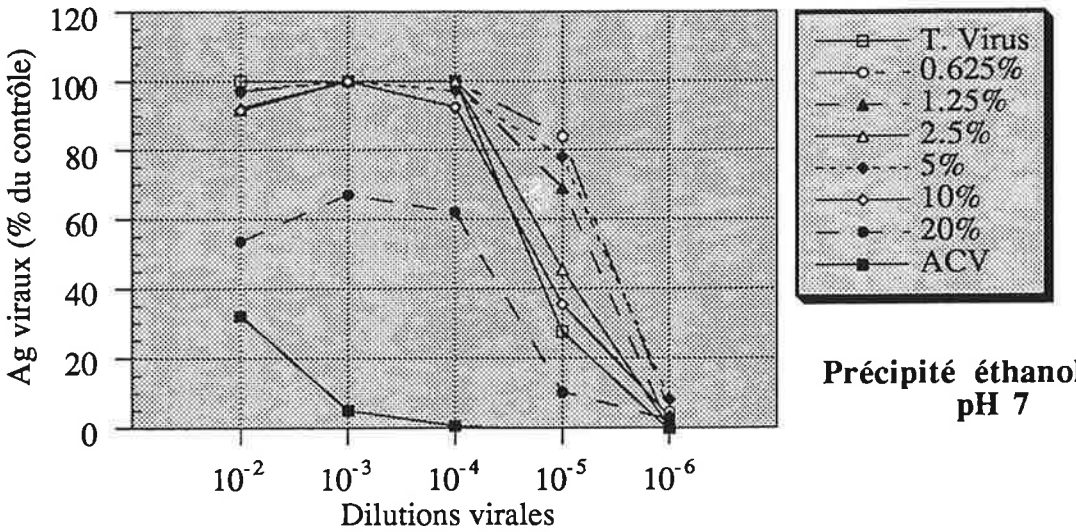
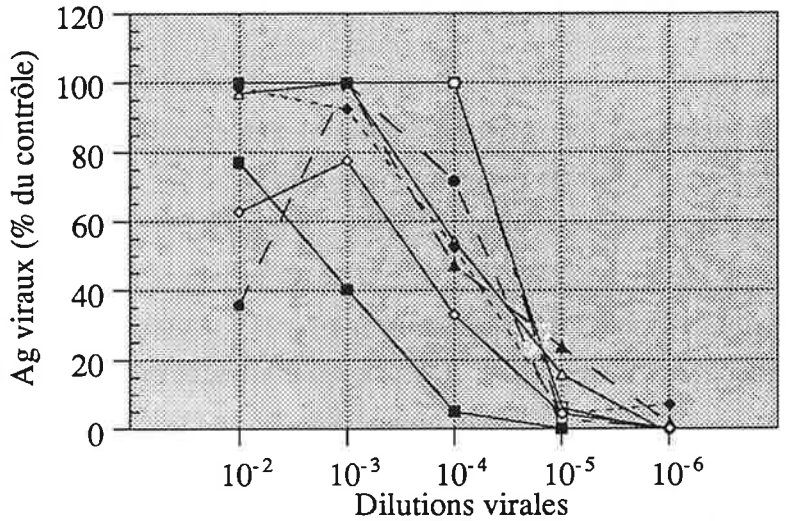


Figure II.11 Antivirogrammes réalisés à partir d'extriats d'une culture de 21 j en fioles agitées: a) prélèvement stérile, b) bouillon brut filtré à 0,45µm, c) précipité éthanolique à pH 4,6.



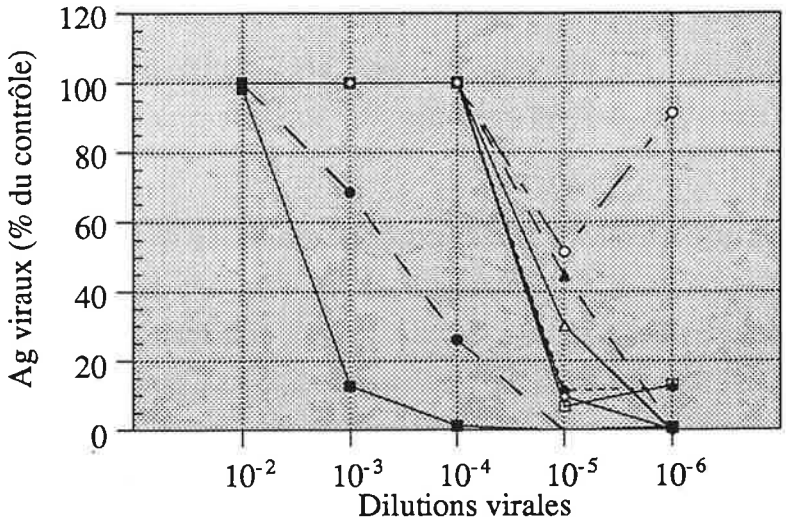
Précipité éthanolique pH 7

d)



Surnageant du broyat de biomasse (éch. E)

e)



Précipité éthanolique du broyat de biomasse (éch. F)

f)

Figure II.11 suite): d) précipité éthanolique pH 7, e) surnageant du broyat de la biomasse, f) précipité éthanolique du broyat de la biomasse.

II.2.5. Conclusion - Discussion

Une activité anti-HSV1 a été détectée sur deux surnageants de culture, S_1 et S_2, de *Macrocystidia cucumis*. Toutefois, de nouvelles cultures réalisées quelques mois après les premières n'ont jamais permis d'établir à nouveau cette activité et donc d'en définir la nature.

Il convient de signaler par ailleurs qu'à la période où ont été détectés S_1 et S_2, deux lots de surnageants ont été testés pour leur activité *in vitro* contre le virus de l'Hépatite A, par une équipe du CRESSA (Service de Santé des Armées, La Tronche - 38). Les résultats des tests RIA (Radio Immuno Assay) ont montré une activité très significative sur le surnageant de culture du premier lot mais aucune activité sur celui du second. D'autre part, des applications locales de surnageants de culture, réalisées sur des patients (7) atteints d'herpès labial ont également montré une rapide rémission des lésions (24 h) et une dimunition des douleurs. Ces tests sont évidemment trop partiels pour faire l'objet d'une étude clinique plus détaillée.

Nos travaux concernant la souche de *M. cucumis* avaient pour objectif initial de définir des conditions de production reproductibles du (ou des) métabolite(s) anti-herpétique(s) et de caractériser sa nature chimique. Pour y parvenir, la première étape a été d'établir une méthode, fiable et utilisable en routine, de détection de l'activité anti-HSV1. Le test ELISA, dont la mise au point est développée en II.2.1, a bien rempli ce rôle. En effet, la présence d'une plaque témoin dans chacun des essais, en plus des deux lignes témoins par plaque, a permis de valider le bon déroulement des tests et notamment l'intégrité de la nappe cellulaires, le développement correct du virus et sa sensibilité à l'agent antiviral. Cette plaque témoin ne comportait pas de substances fongiques mais des dilutions d'acyclovir entre 0,31 et 10 µg/ml. Seuls les essais pour lesquels ces plaques témoins n'ont révélé aucune irrégularité (la très grande majorité) ont été conservés pour l'interprétation.

La reproductibilité du test ne peut donc pas être mise en cause pour expliquer la détection irrégulière de l'activité. Quelques remarques doivent cependant être apportée concernant ce type d'antivirogramme.

Même si sa spécificité est meilleure que la méthode colorimétrique d'évaluation de l'ECP, il reste néanmoins dépendant de l'éventuelle cytotoxicité des échantillons. En effet, une nappe cellulaire dégradée ne permet pas un développement optimal du virus. Ceci empêche d'utiliser des bouillons de cultures concentrés dans les tests car ils se révèlent trop toxiques pour les cellules. Seul un fractionnement et une purification de certains constituants du bouillon est envisageable mais reste très aléatoire sans données de départ. Cela pourrait permettre de séparer les substances toxiques pour les cellules (les acides organiques issus du métabolisme primaire du champignon, par exemple) de celles présentant une éventuelle activité antivirale. C'est dans cette optique que les précipitations à l'éthanol et diverses extractions par solvants ont été tentées.

Ce test n'effectue pas une quantification directe du titre viral puisqu'il évalue la quantité d'antigènes viraux synthétisés en surface des cellules en cours d'infection. Réalisé avec un sérum polyclonal de lapin, il permet la détection de l'ensemble des protéines antigéniques produites au différents stades de la réplication virale. Or, récemment, une activité anti-HSV issue d'un métabolite de *Lentinus edodes* (polysaccharidique) a été décrite comme inhibant la libération des virions hors des cellules infectées (Sarkar *et al.*, 1993). Une inhibition à un stade si tardif de la réplication virale n'a probablement pas d'influence sur le taux d'antigènes présentés en surface des cellules infectées et ne pourrait sans doute pas être détecté par un test ELISA tel que celui que nous avons utilisé. Il faudrait dans ce cas titrer le virus libéré dans le surnageant de culture et comparer ce titre à celui obtenu après éclatement des cellules par un choc hypotonique. Signalons, toutefois que la détection d'une activité lors de nos premiers tests limite la portée de cette hypothèse.

Une amélioration de la sensibilité de détection du test pourrait être envisagée si l'on considère que l'activité antivirale se manifeste au moment de l'adsorption de virus sur les récepteurs cellulaires. En effet, les cellules, la suspension virale et les produits fongiques sont ajoutées simultanément dans les puits. Or, un temps de contact préalable entre la suspension virale et les produits fongiques ou entre les cellules et les produits fongiques permettrait, sans doute, de mettre ce type d'activité mieux en évidence. Un seul test a été réalisé dans ces conditions et il n'a révélé aucune activité.

Puisqu'aucune des modifications de cultures et de préparation des échantillons n'ont permis de déceler une étape responsable de la perte d'activité, l'hypothèse la plus plausible permettant de l'expliquer reste une modification des caractères phénotypiques et / ou génotypiques de la souche fongique. L'absence de détection d'une activité dans des échantillons prélevés stérilement dans les cultures fongiques et utilisés immédiatement dans l'antivirogramme sans autre traitement (pas même une filtration) soutient cette suggestion. Il faut rappeler que la souche utilisée se présente sous forme dicaryotique et qu'une recombinaison entre les deux monocaryons est envisageable. D'autre part, la souche a été isolée à partir d'une bouture d'hyménium et est entretenue par repiquage sur milieu gélosé. Une conservation par lyophilisation ou congélation des spores n'a donc pas été possible et rend la perte d'un caractère génétique rédhibitoire.

II.3. ACTIVITÉ IMMUNOMODULATRICE DES FRACTIONS ISOLÉES DE *FOMES FOMENTARIUS*

Les précipités éthanoliques obtenus à partir des surnageants de culture et de la biomasse de *F. fomentarius* sont divisés en deux fractions par une précipitation sélective au cétyl-triméthyl-ammonium-bromide (CTAB). Cette précipitation permet de recueillir dans le culot de centrifugation une fraction composée majoritairement de polysaccharides acides. La fraction polysaccharidique non précipitable au CTAB, appelée fraction neutre, est ensuite récupérée par précipitation à l'éthanol. On obtient ainsi quatre fractions:

- les fractions S/A et B/A, fractions acides provenant respectivement du surnageant et de la biomasse,
- les fractions S/N et B/N, fractions neutres provenant respectivement du surnageant et de la biomasse.

Les propriétés immunomodulatrices de ces fractions ont été examinées lors des tests suivants.

II.3.1. Absence d'activité mitogénique des fractions seules

La figure II.11 présente la réponse proliférative des lymphocytes du sang périphérique (PBL) - évaluée par l'incorporation de thymidine tritiée - en présence d'un agent mitogène, la concanavaline A (ConA) ou des fractions fongiques à différentes concentrations. Le test a été répété, avec les mêmes fractions, lors de deux essais indépendants (Figure II.12 a et b).

La prolifération des lymphocytes T en réponse à une stimulation par la ConA est dépendante de la dose jusqu'à une concentration de 10 µg/ml. Toutefois, cette réaction proliférative ne se produit que si les lymphocytes sont maintenus en présence de cellules présentatrices (Lymphocytes B, monocytes, cellules dendritiques) porteuses de molécules accessoires. Le test est donc réalisé sur un mélange lymphocytaire obtenu à partir du sang périphérique et non sur des lymphocytes T purifiés.

Aucune des fractions fongiques testées ne provoque une prolifération lymphocytaire significativement supérieur à celle du témoin négatif (0 - PBL seuls) et en aucun cas comparable à celui obtenu en présence de ConA.

Les fractions S/A, S/N, B/A et B/N ne présentent donc **pas d'activité mitogénique**.

La cytotoxicité des substances fongiques a également été examinée, à chacune des concentrations les plus élevées utilisées lors des tests, en contrôlant la viabilité des lymphocytes par comptage après coloration au bleu trypan. Aucune des fractions n'a montré un effet cytotoxique.

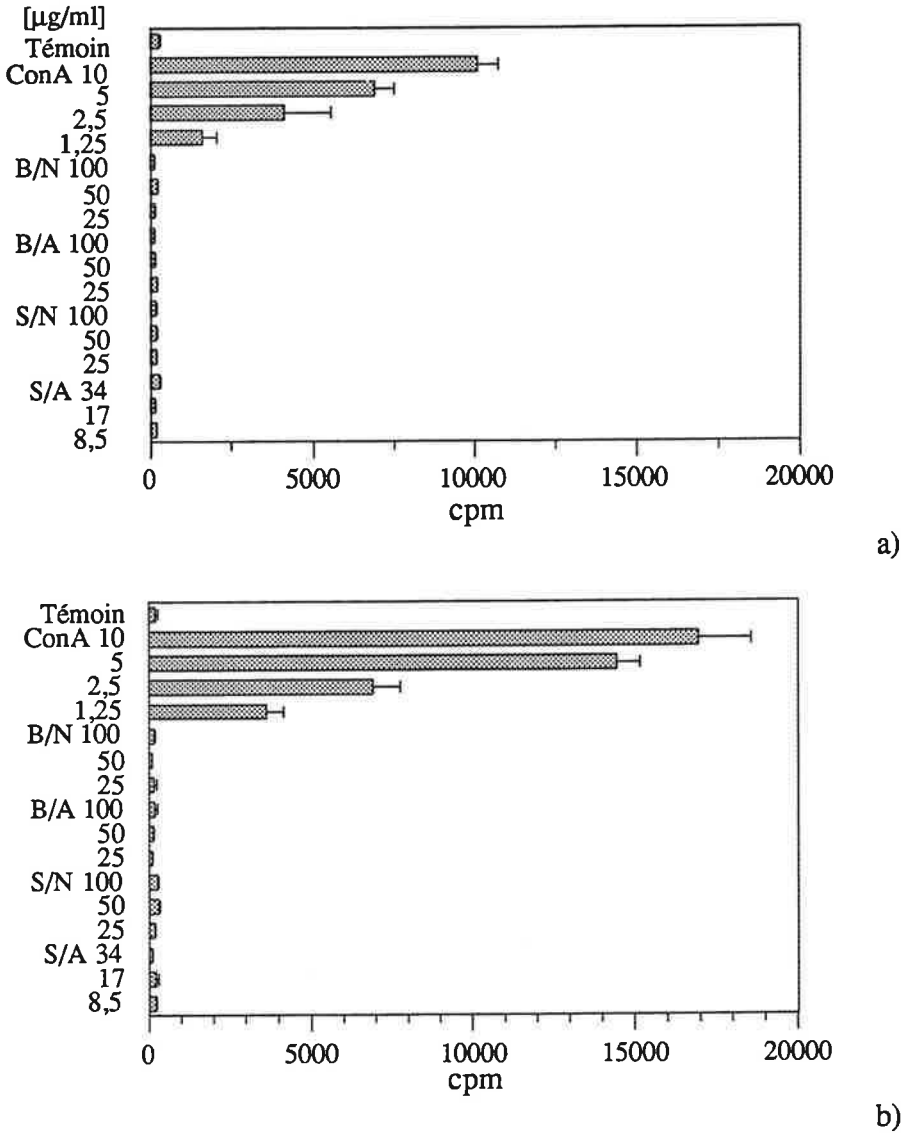


Figure II.12 Activité mitogènique des fractions acides (A) et neutres (N) isolées du surnagenant (S) et de la biomasse (B) de cultures de F. fomentarius. (a et b représentent deux essais indépendants)

II.3.2. Inhibition de l'activité mitogénique de la concanavaline A sur les lymphocytes du sang périphérique

Une seconde série de tests d'activité proliférative a été effectuée avec ces mêmes fractions fongiques, utilisée conjointement avec une concentration non optimale de ConA (2,5 µg/ml). L'objectif est, ici, de révéler une potentielle action synergique des substances fongiques avec la ConA.

Les résultats sont présentés sur la figure II.12a. Aucune synergie avec la ConA n'est observée. En effet, la prolifération lymphocytaire en présence de substances fongiques n'est jamais supérieure à celle du témoin (0 - PBL + 2,5 µg/ml ConA).

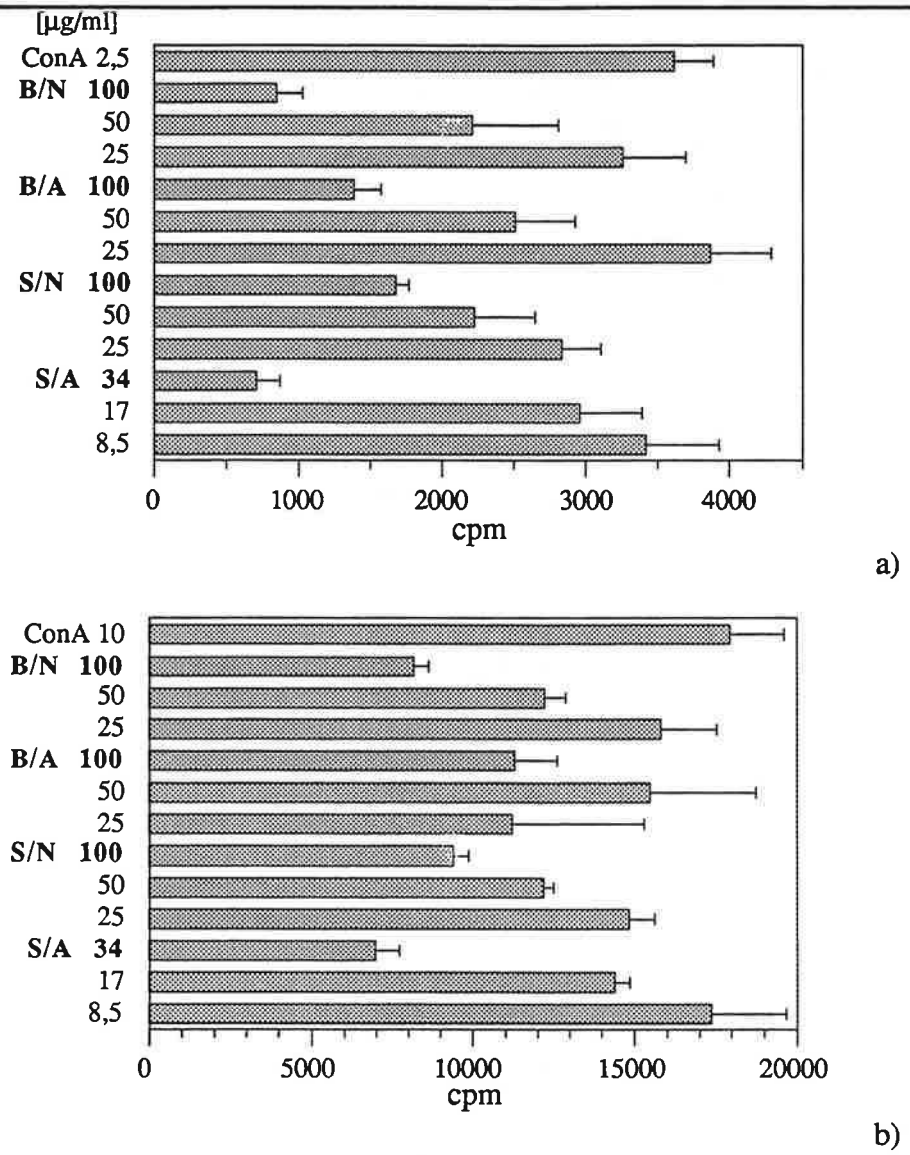


Figure II.13 Inhibition de l'activité mitogénique de la concanavaline A a) à 2,5 µg/ml, b) à 10 µg/ml, par les fractions acides et neutres des extraits de F. fomentarius

A l'inverse, les quatres fractions inhibent l'action mitogénique de la ConA, de façon significative (test de Student, test-T, P<0,01) à 100 µg/ml pour B/A et B/N, à 50 et 100 µg/ml pour S/N, et à 34 µg/ml pour S/A.

Ce test a été répété avec les mêmes fractions, en présence cette fois, d'une concentration optimale de ConA (10 µg/ml). Les résultats sont présentés sur la figure II.13b.

Dans ce cas également, l'activité mitogénique de la ConA est significativement inhibée (test-T, P<0,01) par les quatre fractions fongiques à des concentrations équivalentes à celles du précédent test (100 µg/ml pour B/A, à 50 et 100 µg/ml pour B/N et S/N, et à 34 µg/ml pour S/A).

II.3.3. *Inhibition de la réponse proliférative des lymphocytes T en culture mixte lympho-épidermique*

La nature essentiellement polysaccharidique des produits fongiques et notamment la présence de résidus mannose nous ont conduit à envisager une interaction directe entre les substances fongiques et la ConA pour expliquer l'inhibition de l'activité de cette dernière. En effet la ConA est un polymère de mannose sous forme de dérivés méthylés.

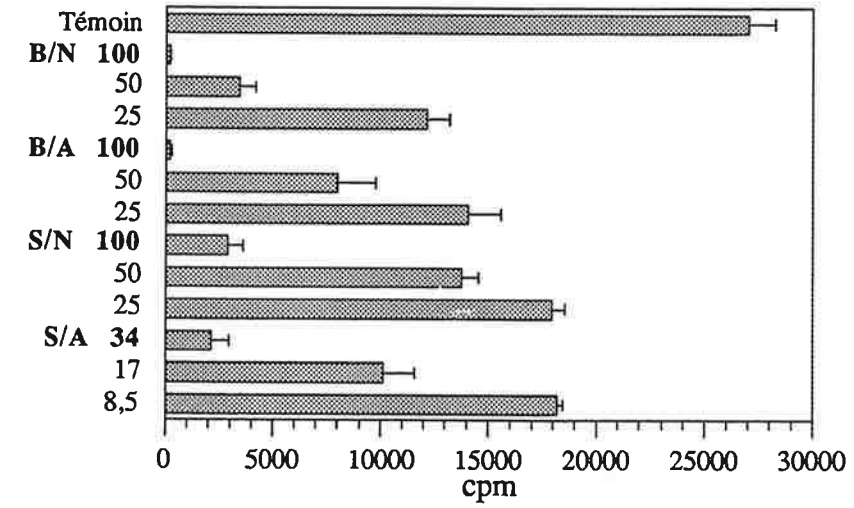
Pour tester cette hypothèse, des tests de prolifération lymphocytaire en réponse à une stimulation par des cellules épidermiques allogéniques (culture mixte lympho-épidermique - CMLE) ont été réalisés. Dans ce cas, les lymphocytes T du sang périphériques sont purifiés et stimulés par des cellules de Langerhans épidermiques (cellules dendritiques exprimant des antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité) provenant d'un autre donneur. Les cellules de Langerhans sont les cellules présentatrices des antigènes reconnus par les lymphocytes T et déclencheur de la réaction proliférative. Celle-ci n'est plus, ici, provoquée par un agent mitogène du type de la ConA.

Le modèle lympho-épidermique, utilisé et étudié par l'équipe de Mme Péguet-Navarro (INSERM U 349), présente l'avantage, par rapport aux cultures mixtes lymphocytaires classiques, de dissocier les cellules responsables de la stimulation (les cellules de Langerhans) des cellules stimulées (les lymphocytes T). Ceci peut, dans certains cas, faciliter l'interprétation des tests en évitant les réactions croisées entre deux populations lymphocytaires allogéniques. Au niveau pratique, il impose toutefois la préparation régulière de cellules de Langerhans à partir de peau humaine.

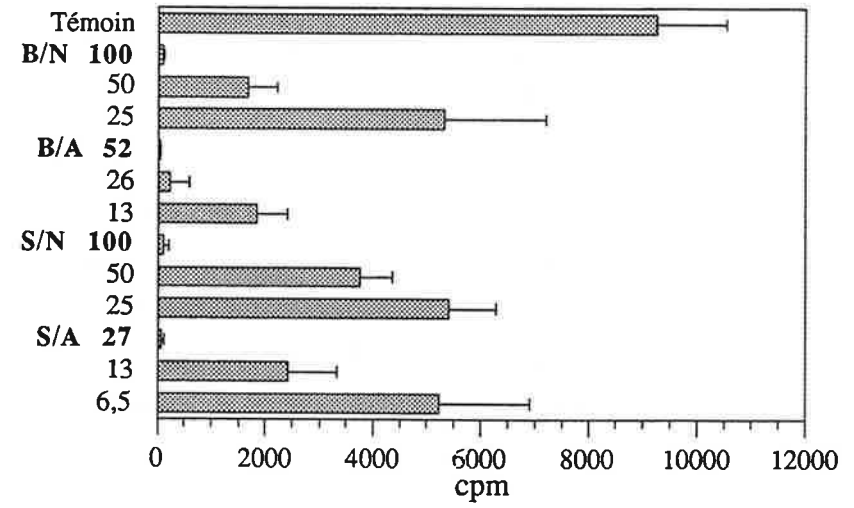
Les résultats des CMLE sont présentés sur la figure II.14. Deux essais ont été réalisés avec des cellules épidermiques enrichies en cellules de Langerhans respectivement à 25% (Figure II.13a) et 61% (Figure II.14b). Dans les deux cas et pour chacune des fractions, une forte action inhibitrice de la réponse proliférative a été observée. Une inhibition complète est même obtenue aux plus fortes concentrations (100 µg/ml pour B/N, S/N, 52 µg/ml pour B/A, et 27 µg/ml pour S/A). Les fractions acides (S/A et B/A) semblent toutefois les plus actives.

La figure II.13c présente un test réalisé avec les fractions neutres précédentes (S/N et B/N) après une étape de purification supplémentaire (DEAE Sephadex - échange d'ions). Les analyses chimiques de ces fractions (détaillées en II.4) ont en effet montrés une mauvaise efficacité de la précipitation initiale et ont révélés la présence de composés acides (ou anioniques) au sein de ces fractions initialement appelés neutres. Seules les fractions issues de l'élution en milieu acide (B/Na et S/Na) présentent encore une activité significative.

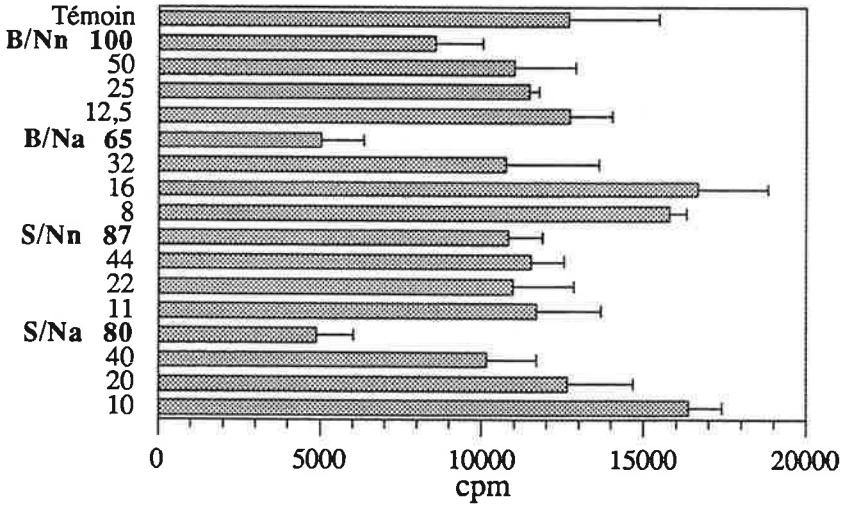
Ces résultats seront discutés en II.5 en relation avec la structure des composés détectés. Toutefois on peut déjà souligner à ce niveau que ces tests permettent d'éliminer une interaction directe entre la ConA et les substances fongiques pour expliquer leur effet immunosuppresseur.



a)



b)



c)

Figure II.14 Inhibition de la réponse proliférative des lymphocytes T en CMLE a) 25% de cellules de Langerhans parmi les cellules épidermiques, b) 61 % de cellules de Langerhans, c) fractions neutres purifiées sur DEAE sephadex.

Les résultats sont encore trop partiels pour évoquer un mécanisme d'action. On peut simplement évoquer les possibilités suivantes (non exhaustives):

- blocage des sites TcR, récepteurs des antigènes sur les lymphocytes T, et inhibition compétitive de la ConA,
- blocage des sites récepteurs des molécules accessoires sur les lymphocytes T,
- blocage de site présentateurs au niveau des cellules de Langerhans.
- inhibition de la production ou de l'action de certaines lymphokines (l'interleukine 2 notamment) au niveau des récepteurs ou du signal intracellulaire qu'elles induisent.

II.4. ANALYSE DES FRACTIONS POLYSACCHARIDIQUES DE *FOMES FOMENTARIUS*

Des purifications et analyses complémentaires ont été menées sur les fractions dont les propriétés immunomodulatrices viennent d'être présentées, de façon à déterminer la nature de leurs composants.

II.4.1. Détermination de la masse molaire par filtration sur gel

Une première purification a été réalisée par filtration sur gel (ou chromatographie d'exclusion). Cette étape avait pour but de séparer les macromolécules polysaccharidiques de plus petits composants (peptides, oligosaccharides...) éventuellement conservés lors des précipitations. L'autre objectif était de déterminer l'ordre de grandeur de la masse molaire des substances isolées.

Les profils d'élution des quatre fractions polysaccharidiques sont présentés sur la figure II.15. Les hauteurs de pics ne sont pas représentatives des concentrations respectives de chaque fraction dans la culture. Elles résultent de différentes dilutions effectuées après l'obtention des fractions brutes. Seuls les volumes d'élution sont à comparer.

Le volume d'élution des fractions neutres (S/N, B/N) caractérise des substances de 400 à 450 kDa avec une certaine variabilité autour de cette taille moyenne (250 à 500 kDa) traduite par la

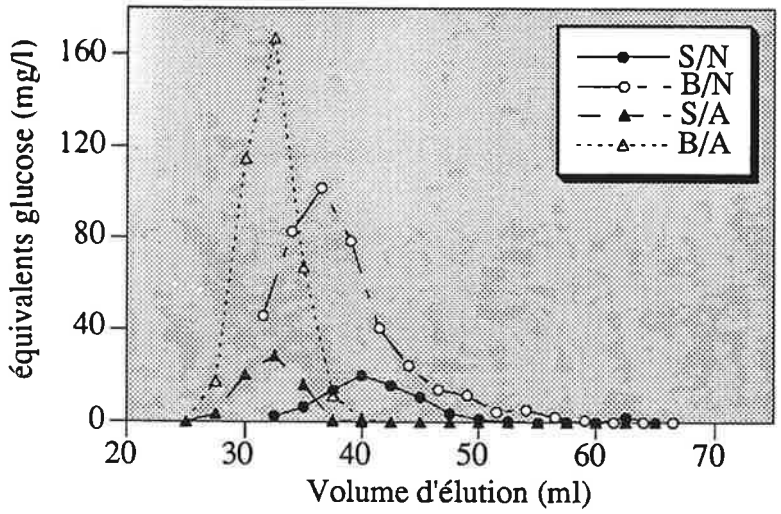


Figure II.15 Profils d'élution des fractions S/N, S/A, B/N, B/A par chromatographie sur gel d'exclusion.

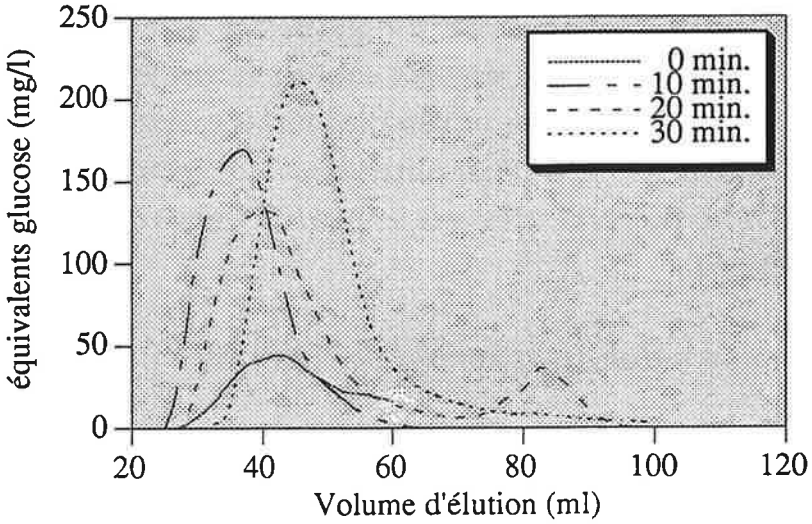


Figure II.16 Influence de la solubilisation par sonication sur le profil d'élution de la fraction polysaccharidique S/N.

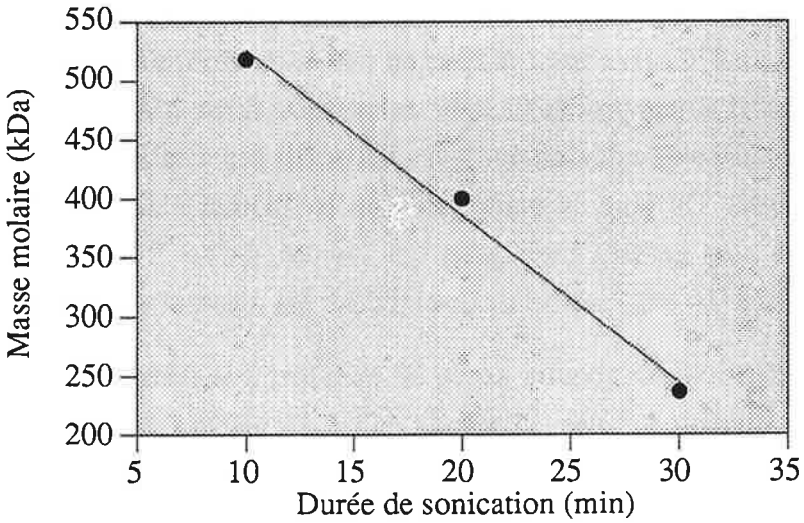


Figure II.17 Influence de la durée de sonication sur la masse molaire des polysaccahrides de la fraction S/N.

largeur des pics. Cependant la symétrie des pics et leur allure monomodale permet d'écarter l'existence de deux fractions nettement distinctes en taille.

La taille des fractions acides, éluées plus tôt, est plus élevée. Elles possèdent un volume d'élution comparable (mais légèrement supérieur) à celui du volume mort. On se trouve ici en dehors de la zone de linéarité de la colonne, on peut donc seulement estimer leur masse molaire comme étant comprise entre 550 kDa (seuil d'exclusion de la colonne) et 2000 kDa. Ces fractions acides sont plus homogènes en tailles que les fractions neutres comme le montre l'allure ressérée de leur pic d'élution.

II.4.2. Influence de la solubilisation par sonication

La faible solubilité des fractions polysaccharidiques lorsqu'elles sont conservées à 4°C (formation d'un précipité troublant la solution) et surtout les difficultés rencontrées pour dissoudre une fraction lyophilisée, nous a conduit à utiliser fréquemment une sonde à ultrasons pour favoriser la solubilisation de ces macromolécules. Toutefois, la sonication peut provoquer une cassure des chaines polysaccharidiques modifiant ainsi la masse molaire de ces molécules.

Pour évaluer l'importance de cette dégradation, un même échantillon S/N a été traité par différentes durées de sonication. Les profils d'élution de ces fractions sont présentés sur la figure II.16 L'allongement du temps (du volume) d'élution exprime une diminution de la taille des fractions. Cette évolution est présentée sur la figure II.17

On observe tout d'abord que le profil d'élution d'un échantillon passé sur la colonne directement après une conservation à 4°C, sans resolubilisation par sonication, présente une surface très inférieure à celle des trois autres profils (malgré un même volume d'injection). Cette perte de produit laisse penser qu'une partie des macromolécules n'était pas solubilisée et n'a donc pas été éluée (retenue par le gel). De plus, la petite taille de la fraction éluée suggère que ce sont préférentiellement les plus grosses molécules qui précipitent au froid. Un traitement par sonication de courte durée (10 min) permet de resolubiliser ces macromolécules.

En prolongeant la sonication, on aboutit, après 20 minutes, à la formation d'une population bimodale composée de macromolécules (MW ≈ 400 kDa) et d'oligosaccharides (MW ≈ 10 kDa). Ces derniers sont eux-mêmes détruits par une sonication plus longue puisqu'il n'apparaissent plus après 30 minutes de traitement. Les petits fragments libérés (oligo ou monomères) s'éluent très lentement et sont traduits par une longue trainée après le pic principal. On peut émettre l'hypothèse qu'il existe, dans la chaîne osidique, des zones de taille relativement homogène, plus fragiles et donc libérées rapidement par sonication. Il pourrait s'agir de ramifications de la chaîne principale. Une fois ces ramifications détachées, la chaîne principale est érodée. On peut également envisager l'arrangement des chaînes en structures tridimensionnelles plus complexes

qui seraient déstabilisées par la sonication, comme c'est le cas pour la structure en triple hélice du schizophyllane (Yanaki *et al.*, 1983a et b).

II.4.3. Purification par chromatographie d'échange d'ions

Si la filtration sur gel montre une relative homogénéité en taille des fractions isolées par précipitations, elle ne renseigne pas, en revanche, sur la nature de ces composés. Des informations initiales peuvent être obtenues par chromatographie d'échange d'ions. Ces chromatographies ont par ailleurs été entreprises dans le but d'éliminer les protéines conservées lors des précipitations.

Les figures II.18 a-b présentent les profils d'élution sur DEAE-sephadex des fractions S/N et

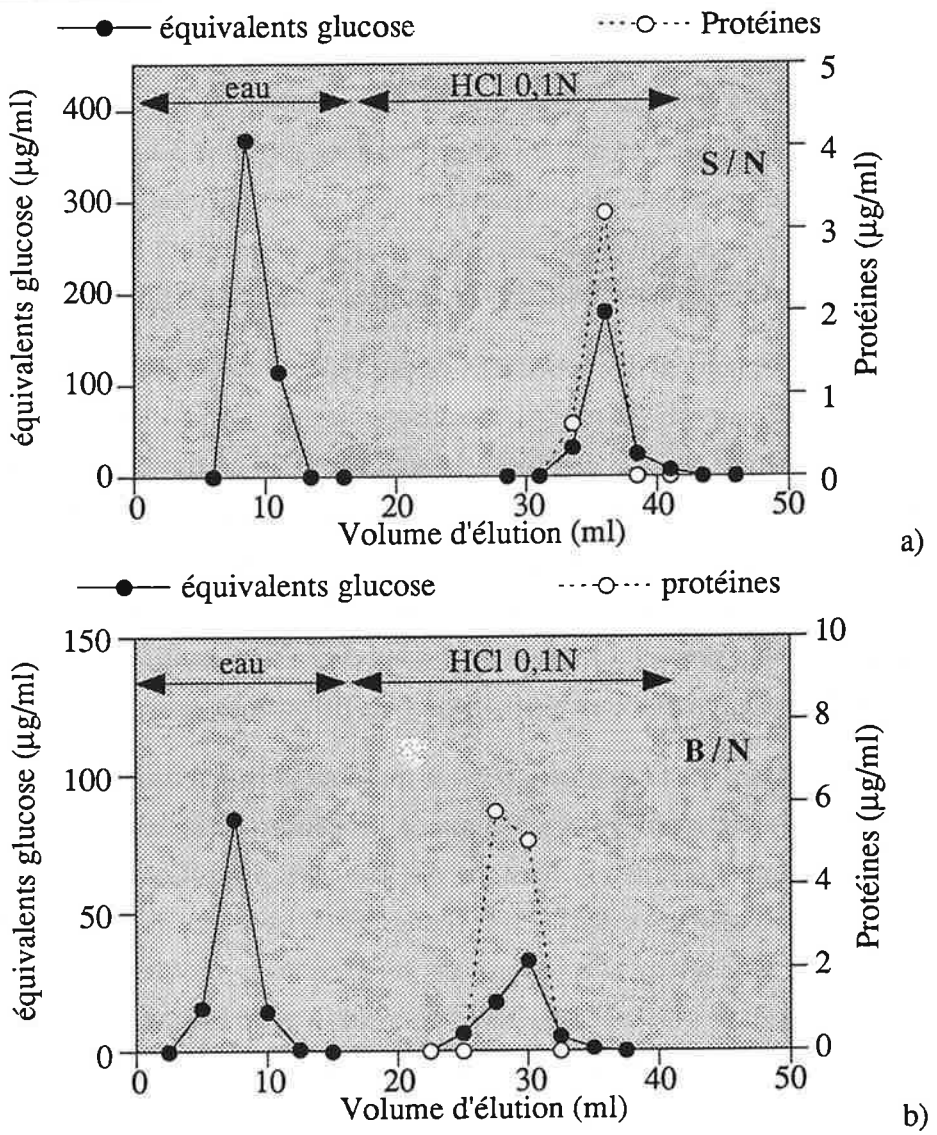


Figure II.18 Profils d'élutions des fractions a) S/N et b) B/N sur DEAE sephadex (forme anionique).

B/N après leur filtration sur gel d'exclusion.

Les deux fractions présentent chacune une composante neutre majoritaire, éluée par l'eau, et une composante acide ou anionique, associée à des protéines. Ces résultats soulignent la faible efficacité de la précipitation initiale au CTAB puiqu'elle ne permet pas de recueillir la totalité des polysaccharides acides. On peut noter que le résultat de cette précipitation et surtout sa spécificité sont très dépendants du pH auquel elle est réalisée (Scott, 1965). En milieu fortement alcalin (pH 10-11), le CTAB précipite indifféremment les polysaccharides neutres et acides ainsi que certaines protéines. La réaction de précipitation possède sa meilleure spécificité pour les polysaccharides acides, à pH neutre (7-8) et devient inopérante en milieu acide. Des essais ponctuels effectués à pH 11 ont en effet montré que l'ajout de CTAB dans le surnageant de culture provoquait non seulement une précipitation complète des composés acides mais également la précipitation d'une part importante de composés neutres.

Les faibles quantités des fractions A/A et C/A n'ont pas permis la réalisation d'un profil d'élution par passage à travers une colonne. Les solutions ont directement été mises en contact d'une suspension de DEAE-sephadex en milieu neutre, agitées pendant 3 h puis filtrées. Le filtrat neutre ne contient que des traces de polysaccharides. La quasi-totalité des polysaccharides initiaux est récupérée après remise en suspension du gel en milieu acide (HCl 0,1 N). La précipitation initiale au CTAB, réalisée à pH 7-8, est donc bien spécifique mais incomplète.

Dans le cadre du développement d'un protocole de purification avancée des différentes fractions polysaccharidiques, une optimisation des conditions de précipitation au CTAB devrait être entreprise. Ces essais n'ont pas été effectués dans le cadre de ce travail. Cette méthode a été choisie ici pour ses facilités à traiter de grands volumes de surnageants de cultures en une seule fois, étape que nous ne pouvions accomplir avec nos moyens de chromatographie d'échanges d'ions. On peut toutefois penser que cette dernière méthode, appliquée directement aux composés recueillis après précipitations éthanoliques et réalisée dans un but préparatif et non plus seulement analytique, remplacerait avantageusement la précipitation préliminaire au CTAB.

L'élimination des protéines s'est également révélée impossible par ce mode de chromatographie. D'autres techniques ont été employées telles que la procédure d'extraction au chloroforme de Sevag (Sevag, 1934), une précipitation sélective des protéines au sulfate d'ammonium ("salting-out") ou une précipitation sélective des polysaccharides à l'hydroxyde de Baryum (Meier, 1965). Mais aucune de ces techniques n'a permis de séparer les protéines des polysaccharides permettant ainsi de penser que ces protéines ou résidus peptidiques sont fixés à la chaîne osidique par des liaisons covalentes (peut être de type N-acétyl-glucosaminyl-asparagine).

Les figures II.19 et II.20 rappellent les schémas d'extraction des différentes fractions et leur part respective par rapport à la fraction brute initiale.

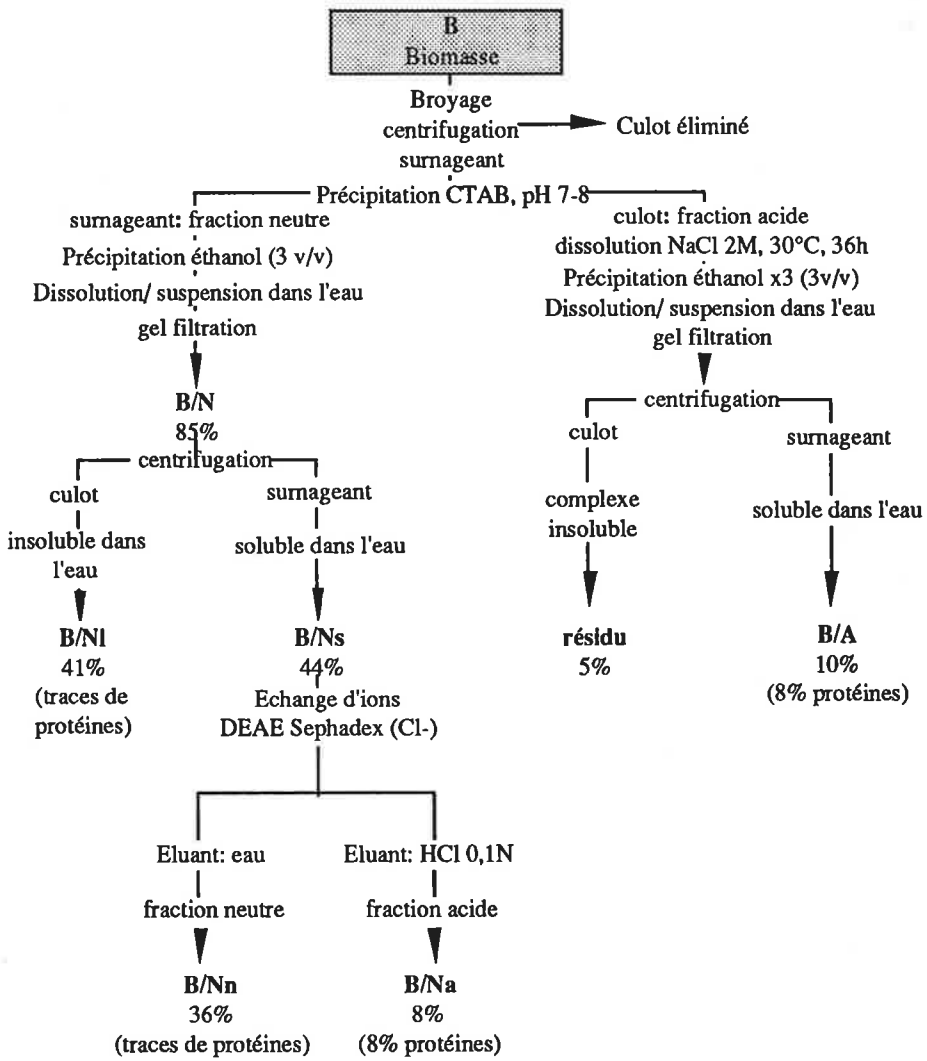


Figure II.18: Schéma d'extraction des fractions isolées de la biomasse

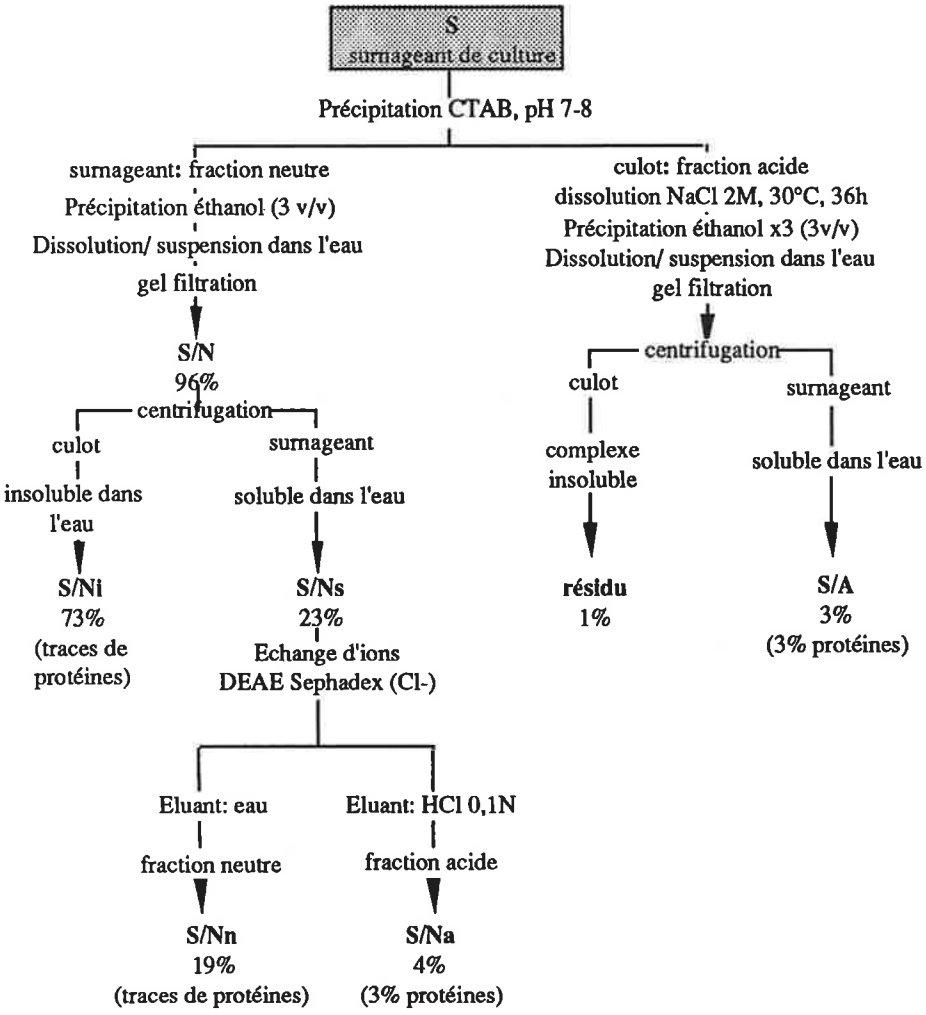


Figure II.17: Schéma d'extraction des fractions isolées des surnageants

II.4.4. Composition en monomères par chromatographie en phase gazeuse

Les fractions S/A et S/Na, d'une part, B/A et B/Na, d'autre part, se sont révélées représenter la même fraction des composés acides du surnageant et de la biomasse. Elles ont donc été rassemblées sous la même dénomination, respectivement S/A_{totale} et B/A_{totale}.

Les fractions S/Nn, S/A_{totale}, S/Ni, B/Nn, B/A_{totale} et B/Ni ont été lyophilisées puis hydrolysées par l'acide trifluoro-acétique (TFA). Après évaporation du TFA puis dérivatisation, les monomères de l'hydrolysat ont été analysés par chromatographie gazeuse (cf. § II.1.4.9 pour le protocole détaillé).

A titre d'exemple, les figures II.21 a, b, c présentent les chromatogrammes obtenus respectivement pour les fractions S/Nn, S/A_{totale} et S/Ni. La figure II.21d présente le mélange standard composé des monomères osidiques les plus fréquemment décrits dans la littérature. Le myo-inositol, présent sur ces chromatogrammes, est un étalon interne ajouté avant l'hydrolyse.

Echantillon	Chromatographie en phase gazeuse	
	Monomères identifiés	ratio molaire
S/Nn	GLc - Gal - Man	25 : 2 : 1
B/Nn	GLc - Gal - Man	20 : 1 : 1
S/A_{totale}	GLc - Gal - Man	6 : 2 : 1
B/A_{totale}	GLc - Gal - Man	20 : 2 : 1
S/Ni	Glc	-
B/Ni	Glc	-

Tableau II.5 Composition en monomères osidiques des fractions polysaccharidiques, déterminées par chromatographie en phase gazeuse.
(Glc: glucose, Gal: galactose, Man: mannose - sous forme pyranosides, dérivés silylés - TMS)

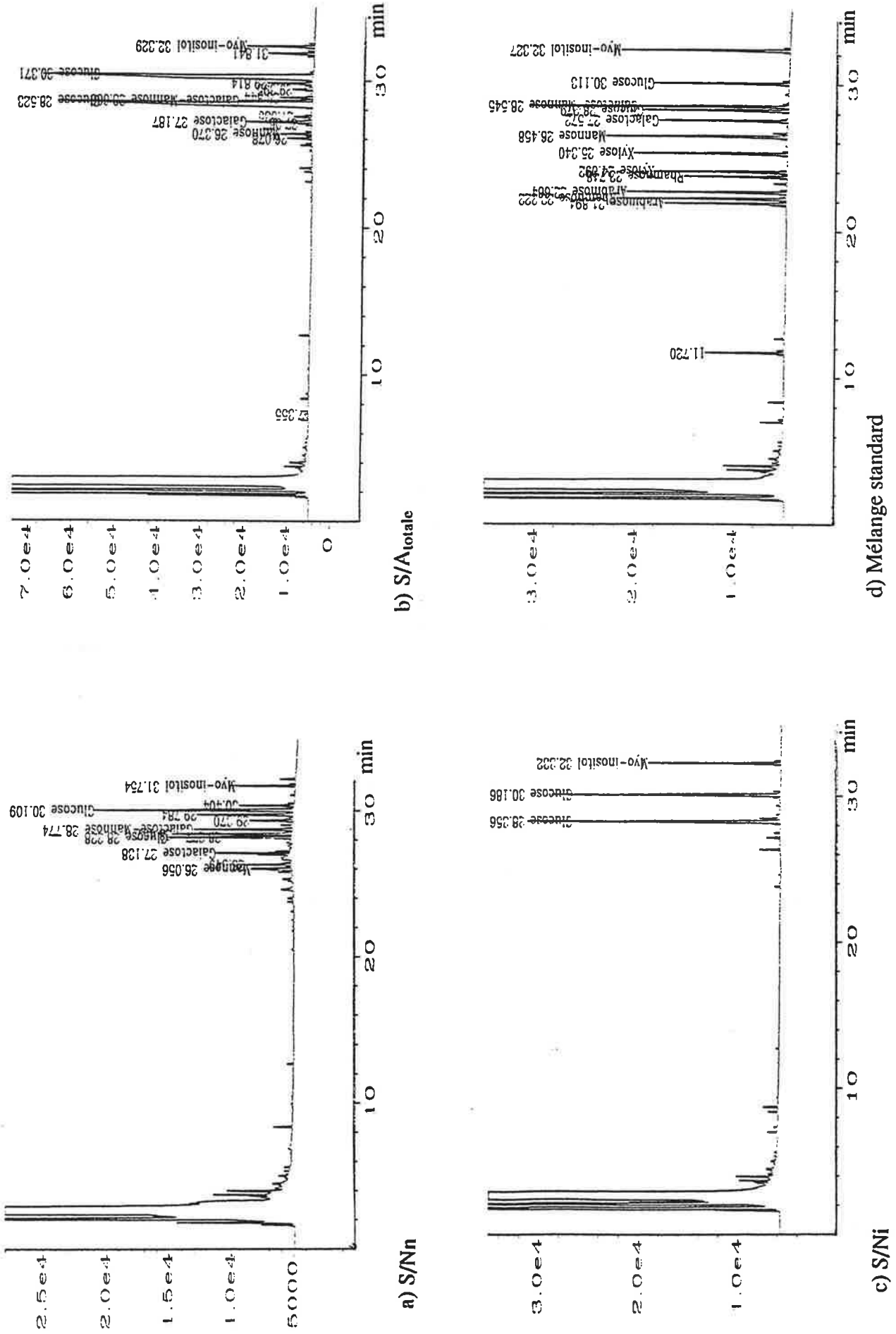


Figure II.21: Chromatogrammes (CPG) des fractions polysaccharidiques S/Nn, S/A$_{totale}$, S/Ni, et du mélange standard.

Ces chromatogrammes montrent que

- la part la plus importante des composés polysaccharidiques isolés du surnageant de culture ou de la biomasse (S/Ni et B/Ni) est représentée par des **homoglucanes** (polymères de glucose) faiblement soluble dans l'eau au delà d'une concentration de 1mg/ml. Cette solubilité est améliorée en milieu alcalin (NaOH 0,1N - 1N)
- les quatres fractions utilisées lors des tests immunologiques sont des **hétéroglucanes composés majoritairement de glucose, associés à des résidus mannose et galactose.** Si la nature des monomères est identique pour chaque échantillon, on constate cependant des différences dans la part respective de ces monomères dans la chaîne polysaccharidique (se reporter au ratio molaire dans le tableau II.5)

Ils subsistent sur certains chromatogrammes de petits pics non identifiés. On peut simplement dire qu'ils ne correspondent ni au xylose, rhamnose ou arabinose — présent dans le mélange standard — ni à l'acide glucuronique ou la glucosamine, testés séparément. La présence de ces pics, indifféremment sur les fractions neutres ou acides, ne permet d'attribuer ces pics à des résidus (de type acides uroniques, par exemple) responsable du caractère anionique des fractions S/A ou B/A. Il pourrait s'agir de produits de dégradation issus de l'hydrolyse.

II.4.5. Structure de la chaine polysaccharidique

De façon à déterminer la nature des liaisons osidiques reliant les différents monomères de la chaîne, les quatres fractions utilisées pour l'analyse chromatographique en phase gazeuse (CPG) ont également été soumises à une méthylation préalablement à l'hydrolyse par le TFA et à la dérivatisation. Puis elles ont été analysées en CPG couplées à un spectromètre de masse.

La réaction de méthylation permet de fixer un groupement méthyle sur chaque site hydroxyle (OH) des composés pyranoses, non engagé dans une liaison osidique de la chaîne. L'hydrolyse, en cassant les liaisons osidiques, libère les sites qui y étaient impliqués. Ces derniers, non méthylés pourront donc recevoir un groupement tri-méthyl-silyle (TMS) lors la dérivatisation ultérieure. On peut ainsi distinguer les carbones de l'hexose qui portaient une liaison osidique — ceux portant un groupement TMS — de ceux restés libres — ceux portant un groupement méthyl.

Les liaisons détectées par spectrométrie de masse sont présentées dans le tableau II.6. On trouve une prédominance de composés glucopyrannose liés en (1->4) ou (1->6) et certains résidus présentant deux points de liaisons (3,6->1) ou (4,6->1) caractérisant la structure ramifiée de la chaine polysaccharidique. Les résidus galactopyranosides détectés sont toujours apparus comme des points de ramifications présentant deux liaisons; (2,6->1) pour B/Nn et (3,6->1) pour B/A_{totale}

Echantillon	Sucres méthylés	Principaux fragment s de Masse (Masse/Charge)	Type de liaisons
S/Nn	2,3,4-Me_3-Glc	45, 88, 101, 133, 159, 205, 287, 319	->6 [Glc*p*] 1->
	2,3,6-Me_3-Glc	45, 88, 101, 133, 175, 217, 232, 320	->4 [Glc*p*] 1->
	2,3-Me_2-Glc	88, 133, 159, 205, 217, 287, 377	->4,6 [Glc*p*] 1->
B/Nn	2,3,4-Me_3-Glc	45, 88, 101, 133, 159, 205, 287, 319	->6 [Glc*p*] 1->
	2,3,6-Me_3-Glc	45, 88, 101, 133, 175, 217, 232, 320	->4 [Glc*p*] 1->
	2,3-Me_2-Glc	88, 133, 159, 205, 217, 287, 377	->4,6 [Glc*p*] 1->
	3,4-Me_2-Gal	73, 133, 146, 205, 217, 245, 345, 377	->2,6 [Gal*p*] 1->
S/A_{totale}	2,3,4-Me_3-Glc	45, 88, 101, 133, 159, 205, 287, 319	->6 [Glc*p*] 1->
	2,3,6-Me_3-Glc	45, 88, 101, 133, 175, 217, 232, 320	->4 [Glc*p*] 1->
	2,4-Me_2-Glc	59, 73, 131, 146, 191, 233, 303	->3,6 [Glc*p*] 1->
B/A_{totale}	2,3,4-Me_3-Glc	45, 88, 101, 133, 159, 205, 287, 319	->6 [Glc*p*] 1->
	2,3,6-Me_3-Glc	45, 88, 101, 133, 175, 217, 232, 320	->4 [Glc*p*] 1->
	2,4-Me_2-Gal	59, 73, 101, 146, 159, 191, 231, 303	->3,6 [Gal*p*] 1->

Tableau II.6 Nature des sucres méthylés détectés en CPG-MS et type de liaisons du résidu pyranoside correspondant.
(2,3,4-Me_3-Glc signifie 2,3,4 tri-O-méthyl-1,6 di-O -méthylsilyl-glucopyranoside; Glcp: glucospyranoside, Galp: galactopyranoside)

Remarque: Il faut noter que la réaction de méthylation s'est révélée imparfaitement réalisée — environ 30% des résidus sont restés complètement non méthylés dont tous les résidus mannopyranosides — et a donc empêché une exploitation complète des résultats. Or, contrairement aux précédentes analyses, la spectrométrie de masse a été effectuée en collaboration avec un autre laboratoire (le laboratoire LEACM de la Faculté de Pharmacie de Lyon), et pour des raisons de temps et de disponibilité de l'appareillage, il n'a pas été possible de répéter l'analyse à partir d'une nouvelle méthylation.

Compte-tenu de la remarque précédente, pour l'exploitation des résultats, seules les liaisons parfaitement identifiées et réalistes ont été prises en compte. Des résidus ne présentant qu'une

méthylation signifiant l'implication du composé dans quatre liaisons osidiques n'ont par exemple pas été considérés. La détermination de la part respective de chaque type liaison dans la chaîne polysaccharidique n'a pu être effectuée.

Les difficultés concernant la méthylation semblent liées à une conservation trop prolongée des échantillons dans le milieu réactionnel de dérivatisation. Elle a sans doute conduit à un détachement de certains groupements méthyle, remplacés ensuite par des groupements TMS. On expliquerait ainsi que les groupements terminaux, les plus accessibles, n'ont pas été retrouvés sous forme tetra-méthyle et aurait donc subi une perte partielle ou totale de leur groupement méthyle. La présence des groupements mannosides non méthylés chez S/Na tenderait à montrer que ces résidus sont préférentiellement en position terminale. Ceci ne constitue cependant qu'une hypothèse.

II.5. DISCUSSION SUR LES FRACTIONS POLYSACCHARIDIQUES DE FOMES FOMENTARIUS

Nous avons isolé des fractions polysaccharidiques du surnageant de culture et du mycélium de *Fomes fomentarius* cultivé sur milieu liquide. Les tests immunologiques réalisés sur ces fractions brutes (S/Ns, S/A_{totale}, B/Ns, B/A_{totale}) n'ont révélé aucune activité mitogénique. En revanche ils ont montré, *in vitro,* des propriétés immunosuppressives significatives, caractérisées, d'une part, par la suppression de l'activité mitogénique de la concanavaline A (ConA) sur les lymphocytes du sang périphérique et d'autre part, par l'inhibition de la réponse proliférative des lymphocytes T stimulés par des cellules présentatrices allogéniques. Les résultats sont encore trop préliminaires pour pouvoir proposer un mécanisme d'action de ces produits. On doit toutefois souligner que les fractions acides (S/A_{totale} et B/A_{totale}) présentaient les activités les plus fortes et que parmi les fractions S/Nn, B/Nn, S/Na, B/Na, seules les fractions acides (S/Na et B/Na), associées à des résidus peptidiques, conservent une activité.

Les résultats des analyses chimiques de ces différentes fractions montrent que *F. fomentarius* produit et libère dans le milieu des polysaccharides de deux types, les homoglucanes et les héroglucanes:

homoglucanes

Ces fractions (S/Ni, B/Ni) sont faiblement solubles dans l'eau mais sont plus aisément solubles en solution alcaline (NaOH 0,1N-1N). Ce type de glucane a fréquemment été décrit chez les Basidiomycètes (cf. § II.1.2.6 - Tableau II.2 pour les références). Ils constituent un composant important de la paroi hyphale (I.1.2.2) et se composent généralement d'une chaîne principale de résidus glucopyranoses attachés en ß(1->3) sur lesquels des ramifications viennent se fixer en ß(1->6). Ces fractions n'ont fait l'objet, ici, ni de caractérisation suffisante pour déterminer la

nature des liaisons, ni de tests immunologiques. Leurs faibles solubilités et la littérature abondante sur ce type de composé en limitaient l'intérêt.

hétéroglucanes

Ils consituent les quatre fractions solubles dans l'eau (S/Nn, S/Na_{totale}, B/NS, B/Na_{totale}) et sont composés de glucose (majoritaire), de galactose et de mannose. Ils présentent une masse molaire élevée (550 - 1000 kDa) et une composition très similaire. Seule la fraction S/A possède un ratio molaire exprimant un plus grand nombre de résidus galactose et mannose.

Ces fractions se distinguent essentiellement par leurs contenus anioniques liés à la présence d'une portion peptidique associée à la chaîne osidiques (S/A_{totale} et B/A_{totale}) ou à celle de groupements de substitutions sur certains monosaccharides. Ainsi l'analyse en spectrométrie de masse après hydrolyse et méthylation de B/A a révélée la présence de groupements phosphate. Ces derniers, substitués sur les groupements hydroxyles des pyranosides de la chaîne, pourraient expliquer la nature anionique de ces polysaccharides.

La nature des liaisons identifiées montre la prédominance d'une chaîne glucopyranosidique liée en (1->4) et en (1->6) et présentant des ramifications attachées en (4,6->1) pour S/Nn et B/Nn, en (3,6->1) pour S/A_{totale} et B/A_{totale}. Les résidus galactose et mannose, très minoritaires, n'ont que rarement pu être détectés à l'exception de B/Nn où ils apparaissent comme des points de ramifications liées en (2,6->1). Il faut souligner à nouveau le caractère uniquement qualitatif et partiel des résultats issus de la spectrométrie de masse. Ils fournissent seulement une tendance et confirme la composition en monomères établie par CPG mais ne permettent pas d'aller plus avant dans l'interprétation. Cette lacune ne permet pas de définir si la meilleure activité des fractions associées à une portion peptidique provient directement de ces peptides ou plutôt d'une différence de conformation (type de liasons et taux de ramifications de la chaîne). La différence des ratios molaires entre S/A et S/Nn permet en effet d'envisager cette dernière hypothèse pour expliquer la différence d'activité. Des échantillons ont récemment été traités par une protéase (pronase) de façon à détruire la portion peptidique mais ils n'ont pas encore pu être testés quant à leur activité immunomodulatrice. Ces essais devraient montrer si la présence de la portion peptidique est importante pour l'expression de l'activité.

Ces résultats, même incomplets, permettent toutefois de reconnaître dans la structure de ces polysaccharides, une structure très proche de celle du PS-K ou Krestin (Tsukagoshi *et al.*, 1984), un complexe peptido-polysaccharidique isolé chez *Coriolis versicolor* (Polyporaceae, Basidiomycète). Ce dernier est en effet composé d'une chaîne principale de glucose liée en ß(1->4) et dont certains résidus présentent des ramifications sur les carbones C_3 et C_6. La partie peptidique, qui représente environ 10% de la fraction osidique (Jong et Donovick, 1989), contient principalement des acides aminés neutres ou acides (Trnovec et Hrmova, 1993). Ceci confère au complexe des propriétés anioniques. Il a été isolé pour la première fois dans les

années 70 (Hirase *et al.*, 1970) pour ces propriétés antitumorales et a montré depuis des propriétés stimulatrices de la réponse immunitaire non spécifique, *in vivo* (Trnovec et Hrmova, 1993 et voir § I.4.2).

Le PS-K diffère cependant des fractions isolées ici par son poids moléculaire (≈ 100 kDa) et par l'abscence de résidus mannose ou galactose. Mais de tels héroglucanes ont déjà été décrits chez différent Basidiomycètes (Ohno *et al.*, 1986; Kiho *et al.*, 1992a). Ces derniers auteurs ont notamment isolé du carpophore de *Armillariella tabescens* (Tricholomacea, Basidiomycètes), un hétéroglucane, solubles dans l'eau et composé à côté du glucose majoritaire de galactose, mannose, et fucose. Certains des résidus galactose sont des points de ramifications liés en (2,6->1) comme cela a été détecté sur la fraction B/Nn.

Enfin un article récent (Aoki *et al.*, 1993) décrit l'obtention de polysaccharides à propriétés antivirales (anti-virus de la mosaïque du Tabac) à partir de *F. fomentarius*. Ce type de métabolites elliciteur des phytoalexines chez les plantes de la famille des *Nicotianea*, est connu depuis plusieurs années (Albersheim et Valent, 1978). Ils ont été isolés à l'origine à partir de la paroi de *Phytophthora megasperma* et ont été décrits comme des glucanes neutres liés en ß(1->3) avec des ramifications en ß(1->6) (Albersheim et Valent, 1978; Kopp et al., 1989). Pour les polysaccharides exocellulaires isolés par Aoki et *al.* (1993), aucune précision n'est apportée concernant la nature ou la composition de ces deux fractions. Ces polysaccharides sont présentés comme comprenant une importante fraction neutre, nomée "fomentaran", associée à une seconde fraction acide en beaucoup plus faible quantité, nomée BAS-F. L'activité antivirale systémique est attribuée à la seconde fraction.

Le type d'activité immunosuppressive détectée ici sur les complexes peptido-polysaccharidiques acides (S/A et B/A) n'a, à notre connaissance, jamais été décrit. De telles substances mériteraient des études complémentaires afin de déterminer si par leur mode d'action ou leurs propriétés pharmacocinétiques, elles présentent des potentialités d'utilisation cliniques.

Conclusion

L'activité anti-HSV détectée lors des tests antérieurs à notre étude n'a pu être établie que, ponctuellement, sur deux surnageants de culture obtenus à plusieurs mois d'intervalles. Dans les deux cas, la concentration des produits fongiques responsable d'une cytotoxicité était supérieure à la concentration nécessaire à l'activité. Toutefois, il faut souligner la proximité de ces deux concentrations qui exprime un mauvais index thérapeutique (rapport entre dose active et dose toxique) des produits testés et impose de rester prudent quant à l'efficacité de tels produits avant la réalisation de purifications plus avancées.

Par ailleurs, les problèmes rencontrés pour établir de façon reproductible cette activité ne nous ont pas permis de définir sa nature. Ils ont également mis en évidence les difficultés inhérentes à l'utilisation des Basidiomycètes en fermentation. En effet, l'impossibilité de conserver ces souches sous forme sporulée ou sous forme végétative lyophilisée ou congelée, impose des repiquages fréquents pour le maintien d'un stock d'inoculum disponible. Ce problème est encore accru par la lenteur des croissances de telles souches sur mileu gélosé (3 semaines par exemple pour obtenir une colonie de 5 cm environ avec *M. cucumis*). Les risques de modifications des caractères de la souche d'origine sont augmentés. Comme nous l'avons illustré dans le paragraphe II.2, les problèmes de reproductibilité ne sont vraisemblablement pas liés au test ELISA ou au mode de préparation des échantillons mais bien à la souche. L'absence d'activité d'un second lot testé, après un premier lot positif, par un laboratoire associé, sur le virus de l'hépatite A, conforte d'ailleurs cette hypothèse.

La stabilité génotypique de la souche de M. cucumis, que l'on peut très probablement incriminée au regard de l'absence de résultats reproductibles, n'autorisait plus la poursuite de ces travaux tels qu'ils avaient été définis et nous a donc contraint à modifier sensiblement les objectifs initiaux du projet. Il convient, en effet, de rappeller que ces objectifs portaient sur la détection et la caractérisation de l'activité anti-HSV de *M. cucumis*. Ils visaient, dans le même temps, à définir un ensemble de paramètres fermentaires permettant une transposition plus facile des cultures de laboratoire à un stade pilote, si l'activité le justifiait. Aucune données n'ayant pu être recueillies sur l'utilisation en fermentation de cette espèce fongique, le projet a nécessité une phase d'essais préliminaires sur le comportement de la souche en milieu liquide (notamment en

réacteur agité) et sur l'influence du milieu de culture (réalisés à l'aide de plans d'expériences non présentés dans ce rapport).

Lors de la première phase du projet, en plus de quelques cultures préliminaires en réacteurs classiques réalisées à St Etienne, nous avons eu l'occasion d'effectuer une série de fermentations en réacteurs pulsés au sein de l'Institut de génie des Procédés (dirigé par le Professeur H. Brauer) à l'Université Technique de Berlin. Cet ensemble de fermentations a révélé une grande fragilité de la souche aux conditions d'agitations, notamment dans les conditions très spécifiques (Brauer, 1991) obtenues dans le réacteur pulsé. Ainsi, selon le mode de préparation de l'inoculum, une culture initiale sous forme de petits pellets ne produisait aucune croissance (même avec une fréquence d'agitation minimale) et dégénérait rapidement alors qu'un inoculum initialement broyé permettait une croissance normale. Mais, nous ne possédions alors pas les moyens de quantifier les paramètres morphologiques qui auraient permis d'interpréter ces différentes influences.

Le manque de données sur la morphologie mycélienne des Basidiomycètes en cultures immergées et la constation que les méthodes d'analyses d'images récemment développées (Reichl *et al.*, 1992; Cox et Thomas, 1992) s'avéraient difficile à appliquer à nos cultures nous ont conduit à développer une nouvelle méthode de caractérisation morphologique des agrégats mycéliens et à l'appliquer à deux souches caractéristiques des ordres majeurs des Basidiomycètes.

Le choix de la seconde souche, *F. fomentarius*, entre dans ce cadre et a notamment été motivé par la volonté de rechercher un lien potentiel entre production métabolique et morphologie mycélienne à l'echelle macroscopique (agrégats et pellets). En effet, elle représente un exemple d'une souche productrice d'un type de métabolites souvent décrit chez les Basidiomycètes, les polysaccharides, et possède un comportement cultural bien distinct de celui observé chez *M. cucumis*.

Cette souche nous a permis, par ailleurs, de déceler une activité immunosuppressive, jusqu'alors non décrite, à partir d'une fraction peptido-polysaccharidique isolés dans le surnageant de culture et dans la fraction extractible et soluble de la biomasse. Les résultats des analyses de la structure des composés actifs ont montré la prédominance d'un hétéroglucane (glucose, mannose, galactose) ramifié associé à des protéines minoritaires (≈ 5 à 8%). Ces résultats appellent cependant des analyses complémentaires pour définir plus précisément la nature des liaisons osidiques et leur répartition. Une étude spécifique de la fraction peptidique, pour déterminer notamment son rôle dans l'activité immunosuppressive, serait également nécessaire. Ce n'est seulement qu'à l'issue de ces analyses complémentaires que les potentialités immunologiques de ces métabolites pourraient être explorée de façon plus

approfondie. On peut notamment penser que la connaissance de la structure détaillée de ces composés présenterait un grand intérêt pour la compréhension des mécanismes d'immunosuppression mis en évidence et qu'elle fournirait des données sur la relation structure / fonction de tels agents.

La suite de l'étude va être consacrée à la description des caractères morphologiques de la biomasse en cultures immergées de ces deux souches de Basidiomycètes. L'absence de productions métaboliques détectables chez *M. cucumis* a évidemment concentré nos observations sur la croissance et différents paramètres influençant son déroulement. Pour *F. fomentarius* , en revanche, nous nous sommes attachés définir l'existence d'une relation entre les paramètres morphologiques de la biomasse et ses capacités de production des polysaccharides.

Chapitre III

L'analyse d'images: Principes et applications à la morphologie mycélienne

Chapitre III

L'analyse d'images: Principes et applications à la morphologie mycélienne

Si les concepts de l'analyse quantitative des images sont relativement anciens (Haas *et al.*, 1967), leur développement en terme d'applications s'est longtemps heurté aux limites technologiques qui imposaient des temps de traitement trop longs pour être utilisables en pratique. Les progrès considérables effectués ces dernières années dans le domaine de la technologie vidéo, de la puissance et de la vitesse de calcul des ordinateurs ont permis une forte baisse du rapport coût / performance des systèmes d'analyse d'images. Cette évolution a ainsi contribué à la large expansion des applications de l'analyse d'images (Vecht-Lifshitz et Ison,1992). Celles-ci peuvent concerner tous les domaines où le suivi et l'étude d'un phénomène font traditionnellement appel à la vision humaine pour y effectuer des tâches répétitives de quantification. Notons toutefois que si les systèmes informatiques sont plus performants que l'association œil / cerveau humain pour leurs capacités de mémoire, de quantification et de reproductibilité, ils demeurent inférieurs en termes de capacités de discrimination, d'interprétation ou de réponses face à des artefacts (Jackman, 1989).

L'importance économique des microorganismes filamenteux et les relations qualitatives établies depuis longtemps entre morphologie et métabolisme ont placé la morphologie mycélienne parmi les domaines où l'analyse d'images est rapidement apparue comme une méthode d'étude riche d'enseignement. Ainsi, divers algorithmes ont été proposés ces dernières années pour décrire les

hyphes libres et leurs ramifications; quelques autres (moins nombreux) ont concerné la forme agrégée (agrégats et pellets) (Thomas, 1992).

Ce chapitre se compose d'un rappel bibliographique consacré, d'une part, aux bases théoriques de l'analyses d'images, c'est à dire aux concepts de morphologie mathématique et à leur traduction en terme de numérisation, d'autre part, aux applications développées dans le domaine des biotechnologies et plus particulièrement des fermentations à microorganismes filamenteux. Pour ce second thème, nous détaillons tout d'abord spécifiquement les algorithmes destinés à la caractérisation de la morphologie mycélienne puis nous abordons les apports de ces méthodes à la connaissance des procédés de cultures de ce type de microorganismes.

III.1. L'ANALYSE D'IMAGES

III.1.1. Principes de l'analyse d'images

L'analyse d'images rassemble les concepts de morphologie mathématique et les procédés informatiques permettant d'extraire et de quantifier les informations d'une image. Elle comprend deux groupes de méthodes selon qu'elles concernent l'identification des formes par comparaison à des images types (reconnaissance des formes) ou l'analyse morphologique de structures quantifiées par des paramètres (analyse quantitative d'images) (Coster et Chermant, 1985).

On peut distinguer trois étapes lors d'une procédure d'analyse d'images.

La première est l'**acquisition** de l'image. Elle requiert des conditions d'illumination et de grossissement optique de l'objet propices à la mise en évidence des caractéristiques recherchées sur les objets analysés. L'étape de prise de vues est en effet d'une importance capitale pour l'exploitation ultérieure de l'image et un grand soin doit donc être accordé à la résolution des problèmes pratiques rencontrés lors de cette phase. Le système de "capture" est généralement constitué d'une caméra vidéo à tube ou CCD (charge coupled device) mais peut aussi consister en une table de numérisation, un scanner ou un densitomètre. Une carte de numérisation transforme ensuite le signal analogique vidéo en données numériques (Mantripragada *et al.*, 1990).

La seconde étape porte sur **l'amélioration de l'image** acquise pour en faire ressortir les caractéristiques qui devront être analysées. Cette étape comprend la réduction du bruit de fond, l'élimination des zones non représentatives, la séparation des objets à mesurer du fond de l'image (segmentation).

La dernière étape est l'étape de **caractérisation et de mesure**. Elle consiste en la détection et la reconnaissance des propriétés des objets, la mesure des paramètres caractérisant ces propriétés et leur classification (traitement des données) (Mantripragada *et al.*, 1990).

III.1.2. La numérisation et notions de réseau

La **numérisation** est l'étape de conversion des images en un format utilisable par l'ordinateur. L'image vidéo est décomposée en une grille de points, appelés "pixels" (picture elements), affectés d'une valeur correspondant à l'intensité lumineuse mesurée en chacun de ces points. Les images en noir et blanc ou monochrome peuvent être digitalisées par une mesure unique de l'intensité (le niveau de gris) alors que les images couleur nécessitent une mesure de l'intensité à trois longueurs d'ondes (rouge, vert, bleu). Le format de numérisation le plus courant correspond à une grille de 512 x 512 pixels, affectés chacun d'une valeur entière sur une échelle

d'intensité lumineuse de 0 à 255. Une telle image occupe 256 Kilooctet de mémoire. Toute transformation ultérieure de l'image se traduit par une transformation mathématique de chacune des valeurs des pixels composant l'image. L'opération de transformation doit donc être répétée 262144 fois (512 x 512). Ceci exprime clairement que le développement des applications de l'analyse d'images a largement été conditionné par l'augmentation de la vitesse et de la taille mémoire des ordinateurs (Jackman,1989).

L'étape de numérisation aboutit à la représentation d'un objet issu d'un espace continu (une image) dans un espace discrétisé (les pixels). Cette représentation discrète nécessite la définition de quelques règles pour permettre une représentation unique, non ambiguë de l'objet continu. L'ensemble des pixels est organisé selon une structure géométrique élémentaire et constitue un **réseau**. En reliant le groupe de pixels adjacents à un pixel central on définit la figure géométrique élémentaire caractéristique du réseau, la **maille**. Celle-ci peut être de type carré ou hexagonal selon l'appareil considéré (Figure III.1).

Un objet digitalisé est donc constitué de l'ensemble des points appartenant à l'intersection du réseau avec l'espace continu délimitant l'objet. En représentation binaire, les points du réseau contenus dans l'objet sont affectés de la valeur 1, les autres de la valeur 0. La connaissance des points du réseau correspondant à une intersection non nulle avec un objet de l'image n'est cependant pas suffisante pour décrire complètement un objet. La notion de périmètre notamment devient ambiguë dans un espace discrétisé si on ne définit pas au préalable la façon dont deux points voisins doivent être reliés.

A un réseau donné on associe donc un **graphe** composé de l'ensemble des sommets appartenant au réseau de points et de l'ensemble des arêtes définies à partir de deux paires de points. Ces arêtes peuvent se rencontrer hors de leur extrémité mais ne doivent pas contenir de noeuds du réseau en dehors de leurs extrémités. Les graphes les plus courants associés respectivement aux deux réseaux généralement utilisés sont présentés sur la Figure III.2.

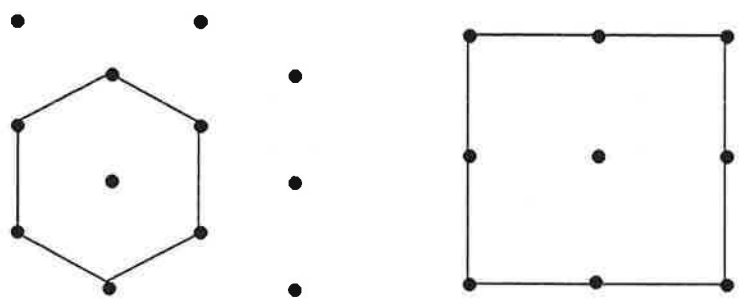


Figure III.1: Maille hexagonale et maille carré.

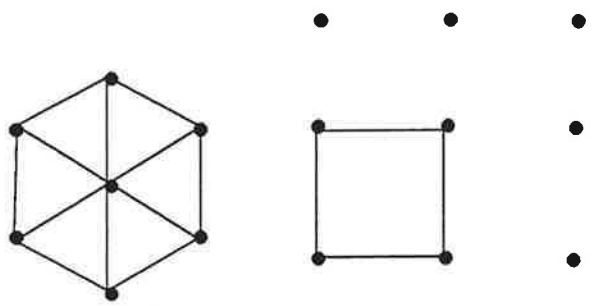


Figure III.2: Graphe hexagonal et graphe carré

La numérisation d'une image en niveau de gris nécessite une transformation de la fonction représentant l'amplitude du signal en chaque point vers une échelle discrète. Cette transformation, ou anamorphose, est réalisée par l'intermédiaire de mémoires rapides spécifiques appelées **LUT** (Look Up Table ou table de conversion). Dans certains cas, il peut être intéressant d'étendre ou de comprimer un intervalle de niveau de gris afin de modifier le contraste et ainsi d'améliorer la différentiation des objets de l'image. On peut alors utiliser une fonction de LUT ou transformation d'anamorphose non linéaire. Ainsi, par exemple, une LUT logarithmique renforce le contraste dans les faibles valeurs de niveaux de gris (zones sombres) et l'amoindrit dans les fortes valeurs (zones claires) (Coster et Chermant, 1985).

III.1.3. Rappels de morphologie mathématique

Ces rappels ont pour objet de présenter succinctement les opérations de base utilisées en analyse d'images et fondées sur des concepts de morphologie mathématique. Ces concepts sont issus des travaux de Haas *et al.*(1967) et sont présentés ici à partir de la synthèse réalisée par Coster et Chermant (1985).

III.1.3.1. Principes

La morphologie mathématique repose sur la comparaison d'objets à un objet de géométrie connue, appelé **élément structurant**, en les transformant à l'aide d'opérations ensemblistes.

Dans un espace discrétisé ou digitalisé, la notion d'élément structurant prend un caractère spécifique qu'il convient de préciser. D'après les définitions de réseau et de graphes associés données en 3.1.2, les pixels d'un hexagone élémentaire (maille hexagonale) constituent le **voisinage** du pixel central. Dans le cas d'un réseau carré, le voisinage d'un point est le carré de taille 2 centré sur ce point. En attribuant des valeurs 1 ou 0 à chacun des points de l'hexagone élémentaire, on forme une **configuration de voisinage** dont un exemple est présenté sur la Figure III.3.

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
DES MINES DE SAINT-ETIENNE
Bibliothèque du Centre SPIN

	1	
0		**1**
	0	
0		**1**
	1	

Figure III.3: Configuration de voisinage

Chacune de ces configurations constitue elle-même un élément structurant pouvant servir de base à une transformation de l'image.

III.1.3.2. Opérations de Base du traitement d'images

Transformations

L'extraction et la mesure des paramètres caractérisant la structure d'un objet sont réalisées par transformations successives de l'image. Ces transformations sont de deux types:

• <u>les transformations ensemblistes classiques:</u>

- l'union ("ou" en logique Booléenne)
- l'intersection ("et")
- la différence ("ou exclusif")
- la complémentation

• <u>les transformations en tout ou rien par un élément structurant:</u>

Pour définir ces dernières transformations, considérons un objet X constitué d'un ensemble de points de l'espace R^2 et un élément B de forme géométrique connue. Pour faciliter la représentation, nous allons considérer, ici, un cercle. Ce cercle, qui constitue l'élément structurant, est déplacé de façon à ce que son origine (le pixel central) occupe toutes les positions de l'espace R^2 défini par les limites de l'image. Pour chaque position, on pose une question relative respectivement à l'union, à l'intersection, ou à l'inclusion de B avec ou dans X. L'ensemble des points correspondants à des réponses positives forme un nouvel ensemble appelé l'**image transformée** ou **transformé de X**.

Deux transformations de ce type sont particulièrement importantes et vont permettre d'illustrer la définition générale présentée ci-dessus. Ce sont l'érosion et la dilatation.

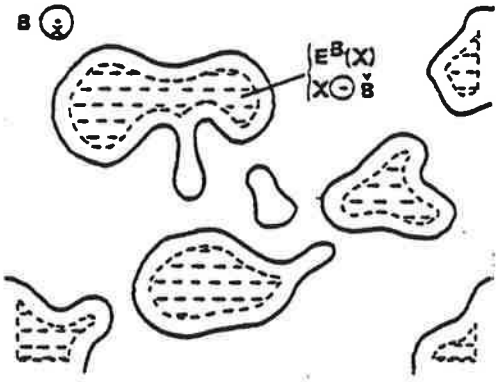


Figure III.4: Erosion d'un ensemble d'objets par l'élément structurant B.

L'érosion

Une transformation par érosion consiste à rechercher l'ensemble des points pour lesquels l'élément B est complètement inclus dans X (soit l'ensemble des points tels que B U X = X). Le nouvel ensemble, appelé érodé de X, est noté $E^B(X)$. En pratique, il apparaît qu'une érosion de X par un élément structurant B revient à retirer une couche périphérique de pixels de même épaisseur que B (Figure III.4). Cette opération permet de supprimer les petits objets isolés (les "îles") ou les fines extensions d'un objet (les "isthmes" ou "presqu'îles") plus petits que B.

La dilatation

L'opération de dilatation définit l'ensemble des points pour lesquels B touche l'objet X (c'est à dire l'ensemble des points pour lesquels l'intersection de B avec X est non nulle). La dilatation revient à ajouter une couche de pixels d'épaisseur équivalente à B, ce qui a pour conséquence de boucher les "canaux", les "lacs" ou les "baies" plus étroits que B (Figure III.5).

Pour un ensemble digitalisé, une transformation en tout ou rien se traduit par une transformation

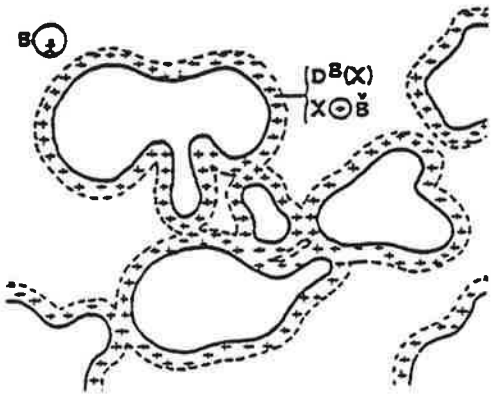


Figure III.5: Dilatation d'un ensemble d'objets par l'élément structurant B.

	1	
1		1
	1	
1		1
	1	

Figure III.6: Elément structurant d'une érosion.

	•	
•		0
	1	
•		•
	•	

Figure III.7: Configuration de voisinage des points frontière.

	•	
•		1
	0	
•		•
	•	

Figure III.8: Elément structurant d'une dilatation.

de voisinage. La transformation de voisinage par un élément structurant consiste à attribuer la valeur 1 à chaque point du réseau dont la configuration de voisinage est semblable à celle de l'élément structurant, la valeur 0 à tous les autres points. Ainsi, l'érosion est la transformation de voisinage par l'élément structurant formant l'hexagone élémentaire (Figure III.6).

Sur une image binaire où les points de l'objet X sont affectés de la valeur 1 et les points n'appartenant pas à X de la valeur 0, il apparaît que les points intérieurs de l'objet présentent la même configuration que l'élément structurant alors que les points frontière possèdent une configuration semblable à celle présentée sur la Figure III.7. A l'issue de la transformation de voisinage, ces points sont donc affectés de la valeur 0, ce qui conduit à la suppression de la couche périphérique de l'objet X.

De même, la dilatation d'un objet X digitalisé est le résultat de l'union de X avec son transformé par l'élément structurant représenté sur la Figure III.8.

L'érosion et la dilatation sont des transformations itératives. L'érodé de X par l'élément structurant B peut de nouveau subir une érosion par le même élément B et fournir un ensemble différent de l'ensemble initial. Deux érosions par un élément de taille 1 sont équivalentes à une érosion par un élément de taille 2. La même constatation reste valable pour la dilatation.

Les trois transformations décrites ci-dessous sont également très couramment utilisées.

L'ouverture

Une ouverture est une érosion suivie d'une dilatation de l'ensemble érodé, par le même élément structurant. L'ensemble "ouvert" est plus régulier et moins riche en détails que l'ensemble initial. L'ouverture adoucit les contours, coupe les "isthmes" étroits, supprime les petites "îles" et les "caps" étroits (Figure III.9).

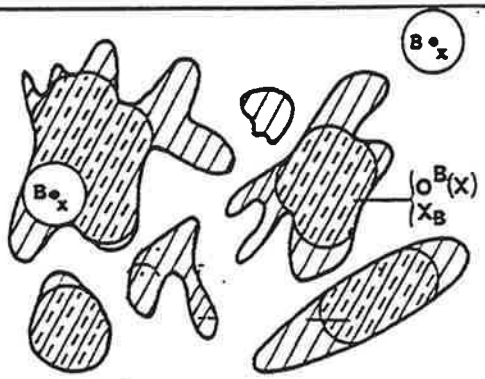


Figure III.9: Ouverture d'un ensemble d'objets par l'élément structurant B.

La fermeture

Une fermeture est une dilatation suivie d'une érosion de l'ensemble dilaté, par le même élément structurant. Un ensemble "fermé" est lui aussi moins riche en détails que l'ensemble initial. La fermeture bouche les "canaux étroits", supprime les "lacs" et les "golfes" étroits (Figure III.10).

L'ouverture et la fermeture, à la différence de l'érosion et de la dilatation, sont des

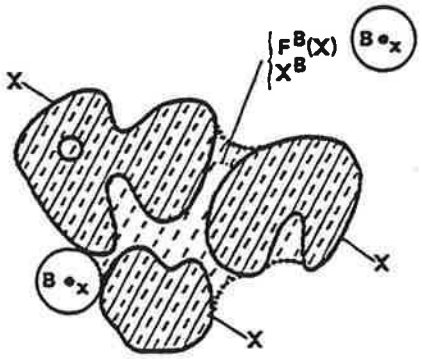


Figure III.10 Fermeture d'un ensemble d'objets par l'élément structurant B.

transformations idempotentes, c'est-à-dire qu'une ouverture, réalisée sur un ensemble ayant déjà subi une ouverture par le même élément structurant, est sans effet.

En revanche, comme l'érosion et la dilatation, l'ouverture et la fermeture ne sont pas homotopiques. Ces transformations ne préservent pas le nombre initial d'objets.

La squelettisation

La squelettisation consiste à réduire l'épaisseur des composants connexes d'un objet jusqu'à la valeur minimale qui conserve leur nombre. La réduction d'épaisseur se fait de manière isotrope.

Le squelette peut également être défini comme étant l'ensemble des centres des sphères de plus grands diamètres inscrites dans l'ensemble X, ou bien encore comme l'ensemble des points équidistants des bords de l'objet (Figure III.11). La squelettisation est une transformation

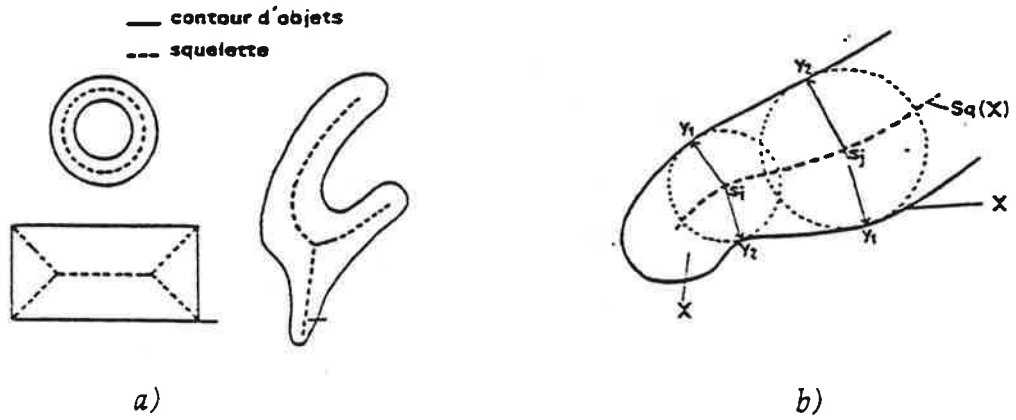


Figure III.11: a)Exemples de squelettes, b) squelette à partir du centre des sphères inscrites de plus grand diamètre.

idempotente; elle est homotopique si l'ensemble initial est un ensemble ouvert.

La squelettisation peut également être traduite en une transformation de voisinage. Toutefois, ce n'est pas une transformation en tout ou rien mais un amincissement (avec l'épaississement ce sont les deux autres catégories de transformations de voisinage). L'amincissement consiste à affecter une valeur nulle aux points d'un ensemble quand ceux-ci ont une configuration donnée.

	1	
•		1
	1	
0		•
	0	

Figure III.12: Elément structurant d'une squelettisation.

L'épaississement ajoute des points à un ensemble (affecte une valeur 1) aux endroits où ceux-ci présenteront ensuite la configuration de voisinage donnée. Le squelette est ainsi issu d'un amincissement par l'élément structurant présenté sur la Figure III.12.

III.1.4. Paramètres de mesures - Facteurs de forme

Aux paramètres classiques permettant de décrire un objet à deux dimensions tels que la surface, le périmètre, la longueur, l'épaisseur, etc., on peut ajouter quelques paramètres plus spécifiques.

- le diamètre équivalent: diamètre du cercle présentant la même surface que l'objet considéré,
- le rayon du plus grand cercle inscrit ou du plus petit cercle circonscrit,
- l'aire convexe: aire du polygone convexe passant par les sommets de l'objet ou encore intersection de l'ensemble des demi-plans contenant l'objet considéré,
- la circularité: $c=4.\pi.\text{Aire} / (\text{Périmètre})^2$,

L'aire convexe, quand elle est rapportée à l'aire réelle de l'objet, et la circularité sont des paramètres qui permettent de quantifier certaines caractéristiques morphologiques des objets analysés. En effet, un rapport aire convexe / aire réelle élevé révèle un objet au contour fortement denté, inversement une faible valeur de ce rapport caractérise un objet compact, au contour régulier. De même, une valeur de circularité proche de 1 révèle un objet assimilable à un disque alors que, quand ce paramètre tend vers 0, il indique soit une forte irrégularité du contour, soit un objet fortement allongé.

A ce titre, ces deux derniers paramètres entrent dans la catégorie des facteurs de formes. Toutefois, si l'ensemble des paramètres cités ci-dessus permettent assez bien de quantifier différentes caractéristiques de taille des objets étudiés, il n'existe malheureusement pas d'indice global permettant de décrire la forme d'un objet indépendamment de l'échelle à laquelle on l'examine et des propriétés que l'on souhaite mettre en évidence (Flook, 1987).

Flook (1987) propose de distinguer trois domaines pour l'examen de la morphologie d'une particule:

- **la morphologie externe**: elle décrit la forme observée à faible résolution (l'aire convexe, par exemple, s'applique à ce domaine),
- **la topographie**: elle concerne la configuration générale du contour (ou périmètre) décrit à une résolution moyenne,
- **la texture:** c'est le domaine de description des caractéristiques microscopiques de surface, seulement accessibles sur des images de haute résolution.

Les limites entre ces trois domaines sont évidemment assez floues et souvent arbitraires.

Pour mesurer des propriétés morphologiques, là encore, il est possible de considérer trois types de méthodes (Flook, 1987 - Coster et Chermant, 1985):

• **les facteurs de formes**: Les plus classiques et les plus simples à mesurer, ils consistent en des rapports de grandeurs métriques (longueurs, périmètres, surfaces,...) combinés de façon à fournir un paramètre sans dimension sensible à un aspect particulier de la forme. La circularité, la compacité (rapport de l'aire convexe sur l'aire réelle) et le rapport d'aspect (largeur / longueur) en sont des exemples.

• **l'analyse harmonique**: La plus connue de ces méthodes est celle utilisant les transformées de Fourier. Elle consiste à mesurer la longueur d'un vecteur radial reliant le centroïde d'une particule à son intercept avec le contour de la particule. En balayant le contour de la particule par une rotation de 2π, on génère une fonction périodique de la forme:

$$R(\vartheta) = A_0 + \sum_{n=1}^{+\infty} A_n.\cos(n.\vartheta - \phi_n) \qquad [3.1]$$

où Ø est l'angle de phase, A_0 la valeur moyenne du rayon sur une période de 2π et A_n l'amplitude de la $n^{ième}$ harmonique.

La connaissance des coefficients avec un degré de précision suffisant, permet de reconstruire la forme initiale. Toutefois, l'interprétation de ces fonctions périodiques reste délicate et les calculs assez lourds. Des méthodes statistiques d'analyse de données (telle que l'analyse en composantes principales, par exemple) sont nécessaires pour permettre d'identifier des groupes de particules présentant des morphologies analogues. Il est également possible d'utiliser les coefficients harmoniques pour comparer un objet à une forme de référence.

• **la dimension fractale**: Les mesures de périmètres sont sensibles à la résolution à laquelle elle sont effectuées. Ainsi, il apparaît que si l'on tente de décrire le périmètre d'un objet par un polygone régulier, dont les côtés ont pour longueur η, il existe parfois une relation linéaire entre le logarithme de $L(\eta)$, la longueur de l'estimation du périmètre, et le logarithme de η, le côté du polygone. Le nombre de côtés du polygone est alors: $\lambda.\eta^{(-D)}$, où λ et D sont des constantes.

La longueur du périmètre estimé est donnée par:

$$\lambda.\eta^{(1-D)}$$

d'où:

$$\ln(L(\eta)) = (1-D).\ln(\eta) \qquad [3.2]$$

(1-D) est donc la pente de la droite: $\ln(L(\eta)) = f(\ln(\eta))$, et le coefficient D est la dimension fractale de l'objet.

Cependant, toutes les particules ne présentent pas cette linéarité. Parfois, on observe une rupture de pente dans la représentation graphique de la fonction [3.2], qui se compose alors de deux demi-droites caractérisant respectivement le domaine de la texture et celui de la structure. Dans d'autres cas, aucune zone de la courbe ne peut être assimilée à une portion de droite.

Le tableau III.1.présente les méthodes d'analyse morphologique les mieux adaptées à un domaine particulier.

Méthodes de mesure	Facteur de forme	Analyse harmonique	Dimension fractale
Propriétés morphologiques			
Morphologie externe	Bonne	Bonne	Médiocre
Topographie	Bonne (analyse multifactorielle nécessaire)	Assez bonne (nombre d'harmoniques requis parfois excessif)	Moyenne (difficultés d'interprétation)
Texture	Médiocre	Médiocre	Bonne (spécialement pour des profils hautement texturés)

Tableau III.1: Validité des méthodes d'analyse morphologique selon le type de propriétés à caractériser (Flook, 1987)

III.1.5. Amélioration de l'image

Après les phases d'acquisition et de numérisation, certaines opérations peuvent être réalisées de façon à améliorer la qualité de l'image et à en faire ressortir les caractéristiques ou les zones à analyser. Toutefois si le but ultime est la quantification d'une propriété de certains éléments contenus dans l'image, il faut noter que tout traitement d'image, c'est-à-dire le changement d'une image en une autre, même afin de l'améliorer, peut modifier la propriété considérée. Ces traitements ne peuvent en aucun cas se substituer à une préparation appropriée de l'échantillon et à de bonnes conditions d'acquisition (Friel et Prestridge, 1994).

Parmi ces différentes opérations, on peut citer:

- **les corrections de l'illumination** (shading correction),

• **l'amélioration du contraste** par modification de la table de conversion, LUT (cf § III.1.2),

• **la réduction du bruit de fond:** l'utilisation des transformations de Fourier permet de convertir les informations spatiales d'une image en données de fréquence. Le bruit de fond, parce qu'il se caractérise par de brusques changements de l'intensité lumineuse sur un petit espace, est représenté, après transformation de Fourier, par des composants à haute fréquence. Il peut ainsi être distingué du reste de l'image et éliminé. Une autre méthode permettant de réduire le bruit de fond consiste à effectuer un moyennage sur plusieurs acquisitions d'un même image.

• **les convolutions:** ce type d'opération qui transforme la valeur d'un pixel en fonction des valeurs prises par ces voisins, correspond à des transformations de voisinage effectuées sur des images en niveau de gris. Ainsi, par exemple, un adoucissement du contraste peut être obtenu par une opération de moyennage au cours de laquelle un pixel prend la valeur moyenne de celles de ces voisins immédiats. Un autre exemple consiste à rechercher les valeurs minimales et maximales des pixels du voisinage (opération de type "min-max"). Si l'écart est au-delà d'une limite pré-définie, la valeur du pixel central est remplacée par la valeur du voisinage la plus proche de la sienne, sinon on lui affecte la valeur moyenne de ces voisins. Cela renforce les contrastes aux limites des objets (délimitation des contours accrue) et lisse le reste de l'image (Jackman,1989).

• **la détection des contours des objets:** Sur une image bien contrastée (où les objets se détachent relativement bien du fond), les contours peuvent être détectés en mesurant le gradient d'intensité lumineuse le long d'une ligne de pixel. Les bords de l'objet sont alors définis comme les points où le gradient subit une forte variation ou change de signe.

• **le seuillage:** Le seuillage (thresholding) est l'opération qui permet à l'opérateur de sélectionner les zones de l'image qui l'intéressent, en fonction de leur niveau de gris. On appelle aussi parfois cette sélection, une segmentation. Après détermination d'un intervalle de valeur (seuil inférieur et supérieur) sur l'échelle des niveaux de gris, on ne retient à l'issue du seuillage que les pixels dont l'intensité est compris dans cet intervalle. Le résultat du seuillage est une image binaire où les zones sélectionnées sont affectées de la valeur 1 (blanc), les autres de la valeur 0 (noir).On transforme ainsi une image numérique où, pour une échelle de 256 niveaux de gris, chaque pixel est codé en 8 bits, en une image binaire où chaque pixel ne nécessite plus qu'un seul bit. Ceci provoque évidemment la perte de toute information concernant les variations de niveaux de gris au sein des objets sélectionnés. Cette opération est le plus souvent interactive, ce qui permet à l'opérateur de contrôler l'effet de sa sélection. Toutefois, il existe des algorithmes de seuillage automatique basés par exemple sur la recherche d'un minimum de la variance des niveaux de gris d'une zone. L'efficacité de ces algorithmes est très variable.

• **les opérations de traitement morphologiques:** Les opérations de transformations décrites en 3.1.3.2 peuvent être utilisées afin d'améliorer l'image (opération d'érosion ou de dilatation en niveau de gris) ou d'en éliminer les composants indésirables. Ainsi, il est rare qu'une simple opération de seuillage permette d'isoler parfaitement les objets que l'on souhaite analyser. Généralement, l'intervalle de niveaux de gris nécessaire à la sélection complète des objets englobe des zones non représentatives qui apparaîtront comme autant d'objets sur l'image binaire. Lorsque ces zones parasites sont de taille inférieure à celle des objets à analyser, il est possible de les éliminer par érosion puis de reconstruire les objets érodés par comparaison avec l'image initiale. Seuls les petits objets, complètement érodés, ne seront pas reconstruits lors de la seconde phase. Inversement si les zones parasites sont plus grandes que les objets à analyser, une série d'érosions suivie d'une reconstruction peut permettre d'obtenir une image composée uniquement des zones parasites. Une différence (transformation ensembliste, ou exclusif) entre cette dernière image et l'image initiale fournit alors l'image des objets à analyser seuls.

III.1.6. L'analyse d'images couleur

L'utilisation d'un système d'analyse d'images couleur présente l'intérêt d'assurer une différenciation de zones dont les niveaux de gris sont identiques. Alors qu'un système d'acquisition monochromatique ne détecte que l'intensité ou la luminosité (brightness) d'un objet, un système couleur ajoute deux dimensions à la représentation de l'information contenue dans chaque pixel de l'image digitalisée. Ainsi, en analyse couleur, en plus de la luminosité, chaque pixel contient l'information sur la teinte (hue) et sur la saturation de la couleur dominante (Fermin *et al.*, 1991).

Deux modes de codage des couleurs sont utilisés. Dans le mode HSI (Hue Saturation Intensity) ou TSI (Teinte Saturation Intensité), la teinte définit la couleur spectrale ou longueur d'onde dominante. La saturation représente le degré auquel le blanc est mélangé à la longueur d'onde dominante. Une couleur fortement saturée est spectralement pure, alors qu'une couleur faiblement saturée est associée au blanc —le rose est du rouge insaturé. L'intensité (I) caractérise le nombre de photons reçus par la caméra ou encore la réflectivité intrinsèque de l'objet ou sa transmissivité.

L'autre mode de codage, le mode RGB (Red Green Blue) ou RVB(Rouge Vert Bleu) décompose l'image en utilisant trois canaux d'acquisition respectivement sensibles à la gamme spectrale correspondant au rouge, au vert et au bleu. Une couleur rouge saturée, par exemple, est traduite ici par une forte valeur du signal sur le canal rouge et des valeurs nulles sur les canaux vert et bleu. En revanche, le rose est traduit par une forte valeur sur le canal rouge mais par des valeurs basses mais non nulles sur les autres canaux. Un changement de luminosité affecte simultanément les trois canaux. Enfin, la saturation est définie par des rapports entre les trois

canaux. Il n'y a pas de correspondance directe entre les modes HSI et RGB mais la plupart des analyseurs utilisant les modes couleur possèdent des algorithmes de conversion permettant le passage de l'un à l'autre.

L'utilisation de l'analyse couleur s'impose si les objets à analyser présente des valeurs d'intensité qui ne permettent pas de les différencier du fond ou d'une autre classe d'objet. Les applications de la couleur se rencontrent notamment dans des domaines tels que l'histologie où l'utilisation de colorants spécifiques est souvent le seul moyen de différencier les zones cellulaires recherchées. Toutefois, il faut noter que dans le cas d'images suffisamment contrastées, un analyse monochrome peut s'avérer satisfaisante et doit alors être préférée à une représentation couleur. Cette dernière occupe en effet, une place mémoire trois fois plus importante, ce qui rallonge d'autant le temps de traitement. Chaque pixel est ici codé en 24 bits.

III.2. APPLICATION DE L'ANALYSE D'IMAGES EN BIOTECHNOLOGIE

En biologie, un grand nombre de méthodes d'étude font appel à la vision, souvent par l'intermédiaire de la microscopie, pour détecter la présence d'un caractère ou d'un phénomène et suivre son évolution. Ces méthodes représentent des applications potentielles de l'analyse d'images. Celle-ci peut en effet apporter une plus grande précision et rapidité lors de la mesure des paramètres recherchés. Les applications de l'analyse d'images dans le domaine de la biotechnologie ont été récemment passées en revue par Vecht-Lifshitz et Ison (1992). Elle sont rassemblées dans le tableau III.2.

Les applications concernant les microorganismes filamenteux feront l'objet d'un chapitre particulier (§ III.3); nous n'évoquerons donc ici brièvement que les autres applications.

Numération et détection de microorganismes unicellulaires

Le comptage des colonies bactériennes est une technique microbiologique appliquée en routine dans les laboratoires de contrôle. L'analyse d'images est particulièrement adaptée à la réalisation de cette tâche répétitive. Elle permet en outre, une détection précoce des micro-colonies et un comptage rapide (1s par boite) (Pover, 1990a). Le taux de croissance de bactéries isolées peut aussi être suivi (Vecht-Lifshitz et Ison, 1992).

Si dans le cas de cultures pures en milieu liquide, l'analyse d'images est en concurrence avec des solutions moins chères et plus simples (telles que la turbidimétrie ou la conductrimétrie), elle présente un intérêt certain dans le cas de cultures mixtes. Elle a ainsi été appliquée au comptage spécifique de levures, lors de fermentations de jus de fruit, en présence d'une forte population bactérienne (Costello et Monk, 1985). Par ailleurs, une méthode de caractérisation morphologique d'une population de levures concernant la distinction des cellules isolées, des

Microbiologie	• quantification de la croissance et viabilité cellulaire, • estimation de la biomasse, • mesure de la sensibilité aux antibiotiques, • adhésion, morphologie et mobilité microbienne, • morphologie et métabolisme des microorganismes filamenteux • cultures cellulaires
Recherche biomédicale	• enzymologie • biologie moléculaire et génie génétique • Histopathologie et neuropathologie
Matériaux et techniques biologiques	• cultures cellulaires humaines et de mammifères
Industries alimentaires	• Détection et évaluation de contaminations

Tableau III.2: Domaine d'applications de l'analyse d'images en Biotechnologie (Thomas, 1993).

cellules bourgeonnantes et des agrégats a été proposée par Pons *et al.*(1993).

L'association de l'analyse d'images avec des techniques de coloration telles que l'épifluorescence (Direct EpiFluorescent Technics) peut permettre la reconnaissance spécifique d'espèce bactérienne mais aussi la détection et la numération dans des milieux complexes (alimentaires ou pharmaceutiques par exemple). Par l'utilisation de l'acridine orange comme colorant, il est également possible de différencier les cellules vivantes (fluorescence orange) des cellules mortes (fluorescence verte) (Pover, 1990b).

L'estimation de la concentration en biomasse passe souvent par l'établissement d'une corrélation avec le volume cellulaire. Or, la détermination de ce volume, à partir de représentations en deux dimensions, nécessite l'utilisation d'algorithme de reconstruction volumique pour des organismes non sphériques (cellules ciliées, bourgeonnantes, ovoïdes...) (Sieracki et al., 1989).

Sensibilité aux antibiotiques

La détermination de la concentration minimale d'inhibition (C.M.I.) sur boîte de Pétri par mesure du diamètre de la zone d'inhibition peut être réalisée par analyse d'images. Elle permet une détection de l'inhibition sur micro-colonies après 4h contre une nuit pour une mesure manuelle (Vecht-Lifshitz et Ison, 1992).

Cultures cellulaires

L'application de l'analyse d'images aux cultures cellulaires concerne là aussi la numération et l'estimation de la biomasse. Toutefois, elle prend un intérêt particulier pour des cultures qui généralement n'autorisent pas de prélèvement important.

Le mode d'adhésion et de colonisation du support peut également être étudié par cette technique, notamment lors de la formation de biofilm (Vecht-Lifshitz et Ison, 1992) ou de cultures sur microporteurs (Pichon *et al.*, 1991 - Pons *et al.*, 1992).

La reconnaissance précoce de micro-colonies d'hybridomes et la quantification de la concentration cellulaire en ADN ont aussi été décrites (Mantripragada et al., 1990).

Enzymologie

La mesure de réactions fluorométriques catalysées par des enzymes permet la détermination *in situ* de concentration en substrats et apporte des informations sur la localisation des sites réactionnels, les voies métaboliques suivies et la corrélation avec la morphologie cellulaire (Vecht-Lifshitz et Ison, 1992).

Biologie moléculaire

L'analyse d'images est maintenant couramment utilisée pour la lecture et la quantification des gels d'électrophorèse pour l'étude des protéines et des acides nucléiques. Là encore, l'utilisation de fluorophores couplés à des anticorps monoclonaux permet la détection et la localisation spécifique de macromolécules.

Histologie

L'histologie, domaine où l'analyse des coupes tissulaires pour y détecter des caractéristiques rares à valeur diagnostique est un outil essentiel, fait aussi largement appel à l'analyse d'images. La reconnaissance de cellules cancéreuses à partir de leur forme ou de leurs composants cellulaires est un exemple d'application. Le marquage par fluorescence de substances anti-tumorales afin de suivre leur localisation dans la cellule en est un autre (Vecht-Lifshitz et Ison, 1992).

Enfin, des séries d'images représentant des coupes 2D peuvent être combinées pour reconstruire une représentation 3D de la zone étudiée. Ce type de démarche est largement utilisé dans le domaine de l'imagerie médicale.

III.3. APPLICATION DE L'ANALYSE D'IMAGES AUX MICROORGANISMES FILAMENTEUX

La variabilité morphologique des microorganismes filamenteux est un thème d'étude majeur pour parvenir à une meilleure maîtrise des cultures de ces microorganismes, particulièrement important sur un plan industriel. Par ailleurs, les diverses formes morphologiques sont riches d'enseignement sur un plan physiologique puisqu'elles peuvent orienter le métabolisme ou, au contraire, être conditionnées par celui-ci.

Dans ce paragraphe, l'accent sera mis sur les méthodes et algorithmes d'analyses d'images, développés ces dernières années pour la caractérisation de ce type de microorganismes. La présentation des diverses méthodes reprendra une classification adoptée par Thomas (1992) dans un article passant ces applications en revue en fonction des formes morphologiques auxquelles elles sont plus spécifiquement consacrées. Les relations entre informations morphologiques et conséquences en termes de productivité et / ou de paramètres de conduite du procédé de fermentation seront détaillées dans le paragraphe § III.4.

III.3.1. Influence de la morphologie mycélienne sur le métabolisme

L'influence de la morphologie de la biomasse sur la productivité en métabolite a été fréquemment décrite. Les fermentations suivantes consituent des exemples où cette influence est particulièrement marquée:

- la production d'acide citrique par *Aspergillus niger* requiert une biomasse se développant sous forme de pellets (Clark, 1962);
- le pullulane, polysaccharide exocellulaire, produit par *Aureobasidium pullulans*, est obtenu plutôt avec une biomasse sous une forme ovoïde type "levure" que sous la forme filamenteuse (Mc Neil *et al.*, 1989), en relation avec de faibles taux de cisaillement (Wecker et Onken, 1991);
- la production de certaines enzymes comme l'α-galactosidase par *Mortierella vinacea* (Kobayashi et Suzuki, 1976) ou la polygalacturonidase par *Aspergillus niger* (Hemmersdorfer *et al.*., 1987) est fortement corrélée à une morphologie de type pellets;
- la forme filamenteuse de *Penicillium chrysogenum* est la plus favorable à la production de pénicilline (Smith et Calam, 1980).

Ces différents exemples traduisent le fait que la transition morphologique entre la forme dispersée du mycélium et la forme agrégée ne doit pas être considérée seulement comme un simple phénomème d'agglomération mécanique mais comme un véritable processus de

différenciation cellulaire. Chaque type morphologique possède alors un phénotype particulier caractérisé par ses propres activités métaboliques (Braun et Vecht-Lifschitz,1991).

Les limitations diffusionnelles dues à l'agglomération de la biomasse peuvent être l'un des facteurs déclenchant la différenciation métabolique. Ainsi l'apparition de gradients de substrats au sein des agrégats peut réduire la répression catabolique (Shinmio *et al.*, 1978) et orienter le métabolisme vers un métabolisme de type secondaire. Inversement, les limitations en oxygène peuvent être à l'origine d'une inactivation d'enzymes oxydatives comme dans le cas de la biosynthèse de la céphalosporine C (Zhou *et al.*, 1992). Enfin, certains métabolites "régulateurs", excrétés notamment en phase d'autolyse et s'accumulant au sein des pellets, ont également été proposés comme des facteurs inducteurs du métabolisme secondaire chez les Actinomycètes (Braun et Vecht-Lifschitz,1991). Ces derniers auteurs proposèrent d'ailleurs de tirer profit de ces caractéristiques pour utiliser la forme agrégée de la biomasse comme un outil d'investigation des régulations métaboliques et d'orientation spécifique vers la production de métabolites particuliers.

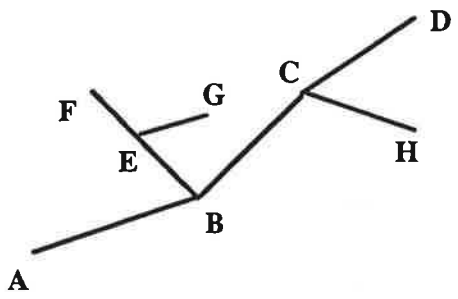
III.3.2. La forme dispersée - l'analyse des hyphes

Avant l'avènement des méthodes informatisées de traitement d'images, les études morphologiques de la biomasse mycélienne reposaient uniquement sur des observations microscopiques ou sur des mesures manuelles réalisées sur des photographies. Cette démarche, longue et fastidieuse, ne fournissait finalement que des descriptions qualitatives de la biomasse.

La première méthode semi-automatique de quantification de la morphologie mycélienne fut proposée en 1981, par Metz *et al.*(1981). Cette méthode est basée sur l'utilisation d'une table de numérisation sur laquelle sont projetées des photographies de particules mycéliennes, prises au microscope. La table de numérisation permet de déterminer les coordonnées des points de l'image touchés par un stylo électronique. Un programme calcule ensuite la distance séparant deux points sélectionnés . Lors d'une analyse, l'opérateur marque donc successivement avec le stylo, les extrémités de tous les segments représentatifs (hyphes principales et ramifications) de l'image.

Les paramètres morphologiques mesurés dépendent ensuite du programme de calcul associé. Ils concernent ici la longueur de l'hyphe principale, la longueur totale des hyphes, le nombre de ramifications et leur longueur et l'unité de croissance hyphale (Metz, 1976; voir Figure III.13). Les agrégats ne sont pas pris en compte.

Cette méthode se révèle toutefois inadaptée au traitement en routine d'échantillons de fermentations. En effet, elle reste particulièrement lourde en quantité de travail imposée à l'opérateur et longue pour obtenir une quantité de données suffisantes à un traitement statistique. Le temps nécessaire à l'analyse de 1000 particules mycéliennes par une méthode analogue a été



Longueur hyphale principale (µm) = ABCD

Longueur mycélienne totale (µm)= ABCD+BEF+CH+EG

Longueur adimensionnelle = ABCD / Diamètre hyphal moyen

Branches du 1er ordre = BEF et CH

Branches du 2nd ordre = EG

Nombre d'extrémités apicales = nombre de branches+2 (A,D,F,G,H)

Unité de croissance hyphale (µm) = Longueur mycélienne total / nombre d'extrémités apicales

Figure III.13: Représentation des paramètres morphologiques décrits par Metz (1976) (cité par Tucker , 1994). et mesurable à l'aide d'une table de digitalisation (Metz et al., 1981).

estimé à 83 h en incluant le temps de prises de vues et de développement du film photographique (Adams et Thomas, 1988).

Une méthode similaire légèrement améliorée par la projection de l'image microscopique sur un écran vidéo et l'utilisation d'une souris pour retracer le contour des hyphes a été appliquée à l'étude de la morphologie mycélienne de *Fusarium graminearum* en culture continue (Wiebe et Trinci, 1991). En 1988, l'utilisation d'un analyseur d'images pour la caractérisation morphologique de mycélium a permis de réduire le temps de traitement de 4 à 5 fois (Adams et Thomas, 1988). Avec cette dernière méthode, les images des particules mycéliennes sont squelettisées après seuillage (segmentation). La longueur des branches est alors directement calculée par un comptage de pixels par le logiciel d'analyse associé. Il faut cependant noter que cette méthode, proposée avec un analyseur d'images de la première génération, reste encore largement manuelle puisqu'un opérateur effectue la sélection des branches à analyser.

Le premier algorithme de traitement d'images permettant une analyse automatique de la morphologie mycélienne a été proposé en 1989, par Packer et Thomas. Sur l'image binaire obtenue après seuillage, les objets non représentatifs (particules du milieu, débris mycéliens, etc.) sont généralement petits et compacts et présentent une forme beaucoup plus circulaire que le mycélium ramifié. Un test définissant les objets sans trou et avec une valeur de circularité proche de 1, permet d'éliminer ces particules parasites (une correction interactive peut être introduite si nécessaire). Les particules mycéliennes restantes sont alors squelettisées. Seules les branches d'une longueur minimale sont conservées de façon à éliminer les artefacts de squelettisation. A ce niveau, deux populations sont distinguées; la forme dispersée du mycélium et la forme agrégée (les clumps). Cette dernière se différencie de la première par le fait que la représentation

Acquisition et amélioration du contraste: Imag numérique

Seuillage: Im binaire

Squelettisation ultime: réduit les objets compacts à un pixel unique et les "clumps" à des boucles

Les **"clumps" sont isolés** dans une image séparée; les deux images sont reconstruites

L'abscence de point de ramification perm **l'isolement des hyphes non ramifiées**

Suppression des gros débris une érosion sélective permet d'éliminer le mycélium plus fin que les débris. Ceux- ci sont reconstruits et éliminés par différence avec l'imag précédente.

Un critère de circularité permet d'**éliminer les petits débris,** plus "sphériques que le mycélium

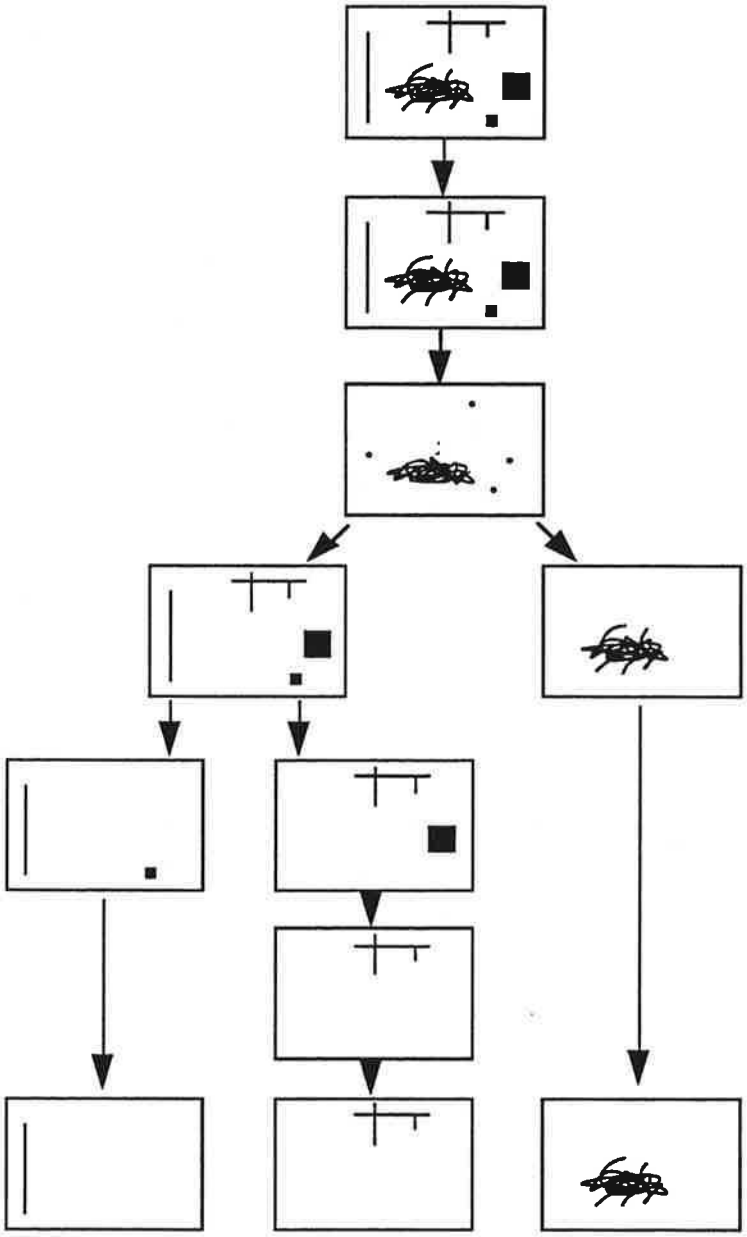


Figure III.14: Algorithme de différenciation et d'analyse des hyphes libres et des formes agrégées (Tucker et al., 1992)

binaire d'un "clump" squelettisé contient encore des trous. Les trous causés par l'enchevêtrement des hyphes à l'intérieur des agglomérats ne produisent en effet que des boucles à l'issue de la squelettisation. La fraction agrégée de la biomasse peut alors être exprimée en pourcentage de la surface projetée de la biomasse totale avant d'être éliminée de l'image. Pour chaque particule de la forme dispersée, le chemin connexe le plus long est déterminé et mesuré par un comptage de pixels. Il est défini comme représentant l'hyphe principale. Après suppression de l'hyphe principale, le second chemin connexe le plus long représente la plus longue branche. Les autres branches sont ainsi identifiées puis mesurées par répétition de cette procédure. Cette méthode automatique fournit les mêmes paramètres que ceux déterminés avec la table de numérisation (Metz *et al.*,1981) en seulement 90 min pour 1000 particules analysées. Elle fut appliquée à l'étude de bouillon de fermentation de *Streptomyces clavuligerus* et de *Penicillium chrysogenum.*

Tucker *et al.*(1992) ont complété cette méthode en lui associant une caractérisation plus complète de la biomasse sous forme agrégée (Figure. III.14). Ainsi en plus de leur aire projetée, la circularité des agrégats est utilisée pour définir l'irrégularité du contour des particules et donc l'importance des hyphes périphériques alors que le rapport de l'aire réelle sur l'aire convexe définit, lui, la "compacité" de la particule.

L'analyse de branches isolées est également rendu possible sur ce dernier algorithme par la définition d'un ordre de ramification (Figure. III.15). Cet ensemble de caractéristiques en fait à ce jour l'algorithme le plus complet pour l'analyse d'une biomasse filamenteuse ne présentant pas de pellets.

A côté des méthodes visant une caractérisation rapide de la biomasse d'un échantillon de fermentation, d'autres applications ont été développées dans le but de parvenir à une meilleure connaissance du processus de croissance des microorganismes filamenteux. Ainsi, le développement des premières ramifications après la germination d'une spore de *Streptomyces*, observée sous microscope dans une cellule de culture, a été étudié par une méthode d'analyse d'images semi-automatique (Reichl *et al.*, 1990a). Là également, un analyseur d'images effectue la mesure de segments isolés par un processus de squelettisation après une sélection interactive des ramifications à analyser. Cette méthode associée à une coloration par épifluorescence (à l'acridine orange) peut également s'appliquer à la mesure de la distance interseptale (Reichl *et al.*, 1990b). Un développement ultérieur a permis d'étendre la méthode à l'examen de la direction de croissance des hyphes ainsi qu'à la mesure des angles entre les branches et les hyphes mères (Yang *et al.*, 1992a). En divisant les hyphes en segments de même longueur l, un angle d'extension apicale α et un angle de ramification β ont été définis (Figure. III.16).

La distribution de la fréquence de ces deux angles peut être décrite par une distribution normale, centrée respectivement sur les valeurs α=0,2° et β=1,2°. Ceci décrit une croissance apicale des hyphes préférentiellement rectiligne avec une formation de ramifications perpendiculaires. En

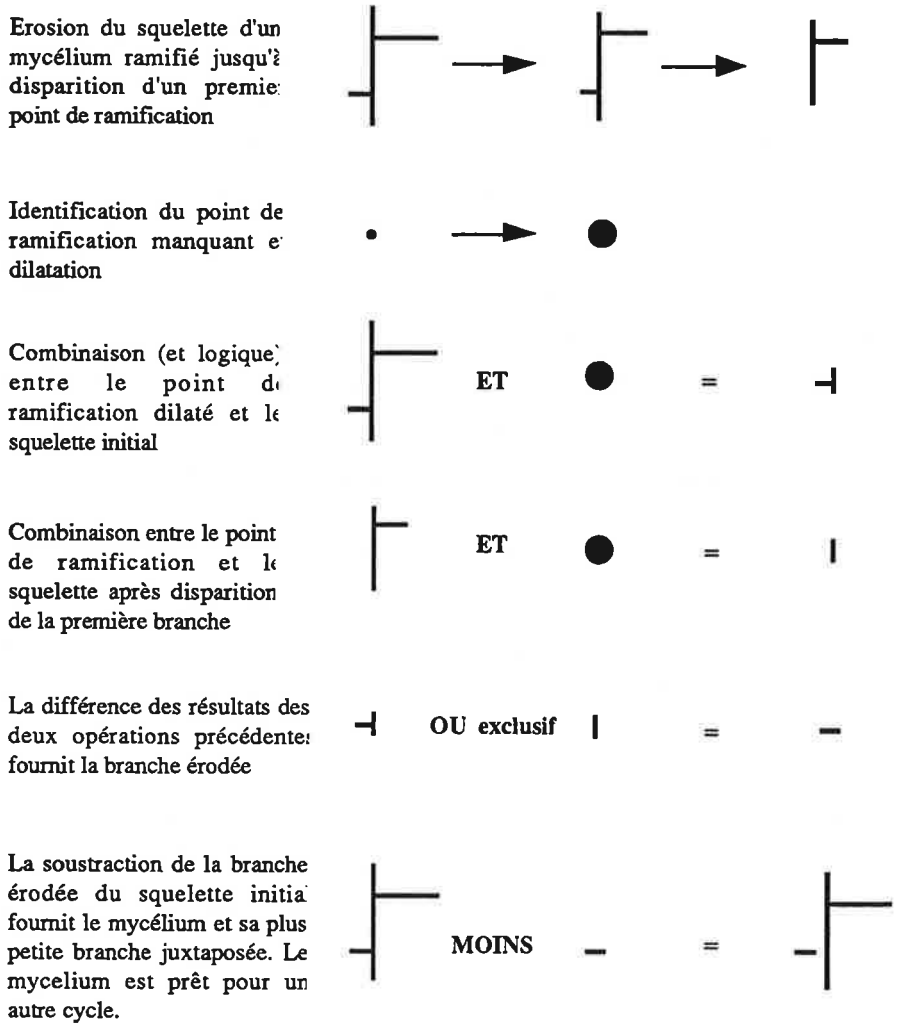


Figure III.15: Algorithme de détection et d'isolement des ramifications (Tucker et al., 1992)

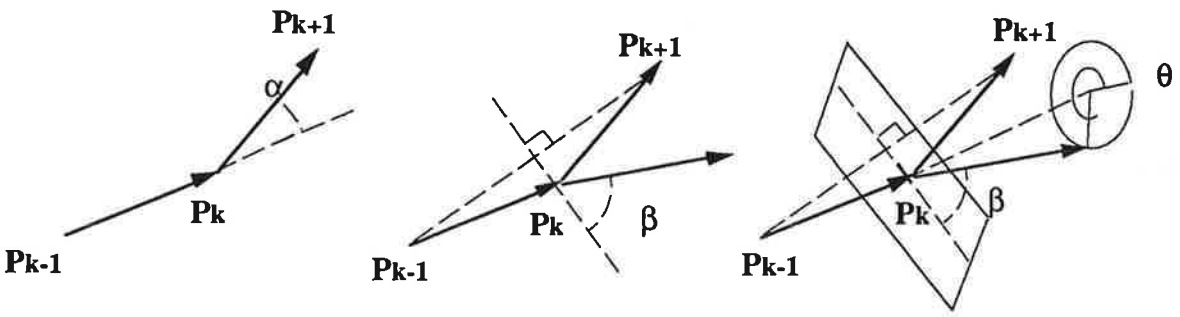


Figure III.16: angle d'extension apicale et de ramification (Yang et al., 1992)

plus des angles, le taux de croissance d'une hyphe individuelle, le taux d'extension linéaire d'une hyphe et le taux de croissance global du mycelium furent déterminés également.

En supposant l'absence de direction préférentielle de croissance lors des premières phases, ce processus peut être étendu à un développement en volume (trois dimensions). Sur ces bases, un modèle mathématique décrivant la croissance apicale, la septation et la ramification a été créé et permet de simuler le développement d'une spore jusqu'à la formation d'un pellet (Yang *et al.*, 1992b).

III.3.3. les pellets

Certaines caractéristiques génétiques et conditions de cultures particulières peuvent provoquer une croissance des microorganismes filamenteux sous forme de pelotes ou "pellets" constituées d'un réseau filamenteux plus ou moins dense. La formation de ce type morphologique n'est que rarement recherchée dans les applications industrielles. Il est en effet considéré comme une cause de non homogénéité de la biomasse, néfaste au contrôle du procédé de fermentation. Toutefois il existe certaines applications où les pellets sont souhaitables pour l'obtention d'une meilleure productivité ou de métabolites spécifiques. Parmi celles-ci, on peut citer les procédés de culture de champignons comestibles en milieu liquide où l'obtention de métabolites secondaires à propriétés aromatiques est recherchée (Zadrazil et Grabbe, 1983; Gross et Asther, 1989) et la production d'acide citrique par *Aspergillus niger* (Clark, 1962). Dans ce dernier article, la structure externe et interne des pellets est décrite selon une classification en trois types morphologiques qui est, depuis, la plus communément reprise. On distingue ainsi:

- les pellets "cotonneux" ou "pelucheux", constitués d'une zone centrale où l'enchevêtrement des hyphes est dense et compact et d'une zone périphérique beaucoup plus lâche,
- les pellets lisses et compacts qui présentent une extension radiale des hyphes périphériques très limitée,
- les pellets lisses et creux, dans lesquels le centre est en phase d'autolyse causée par des limitations diffusionnelles.

Si les paramètres de culture pouvant influer sur la formation et la structure des pellets ont été décrits depuis longtemps (Metz et Kossen, 1977), les méthodes quantitatives de caractérisation morphologique des pellets reposaient, jusqu'à il y a encore peu de temps, sur des observations microscopiques ou sur de fastidieuses et peu précises opérations de tamisages (Vecht-lifshitz *et al.*, 1990). Des progrès majeurs ont été proposés récemment avec le développement des techniques d'analyse d'images.

Reichl *et al.*(1992) ont proposé la première méthode d'analyse d'images permettant une caractérisation quantitative et reproductible des pellets au sein d'une biomasse filamenteuse.

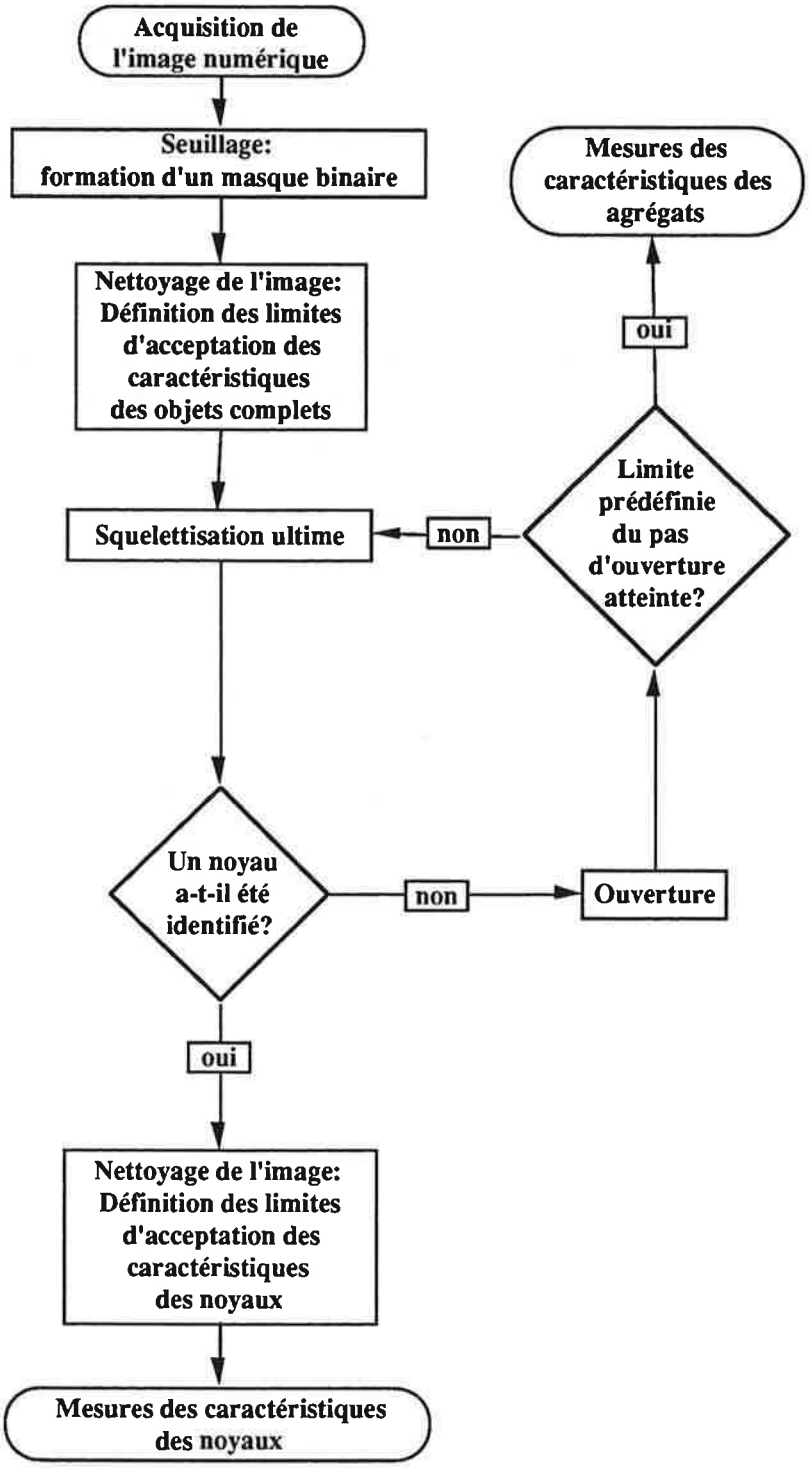


Figure III.17: Algorithme de reconnaissance et d'analyse des pellets selon un critère morphologique (Cox et Thomas, 1992)

Dans cette méthode, les particules de biomasse, observées sur un champ lumineux, sont tout d'abord détectées par un seuillage local (gradient en niveau de gris). Pour chacune des particules de l'image binaire ainsi obtenue, on détermine alors la valeur moyenne en niveau de gris de la zone qu'elle couvre sur l'image numérique initiale. La distinction entre pellet et mycelium dispersé ou agrégat non compact repose alors sur la comparaison de cette valeur moyenne avec une limite préétablie interactivement lors d'observations microscopiques. Un pellet, plus dense en son centre, présente une valeur moyenne de niveau de gris plus basse (objet plus sombre) que les agrégats filamenteux. La méthode permet d'obtenir la distribution en taille (surface projetée) des pellets, la taille moyenne et le pourcentage de la biomasse sous forme de pellet (en pourcentage de la surface projetée des particules totales). Enfin, un facteur de forme basé sur la perte relative de surface des objets après des ouvertures successives de pas croissant a été défini. Il permet de distinguer les pellets lisses, subissant une faible perte de surface après ouverture, des pellets au contour très dentelé, beaucoup plus affectés par la réduction de surface lors des ouvertures. Cette méthode qui ne nécessite pas de préparation spécifique de l'échantillon pourrait être adaptée à une analyse en ligne d'un échantillon de fermentation à condition de posséder un système de prélèvement adapté. Toutefois, la définition d'une limite établie subjectivement rend cette méthode fortement dépendante des conditions d'initialisation et donc difficilement standardisable pour d'autres laboratoires. En outre, la manipulation d'images numériques qu'elle impose, reste longue sur la plupart des analyseurs commerciaux. Typiquement, la durée d'analyse est de 2min 30s par image, soit 60 à 90 min pour l'analyse d'un échantillon complet.

Cox et Thomas (1992) ont développé un critère morphologique pour distinguer les pellets des agrégats filamenteux. Un pellet est défini, ici, comme une particule dont la représentation en projection sur un plan comprend une zone compacte (sans trou), réductible à un point central unique après une opération de "squelettisation ultime".

L'algorithme de traitement d'images développé pour appliquer ce critère est présenté sur la (Figure III.17) Pour améliorer le contraste lors de l'acquisition des images, les particules sont colorées au bleu coton et exposées sur un champ lumineux. La détection des particules s'en trouve ainsi facilitée lors du seuillage. L'ensemble des opérations de traitement est ensuite effectué sur l'image binaire issue du seuillage. Après une étape de nettoyage des images par érosion / reconstruction pour éliminer les débris mycéliens ou les particules du milieu, l'image binaire initiale est constituée des objets complets (noyau et zone filamenteuse périphérique). Cette image subit alors une première squelettisation ultime. Cette opération érode de façon isotrope le squelette d'une particule. Si la particule est compacte, la squelettisation ultime se poursuit jusqu'à l'obtention du pixel central; si la particule comporte des trous (formés par exemple par un enchevêtrement plus diffus à la périphérie qui laisse percevoir le fond de l'image), la squelettisation provoque la formation de boucles de pixels sur lesquelles une érosion isotrope est inopérante (Figure. III.18).

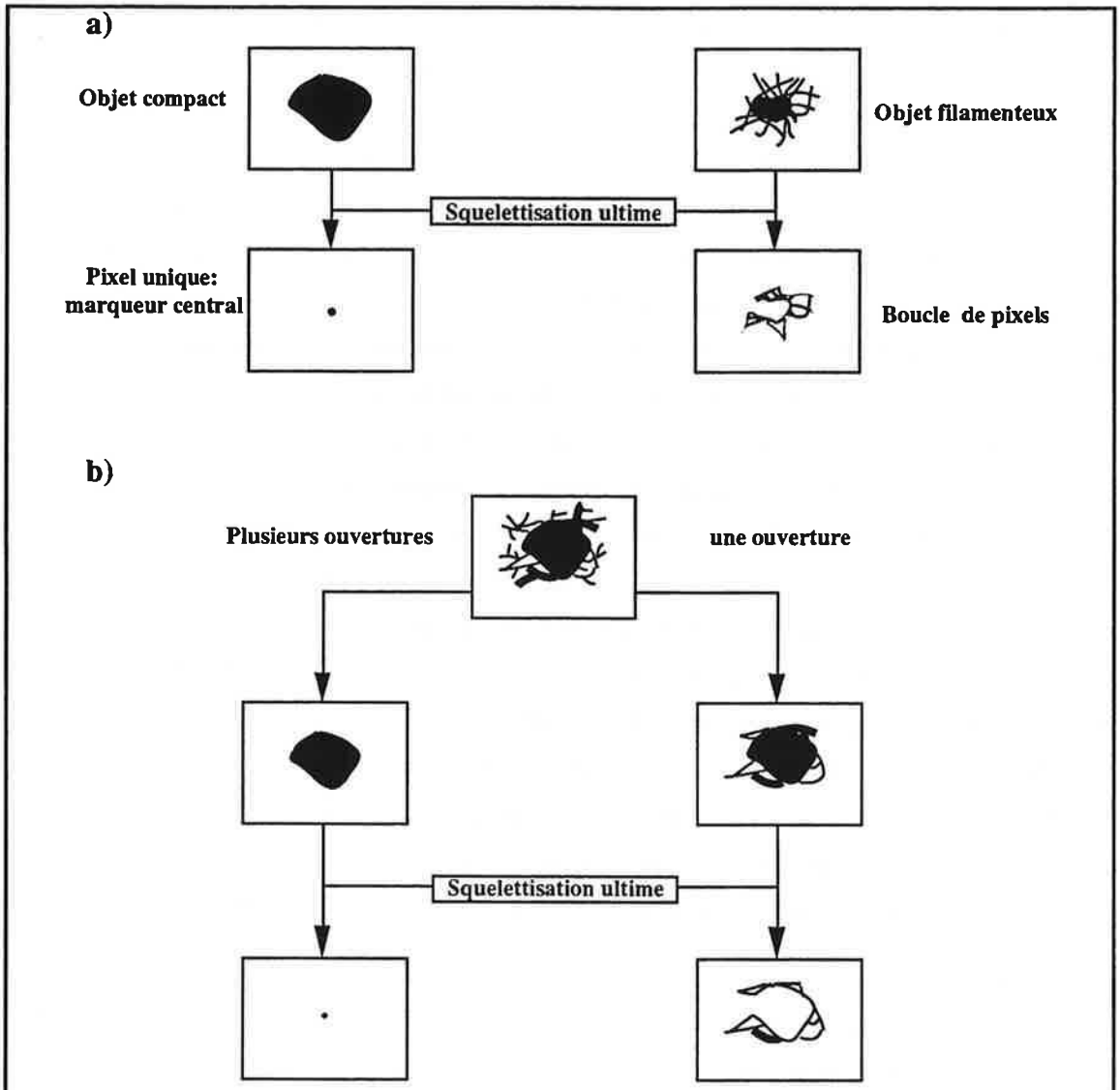


Figure III.18: a) Résultat d'une squelettisation ultime sur un objet compact et sur un objet filamenteux. b)Combinaison des opérations d'ouverture et de squelettisation ultime pour la reconnaissance du noyau d'un pellet. (Cox et Thomas, 1992)

A l'issue de cette première squelettisation, les pixels isolés constituent les marqueurs des objets compacts, les pellets. Ces derniers sont soustraits de l'image initiale. Une reconstruction de ces objets à partir des points isolés fournit l'image des noyaux des pellets. Les objets restants sur l'image initiale sont ceux qui présentaient encore des trous dans la zone annulaire. Une opération d'ouverture, qui supprime les fines protubérances périphériques d'un objet en modifiant peu les zones compactes, est alors réalisée. Une nouvelle squelettisation ultime permet d'identifier les objets compacts issus de l'ouverture. La reconstruction de ces objets à partir des marqueurs

fournit les noyaux des pellets dont la zone périphérique a été éliminée par l'ouverture. Cette combinaison ouverture / squelettisation est répétée un nombre de fois prédéfini (quatre fois dans le cas de l'étude publiée). A l'issue de ce processus, les objets qu'il n'a pas été possible d'ouvrir jusqu'à obtention d'une zone compacte sont considérés comme des agrégats mycéliens sans noyau.

Cette méthode permet la distinction et la caractérisation morphologiques de deux types de structures mycéliennes, les pellets et les agrégats mycéliens. En plus de la distribution en taille (surface projetée) de chacune des populations, les pellets sont caractérisés de façon plus fine par la mesure de la taille et de la circularité de leur noyau. La transition entre des pellets de type "lisses" et des pellets "pelucheux" a pu être détectée au cours d'une fermentation par l'utilisation du rapport de l'aire convexe (aire convexe / aire réelle) comme facteur de forme décrivant la compacité des objets. L'algorithme de traitement, réalisé uniquement à partir d'images binaires, est rapide (15 min. pour 212 particules réparties sur 49 images) et permet donc un suivi en routine d'une fermentation. Une fois définies les conditions d'initialisation (nombre d'ouverture pour la détection du noyau), il est de plus aisément répétable sur un autre système d'analyse. Toutefois, le critère morphologique tel qu'il est défini reste dépendant de la résolution de l'image. Celle-ci peut en effet faire varier le niveau à partir duquel sont détectés les premiers trous dans la zone périphérique. Ce paramètre peut notamment être important lors de l'analyse de gros pellets nécessitant une acquisition réalisée avec un faible grossissement et pour lesquels une superposition des couches filamenteuses périphériques peut provoquer une surestimation de la taille du noyau.

Dans une autre approche de la distinction entre pellets et agrégats, Pichon *et al.*(1993) ont proposé l'utilisation d'une ouverture en niveaux de gris (accentuant les zones sombres) sur l'image numérique initiale pour différencier les pellets des agrégats mycéliens de faible densité. Les noyaux des pellets, zones les plus sombres, peuvent alors être isolés plus facilement par seuillage. Toutefois, peu de précisions sont apportées concernant le choix du niveau d'ouverture numérique (opération longue) et du seuillage. Une autre distinction est ensuite réalisée entre les agrégats peu denses et la forme dispersée du mycélium sur la base du nombre de trous par objets. Pour cette dernière classification, l'utilisation d'un algorithme de logique floue est évoquée.

III.3.4. la différentiation hyphale

Un domaine complémentaire à l'analyse de la forme dispersée du mycélium est l'étude des formes de différenciation. Parmi celles-ci, la vacuolisation, la septation ou la germination des spores ont fait l'objet de méthode d'analyses d'images spécifiques.

La reconnaissance des zones actives du mycélium en distinguant différentes régions cytoplasmiques est une information importante dans l'optique d'une meilleure compréhension et

modélisation des productions de métabolites. Dans ce cadre, Packer *et al.*(1992) ont différencié deux zones au sein des hyphes de *Penicillium chrysogenum*: la région cytoplasmique active, en position apicale et la région subapicale dégénérée, présentant de larges vacuoles. La méthode de traitement d'images repose sur l'utilisation d'un double seuillage permettant de sélectionner respectivement les hyphes complètes et les zones cytoplasmiques apicales seules. La mesure de la fraction de chacune des zones corrélée avec une valeur moyenne de leur densité a permis d'établir une estimation précise de la concentration en biomasse même en présence de particules solides dans le milieu.

Une caractérisation plus complète de la vacuolisation de *Penicillium chrysogenum*: a été proposée par Paul *et al.*(1992) et appliquée au suivi de la production de pénicilline. En utilisant un plus grand grossissement, la taille, la forme et la fraction volumique des vacuoles individualisées ont pu être analysées par l'utilisation d'un double seuillage permettant, cette fois, la détection, d'une part, des zones non vacuolées des hyphes, d'autre part, des vacuoles seules. Des filtres de tailles, de circularité et des érosions sélectives complètent l'algorithme de façon à éliminer les artefacts de l'image.

La formation des septa et la mesure de la distance interseptale ont également fait l'objet de méthodes déjà évoquées au § III.3.2 (Reichl *et al.*, 1990 a et b).

Enfin, un algorithme de caractérisation de la germination des spores au sein d'un inoculum de *Penicillium chrysogenum* a récemment été décrit (Paul *et al.*, 1993). Cet algorithme permet la différenciation des spores non germées, des spores germées et des tubes de germination. Son originalité repose sur les étapes suivantes. Une première classification intervient sur l'image binaire nettoyée des spores totales. Elle distingue les spores germées des spores non germées sur la base de leur valeur de circularité. Les spores germées sont ensuite isolées de leur tube de germination par une succession d'ouverture de taille décroissante qui permet d'éliminer sélectivement les tubes de plus en plus fins. Par différence entre l'image reconstruite des spores germées et l'image des spores après ouverture, on obtient les tubes de germination. Les petites spores éliminées lors de la première ouverture (effectuée avec le pas d'ouverture maximal) sont récupérées par différence entre l'image initiale et l'image reconstruite après ouverture. L'image de ces petites spores constitue alors la nouvelle image initiale du processus de sélection. Elles subissent à nouveau une ouverture d'un pas inférieur à la précédente qui permet la nouvelle différenciation des tubes de moindre épaisseur.

III.3.5. les méthodes pour cultures en milieu solide

Bien que les applications industrielles des fermentations en milieu solide soient peu nombreuses, elles ne sont toutefois pas négligeables puisqu'elles englobent la majorité des techniques de production des champignons comestibles dont la plupart sont des Basidiomycètes. Sur substrat solide, l'analyse d'image a été utilisée pour le suivi de la progression d'un front de colonie avec

acquisitions régulièrement espacées dans le temps (Lemière *et al.*, 1991). Les paramètres étudiés sont la vitesse d'extension apicale, le diamètre des hyphes, la distance entre deux ramifications, la fréquence des ramifications.

Une méthode pour la mesure du taux d'extension apicale en milieu gélosé a également été proposée. Cela permettrait d'obtenir, de façon simple, une estimation du taux de croissance spécifique de *Gibberella fujikuroi* pour différentes compositions de milieu (Gonzales-Blanco *et al.*, 1993). La valeur du taux de croissance, μ, est déduite de l'équation suivante:

$$\mu = \ln(2).\ (Vr/Le) \qquad [3.3]$$

où Vr est le taux d'extension apicale et Le, la longueur hyphale moyenne. Cette valeur semble corrélable avec celle obtenue en culture liquide.

Plus généralement, l'application de l'analyse d'images au suivi de la croissance en milieu solide permettrait d'automatiser les mesures des paramètres d'extension hyphale définis par Trinci lors de mesures manuelles (Trinci, 1974) et de disposer de données plus complètes à incorporer dans le modèle de croissance qu'il a proposé (Prosser et Trinci, 1979).

Enfin une dernière méthode en milieu solide fait intervenir un mode d'acquisition couleur pour le suivi de la biodégradation d'un colorant révélatrice d'une activité peroxydasique (Jones *et al.*, 1993). Des acquisitions numériques, échelonnées au cours du temps, permettent par simple différence des images successives du plan H (Hue ou teinte) de déterminer la cinétique enzymatique de dégradation.

III.4. APPORT DE L'ANALYSE D'IMAGES À L'ÉTUDE DES RELATIONS ENTRE MORPHOLOGIE, CONDITIONS DE CULTURE ET MÉTABOLISME.

Les applications de l'analyse d'images au suivi morphologique de la biomasse en fermentation vont maintenant être présentées en fonction du type de relations qu'elles ont servi à mettre en évidence.

III.4.1. Relations entre la biomasse et les propriétés rhéologiques du milieu

La première corrélation entre un facteur morphologique de la biomasse, sa concentration et les propriétés rhéologiques du milieu fut proposée par Roels et al. (1974). Elle reposait alors sur une analogie avec la théorie appliquée à la description du comportement rhéologique des solutions de polymères. Metz *et al.* (1979), en utilisant une table de numérisation (Metz *et al.*, 1981, cf III.1.8.1.) pour la mesure des longueurs des hyphes et de leurs ramifications ont

proposé de décrire l'influence de la morphologie de la forme dispersée de la biomasse par l'équation générale [3.4].

$$RP = (C_M)^{\alpha}(L_e^*)^{\beta}(L_{hgu})^{\gamma}(L_t)^{\delta}(L_e)^{\varepsilon} \qquad [3.4]$$

où:

- RP est un paramètre rhéologique choisi parmi les suivants: Kc, la constante de la loi de Casson($(Nsm^{-2})^{0,5}$), τ_0, le seuil de contrainte de casson (Nm^{-2}), τ_b, le seuil de contrainte de la loi de Bingham (Nm^{-2}) ou η_∞, la viscosité à un gradient de vitesse de cisaillement infini (Nsm^{-2}),
- C_M est la concentration en biomasse (g/l),
- L_e^*, la longueur adimensionnelle des hyphes (longueur / diamètre),
- L_{hgu}, l'unité de croissance hyphale (µm),
- L_t, la longueur totale des hyphes (µm),
- L_e, la longueur de l'hyphe principale (µm).

Par régression multivariable à partir de leurs mesures expérimentales effectuées sur *Penicillium chrysogenum*, ils ont obtenu les relations numériques suivantes:

$$K_c = 5.454(C_M)^{1.0}(L_{hgu})^{0.6} \qquad [3.5]$$

$$\tau_0 = 1.67x10^{-4}(C_M)^{2.5}(L_e^*)^{0.8} \qquad [3.6]$$

Si cette étude fut d'une grande importance par les concepts nouveaux qu'elle introduisit, les valeurs numériques de ces corrélations et le choix des paramètres morphologiques jugés significatifs doivent toutefois être considérés avec précaution. En effet, la méthode de mesure utilisée ne permet pas de prendre en compte la morphologie des agrégats, qui, dans ce type de fermentation, peuvent représenter plus de 90% de la biomasse (Packer*et al.*, 1990).

La méthode d'analyse d'images développée par Tucker *et al.* (1992) permet non seulement de mesurer les caractéristiques de la forme dispersée mais aussi de décrire différents paramètres morphologiques des agrégats. En appliquant cette méthode aux fermentations de *Penicillium chrysogenum*, une relation similaire à l'équation [3.4] a pu être déterminée (Tucker et Thomas, 1993). Toutefois, la corrélation [3.7] avec les paramètres rhéologiques du bouillon de culture (RP) prend maintenant en compte, deux facteurs morphologiques des agrégats, la "rugosité" (ou

"roughness", issue de la circularité de la particule) et la "compacité" (ou "compactness", définie comme le rapport de l'aire convexe sur l'aire réelle).

$$RP = \text{constante}.\left(C_M\right)^{\alpha}(\text{Roughness})^{\beta}(\text{Compactness})^{\gamma} \qquad [3.7]$$

Les valeurs estimées par cette formule ont montré une excellente corrélation avec les valeurs rhéologiques mesurées tout au long de la culture (Tucker et Thomas, 1993) et ont donc confirmé l'importance de la forme agrégée sur la viscosité du bouillon de culture. Dans le cas de fermentations d'*Aspergillus Niger*, en associant cette méthode à une mesure en ligne des propriétés rhéologiques du bouillon de culture, Olvik *et al.* (1993) ont relié l'indice de consistance, K, de la loi-puissance, avec la "rugosité" (ou "roughness") des agrégats et la concentration en biomasse. La compacité apparait ici moins influente sur les propriétés d'écoulement du bouillon de culture.

III.4.2. Etude de la concentration en biomasse et de ses propriétés physiologiques

L'utilisation de l'analyse d'images pour évaluer la concentration en biomasse lors de fermentation de *Penicillium chrysogenum* a été décrite par Packer *et al.* (1992) (cf. § III.3.2.). La méthode permet d'obtenir une bonne estimation dans une gamme de concentration comprise entre 0,03 et 38 g/l. Une fois l'optimisation des temps de traitement réalisée, une telle méthode pourrait se révéler utilisable en routine et compétitive par rapport à la mesure classique du poids sec, notamment dans les cas où l'abondance des particules solides du milieu rend cette mesure peu fiable. D'autre part, la méthode d'analyse d'images est beaucoup plus riche d'information que la mesure conventionnelle. Elle permet en effet de caractériser également l'état de différenciation physiologique de la biomasse par une mesure de sa fraction cytoplasmique.

Cette caractérisation de l'état de différenciation de la biomasse est réalisée plus précisément par l'algorithme de Paul *et al.*(1992) où la taille, la forme et le nombre de vacuoles sont analysés. Bien que dans l'étude citée, aucune corrélation n'a pu être établie entre le taux de vacuolisation et la production de pénicilline, ce type de méthode pourrait se révéler particulièrement importante dans l'optique d'une modélisation du comportement métabolique de la biomasse dispersée en relation avec sa morphologie (interne ou externe).

Le taux de croissance est un autre facteur de variation de la morphologie hyphale. Cependant, seules des méthodes manuelles utilisant une table de numérisation ont été utilisées pour étudier ce facteur. Ainsi, Metz *et al.*(1981) ont montré une augmentation de la longueur moyenne des hyphes principales et une constance de l'unité de croissance hyphale lorsque le taux de croissance est augmenté en cultures continues de *Penicillium chrysogenum*. Pour *Fusarium*

graminearum, l'influence du taux de croissance est variable selon la souche (Wiebe et Trinci, 1991).

Souvent cité comme un facteur influant ultérieurement sur la morphologie de la biomasse (Van Suijdam et Metz, 1981, Braun et Vecht-Lifschitz,1991), l'inoculum a également fait l'objet de caractérisation par analyse d'images. Paul *et al.* (1993) ont testé l'influence du milieu de culture sur la germination et la viabilité des spores de *Penicillium chrysogenum*. Par ailleurs, il a été montré qu'une augmentation de la concentration initiale en spores lors de culture de *Penicillium chrysogenum* en erlenmeyers provoque une augmentation de la longueur moyenne des hyphes et du taux de ramification alors que dans le même temps la taille des agrégats et leur compacité décroit (Tucker et Thomas, 1993).

III.4.3. Influence de l'agitation sur la morphologie de la biomasse

L'intensité et la nature de l'agitation ont naturellement été considérées depuis longtemps comme des facteurs influant sur la morphologie mycélienne (Märkl et Bronnenmeier, 1985). Van Suijdam *et al.* (1981), en utilisant une table de numérisation pour les mesures morphologiques (Metz *et al.*, 1981), ont montré que lors de cultures continues de *Penicillium chrysogenum,* la longueur moyenne de l'hyphe principale diminuait avec l'augmentation de la vitesse d'agitation. Pour décrire cette évolution, ils ont défini un modèle basé sur la fréquence de circulation à travers une zone du réacteur où les forces locales de cisaillement sont plus fortes que les forces nécessaire à la cassure de la paroi hyphale. Une corrélation entre la longueur maximale des hyphes Le_{max} et le maximum local de dissipation d'énergie ε_{max} a ainsi été proposée:

$$L_{e\,max} \propto \frac{d^{0,38}}{(\varepsilon_{max})^{0,25}} \qquad [3.8]$$

où d est le diamètre des hyphes.

ε_{max} peut être exprimé en fonction de la vitesse d'agitation et des caractéristiques de l'agitateur:

$$\varepsilon_{max} \propto N^3 D_i^2 \qquad [3.9]$$

avec N, vitesse d'agitation (s^{-1}) et D_i, le diamètre de l'agitateur.

On peut alors en déduire le volume de la zone de dispersion des turbulences et, en introduisant la capacité de pompage de l'agitateur, exprimer la fréquence de cassure par la relation suivante:

$$\text{Fréquence de cassure} \propto \frac{L_e}{d^{0,38}} . N^{1,75} . D_i^{0,5} \qquad [3.10]$$

ou, pour des caractéristiques de morphologie mycéliennes données:

$$\text{Fréquence de cassure} \propto N^{1,75}.D_i^{0,5} \qquad [3.11]$$

Toutefois, les corrélations avec les résultats expérimentaux n'étaient pas satisfaisantes.

Pour le même type de fermentation et en utilisant la même méthode de mesure des paramètres morphologiques (une table de numérisation), Smith *et al.* (1990) ont observé une diminution de la longueur moyenne des hyphes principales et du nombre de leurs ramifications au cours de la fermentation. Cette diminution était plus rapide et plus marquée pour les fortes vitesses d'agitation (1000 - 1200 rpm). Ils ont montré de plus que la réduction de la longueur des hyphes s'accompagnaient d'une moindre production de pénicilline. Pour traduire l'effet de l'agitation sur la morphologie hyphale, ces auteurs ont modifié le modèle décrit par Vansuijdam *et al.* (1981) en y incorporant l'influence du temps de circulation. La relation de proportionnalité entre la fréquence de cassure et les caractéristiques de l'agitation devient alors:

$$\text{Fréquence de cassure} \propto \frac{P}{D_i^3.t_c} \qquad [3.12]$$

où P est la puissance développée par l'agitateur et t_c le temps de circulation (l'inverse de la fréquence de circulation $N.D_i^3/V$). Cette relation a fourni une bonne corrélation avec les résutats expérimentaux.

Une étude plus complète portant sur trois échelles de réacteurs (5, 100 et 1000 dm^3) et différentes vitesses d'agitation (265 -1300 rpm) et utilisant une méthode automatique d'analyse d'images (Packer et Thomas, 1990) a récemment été publiée (Makagiansar *et al.*, 1993). Elle a confirmé l'effet néfaste sur la production en pénicilline de la diminution de la taille des hyphes due à l'agitation. De plus, les données plus abondantes fournies par l'analyse d'images ont permis de vérifier et d'établir plus précisément la validité de la corrélation [3.12] proposée par Smith *et al.* (1990).

On peut noter que dans le cas de fermentations de *Streptomyces clavuligerus*, le même phénomène de fragmentation précoce des hyphes sous l'action de l'agitation a été observé (Belmar-Beiny et Thomas, 1991). Cependant, aucune influence sur la productivité en acide clavulanique n'a été détecté montrant ainsi que pour cette production, la morphologie peut être modifiée pour optimiser les conditions de fonctionnement du réacteur sans risque sur le métabolisme de la souche.

La plupart des études de l'influence de l'agitation sur la morphologie de la biomasse portent sur la forme dispersée. Très peu de travaux concernent les pellets ou les agrégats. Cela tient notamment au fait que si les mesures des caractéristiques hyphales étaient longues mais réalisables avant le développement des techniques automatiques d'analyse d'images, il n'en est pas de même pour l'analyse quantitative des agrégats ou des pellets. A l'exception du diamètre

externe accessible par simple tamisage, les autres paramètres de caractérisation morphologique des pellets sont trop subjectifs ou impossibles à mesurer par des méthodes manuelles. Quelques travaux, même s'ils n'utilisent pas l'analyse d'images comme méthodes de mesure méritent toutefois d'être cités.

Taguchi *et al.* (1968) ont observé l'évolution du diamètre des pellets d'*Aspergillus niger* et de *Lentinus edodes* , obtenus lors de cultures réalisées préalablement, lorsque ceux-ci sont placés sous diverses vitesses d'agitation dans un réacteur classique. Les mesures de diamètre ont été réalisées manuellement par observation microscopique ou sur photos. Deux phénomènes ont été décrits et corrélés aux conditions d'agitation. Le premier est une attrition de fragments provenant de la couche mycélienne superficielle. La relation suivante a été proposée pour décrire son effet sur le diamètre des pellets.

$$\frac{d(D_p)}{dt} \propto (ND_i)^{5,5} D_p^{5,7} \qquad [3.13]$$

où D_p est le diamètre des pellets (m). (les autres notations ont été définis plus haut.)

Le second phénomène est une rupture complète des pellets. La variation au cours du temps du nombre de pellets encore intacts est donné par la relation suivante:

$$\frac{d(n)}{dt} \propto \left(D_p^{3,2} N^{6,65} D_i^{8,72}\right).n \qquad [3.14]$$

où n est le nombre de pellets n'ayant pas encore subi de rupture.

Une mesure de la force de résistance des pellets à la rupture par étirement, réalisée dans la même étude à l'aide d'un pendule de tension, a permis aux auteurs d'attribuer l'attrition et la rupture à de fortes contraintes locales de turbulence ou à des chocs avec l'agitateur mais non à des contraintes d'écoulement purement visqueux. Par ailleurs, un phénomène de fatigue abaissant la résistance à la rupture a été mis en évidence.

Il faut cependant remarquer que ces corrélations ont été obtenues avec des pellets de grande taille (3 à 4 mm) et que l'évolution du diamètre des pellets n'a pas été suivie lors de cultures, ce qui limite considérablement leur application.

En étudiant la formation, la taille (par tamisage) mais aussi l'hydrophobicité des pellets de *Streptomyces tendae*, Vecht-Lifshitz *et al.* (1990) ont montré que des limitations en oxygène conduisaient préférentiellement à une croissance sous forme "pulpeuse" alors que la taille et le nombre des pellets augmentent avec la disponibilité en oxygène dissous. Ces auteurs ont suggéré un mécanisme d'agrégation du réseau filamenteux lié à l'existence d'interactions hydrophobes entre les parois cellulaires des hyphes. L'intensité de ces interactions augmenterait en présence de "biofloculants", excrétés en réponses à de bonnes conditions d'oxygénation. Bien que

l'extension de ce mécanisme à d'autres cultures soit probablement délicate, il a tout de même le mérite de mettre l'accent sur un phénomène rarement evoqué, les forces d'interactions interhyphales. Le rôle de ces interactions de surface a récemment été souligné dans le cas de la formation de pellets par agrégation de conidiospores chez *Phanerochaete chrysosporium* (Gerin *et al.*, 1993).

III.5. MÉTHODES INDIRECTES D'ÉTUDES DES VARIABLES MORPHOLOGIQUES

D'autres méthodes, qualifiées d'indirectes parce qu'elles ne fournissent pas une description de la morphologie hyphale, permettent cependant de prendre en compte ses modifications et son influence sur la productivité de la culture.

III.5.1. Méthodes de filtration

Cette méthode est basée sur les travaux de Nestaas et al. (1981a et b). Ils ont développé une cellule pour mesurer des propriétés de filtration du bouillon de fermentation. La mesure porte sur le volume du filtrat, le volume du gâteau de filtration et le temps de filtration. En utilisant l'équation de Kozeny-Carman [3.15], une relation a pu être établie entre ces paramètres de filtration facilement mesurables et une propriété morphologique du mycélium, sa densité hyphale, ρ_h.

$$\frac{t_F}{V_F} = \frac{r\mu_F\omega\bar{v}}{2A^2\Delta P}V_F + \frac{r\mu_F L}{A\Delta P} \qquad [3.15]$$

où t_F, est le temps de filtration (s), V_F, le volume du filtrat (cm^3), r, la résistance spécifique du gâteau de filtration (cm^{-2}), μ_F la viscosité du filtrat ($g.cm^{-1}.s^{-1}$),A, la surface du filtre (cm^2), ω, la masse de solides en suspension (g sec de gâteau de filtration / cm^3 de filtrat, $\bar{v}$, le volume spécifique du gâteau de filtration (cm^3 / g sec), ΔP, la pression de de filtration, L la hauteur du gâteau de filtration (cm).

Après arrangement de l'équation [3.15], introduction du diamètre et de la densité hyphale pour exprimer respectivement la surface spécifique du gâteau de filtration et sa fraction vide, on obtient la relation:

$$\frac{t_F}{V_F V_C} = \frac{K''\mu_F}{32A^2\Delta P}\cdot\frac{\rho_h\bar{v}}{(\rho_h\bar{v}-1)^3 d_h^2} \qquad [3\ 16]$$

où V_C, est le volume du gâteau de filtration, ρ_h, la densité hyphale (g sec d'hyphes / cm^3 d'hyphes humide), d_h, le diamètre des hyphes (cm), K", la constante de Koseny, ici prise égale à 5,5.

L'application de cette méthode à la production de pénicilline par *Penicillium chrysogenum* a montré une diminution de la densité hyphale au cours de la culture. Celle-ci fut corrélée à une perte de composants cytoplasmiques essentiellement protéiques, entrainant une diminution de l'activité métabolique et donc de la synthèse de pénicilline. Par ailleurs, ces auteurs ont également proposé une relation entre le volume spécifique du gâteau de filtration et le taux de ramification des hyphes (Nestaas *et al.*, 1981b). Toutefois, si la prévision sur cette base semble bonne pendant la période de croissance exponentielle, elle est beaucoup moins satisfaisante dès qu'une fragmentation importante du mycélium intervient. Le choix d'une constante de Kozeny identique quelle que soit la morphologie semble être une des limites essentielles de la méthode (Liu et Yu, 1993).

Outre l'originalité de son concept, la méthode s'est révélée particulièrement intéressante par ses implications sur les connaissances du processus de production de la pénicilline. Elle a ainsi servi de base à la création d'un modèle structuré morphologiquement (Nestass et Wang, 1983) distinguant trois zones au sein des hyphes:

- l'extrémité apicale responsable de la croissance,
- les cellules sub-apicales responsables de la production de pénicilline,
- les cellules dégénérées ayant perdues la quasi-totalité de leur cytoplasme.

Ce type de modèle a depuis été repris et développé par Nielsen (1993).

III.5.2. Méthodes rhéologiques

Nous ne ferons pas ici une description exhaustive des méthodes de mesures des propriétés rhéologiques des cultures de microorganismes filamenteux. Elles ont d'ailleurs fait l'objet de revues détaillées (Roels *et al.*, 1974, Metz *et al.*, 1979, Grant-Allen et Robinson, 1990). Il convient simplement de signaler que ces méthodes apportent des informations complémentaires à l'analyse morphologique de la biomasse et qu'elles sont indispensables pour une bonne caractérisation des phénomènes de transferts et de contraintes mécaniques au sein d'un réacteur.

Précisons cependant qu'une cellule de mesure en ligne des propriétés rhéologiques (l'indice de consistance, K, et l'indice d'écoulement, n, d'une loi puissance) a été développée (Olsvik et Kristiansen, 1992a). Appliquée au suivi de fermentations continues d'*Aspergillus niger*, la méthode a permis de mettre en évidence, une diminution de K avec l'augmentation de la concentration en oxygène dissous (Olsvik et Kristiansen, 1992b). Ces résulats ont été corrélés

avec des facteurs de forme des agrégats mycéliens, déterminés par analyse d'images (Olsvik *et al.*, 1993).

Enfin, une définition d'un facteur morphologique quantitatif obtenu à partir d'une combinaison de paramètres rhéologiques (comme par exemple le seuil de contrainte de la loi de Casson) et de paramètres de filtration (notamment l'indice de compressibilité et la valeur de la constante de Koseny) a récemment été proposée (Liu et Yu, 1993).

III.5.3. Méthodes ultrasoniques

Ce type de méthodes utilise la diffusion des ondes ultrasonores à travers un volume de bouillon de fermentation pour évaluer la dimension fractale de la biomasse qu'il contient. (La dimension fractale a été définie en § III.1.4.)

La masse d'un objet fractal est distribuée, dans un espace à trois dimensions, selon une loi de la forme:

$$m(r) \propto r^D \qquad [3.17]$$

où m(r) est la masse contenue dans une sphère de rayon r, et D la dimension fractale.

Patankar *et al.* (1992) ont montré que l'intensité des ondes ultrasonores diffusées (I_S) par ce type d'objet dépend de leur dimension fractale selon l'expression suivante:

$$I_s(q) \propto q^{-D} \qquad [3.18]$$

Cette relation peut également être exprimée sous la forme:

$$\ln (I_S(q)) = -D \,.\, \ln (q) + \text{constante} \qquad [3.19]$$

avec q étant le vecteur de diffusion, obtenu par différence entre les vecteurs de nombre d'ondes du rayon incident et du rayon diffusé.

Ces auteurs ont développé une sonde permettant de mesurer l'intensité diffusée, Is, et le vecteur de diffusion, q et ont montré que les valeurs de dimension fractale ainsi obtenues permettaient de distinguer une biomasse filamenteuse d'une biomasse sous forme de pellets, pour des échantillons de cultures de *Streptomyces* et de *Penicillium*. De plus, ces résultats permirent d'établir une excellente corrélation entre la dimension fractale et des propriété de filtration du bouillon de culture, dépendantes de la morphologie de la biomasse (Patanckar *et al.* 1993). Les propriétés de filtration étudiées ici sont l'indice de compressibilité du gâteau de filtration et la constante de Kozeny.

Cette nouvelle méthode semble particulièrement intéressante sous deux aspects. Non invasive, elle pourrait faire l'objet d'un développement pour une mesure *in situ*. D'autre part, puisque les informations qu'elle procure concernent la structure tridimensionnelle des objets, elle pourrait être utilisée pour caractériser la stucture interne des pellets et notamment leur densité.

Conclusion

Le développement des méthodes de caractérisation de la morphologie mycélienne a connu un essor considérable lors de ces dernières années. Les progrès dans le domaine de la technologie informatique, en rendant les temps de traitement beaucoup plus compatibles avec des utilisations en routine, ont certainement joué un rôle important dans ce phénomène.

Les méthodes proposées couvrent maintenant toute la gamme de morphologie rencontrée en fermentations, de la germination des spores (Paul *et al.*, 1993) à la forme "pellet" (Reichl *et al.*, 1992; Cox et Thomas, 1992) en passant par le mycélium dispersé ou faiblement agrégé (Tucker *et al.*, 1992).

Ces méthodes ont été exploitées dans des études de divers aspects des procédés de fermentations comme par exemple la corrélation entre morphologie de la biomasse et rhéologie du bouillon de culture (Olsvik *et al.*, 1993; Tucker et Thomas, 1993) ou l'effet de l'agitation sur la morphologie (Makagiansar *et al.*, 1993). L'utilisation de l'analyse d'images a également fourni des informations extrêmement importantes sur la physiologie de la biomasse fongique comme notamment la différenciation hyphale corrélée avec le taux de production de pénicilline chez *Penicillium chrysogenum* (Paul *et al.*, 1994).

En dépit des conséquences des limitations diffusionnelles sur l'activité métabolique et ses régulations (Hemersdörfer *et al.*, 1987; Braun et Vecht-Lifschitz, 1991), aucune des méthodes précédentes n'a été conçue pour établir une relation entre les paramètres morphologiques des agrégats ou des pellets et leur accessibilité aux substrats du milieu.

Cette constatation, ajoutée aux difficultés pour adapter les méthodes préexistantes aux caractéristiques de nos cultures (pellets de grandes tailles présentant des zones filamenteuses particulièrement denses par exemple), a motivé notre choix de développer une nouvelle méthode tenant compte de ces facteurs.

Cette méthode va maintenant être décrite dans le chapitre suivant.

Chapitre IV

Développement d'une méthode d'analyse d'images pour la caractérisation d'une biomasse mycélienne agrégée

Chapitre IV

Développement d'une méthode d'analyse d'images pour la caractérisation d'une biomasse mycélienne agrégée

Une nouvelle méthode d'analyse d'images pour la classification et la caractérisation des particules mycéliennes fongiques est présentée dans ce chapitre. Fondée sur un critère de différenciation d'ordre diffusionnel, la méthode tire son originalité de son association avec une technique simple de coloration qui permet de distinguer les zones mycéliennes faiblement enchevétrées (les agrégats ou les zones filamenteuses périphériques des pellets) des zones plus compactes (les noyaux des pellets).

Après une description détaillée de la procédure de coloration et de l'algorithme de traitement d'images, différents paramètres susceptibles d'influer sur les résultats sont examinés.

Développée initialement pour être utilisable avec un appareillage ne disposant que du mode monochrome d'acquisition et de traitement d'images, la méthode a connu un développement ultérieur pour l'adapter au mode d'acquisition couleur et ainsi améliorer sa précision et son degré d'automatisation. Ces derniers travaux ont été conduits en collaboration avec P.W. Cox, membre de l'équipe dirigée par le Dr. C.R. Thomas, au Biochemical Engineering Center de l'Université de Birmingham (Angleterre).

Enfin, les résultats de cette nouvelle méthode sont comparés à ceux fournis par l'algorithme le plus rapide et le plus reproductible publié à ce jour pour la caractérisation d'une biomasse sous forme de pellets (Cox et Thomas, 1992).

IV.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

IV.1.1. Méthode de coloration

Les échantillons issus de la fermentation sont dilués avec de l'eau (généralement entre 2 et 10 fois) de façon à obtenir une concentration finale en particules (pellets et agrégats) de l'ordre de 10 à 50 par ml.

Si la coloration, puis l'analyse, ne peuvent être réalisées immédiatement après le prélèvement, ce dernier est mélangé à volume égal avec une solution fixatrice, stoppant la croissance du champignon, puis conservé à 4°C. La solution fixatrice est une solution aqueuse de formaldéhyde à 5% et d'acide acétique glacial à 2,5%. Sa composition est dérivée de celle utilisée par Cox et Thomas (1992). Toutefois il s'agit ici d'une solution aqueuse et non éthanolique de façon à ne pas gêner la fixation du colorant et à permettre une coloration directe sans rinçage préalable.

Le protocole de coloration, dérivé de la première phase d'une coloration de Gram classique, est le suivant:

- Addition de 0.8 ml d'une solution à 2% de cristal violet dans 20 ml de l'échantillon dilué.
- Les pellets sont maintenus 5 min en contact avec le colorant de façon à permettre un pénétration de ce dernier jusqu'au centre des particules.
- Elimination de la solution colorante par aspiration à travers un tamis en acier inoxydable d'une maille de 100 µm.
- Rinçage de la biomasse déposée sur le tamis par une solution de lugol diluée (1/50ème). Le lugol forme, avec le cristal violet, un complexe insoluble dans l'eau. On fixe donc ainsi le colorant qui a pénétré dans les hyphes.
- Les pellets sont maintenus 1 min en suspension dans la solution de lugol.
- Elimination de la solution de lugol par aspiration à travers le tamis.
- La biomasse est remise en suspension dans un faible volume d'eau (10 à 20ml).
- Addition de trois volumes d'éthanol à 80% et agitation douce. L'éthanol solubilise le complexe cristal violet / lugol dans les zones où il a pu se répandre sans rencontrer de limitations diffusionnelles.
- Après 45 s, la solution d'éthanol est rapidement retirée par aspiration à travers le tamis.

- Rinçage immédiat de la biomasse avec de l'eau qui stoppe la phase de décoloration.
- La biomasse est remise en suspension dans un volume d'eau défini.

Les solutions de cristal violet et de lugol utilisées ici sont des solutions commerciales (respectivement, Color Gram 2™ - R1 et R2 - Biomérieux®- Marcy l'Etoile - France) destinées à la coloration de Gram.

Solution de cristal violet:		*solution de lugol:*	
cristal violet	*2%*	*iode*	*1,3%*
oxalate d'ammonium	*0,8%*	*iodure de potassium*	*2%*
éthanol	*20%*	*Polyvinylpyrrolydone*	*10%*

La figure IV.1 montre un pellet à l'issue de la procédure de coloration.

IV.1.2. Matériels (acquisition - traitement d'images)

Un schéma du dispositif d'acquisition et de traitement d'images est présenté sur la figure IV.2.

IV.1.2.1 Caméra

La caméra vidéo utilisée pour l'acquisition est une caméra à tube, monochrome (Hammamatsu type C2400-1, tube Chalnicon). Elle possède, sur son boitier de contrôle, un réglage du contraste (par l'intermédiaire du gain et de l'offset du signal vidéo) et un correcteur d'effet d'ombre (shading).

Elle est équipée d'un objectif Olympus de 50 mm et d'un doubleur de focale permettant une prise de vue en position macro. Le grossissement final sur le moniteur de l'analyseur d'image peut varier entre 5 et 26 fois.

IV.1.2.2 Analyseur d'images

Le coprocesseur Morphopericolor™ de Matra MS2I (Le Mesnil St. Denis - France) est utilisé pour la numérisation et le traitement d'images. Cet appareil a été conçu par le centre de morphologie mathématique de l'Ecole des Mines de Paris et développé sous licence Armines au milieu des années 80 (85-87). Il possède une architecture cablée qui lui confère des performances en termes de temps de traitement encore tout à fait satisfaisantes comparées aux coprocesseurs proposés ultérieurement.

L'analyseur d'images est équipé de son propre moniteur couleur et est piloté par un PC Kennitec 486DX-33. Doté d'un menu interactif et d'une option permettant l'enchaînement et la répétition

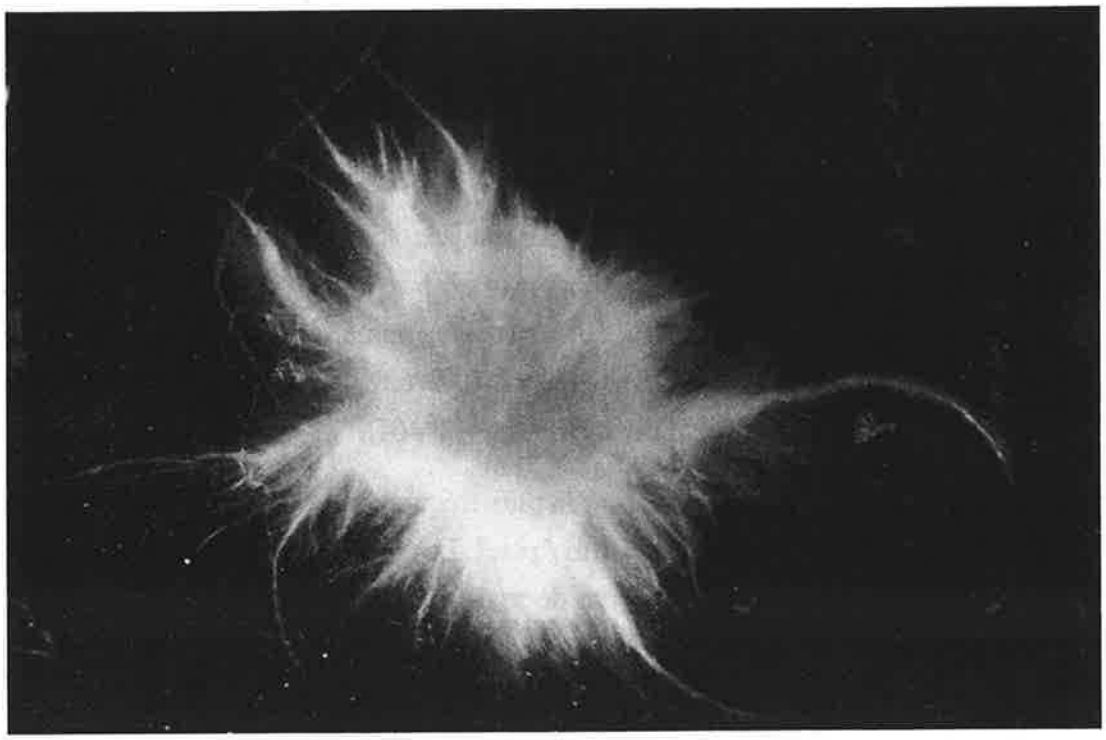


Figure IV.1: Pellet de Fomes fomentarius à l'issue de la procédure de coloration.

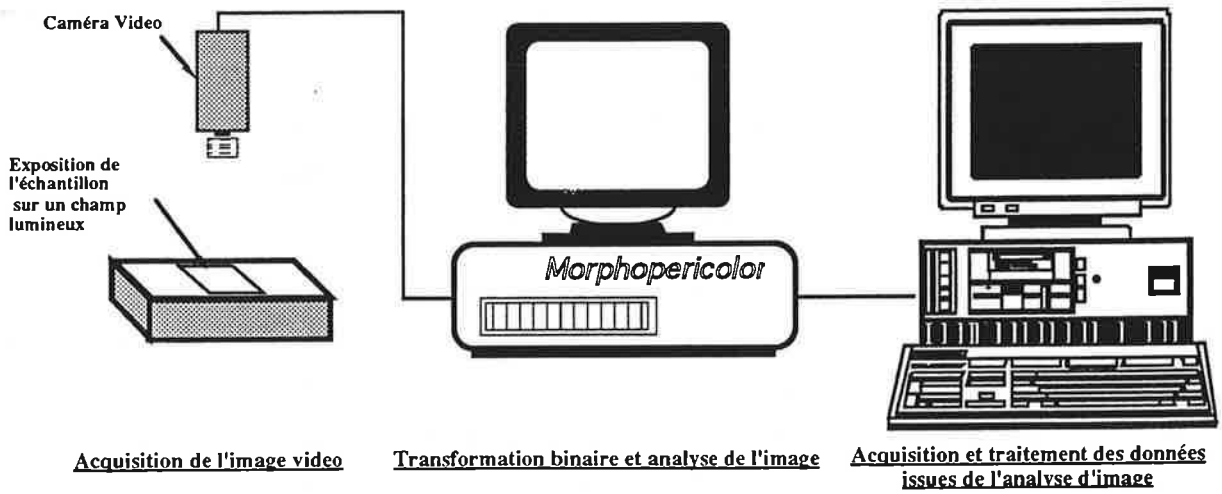


Figure IV.2: Schéma du système d'acquisition et d'analyse d'images

d'une série de traitement sous la forme de séquences (ou macro-commande), il permet également d'intégrer les fonctions de traitement d'images au sein de programmes en language PASCAL. Pour l'application présentée ici, les programmmes de traitement d'images et d'acquisition de données ont été écrits en Turbo Pascal™(Borland) version 7,0.

Le Morphopericolor™ peut traiter deux formats d'images: 256x256 pixels ou 512x512 pixels. Seul ce second format a été utilisé. Dans ce mode, il n'est possible de stocker simultanément que 2 images numériques et 9 images binaires. Sur les images numériques, l'intensité des pixels est représentée sur une échelle de 64 niveaux de gris (0 à 63). La représentation d'une image numérique nécessite donc 6 images (ou plans) binaires (2^6=64).

Les pixels sont rectangulaires et la résolution la plus fréquemment utilisée, correspondant à un grossissement optique de 10, est de 40 x 31 µm / pixel. La maille du réseau de pixels est de type hexagonal sur le Morphopericolor™; ce type de maille est le plus proche de la maille idéale circulaire.

IV.1.2.3 Conditions d'éclairage et d'exposition des échantillons

L'illumination par transmission est assurée par une boite lumineuse contenant deux néons de 40W et une face supérieure en verre dépoli.

Un échantillon de 20 ml, issu de la procédure de coloration, est réparti dans une boite (105x130mm) à fond en verre puis déposé sur le champ lumineux. La dilution préalable de l'échantillon et la grande surface de la boite permettent de limiter la probabilité de contact ou de superposition des particules. Une séparation manuelle est effectuée en début d'acquisition si nécessaire. Une grille, composée de 25 cases de 17,3 x 22,3 mm (champ couvert par une image au grossissement 10), est ensuite déposée dans la boite contenant l'échantillon. Elle assure la stabilité des particules lors des déplacements de la boite pour l'acquisition des images successives et permet un repérage aisé des champs déjà analysés.

La LUT (Look Up Table) est de type linéaire et n'est pas modifiable par le Morphopericolor™. Le signal vidéo est donc réglé directement à partir du boitier de contrôle de la caméra. De façon à élargir au maximum la gamme de niveau de gris de l'image numérique, le zéro noir est positionné en valeur nulle pour permettre une meilleure différenciation des niveaux sombres, le gain est placé sur la position minimale permettant de sélectionner la totalité du fond de l'image (le champ lumineux) par le niveau de gris 63. Une augmentation du gain au-delà de cette valeur ne permet plus de différencier les objets clairs du fond de l'image, une diminution du gain sous cette valeur réduit la gamme de niveau de gris représentant les objets et diminue les contrastes entre zones sombres colorées et zones claires décolorées.

IV.1.3. Algorithme de traitement d'images monochromes

La procédure de coloration / décoloration fait apparaître deux types de zones au sein de la biomasse. Celles auprès desquelles l'éthanol a pu parvenir par simple convection et pénétrer dans les hyphes, sont décolorées: ce sont les zones filamenteuses. Celles dans lesquelles les phénomènes de diffusion ont retardé la pénétration de l'éthanol sont restées colorées en bleu: ce sont les zones compactes de la biomasse, les noyaux des pellets. C'est cette propriété permettant de différencier des structures mycéliennes sur la base d'un critère diffusionnel qui est exploité par l'algorithme de traitement d'images présenté sur la figure IV.3. Les figures IV.4 et IV.5 illustrent la visualisation des différentes images binaires lors du déroulement du programme.

Le programme de traitement se compose de trois phases exécutées indépendamment :

la phase d'acquisition

Afin d'obtenir un nombre représentatif de particules (entre 150 et 400), l'analyse d'un échantillon nécessite l'acquisition d'une série d'images (généralement 25). Cette première phase constitue la première étape de l'algorithme. La première image numérique de la série est immédiatement seuillée interactivement. Les valeurs de seuil permettent de sélectionner les zones claires, décolorées de la biomasse et d'obtenir ainsi l'image binaire (a) des zones filamenteuses. Une mise à zéro automatique de la valeur du seuil bas définie précédemment fournit ensuite l'image binaire (b) des objets complets. A l'issue de la phase d'acquisition, les images numériques ne sont pas conservées et seule la paire d'images binaires (a) et (b) est finalement stockée. Pour un échantillon, on obtient donc deux séries de 25 images binaires associées par paires; les images d'une série contiennent uniquement les zones filamenteuses (agrégats de faibles densité et zone annulaire des pellets), les images de l'autre série se composent des objets complets.

la phase de traitement et de mesures

Cette phase est représentée par le reste de la figure IV.3. Cette phase, répétée pour chacune des images de la série, est décrite ici pour une image type. L'image binaire des objets complets (b) est tout d'abord nettoyée des objets non représentatifs en deux étapes. Les objets coupés par le bord de l'image sont éliminés; puis une érosion (généralement d'un pas de 1 ou 2) permet d'éliminer les petits débris de mycélium ou les particules solides du milieu. Une reconstruction, utilisant l'image (b) comme référence, permet de récupérer l'intégrité des objets non éliminés par l'érosion et de fournir l'image (b') des objets complets nettoyés. Seuls peuvent subsister à ce stade de grosses particules compactes du milieu (de taille équivalente aux pellets) qui seront identifiées à un stade ultérieur. Une intersection entre (b') et (a), l'image des zones filamenteuses, fournit l'image nettoyée (a') de ces zones. L'analyse et la caractérisation de chaque particule commence alors. Le premier objet de l'image (b') est détecté, soustrait de (b') et

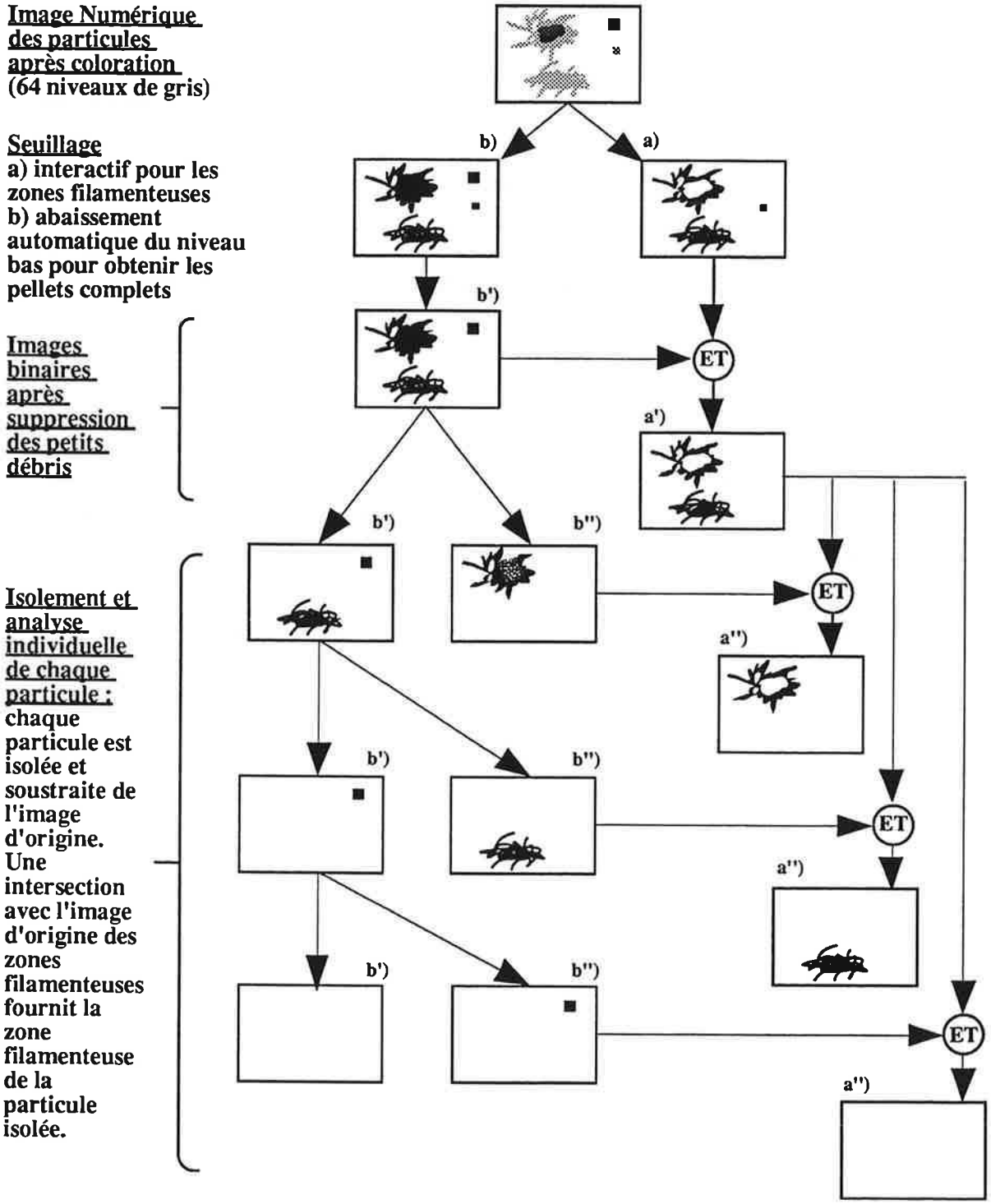


Figure IV.3: Algorithme de traitement des images monochromes après la procédure de coloration / décoloration par le complexe cristal violet / lugol.

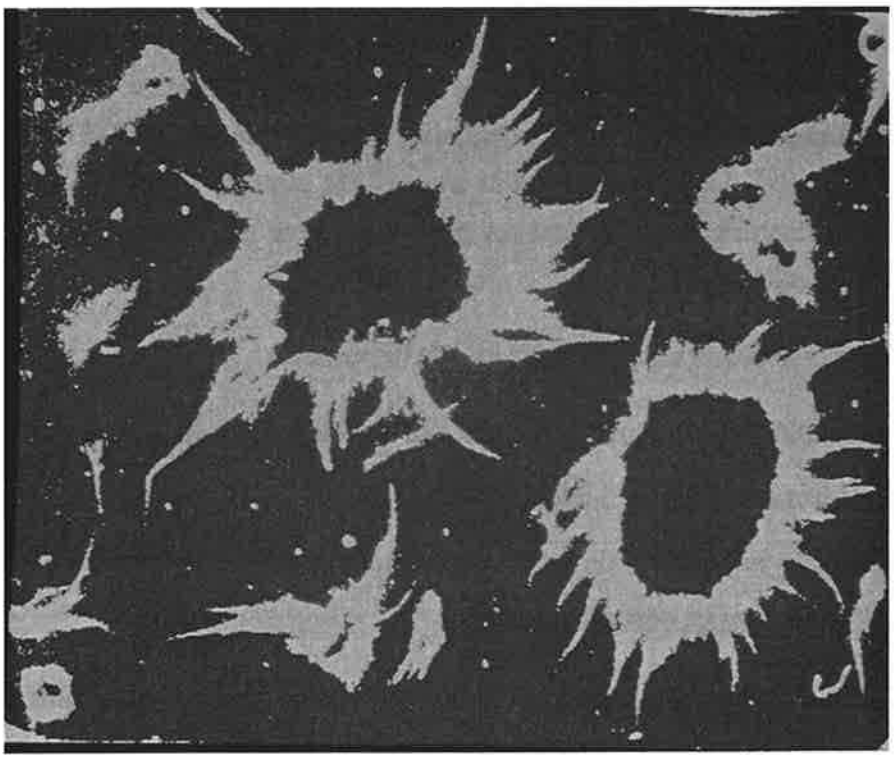


Figure IV.4: Image binaire (a)

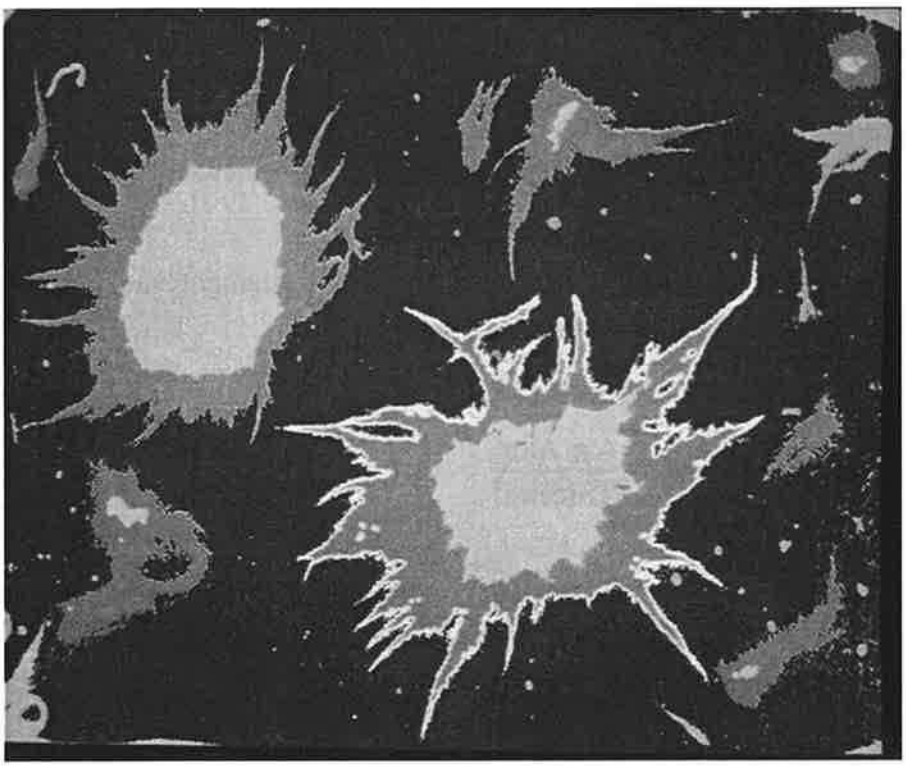


Figure IV.5: Superposition des images binaires (a') , (b) et (b') telles qu'elles apparaissent pendant le traitement d'images:
(a')en orange représente les zones filamenteuses après nettoyage, (b) en bleu clair représente l'ensemble des objets complets. Après recouvrement par les autres images, seuls les objets éliminés lors du nettoyage (érodés ou coupant le bord de l'image) sont visibles sur cette représentation, (b') en jaune-vert représente les pellets complets. Après recouvrement par (a') seuls les noyaux sont visibles sur cette représentation. La particule soulignée en blanc est en cours de mesure.

placé dans l'image (b"). C'est sur cette dernière image composée d'un unique objet que sont effectuées les mesures de caractérisation des objets complets. Une intersection de (b") avec (a') fournit l'image (a") de la zone filamenteuse de l'objet isolé. L'image (a") est utilisée pour les mesures de caractérisation de la zone filamenteuse. Le processus est répété tant qu'il reste des objets dans l'image (b'). Un gros débris qui n'a pas été éliminé lors de la phase initiale de nettoyage peut être identifié à ce stade puisque généralement de telles particules ne présentent pas de zones décolorées sélectionnables lors du premier seuillage.

Les caractéristiques mesurées sur les images (a") et (b")sont:

- l'aire projetée de la particule complète et celle de la zone filamenteuse,
- le périmètre de la particule complète,
- l'aire de particule totale après successivement quatre ouvertures de pas croissant.

Les paramètres calculés qui en découlent sont:

- l'aire projetée du noyau, obtenue par différence des aires projetées de la particule complète et de celle de la zone filamenteuse,
- les diamètres équivalents du noyau et de la particule totale:

$$\text{Diamètre équivalent} = \sqrt{\frac{4.\text{Aire}}{\pi}} \qquad [4.1]$$

- la fraction filamenteuse, rapport de l'aire filamenteuse (aire de la couronne) sur l'aire totale,
- l'épaisseur moyenne équivalente de la zone filamenteuse, demi-différence du diamètre équivalent de la particule et de celui du noyau,
- la circularité de la particule ($4\,\pi$ Aire / Périmètre^2),

$$\text{Circularité} = \frac{4.\pi.\text{Aire}}{\text{Périmètre}^2} \qquad [4.2]$$

- un facteur de forme ou "facteur d'ouverture" exprimé par la moyenne des pertes relatives de surface de la particule après quatre ouvertures successives de pas croissant (Reichl *et al.*, 1992).

La phase d'analyse granulométrique

Les caractéristiques des particules de la population sont recueillies dans deux types de fichiers. Un premier fichier contient les données des six derniers paramètres calculés décrits ci-dessus pour chacune des particules analysées. Un second fichier contient les distributions en pourcentage du nombre de particules et en pourcentage de l'aire projetée totale, pour chacun des

six paramètres et pour l'ensemble de la population. Une procédure d'affichage graphique permet de présenter à l'écran ces diffférentes distributions dès la fin de l'analyse.

IV.1.4. Algorithme de traitement d'images couleur

L'algorithme, présenté ici, a été écrit en collaboration avec P.W. COX au sein du Département de Génie Biochimique de l'Université de Birmingham (Angleterre), sous la direction du Dr. C.R. Thomas.

Le système d'acquisition et de traitement d'images utilisé pour cet algorithme a été décrit par Cox et Thomas (1992). Précisons cependant que l'acquisition a été réalisée *via* une caméra CCD couleur (modèle XC-007, Sony) équipée d'un zoom optique permettant l'obtention d'une résolution finale de l'ordre 15 à 40 µm / pixel. L'analyseur d'images est le Quantimet™ 570 (Leica Cambridge Ltd, Cambridge, Angleterre). Une illumination indirecte et réfléchie, assurant à la fois un bon rendu des couleurs et un fond de l'image sombre, a été obtenue en utilisant les néons d'éclairage ambiant et en observant les échantillons, répandus dans un boite en verre, par dessous.

Cet analyseur conçu sur les mêmes bases théoriques que le Morphopericolor™ a également été développé sous licence Armines. Il représente toutefois une version avancée du Morphopericolor™ puisqu'il permet notamment de stocker simultanément 22 images numériques de 256 niveaux de gris. Ces temps de traitement extrêmement courts le placent certainement cet appareil parmi les plus performants du marché.

Si l'algorithme a été conçu sur le Quantimet™ 570, il ne contient pourtant aucune fonction spécifique à cet appareil et peut être implanté sur tout autre analyseur disposant du mode d'acquisition couleur RVB et des fonctions classiques d'opérations logiques entre images numériques.

L'acquisition est réalisée en mode RVB mais seuls les plans Bleu et Vert sont utilisés. Sur le plan Bleu (Image D1- "digital"), les zones de la biomasse décolorées (blanches) et colorées (bleues) ont des intensités très voisines, proches de 255 (Figure IV.6). Sur le plan Vert (Image D2) en revanche, les zones colorées en bleu ont une intensité très faible proche de celle du fond de l'image alors que les zones filamenteuses (blanches) conservent une intensité élevée très voisine de celle qu'elles possèdent sur le plan Bleu. La soustraction de ces deux plans numériques fournit une nouvelle image numérique où seules les zones colorées en bleu présentent une forte valeur d'intensité (D3). D'autre part, le type d'éclairage, une saturation des valeurs de blanc ou bien encore une légère désorption du colorant hors des objets peuvent provoquer la formation d'un halo en périphérie des objets sur le plan Bleu. Celui-ci apparaît sur l'image résultant de la soustraction des plans Bleu et Vert (D3).

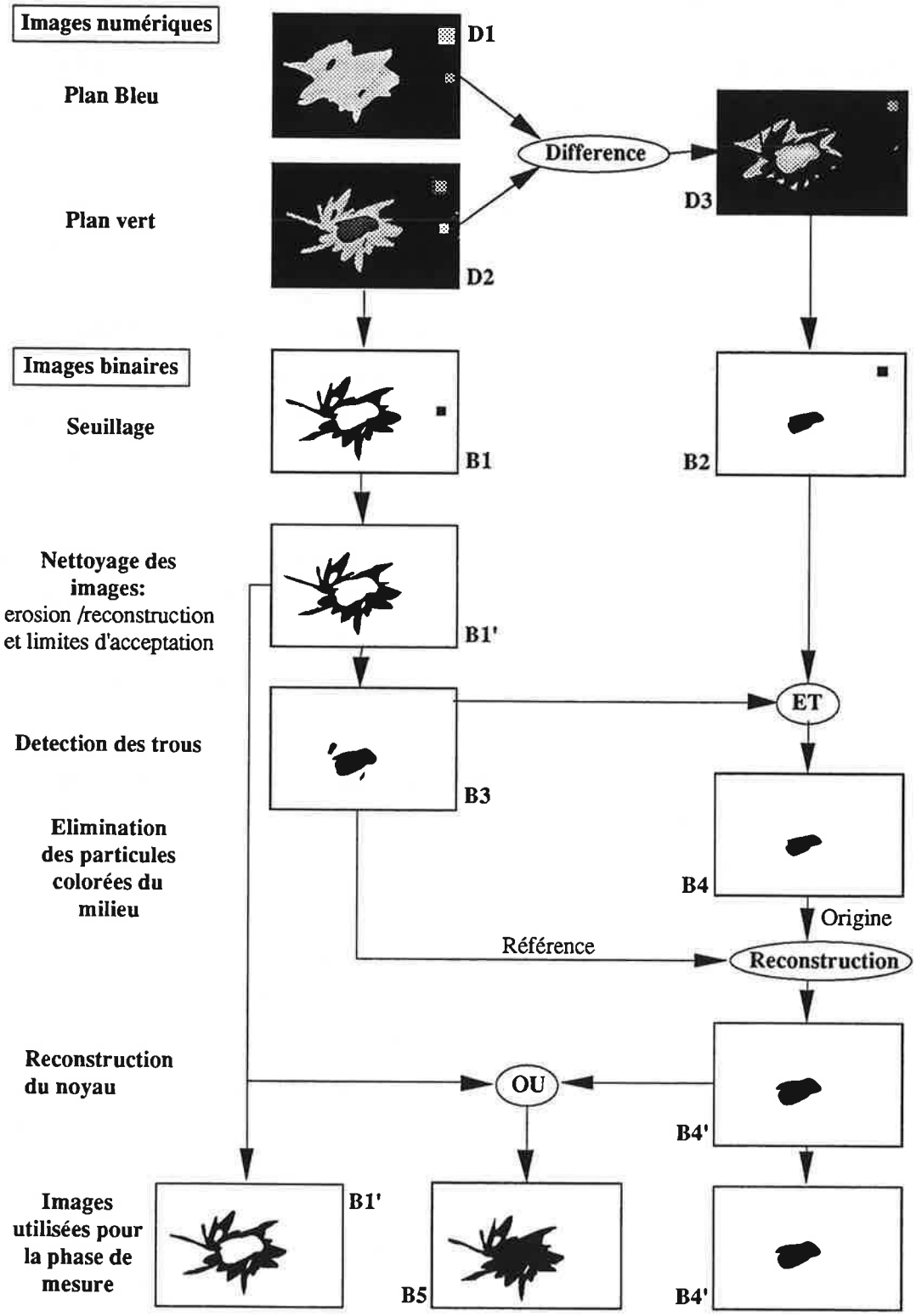


Figure IV.6: Algorithme de traitement des images couleur après la procédure de coloration / décoloration par le cristal violet.

L'étape suivante est un seuillage réalisé sur le plan vert de façon à sélectionner les zones filamenteuses décolorées (blanches). Celles-ci constituent l'image binaire B1. L'image B1 subit alors une phase de nettoyage. La première opération est une érosion / reconstruction qui permet d'éliminer les petites particules du milieu ou les débris mycéliens non significatifs. La seconde opération est un test sur la valeur de circularité des particules restantes permettant de différencier les gros objets solides du milieu (non éliminés lors de l'érosion) des agrégats mycéliens en fonction de la régularité de leur contour. On obtient ainsi B1' ne contenant que les zones filamenteuses.

La valeur de seuil utilisée pour seuiller D2 est conservée pour seuiller l'image D3. La valeur élevée du niveau de ce seuil fournit l'image binaire de la partie la plus intensément bleue du noyau (B2). Le halo dont l'intensité est issue de la soustraction d'une zone légèrement bleutée avec une zone d'intensité très faible est alors éliminé.

Sur B2, la suppression des particules solides avec une procédure similaire à celle utilisée sur B1 serait inefficace car la représentation binaire des noyaux partiels (zone bleue intense) et les particules du milieu peuvent avoir des formes et des tailles très proches. La suppression de ces particules est donc obtenue par deux étapes supplémentaires. La première consiste en une détection des trous sur l'image B1'. Ces "trous" sont constitués des zones bleues et de zones du fond de l'image. Ils sont stockés dans B3. La seconde étape est une intersection ("ET" logique) entre B2 et B3. Les particules solides absentes de B3 sont ainsi éliminées sur l'image résultat B4. Les noyaux sont alors reconstruits en utilisant les noyaux partiels de B4 comme origine et l'image des "trous" comme référence. On obtient ainsi B4', l'image des noyaux seuls. Un "OU" logique entre B4' et B1' fournit alors l'image binaire des particules mycéliennes complètes (B5). Les particules ne possédant pas de zones restées colorées constituent les agrégats, à différencier des pellets possédant un noyau coloré. Les agrégats n'apparaissent pas sur B4' et leur représentation est identique sur B1' et B5. Les trois images binaires, B1', B4' et B5 sont utilisés lors de la phase de mesure, pour caractériser respectivement les zones filamenteuses, les particules complètes et les noyaux.

Les mesures effectueés par cet algorithme sont similaires à celles obtenues avec l'algorithme monochrome avec cependant un paramètre complémentaire disponible sur le Quantimet™ et non sur le Morphopericolor™. Il s'agit de l'aire convexe, aire obtenue en remplissant les creux du contour de la particule. Celle-ci permet de calculer deux facteurs proposés par Cox et Thomas (1992), le taux de "remplissage" de la couronne filamenteuse ("annular fullness" = aire convexe de la couronne / aire réelle de la couronne) et le rapport des aires convexes (aire convexe du noyau /aire convexe de la particule).

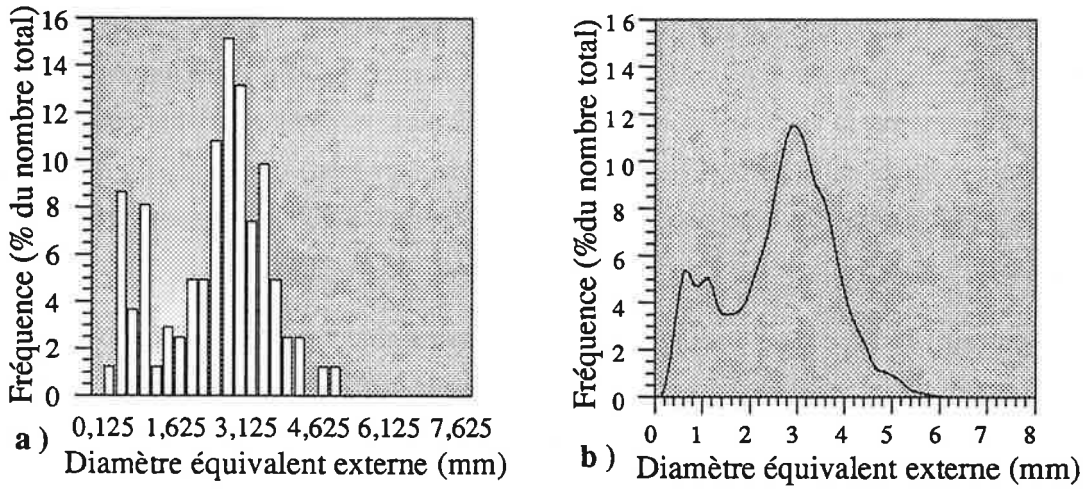


Figure IV.7: Comparaison des deux modes de représentation des distributions de population a) discret, b) après lissage.

IV.1.5. Présentation des résultats

Les distributions de population obtenues à partir des paramètres mesurés par les algorithmes de traitement d'images traduisent évidemment une répartition des différentes particules au sein de classes (de taille notamment) **discrètes** et justifieraient donc une présentation sous forme d'histogramme. Cependant, pour permettre la comparaison de différentes distributions sur un même graphique, un représentation sous forme de courbes **continues** obtenues par une procédure de lissage a été préférée. Ce lissage a pour conséquence de sous-évaluer les maxima des distributions mais conserve la surface initiale représentée par les différentes classes (distributions normalisées, le total des classes représente 100% des particules analysées). Comme l'illustre la figure IV.7, les différences entre les deux représentations sont minimes et ne nuisent pas à l'interprétation.

IV.1.6. Statistiques

L'intervalle de confiance sur une valeur moyenne, m, est calculé selon la formule [4.3] (AFNOR, 1978):

$$m \pm \frac{t_b}{\sqrt{n}} s \qquad [4.3]$$

avec: t_b : est la variable bilatérale de Student au niveau de confiance 95%,

n : le nombre d'individus pris en compte pour le calcul de la moyenne,

s : l'estimation de l'écart-type de l'échantillon.

Pour la comparaison des distributions, le test de Kolmogorov-Smirnov (AFNOR, 1978) a été utilisé. Il s'applique à des populations de plus de 30 individus, dont le caractère étudié est une variable continue.

Pour le calcul du critère de comparaison, les deux populations d'effectifs respectifs n1 et n2, sont répartis en classes de même limite puis les fréquences cumulées, F1 et F2, sont calculées pour chaque population. On effectue ensuite les différences entre chacune des classes cumulées (F1-F2). La plus grande de ces différences est appelée "d" et permet de calculer le critère "C" [4.4]:

$$C = d\sqrt{\frac{n_1 . n_2}{n_1 + n_2}} \qquad [4.4]$$

Pour un test bilatéral à un niveau de risque de 5% , les deux populations sont considérées significativement différentes si :

- C > 1,36 à un niveau de risque de 5%,
- C > 1,63 à un niveau de risque de 1%.

IV.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

IV.2.1 Influence du temps de décoloration

La méthode d'analyse d'images développée au cours de ce travail repose sur une procédure de coloration différentielle permettant une différenciation de deux zones au sein de la biomasse.

Une classification usuellement adoptée pour la description et la classification d'une biomasse mycélienne sous forme agrégée repose sur la morphologie et la densité des agrégats (Reichl *et al.*, 1992; Cox et Thomas, 1992). On distingue ainsi notamment les pellets, constitués d'un enchevêtrement hyphal dense en leur centre et plus ou moins distendu en périphérie, des agrégats plus lâches. Toutefois, quel que soit le critère adopté pour parvenir à cette classification, une certaine subjectivité lui reste associée puisqu'il s'agit en fait de définir une limite parmi différents types de réseaux filamenteux dont la densité d'enchevêtrement présente une répartition continue.

Dans le cas de la méthode développée ici, la subjectivité de la classification réside dans le choix du temps de décoloration. L'influence de ce temps sur la taille de la zone restée colorée — le noyau compact — est montrée sur la figure IV.8.

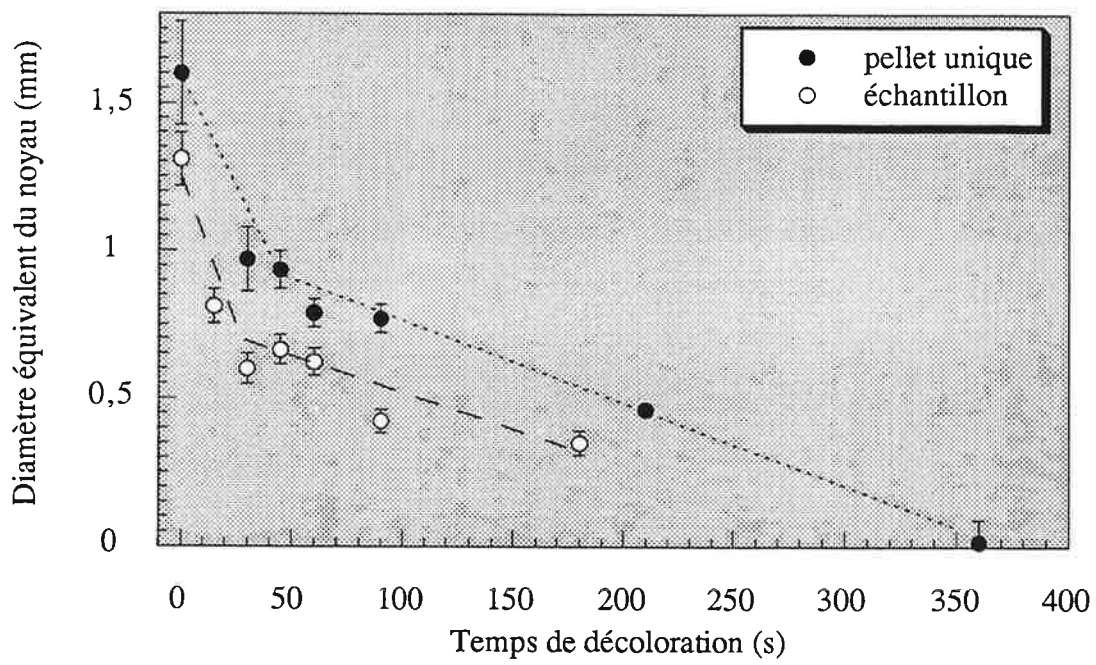


Figure IV.8: Influence du temps de décoloration sur la taille de la zone colorée, détectée comme noyau.

(Pour le pellet unique, moyenne de 10 acquisitions sous différentes orientations, après plusieurs cycles successifs de coloration / décoloration, ± intervalle de dispersion représentant 95 % de la population, avec un risque de 5% ; pour l'échantillon, moyenne ± intervalle de confiance de 95% sur la valeur de la moyenne)

Après une rapide décoloration de la zone externe lors des 30 premières secondes, on constate une baisse importante du taux de décoloration intervenant après 45 secondes. Ce taux reste constant jusqu'à décoloration complète du pellet. Pour la plupart des pellets examinés, le changement intervenant dans le taux de décoloration a été constaté entre 45 et 60 secondes. On retrouve cette allure lors de l'analyse d'un échantillon complet. La figure IV.8 présente les valeurs moyennes du diamètre équivalent des noyaux de cette échantillon. Le temps de 45 secondes a été retenu pour l'ensemble des essais effectués ultérieurement. Il semble suffisamment long pour assurer la pénétration de l'éthanol dans les hyphes directement en contact avec le milieu extérieur et l'élution du complexe cristal violet / lugol qu'ils contiennent. En revanche, les zones atteintes après diffusion et/ou convection de l'éthanol à travers les couches hyphales superficielles présentent un taux de décoloration plus faible.

La procédure de coloration adoptée ici n'est pas adaptée à un suivi en continu du processus de décoloration. La nécessité d'effectuer des cycles successifs de coloration / décoloration nuit gravement à la précision de la détermination du taux de décoloration. Ainsi, il pourrait être abusif d'interpréter la constance du taux de décoloration après 45s comme une homogénéité de densité du noyau. Une méthode, plus adaptée à de telles mesures, est présentée au chapitre VI. Par ailleurs, l'application d'une telle procédure à un échantillon complet est difficile sur un plan pratique.

IV.2.2 Reproductibilité

IV.2.2.1 Reproductibilité de l'échantillonnage

Pour les cultures en réacteurs, un mode d'échantillonnage par surpression a été adopté. La rapidité du prélèvement et le diamètre interne du tube plongeant (10 mm) permettent d'obtenir un bonne reproductibilité des échantillons comme le montre la figure IV.9.

Remarquons, toutefois, que si la reproductibilité de l'échantillonnage est assuré à un temps donné de la culture, elle ne garantit pas la représentativité de ces prélèvements. En effet dans ce type de culture mycéliennes, au comportement rhéologique typiquement non newtonien quand la concentration en biomasse devient élevée, il est souvent difficile de maintenir l'homogénéité de la culture en tout point du réacteur. Ainsi, pour éviter que, dans les cas extrêmes, les prélèvements ne représentent que l'état de la biomasse dans la zone du tube plongeant (généralement proche de l'agitateur) et non celui de l'ensemble du réacteur, une brève et violente augmentation de la vitesse d'agitation a parfois été utilisée pour remettre en circulation des zones inertes. Cependant comme cette opération peut également produire une fragmentation artificielle de la biomasse, son utilisation a été limitée autant que possible.

La figure IV.10 présente les distributions des diamètres externes équivalents de cinq échantillons prélevés dans une même culture en fioles agitées. Deux l'ont été par simple aspiration manuelle à

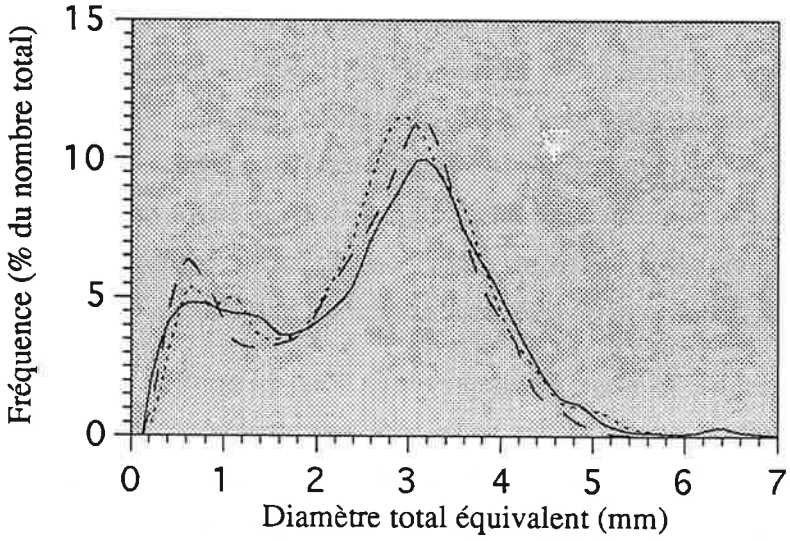


Figure IV.9: Distributions des diamètres équivalents externes de trois échantillons prélevés à un même âge de culture, dans un réacteur agité.
(Culture de Macrocystidia cucumis en fin de phase de croissance - 200h d'âge - agitation: 200 rpm)

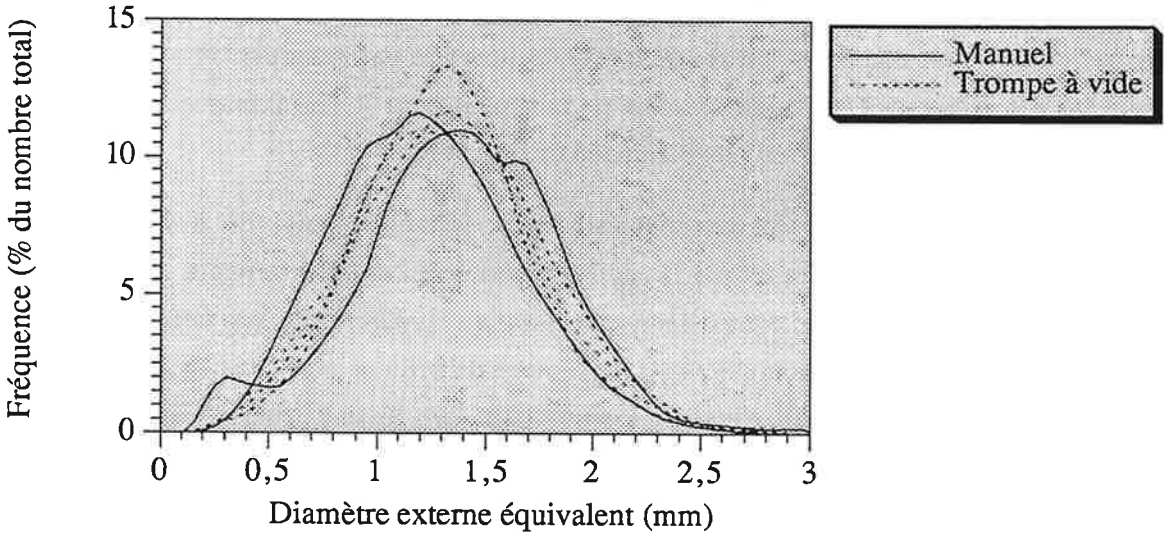


Figure IV.10: Comparaison des distributions des diamètres externes équivalents pour deux échantillons prélevés manuellement et trois prélevés à l'aide d'une trompe à vide, lors d'une culture en fioles agitées.
(Culture de Fomes fomentarius à 72h d'âge.)

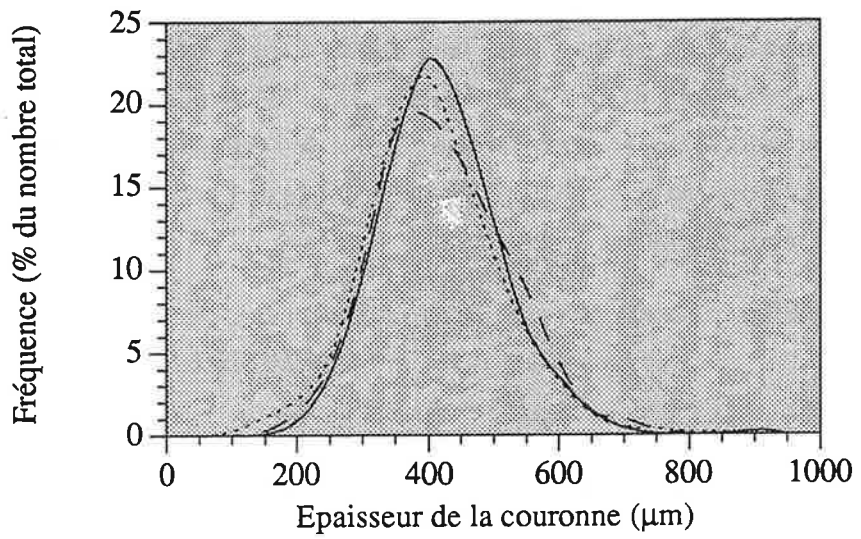


Figure IV.11: Distributions des épaisseurs des couronnes filamenteuses de trois échantillons d'une même culture, colorés indépendamment.

l'aide d'une pipette à l'extrémité tronquée, les trois autres par l'intermédiaire d'une trompe à vide.

Les échantillons prélevés manuellement présentent des différences significatives avec les trois autres tant au niveau de leur valeur moyenne (test de Student, $p<0,01$) qu'au niveau de la répartition de leur distribution. Ceci souligne à nouveau l'intérêt d'un soutirage rapide au moment de l'échantillonnage dans ce type de culture.

IV.2.2.2 Reproductibilité de la coloration

Les trois échantillons précédents, soutirés à l'aide d'une trompe à vide, ont été colorés indépendamment. La figure IV.11 présente les distributions obtenues pour l'épaisseur des couronnes filamenteuses des pellets de ces échantillons.

Les valeurs moyennes de ces trois populations ne présentent aucune différence significative (test de Student, $p>0,3$). L'identité statistique de leur distribution est montrée par la valeur du coefficient "c" du test de Kolmogorov-Smirnov Respectivement, pour les trois distributions considérées deux à deux, c est égal à 0,93; 0,74; ou 0,88. Ceci reste très inférieur à 1,36, valeur à partir de laquelle une différence peut être considérée comme significative avec un risque de 5%. La procédure de coloration présente donc une bonne reproductibilité, supérieure à celle de l'échantillonnage.

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
DES MINES DE SAINT-ETIENNE
Bibliothèque du Centre SPIN

IV.2.2.3 Reproductibilité de la détection par un même opérateur

L'appareillage utilisé pour le développement de la méthode d'analyse d'images n'autorise pas l'utilisation de procédures de seuillage automatiques. La phase de sélection des zones filamenteuses reste donc interactive et dépendante du choix de l'opérateur. Toutefois, les forts contrastes assurés par la coloration permettent de limiter la plage de choix de l'opérateur et donc de garantir une bonne reproductibilité de la détection.

La figure IV.12 présente les valeurs des paramètres mesurés sur un même pellet lors de dix acquisitions indépendantes réalisées sous des orientations aléatoires de la particule et sans visualisation par l'opérateur des valeurs de seuil sélectionnées.

On observe que la reproductibilité de la zone détectée comme le noyau est très bonne. En

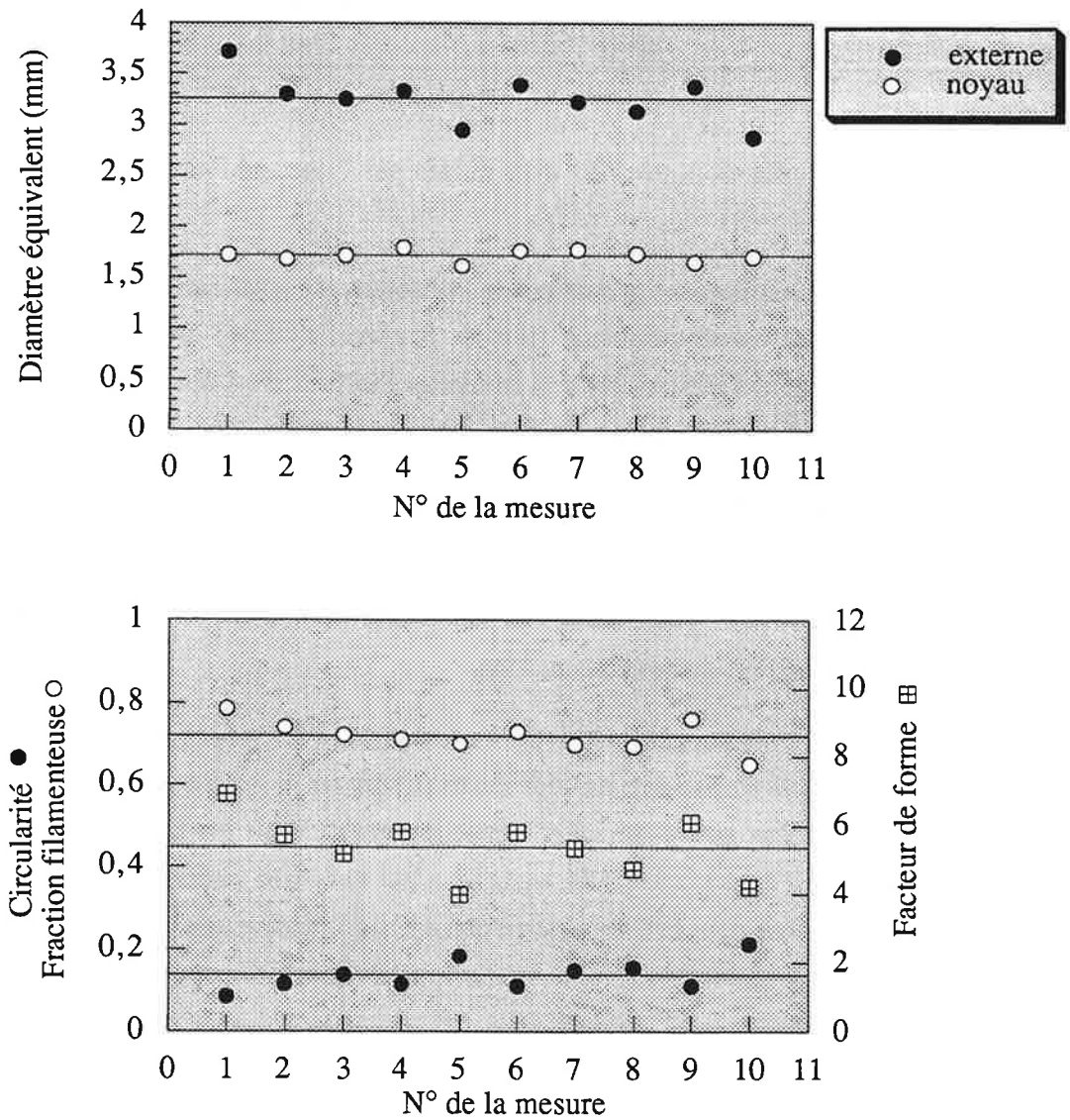


Figure IV.12: Mesures des paramètres morphologiques d'un même pellet, orienté aléatoirement, lors de 10 acquisitions indépendantes.

revanche, le diamètre total se montre plus variable alors que celui-ci est indépendant du choix de l'opérateur lors du seuillage. Ces variations représentent en fait les variations de la surface projetée d'une particule dont le contour volumique est très irrégulier. La surface projetée du noyau dont le volume présente une forme plus sphérique est moins dépendant de l'orientation de la particule au moment de l'acquisition.

La fraction filamenteuse exprime le rapport entre les surfaces projetées de la particule totale et celle du noyau. Sa variabilité est donc directement liée à celle du diamètre totale. Enfin on observe que le facteur de forme et la circularité (indépendants de la détection de la zone filamenteuse) apparaissent également fortement dépendants de l'orientation du pellet.

IV.2.2.4 Reproductibilité de la détection par deux opérateurs différents

Les figures IV.13 a-c présentent les distributions obtenues lors de l'analyse respective de trois échantillons (a, b et c) par deux opérateurs différents (1 et 2). Le tableau IV.1 montre les valeurs des coefficients "C" des tests de Kolmogorov-Smirnov réalisés sur ces distributions. Les valeurs très inférieures à 1,36 attestent de la bonne similitude des distributions, considérées deux à deux.

Echantillons	c
a1 - a2	0,337
b1 - b2	0,548
c1 - c2	0,298

Tableau IV.1 Valeurs du coefficient c du test de Kolmogorov-Smirnov pour les échantillons analysés indépendamment par les opérateurs 1 et 2

IV.2.3 Influence de la résolution

L'influence de la résolution sur la valeur des paramètres mesurés est montrée sur les figures IV.14 a-b.

On observe une complète indépendance du diamètre du noyau vis à vis de la résolution utilisée lors de l'acquisition (Figure IV.12 a).

La petite augmentation du diamètre total équivalent vers les résolutions les plus grossières s'explique par la présence de trous dans la couronne périphérique de la particule. Lorsque ces trous, par lesquels on distingue le fond de l'image, ont une taille supérieure à celle d'un pixel, ils ne sont pas détectés. En revanche, lorsque leur taille devient inférieure à celle d'un pixel, ils ne contribuent à l'intensité détectée par le pixel qui les recouvre que par une fraction proportionnelle

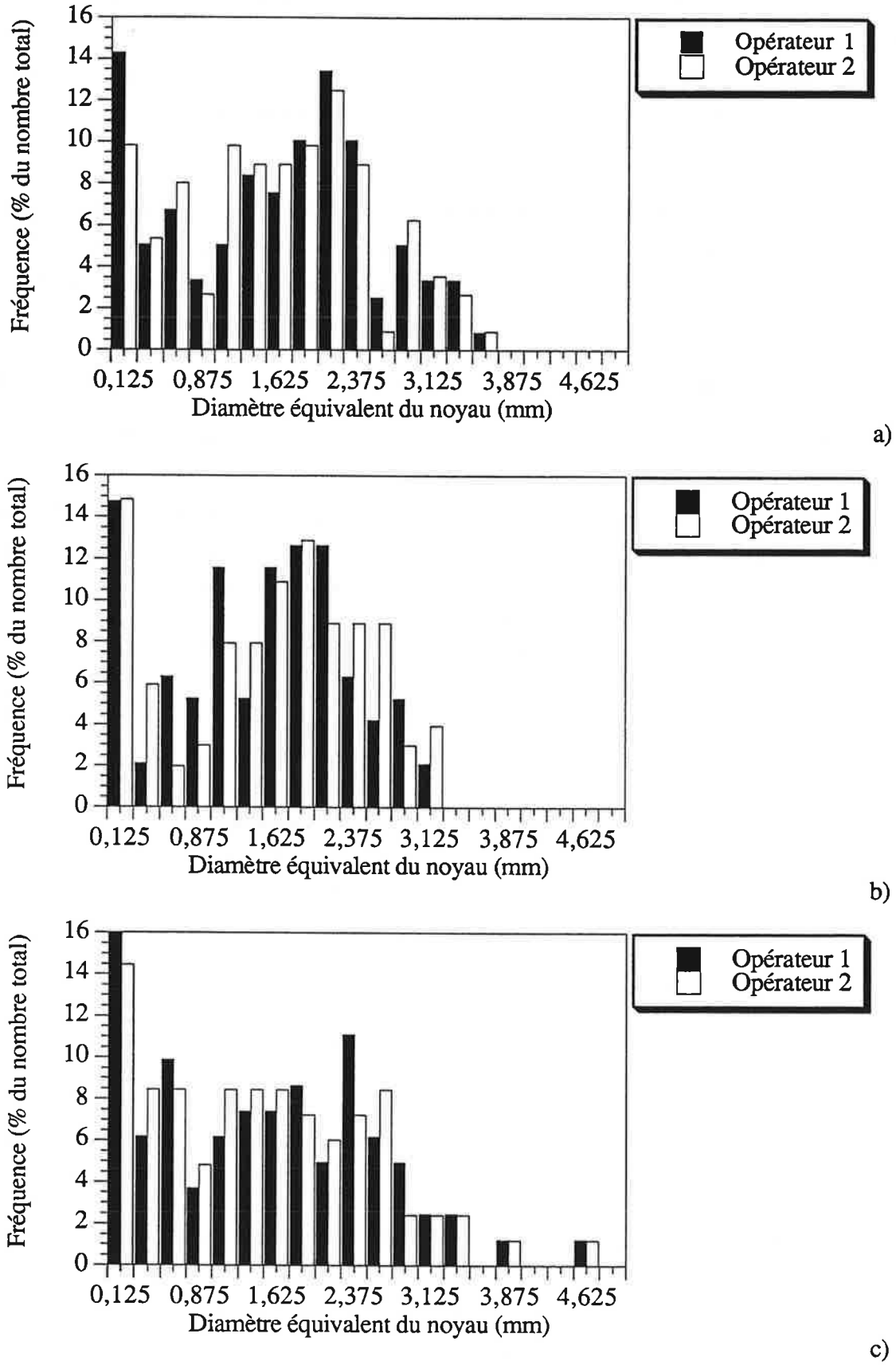


Figure IV.13: Distributions comparées des diamètres équivalents des noyaux de trois échantillons (a, b et c), analysés par deux opérateurs (1 et 2).

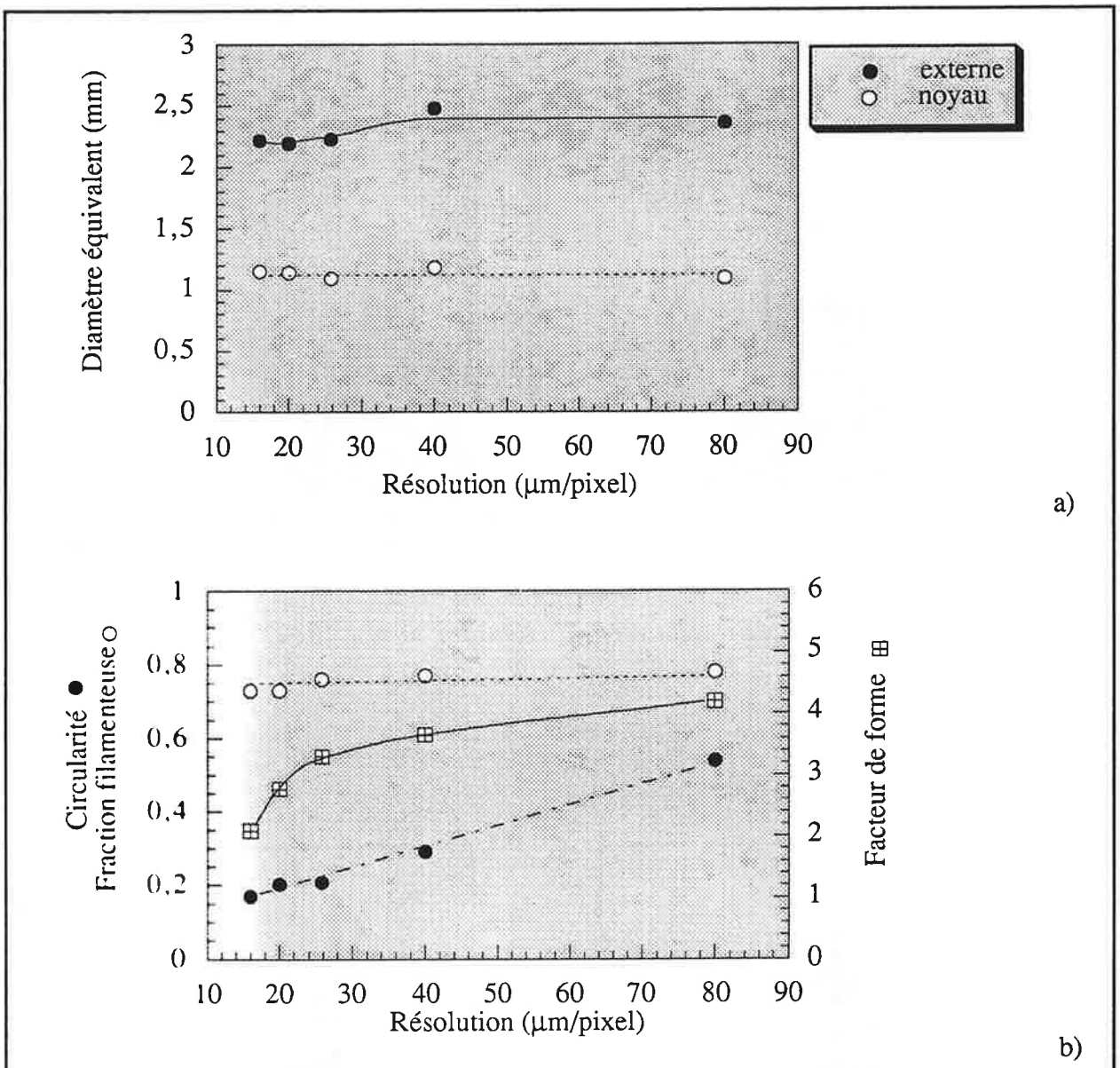
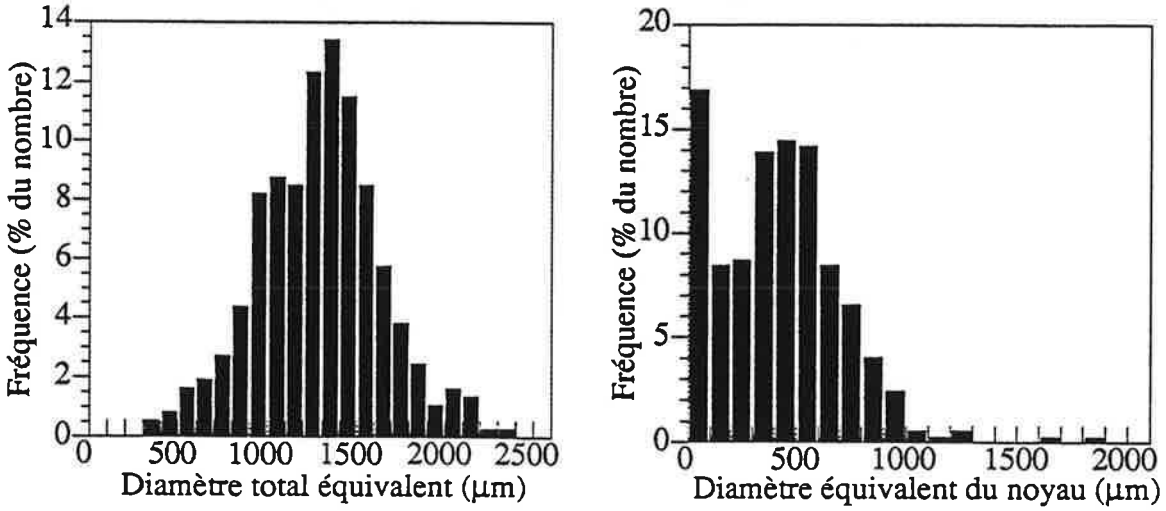


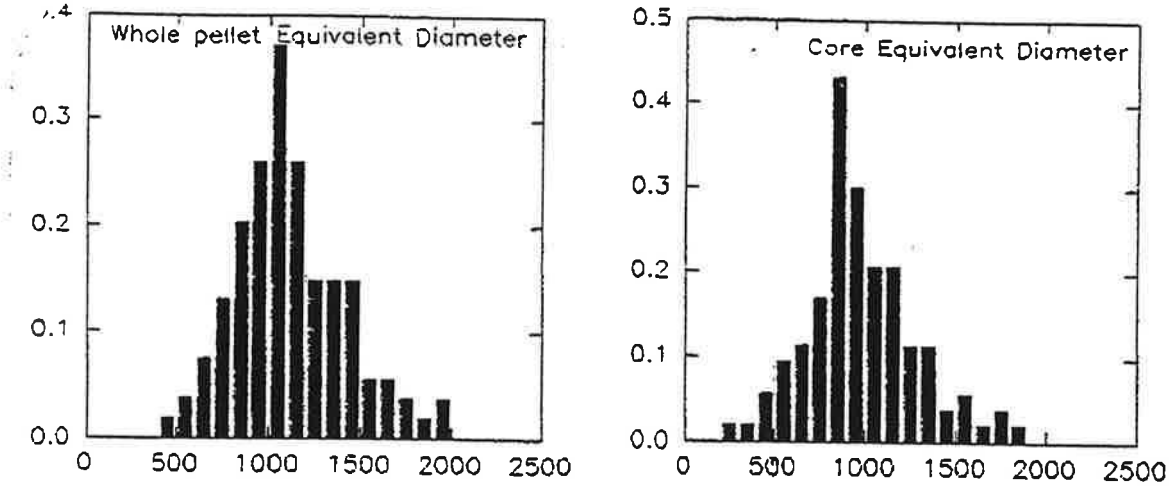
Figure IV.14 a-b: Influence de la résolution sur la valeur des paramètres morphologiques.

à leur surface, l'autre fraction provient des autres zones recouvertes par le pixel et correspondant, dans ce cas, à la couronne filamenteuse. L'intensité globale de ce pixel peut alors être suffisante pour entrer dans la fourchette de seuillage. Sur l'image binaire, le trou n'apparaît plus. Il est intégré à la couronne filamenteuse, d'où une légère augmentation de la surface totale de la particule, quand l'aire des pixels augmente, tant que tous les trous ne sont pas bouchés.

Les valeurs de la fraction filamenteuse (Figure IV.14b) confirment l'indépendance de la détection des deux zones vis à vis de la résolution. En revanche les deux paramètres morphologiques, le facteur de forme et la circularité, montrent une forte dépendance vis-à-vis de ce paramètre d'acquisition des images. Ainsi la circularité diminue linéairement lorsqu'on améliore la



a) méthode "coloration 1" (Durant et al., 1994)



b) méthode "érosion ultime" (Cox et Thomas, 1992)

Figure IV.15: Comparaison des distributions des diamètres équivalents externes et des noyaux, pour un même échantillon analysé :
a) par la méthode "coloration1", b) par l'algorithme de Cox et Thomas (1992).

résolution. Elle exprime ainsi une irrégularité accrue et donc une augmentation de la longueur du périmètre de la particule en fonction de la finesse de l'échelle à laquelle on l'observe. Ceci rappelle une propriété des objets fractals. Le facteur de forme augmente lui aussi lorsque la résolution devient moins fine, c'est à dire lorsque la surface de l'objet, exprimée en pixels, diminue. La réalisation d'une ouverture sur un tel objet constitué d'un plus petit nombre de pixels peut se traduire par une perte relative de surface plus importante. Ces propriétés amenuisent considérablement les informations qu'il est possible de retirer de ces facteurs de forme.

IV.2.4 Comparaison avec l'algorithme de Cox et Thomas (1992)

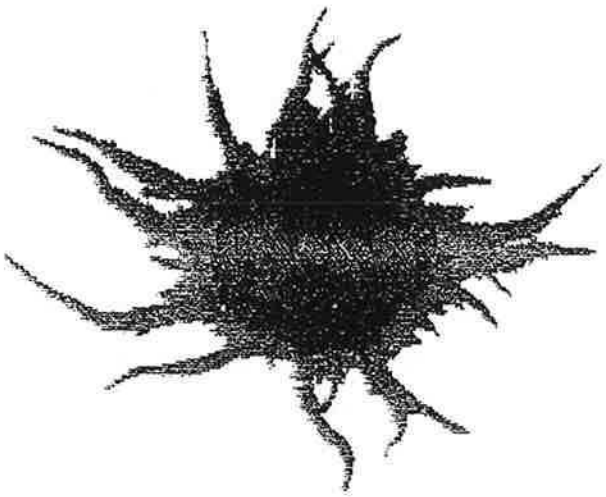
De façon à comparer la classification morphologique obtenue à l'issue de la procédure de coloration / décoloration avec celle issue du critère de reconnaissance des noyaux développé par Cox et Thomas (1992), deux échantillons d'une même culture de *Fomes fomentarius*, en fioles agitées, ont été respectivement analysés à St. Etienne, selon la procédure décrite en IV.1.1, et au sein du laboratoire de Biochemical Engineering de l'Université de Birmingham (U.K.) selon la procédure décrite par Cox et Thomas (1992). Ces dernières analyses ont été réalisées par P.W. Cox. Les résultats sont comparées sur les figures IV.15 a-b.

Pour simplifier la lecture, la méthode développée ici et basée sur la coloration préalable des échantillons avec le complexe cristal violet - lugol (Durant *et al.*, 1994), sera appelée méthode "coloration 1" dans la suite. La méthode développée à Birmingham par Cox et Thomas (1992) sera nomée méthode "érosion ultime".

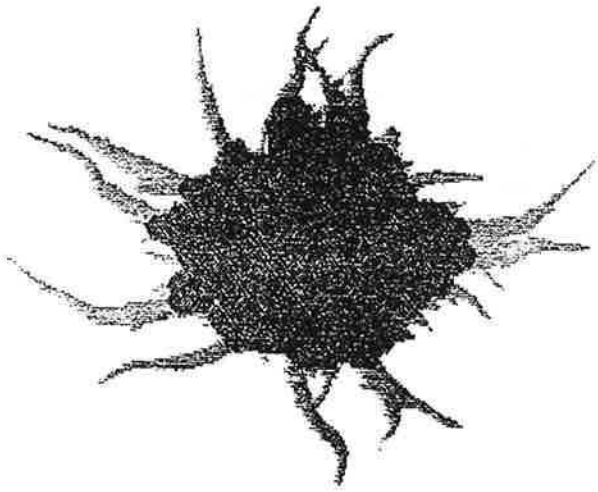
Les distributions des diamètres équivalents totaux possèdent des profils très semblables et attestent de la bonne similitude des deux échantillons. La faible différence constatée dans les valeurs moyennes peut soit représenter une variation inhérente à l'échantillonnage, soit provenir d'une différence de résolution (40 µm / pixel à St Etienne, 25 µm / pixel à Birmingham) selon le phénomène décrit en IV.2.3.

Le diamètre moyen des noyaux détectés par la méthode "coloration 1" est environ deux fois plus petits que ceux isolés par des opérations d'érosions ultimes combinées à des ouvertures de pas croissant. D'autre part, une fraction non négligeable de la population (17% en nombre, 8% en surface projetée) est complètement décolorée à l'issue de la procédure de coloration / décoloration. Ces particules apparaîssent dans la première classe de la distribution des noyaux et correspondent donc à des agrégats. En revanche, la méthode "érosion ultime" ne révèle la présence d'aucun agrégat au sein de l'échantillon. Par cette méthode, un noyau a été détecté dans chacune des particules analysées.

La différence constatée sur les distributions est illustrée par les figures IV.16 a et b. Elles caractérisent la différence fondamentale qui résident dans les critères de classification des deux



a) Méthode "coloration 1" (Durant et al., 1994)



b) Méthode "érosion ultime" (Cox et Thomas, 1992)
(série de 3 ouvertures avant détection de la zone compacte)

Figure IV.16: Comparaison du noyau détecté sur un même pellet selon un critère "diffusionnel", b) selon un critère morphologique.

méthodes. Ainsi, la reconnaissance d'un noyau par la méthode "coloration 1" est basée sur la présence d'une zone non accessible à l'éthanol lors de la phase de décoloration. Le critère est donc ici d'ordre **diffusionnel**. Dans le cas de la méthode "érosion ultime", la détection du noyau s'appuie sur la présence, dans l'image projetée de la particule, d'une zone compacte, sans trou laissant apparaître le fond de l'image. La plus grande zone compacte, réductible à un pixel central unique après une opération d'érosion ultime, est considérée comme le noyau. Le critère est donc ici d'ordre **morphologique**. Ce dernier critère tire profit du caractère diffus de l'enchêtrement mycélien dans la zone périphérique pour la différencier de la zone centrale où la densité du réseau filamenteux est tel qu'il ne permet plus d'apercevoir le fond de l'image. Toutefois la représentation en deux dimensions (sur une image) de ces particules à trois dimensions et dont la forme est plus ou moins sphérique, provoque la superposition, sur un même plan, de couches filamenteuses se trouvant normalement sur des latitudes différentes de la particule. Cette superposition, dont la probabilité augmente rapidement avec la taille des particules analysées, laisse alors apparaître ces zones filamenteuses comme une zone sans trou, indiscernable, sur un plan morphologique, de la véritable zone centrale compacte. Ce phénomène est responsable d'une surestimation de la taille des noyaux par la méthode "érosion ultime". Par la méthode "coloration 1", les zones filamenteuses périphériques, même si elles se recouvrent sur l'image, restent différenciables du noyau par leur absence de coloration et donc leurs niveaux de gris élevés.

D'autre part, le nombre et la localisation des trous détectés dans la zone périphérique de la particule sont des paramètres fortement dépendants de la résolution utilisée pour l'acquisition (IV.2.3). Ainsi, l'observation d'une particule avec une meilleure résolution a tendance à réduire la taille de la zone sans trou et donc le diamètre du noyau détecté par la méthode "érosion ultime". On a vu en IV.2.3 que la résolution n'a en revanche aucune influence sur le diamètre du noyau détecté par la méthode "coloration 1".

Les temps de traitement des deux méthodes sont comparés dans le tableau IV.2. La méthode proposée par Reichl et Yang (1992), également destinée à une caractérisation d'une biomasse sous forme d'agrégats, y figure aussi.

Plus rapide que la méthode de Reichl et Yang (1992), fondée sur le traitement d'images numériques, la méthode proposée ici présente des temps de traitement comparables à ceux obtenus par Cox et Thomas (1992). Signalons cependant que dans le cadre de cette dernière méthode, la coloration préalable de l'échantillon n'est destinée qu'à accroître le contraste. Cette phase de préparation est donc très courte — probablement limitée à une durée de 1 à 5 minutes — et ne requiert que peu de manipulations. En revanche, l'étape limitante de cette méthode apparait être l'opération d'érosion ultime qui, effectuée sur chaque particule, permet de distinguer les zones compactes (les noyaux) de celles présentant des trous (les couronnes ou les agrégats). Sur le Morphopericolor™, elle est réalisée en 1 à 6s, selon la taille de l'objet mais est

	Durant *et al.*, 1994	Cox et Thomas, 1992	Reichl et Yang, 1992
Coloration	10 min	1-5 min	
Acquisition	5-10 min		
Traitement - analyse des données	3 min* 5 min 35 s**	16,3 min* 30 min**	
Temps par particule	0,85 s	4,6 s	150 s /champs
Durée totale de l'analyse	20*-25** min	20*-35** min	> 60 min

Tableau IV.2: Comparaison des temps de traitements de la méthode d'analyse d'image développée ici avec deux autres méthodes précédemment publiés.
(pour un échantillon composé de 212particules - Temps mesurés pour la méthode Cox et Thomas (1992) et estimés pour la méthode Durant et al. (1994) - ** échantillon de 395 particules - Temps mesurés pour la méthode Durant et al. (1994) et estimés pour la méthode Cox et Thomas (1992). Pour la méthode Reichl et Yang (1992) seul une estimation du temps par image est fournie bien qu'il soit précisé qu'il varie en fonction du nombre de particules.)*

probablement un peu plus rapide sur le Quantimet™ 570 utilisé par l'équipe du Dr. Thomas. Dans le cas de notre méthode, le temps de traitement global dépend environ pour moitié de l'étape de coloration qui requiert une manipulation par un opérateur. Sa durée, imposée par les temps de pénétration du colorant au sein de la biomasse et par les phases de rinçage, est difficilement réductible. Cependant, elle est complètement indépendante du nombre de particules contenus dans l'échantillon. Puique la simplicité de l'algorithme permet d'obtenir des temps de traitement très rapides (0,85 s / pellet contre 4,6 s / pellet pour la méthode de Cox et Thomas), il apparait alors intéressant de traiter de grands échantillons par cette méthode. Ceci a en effet peu d'influence sur la durée d'analyse — 20 minutes pour 200 particules contre 25 minutes pour 400 particules — et on limite, de cette façon, les risques d'introduire un biais dans les résultats par une mauvaise représentativité de l'échantillonnage.

IV.2.5 Comparaison entre les deux modes de traitement, monochrome et couleur

La méthode "coloration 1" a été développée initialement pour permettre son utilisation avec un mode d'acquisition monochrome des images. Cette contrainte, imposée par le matériel dont nous disposions, ne permettait pas de tirer pleinement profit des résultats de la procédure de coloration / décoloration qui différencie les deux zones mycéliennes non seulement par leur contrastes exprimés en niveaux de gris mais aussi par leurs couleurs. De plus, l'observation en lumière transmise peut affecter la détection de certaines catégories de particules. Ainsi les grandes particules, particulièrement compactes, peuvent présenter une zone parfaitement opaque. Celle-ci interfère avec le contraste issu de la coloration et peut gêner la sélection des valeurs de seuillage par l'opérateur. A l'inverse, l'extrémité des zones filamenteuses ou les petits agrégats complètement décolorés peuvent présenter des niveaux de gris très proche de celui du fond de l'image et une légère modification du niveau supérieur de seuillage peut influencer leur détection.

Ceci nous a conduit a développer un algorithme de traitement d'images en couleur permettant de rendre l'étape de seuillage encore plus indépendante de l'opérateur et ainsi d'automatiser cette phase. L'algorithme est présenté en IV.2.4. Il sera appelée ici, pour simplification, méthode "coloration 1 bis".

De façon à comparer la différenciation opérée par chacune des méthodes, des pellets de *Fomes fomentarius,* colorés puis séchés sur une lame en verre, ont été successivement analysés par les deux algorithmes à St. Etienne et à Birmingham. Les figures IV.17 a-b et IV.18 montrent respectivement l'image numérique des pellets, observé sous un éclairage transmis, utilisée pour la méthode "coloration 1" (Figure IV.17 a), l'image binaire des couronnes issus de la phase de seuillage interactif de cette même méthode (Figure IV.17 b) et l'image numérique du canal vert obtenue lors de l'acquisition par la camera CCD couleur, sous un éclairage réfléchi indirect, et utilisée pour le traitement par la méthode "coloration 1 bis".

Ces figures illustrent les contrastes, créés par la coloration, en fonction du mode d'acquisition et du type d'éclairage utilisé pour chacune des méthodes. On observe tout d'abord que la coloration bleue du noyau est suffisamment intense pour créer, sur le plan vert de l'image couleur RGB, une zone où les niveaux de gris sont très faibles (proches de ceux du fond de l'image). Cette zone se différencie nettement de la couronne filamenteuse décolorées (blanche et donc présentant des niveaux de gris élevées sur le plan vert) et souligne clairement l'intérêt d'un mode d'acquisition couleur pour l'analyse de ce type de pellets colorés. Sur l'image numérique issue de l'acquisition monochrome sous lumière transmise, la transition entre le noyau et la couronne apparaît plus progressive et donc plus difficile à définir. Néanmoins, les pellets présente un noyau encore nettement contrasté (après une opération de délinéation ou d'amélioration de contrastes), qui reste délimitable par une opération de seuillage.

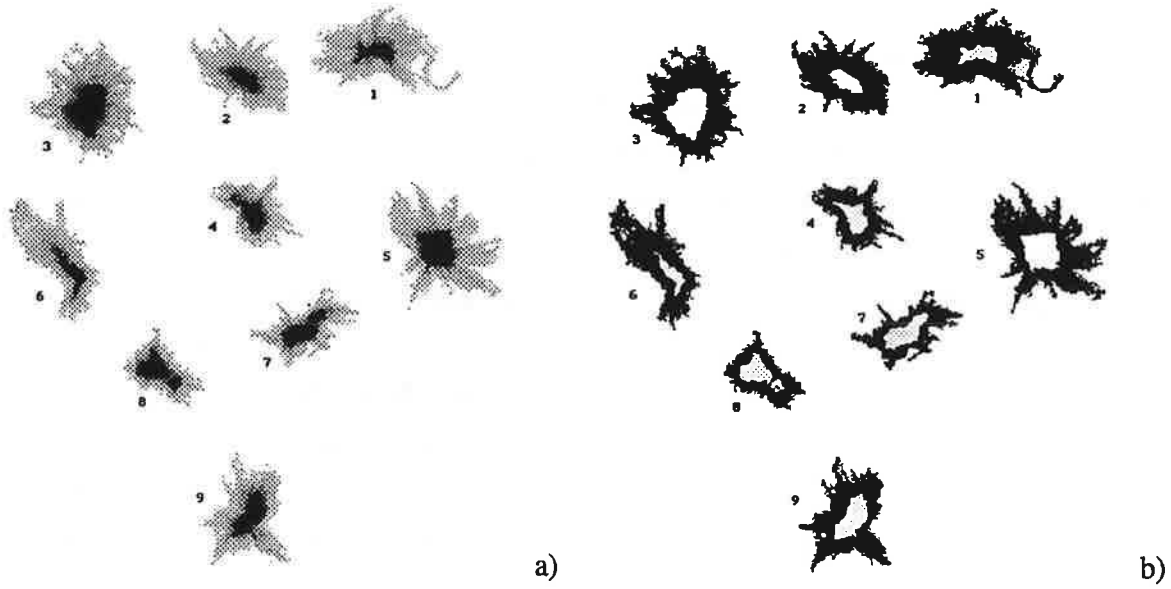


Figure IV.17: a) Image numérique (64 niveaux de gris) de pellets colorés et observés sous illumination transmise; b) Image binaire après seuillage interactif.

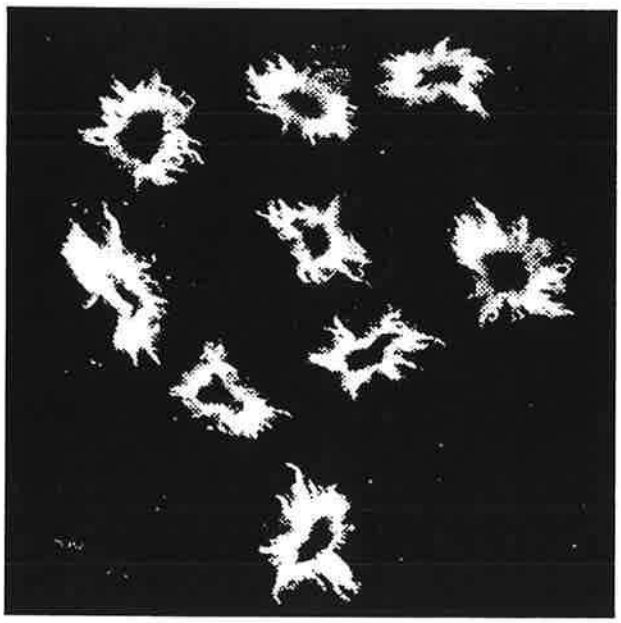


Figure IV.18: Image numérique du canal vert de la caméra CCD couleur des mêmes pellets observés sous illumination indirecte réfléchie.

Les formes et surfaces des noyaux définis selon les deux modes d'acquisition apparaissent très semblables. Les valeurs numériques des diamètres équivalents révèlent cependant des noyaux plus grands de 12 % en moyenne lorsqu'ils sont mesurés par la méthode "coloration 1bis". Outre le caractère plus subjectif du seuillage de la méthode "coloration 1" déjà signalé, la raison de cette différence peut également résider dans une plus grande sensibilité de la détection des zones colorées par l'algorithme couleur. En effet, le minimum d'intensité de la coloration requis pour créer un contraste perceptible en mode monochrome, sous illumination par transmission, est probablement supérieur à celui nécessaire à une détection du contraste sur le canal vert de la caméra CCD. Ceci explique que la transition couronne / noyau se situe à une position légèrement plus profonde en mode monochrome. Par ailleurs, il faut noter que cette comparaison a été effectuée sur des pellets séchés et donc étalés sur la lame. Or, lors du séchage, le colorant a tendance à désorber en formant un halo bleuté autour du noyau. Ce halo, imperceptible en mode monochrome, peut également être à l'origine de la différence de diamètre observée entre les deux modes d'analyse.

Une comparaison en conditions opératoires "réelles", c'est à dire sur des échantillons complets gardés en suspension, a également été réalisée tout au long d'une culture en fioles agitées.

La figure IV.19 montre l'évolution du diamètre moyen des pellets et des noyaux au cours du temps.

Les profils très proches confirment la bonne similitude de détection des deux méthodes.Ces résultats semblent également appuyer l'hypothèse d'un effet du halo de colorant formé lors du

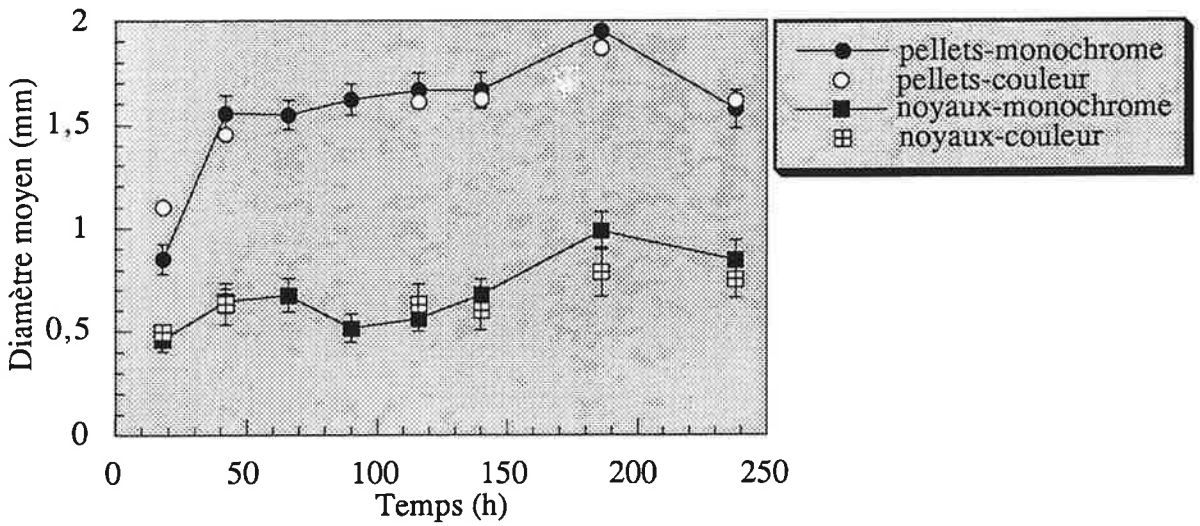


Figure IV.19: Evolution des diamètres équivalents externes et des noyaux mesurés par l'algorithme monochrome et l'algorithme couleur, lors d'une culture de Fomes fomentarius en fioles agitées.

séchage pour expliquer la différence de diamètres constatés sur les pellets des figures IV.17 et IV.18. En effet, cette différence systématique n'apparait plus en effet lorsque les pellets sont analysés en suspension.

Conclusion

La méthode de coloration associée à une procédure de traitement d'images exposée dans ce chapitre représente une nouvelle alternative pour la classification et les mesures morphologiques d'une biomasse mycélienne où les formes agrégées dominent.

Grâce à la reconnaissance des zones compactes dès l'étape initiale de seuillage, rendu possible par la procédure de coloration, l'algorithme de traitement d'images ne requiert que des opérations simples, disponibles sur la très grande majorité des analyseurs d'images commercialisés. La simplicité de l'algorithme de traitement permet d'obtenir un temps de traitement court (Tableau IV.2), parfaitement compatible avec une suivi en routine d'échantillons de fermentation.

L'originalité de la méthode repose sur le critère utilisé pour classer la biomasse en deux sous ensembles selon son accessibilité à un agent présent dans le milieu. Ceci en fait la première méthode permettant de décrire une biomasse mycélienne selon un critère que l'on peut qualifier de "diffusionnel". Un tel critère semble plus apte à représenter les propriétés physiologiques des différentes zones des agrégats que ceux précédemment proposés (Reichl et Yang, 1992; Cox et Thomas,1992).

Le développement d'un algorithme complémentaire bénéficiant du mode d'acquisition couleur a permis de s'affranchir des artefacts ou limites imposés par l'acquisition monochrome et d'automatiser l'étape de seuillage. Toutefois, l'utilisation d'une acquisition en mode couleur peut allonger quelque peu le temps de traitement en raison des opérations logiques entre images numériques nécessitées par cet algorithme même si cette opération ne consiste qu'en une simple différence de niveaux de gris généralement très rapidement réalisée entre deux images 512x512 pixels.

La coloration apparait comme une étape capitale, dont la durée est difficile à réduire et qui, au moins dans sa configuration actuelle, nécessite l'intervention d'un opérateur. C'est également sur cette étape que repose la subjectivité de la classification.

Dans l'optique d'une application en routine au niveau industriel d'une telle méthode, certains amménagements pourraient être considérés dans le but de parvenir à une automatisation de l'ensemble des étapes.

- L'automatisation de l'étape de coloration demanderait la conception d'une cellule de filtration spécifique autorisant la réalisation des phases de coloration, rinçage et remise en suspension de la biomasse de façon automatique. Si les apports des différentes solutions de colorants et l'élimination des solutions en excès par filtration ne semble poser aucun problème technique particulier, la phase de remise en suspension de la biomasse déposée sur le filtre pourrait s'avérer plus complexe à réaliser (rinçage à contre-courant ou décolmatage par une poussée pneumatique). Cet objectif semble cependant réalisable.
- La phase d'acquisition, effectuée avec un déplacement manuel du champs de prise de vue, pourrait aisément être réalisée à l'aide d'une platine motorisée commandée par l'analyseur d'images. Cependant, son automatisation complète demanderait également une réduction de la probabilité de contact entre deux particules en réalisant des dilutions plus importantes de l'échantillon et donc en traitant un plus grand nombre d'images. Cela n'affecterait qu'assez peu le temps de traitement global. Actuellement, les particules en contacts sont séparées manuellement par l'opérateur.
- On a vu en III.3.5 que l'utilisation d'un mode d'acquisition couleur permet d'automatiser complètement la phase de traitement d'images en supprimant l'interactivité du seuillage, inévitable en mode monochrome.

L'application de cette méthode aux deux souches étudiées dans ce rapport va maintenant être présentée.

Chapitre V

Application au suivi des fermentations

Chapitre V

Application au suivi des fermentations

L'étude des relations entre la morphologie des microorganismes filamenteux et leurs conditions de culture est d'autant plus complexe que chacun de ces deux paramètres influence et est conditionné par l'autre.

Les paramètres de culture qui peuvent influer sur le type morphologique prépondérant au sein de la biomasse sont nombreux et bien établis (Metz et Kossen, 1977, Van Suijdam et Metz, 1981, Braun et Vecht-Lifschitz,1991). Parmi ceux qui sont le plus fréquemment cités, on trouve:

- l'agitation (les contraintes de cisaillement),
- le milieu de culture (notammment la présence de particules solides ou le rapport C/N),
- le pH,
- la concentration d'oxygène dissous,
- la présence d'agents surfactants,
- le taux de croissance (ou le taux de dilution en cultures continues),
- la taille de l'inoculum (notamment dans le cas d'un inoculum constitué de spores),
- la composition de la paroi hyphale (notamment sa charge ionique et sa composition en lectines, glyco-protéines facteurs d'agrégation).

Les propriétés génétiques de la souche qui influent également sur le taux de croissance et la composition pariétale, doivent également être prises en compte.

A l'inverse, les cultures de microorganismes filamenteux confèrent au milieu des propriétés rhéologiques fortement variables avec la morphologie et la concentration en biomasse (Roels *et al.* 1974, Baker *et al.* 1988, Grant Allen *et al.*, 1990). En fermentations industrielles, ceci conduit souvent à la recherche d'un compromis pour déterminer les conditions d'agitation les mieux adaptées au procédé. En effet, la nature typiquement non newtonienne (souvent pseudoplastique) du bouillon de culture permet d'assurer une bonne homogénéité dans la zone à fortes contraintes de cisaillement (proche de l'agitateur) alors que dans les zones les plus éloignées de l'agitateur (proche des parois du réacteur), la viscosité augmente rapidement et peut annuler l'écoulement. Les transferts de masse et de chaleur dans ces zones stagnantes sont donc considérablement réduits et seul un faible volume de la culture peut être maintenu dans des conditions optimales. Une augmentation de la vitesse d'agitation (et donc de la puissance dispersée) permet d'améliorer l'homogénéité de la culture mais ceci est obtenu au détriment de la puissance consommée et d'une augmentation des forces de cisaillement qui peut être dommageable pour l'intégrité des hyphes.

Si l'existence de ces interactions est connue depuis longtemps, leur quantification était en revanche très limitée jusqu'à ces dernières années par l'absence de méthodes d'études rapides et reproductibles. Seules des variables globales, telles que la concentration en biomasse ou la concentration en métabolites, étaient facilement accessibles pour parvenir à une définition des conditions optimales de culture et à une connaissance des facteurs influants (Shügerl *et al.*, 1988); ou bien, lors d'études ponctuelles, de fastidieuses méthodes manuelles étaient utilisées pour la mesure de paramètres morphologiques tels que la longueur moyenne de l'hyphe principale ou de ces ramifications (Metz *et al.*, 1981). Ces études restaient toutefois incomplètes puisque la forme agrégée n'était pas prise en compte. L'analyse d'images a apporté un progrès considérable dans ce domaine en permettant le développement de méthodes applicables à un suivi en routine des évolutions morphologiques.

Dans ce chapitre, nous présentons l'application de la méthode, dont la mise au point a été traitée dans le chapitre IV, aux fermentations des deux souches de Basidiomycètes étudiées ici, *M. cucumis* et *F.fomentarius*. Pour la première souche, les caractéristiques morphologiques de la biomasse en relation avec la croissance sont examinées sous différentes conditions d'agitation et d'aération, en réacteurs classiques. Pour la seconde, la production de polysaccharides sur deux milieux de cultures, en fioles agitées et en réacteur, est comparée. Les conditions favorables à la prodution de polysaccharides sont reliées aux caractéristiques morphologiques de la biomasse et permettent de formuler des suggestions sur la définition d'un procédé de production adapté à ce type de souche. Enfin, certaines limites inhérentes à cette méthode, en particulier, ou à l'analyse d'images, en général, sont discutées.

V.1. PROPRIÉTÉS MORPHOLOGIQUES DE *Macrocystidia cucumis*

V.1.1. Particularités culturales: essais préliminaires

L'absence de données concernant les paramètres culturaux de la souche de *M. cucumis* nous ont contraint à réaliser une série d'essais préliminaires à son utilisation en fermentation. Ces essais s'intégraient initialement dans une étude plus globale de l'influence des conditions de culture sur la production du métabolite antivirale recherché. Ils comprenaient notamment des tests sur la composition du milieu de culture à l'aide de plans d'expérience et l'examen de différentes sources de substrats carbonés et azotés.

Nous ne présentons ici que les résultats facilitant l'interprétation de la caractérisation morphologique qui va suivre (§ V.1.2) ou soulignant quelques propriétés fondamentales de ce type de champignon (la sensibilité à la température par exemple).

V.1.1.1. Mode de préparation de l'inoculum

Cultures statiques ou agitées

L'obtention d'une biomasse mycélienne en suspension liquide, dont la concentration est facilement standardisable, représente une étape importante, préalable à l'inoculation des cultures de production. Dans ce but, trois modes de remise en cultures des fragments de colonies obtenues sur milieu gélosé, ont été comparés, d'une part, lors de la culture d'inoculum sur milieu "Malt" (Phase 2, cf. §II.1.1.6), d'autre part, après transfert sur milieu "L" (Phase 3). Ces trois modes de préparation sont:

- inoculation par des fragments de colonies grossièrement découpés à la spatule puis incubation sur table d'agitation ("Agités");
- broyage des fragments de colonies par une hélice à pales tranchantes puis incubation sous agitation ("Broyés");
- inoculation par des fragments grossièrement découpés à la spatule puis incubation statique ("Statiques").

A l'issue de la préculture (Phase 2), les trois types de cultures sont broyées et utilisées pour inoculer des fioles de milieu "L" à un taux de 10% aprés standardisation de l'inoculum.

La Figure V.1 présente la concentration finale en biomasse après 12 jours (Phase 2) et 8 jours (Phase 3) selon le mode de remise en culture. Les résultats montrent l'effet bénéfique du broyage qui, en multipliant les fragments mycéliens, génére de nouveaux points de croissance. La culture

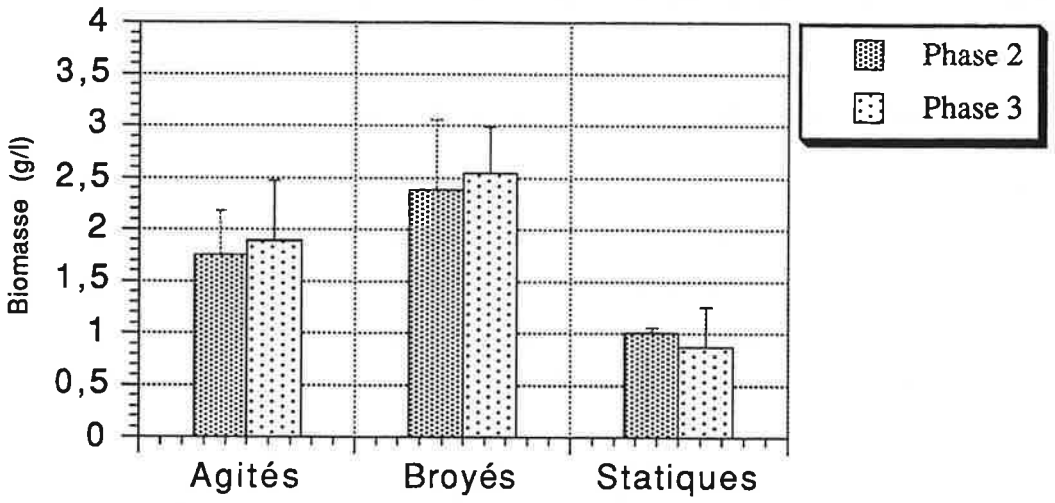


Figure V.1: Influence du mode de préparation de l'inoculum

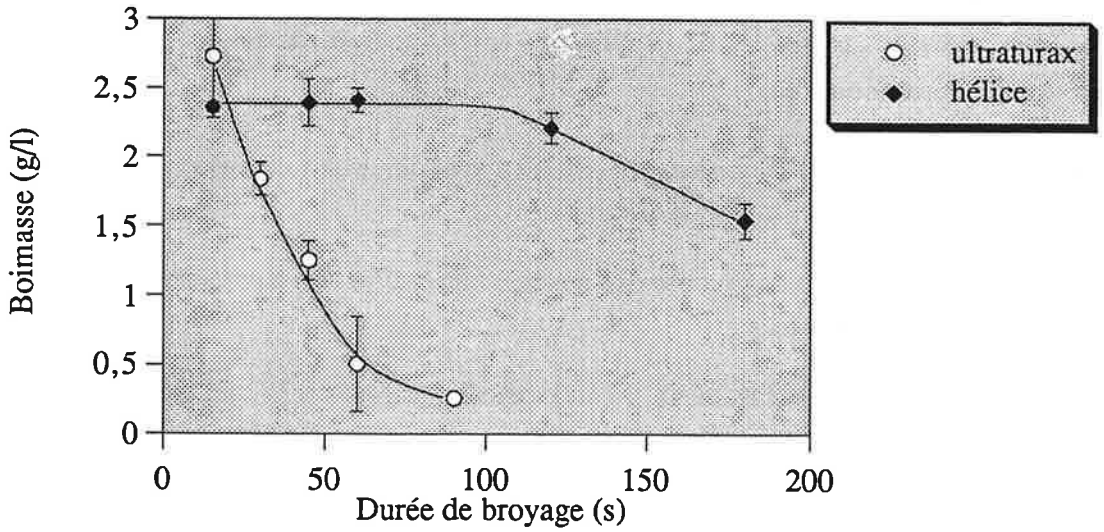


Figure V.2: Influence du mode et du temps de broyage sur la biomasse finale.
6 fioles par mesure ± écart type, inoculum à 8%v/v, 10j d'incubation, 24°C, 120 tours/min)

statique est parfois préconisée (Worgan, 1968; How Tan et Moore, 1992) car elle fournit, en surface, une nappe mycélienne sans pellet, facile à homogénéiser. Il faut noter que pour certaines souches de *Lentinus edodes* (espèce comestible pour laquelle les données culturales sont les plus abondantes), l'agitation de la préculture ne procure pas de gain significatif en biomasse comparée à une culture statique (How Tan et Moore, 1992).

Lors de la phase 3 (culture sur milieu "L"), les mêmes différences sont observées montrant ainsi que la fraction de biomasse active est plus importante dans un inoculum ayant subi un broyage initial. Les agrégats mycéliens y sont probablement petits et présentent moins de zone en dégénérescence comme c'est le cas dans les deux autres types de cultures.

Mode de broyage

Un homogénéiseur-disperseur de type Ultraturax™ (20000 t/min) et une hélice à quatre pales tranchantes ((Diamètre 2,5 cm - 2000 t/min) ont été comparés quant à leur influence sur le broyage de l'inoculum et sur la concentration finale de la biomasse sur milieu "L". La Figure V.2 présente les résultats.

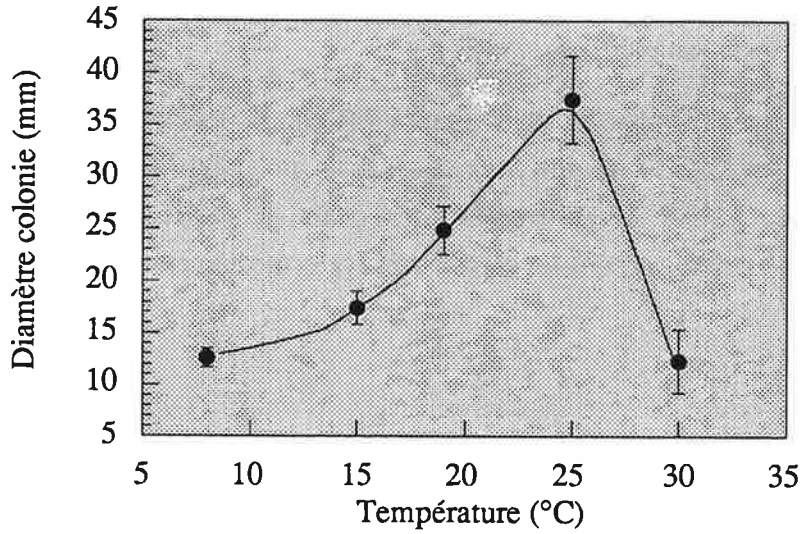
Le broyage à l'ultraturax n'est pas adapté à cette souche puisqu'il conduit rapidement à une altération de l'inoculum, même pour de courtes durées de broyage. Un temps de broyage d'une minute avec l'hélice a été choisi pour la préparation de l'inoculum. Ceci correspond au comportement décrit pour *L. edodes* pour lequel la valeur de l'unité hyphale de croissance n'est pas modifiée après une homogénéisation de plus de 3 minutes avec un homogénéiseur à pales de type "Waring blender" (How Tan et Moore, 1992). Le broyage reste en effet bénéfique pour la croissance tant qu'il ne produit pas de fragments dont la taille est inférieure au seuil de viabilité, c'est à dire la taille du compartiment cellulaire apical. Les paramètres morphologiques des hyphes, comme par exemple l'unité hyphale de croissance, n'ont pas été déterminés au cours de ce travail orientés vers la morphologie macroscopique du mycélium.

V.1.1.2. Conditions d'incubation

Température

La température optimale d'incubation a été déterminée lors de culture en milieu "Malt" gélosé, par mesure du diamètre des colonies après 21 jours d'incubation (Figure V.3).

On observe que la croissance la plus rapide est obtenue à 25°C et surtout qu'elle est fortement inhibée par une température supérieure. Cette sensibilité aux températures supérieures à la température optimale est comparable à celle décrite pour *L.edodes*, pour lequel l'optimum est également de 25°C (Song *et al.*, 1987).



FigureV.3; Influence de la température d'incubation sur la croissance.
(10 boites par mesure ± ecart type, 21j)

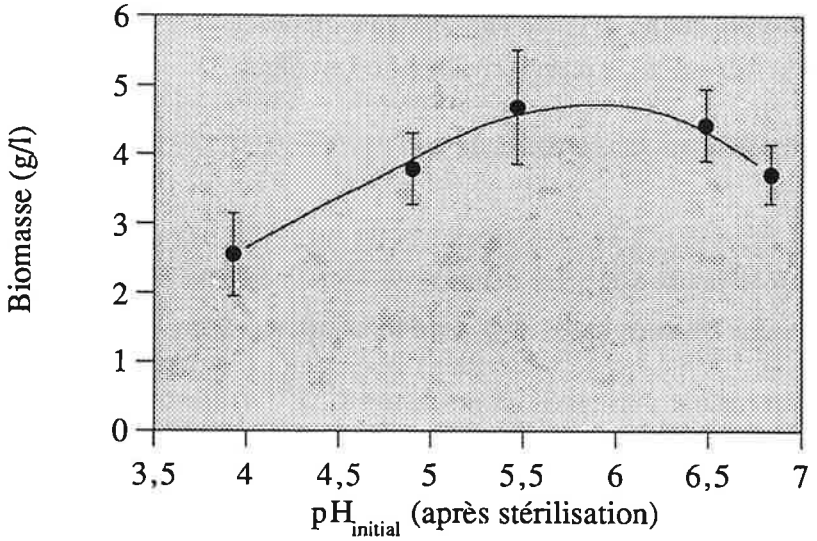


Figure V.4: Influence du pH initial sur la croissance.
(10 fioles par mesure ± ecart type, 10j, 24°C, 120 tours/min)

pH initial

Le pH optimal de croissance sur milieu "L" se situe entre 5,5 et 6 (Figure V.4). Il correspond à la gamme la plus fréquemment décrite (Worgan, 1968) mais est supérieur aux valeurs optimales de *L. edodes* (4,3 à 4,8) (Song *et al.*, 1987).

V.1.2. Evolution morphologique lors d'une culture type en réacteur

La fermentation MC01 va illustrer une évolution type de la biomasse de *M. cucumis* lors d'une culture en réacteur agité. Les paramètres de la culture sont rappelés au Chapitre II (Tableau II.1, p.39). Cet exemple va permettre de passer en revue l'ensemble des facteurs morphologiques directement mesurés par la méthode d'analyse d'image décrite dans le chapitre III, ou qui en sont dérivés.

La figure V.5 montre la courbe de croissance, l'évolution des concentrations en substrats et les taux de croissance et de consommation spécifique en oxygène obtenus lors de cette fermentation.

La croissance débute après 40h de latence et connait un premier ralentissement qui s'apparente à un phénomème de diauxie. Il correspond en effet à l'épuisement en ammonium du milieu (ou à l'épuisement des facteurs de croissance contenus dans le malt). L'augmentation de la biomasse reprend ensuite à partir des autres sources azotées organiques, l'hydrolysat de caséine et l'asparagine. La linéarité de cette phase (de 150 à 250h) se traduit par une diminution régulière du taux de croissance spécifique (0,01 à 0 h^{-1}). La phase stationnaire débute peu avant 300 h alors que glucose et oxygène dissous semblent encore à des concentrations supérieures aux valeurs critiques.

Les figures V.6 à V.11 présentent les distributions des différents paramètres morphologiques issus de l'analyse d'images. Selon les cas, elles sont exprimées soit en pourcentage du nombre total de particules détectées, soit en pourcentage de l'aire totale détectée. Cette dernière forme de présentation tend à montrer l'importance des grandes particules dans la biomasse globale alors que la première souligne la prédominance en nombre des petites particules. Pour la distribution des diamètres externes équivalents (Figure V.6 et V.7), les deux modes de réprésentation sont montrés et permettent d'illustrer cette remarque.

Les distributions en diamètres équivalents externes (Figure V.6 et V.7) et internes (noyau) (Figure V.8) permettent de décomposer la culture en quatre phases, correspondant aux quatre graphes présentés pour chaque distribution. La première représente la phase de latence (0-50h) au cours de laquelle les particules présentes sont le résultat direct de l'homogénéisation de la culture d'inoculum. On constate, sur la distribution en pourcentage d'aire (Figure V.7), la présence de grandes particules (2 à 3mm) imparfaitement fragmentées, très minoritaires en nombre (Figure V.6). Le décalage de la distribution vers la droite à partir de 60 heures marque le début de la phase de croissance (seconde phase, 50-200h). Celle-ci concerne l'ensemble des

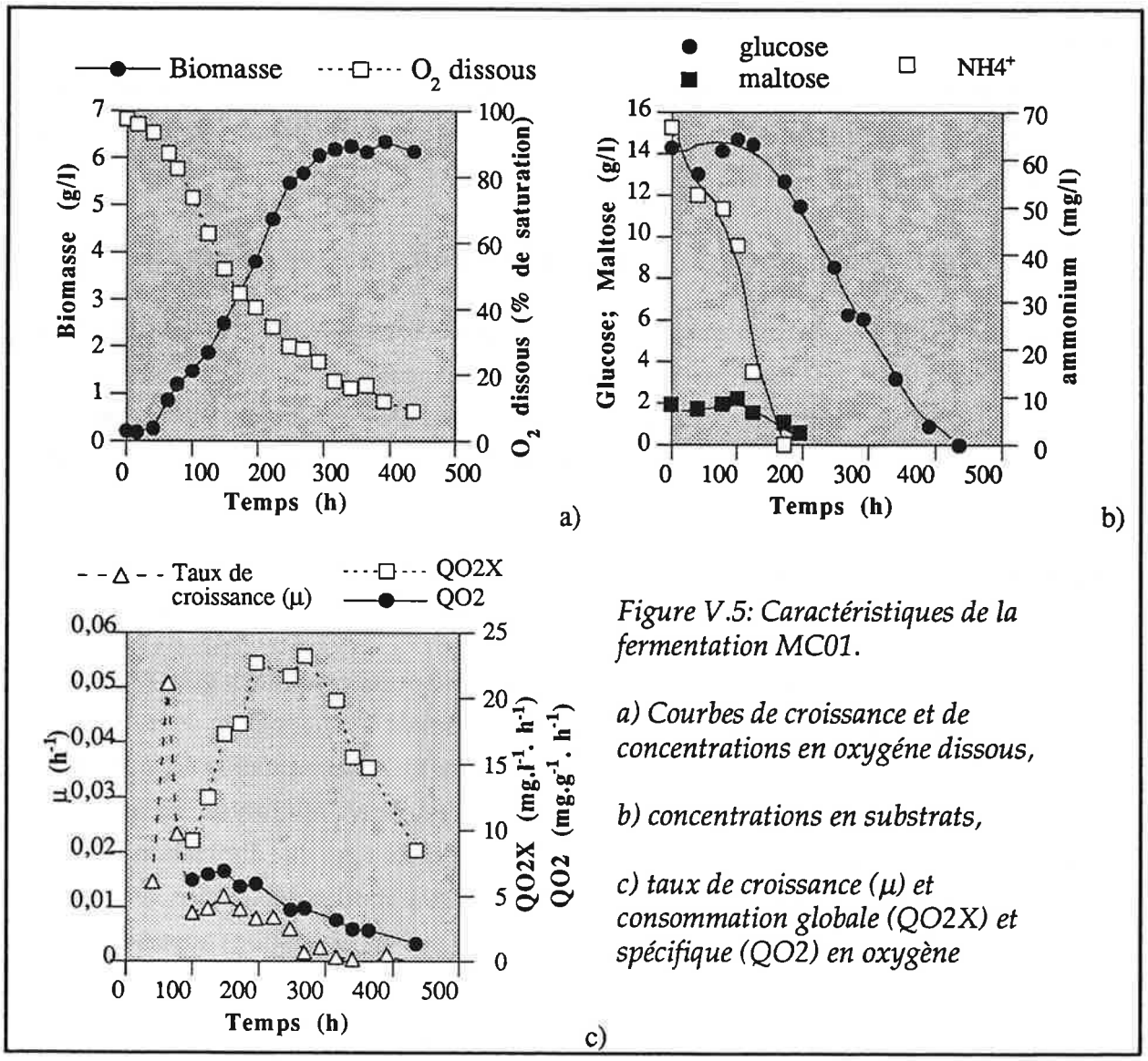


Figure V.5: Caractéristiques de la fermentation MC01.

a) Courbes de croissance et de concentrations en oxygéne dissous,

b) concentrations en substrats,

c) taux de croissance (µ) et consommation globale (QO2X) et spécifique (QO2) en oxygène

particules initialement présentes et produit une population hétérogène en taille mais dont l'essentiel de la biomasse est représenté par des pellets. Les noyaux de ces derniers atteignent 4 à 5mm de diamètre équivalent (Figure V.8). La croissance des pellets et de leurs noyaux s'interrompt après 200 heures de culture. On observe alors une transition morphologique avec la formation d'une nouvelle population de petites particules dépourvues de noyaux, les agrégats (troisième phase; 200-300h). Les pellets sont cependant conservés et maintiennent leur diamètre et celui de leur noyau jusqu'à la fin de la culture (phase stationnaire; 300-400h). La représentation de la population en pourcentage du nombre de particules en fonction des valeurs de la fraction filamenteuse indiquent que les particules sans noyau (fraction filamenteuse proche de 1) restent largement majoritaires, en nombre, tout au long de la culture (distributions non montrées). Les distributions en aire de la fraction filamenteuse démontrent que la part de ces particules sans noyaux dans la biomasse totale ne cesse de diminuer pendant toute la phase de croissance (Figure V.9). On observe également sur ces distributions que l'apparition d'une

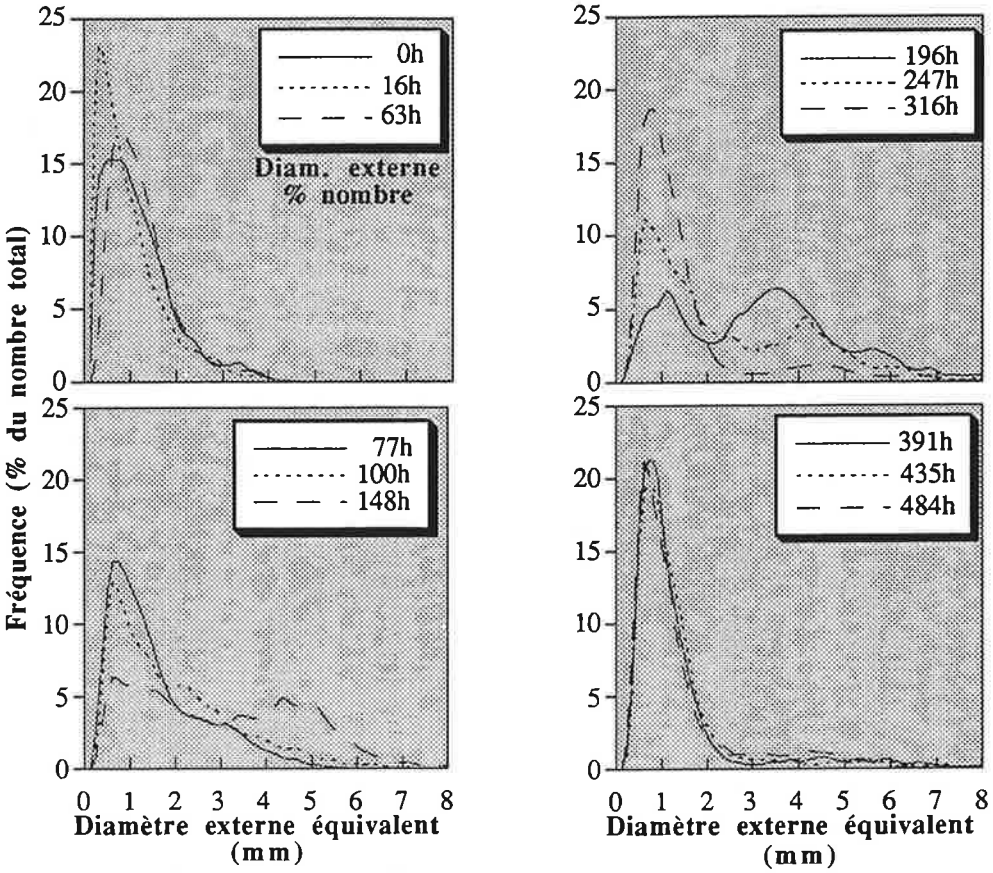


Figure V.6: Distributions des diamètres équivalents (en pourcentage du nombre de particules) lors de la fermentation MC01.

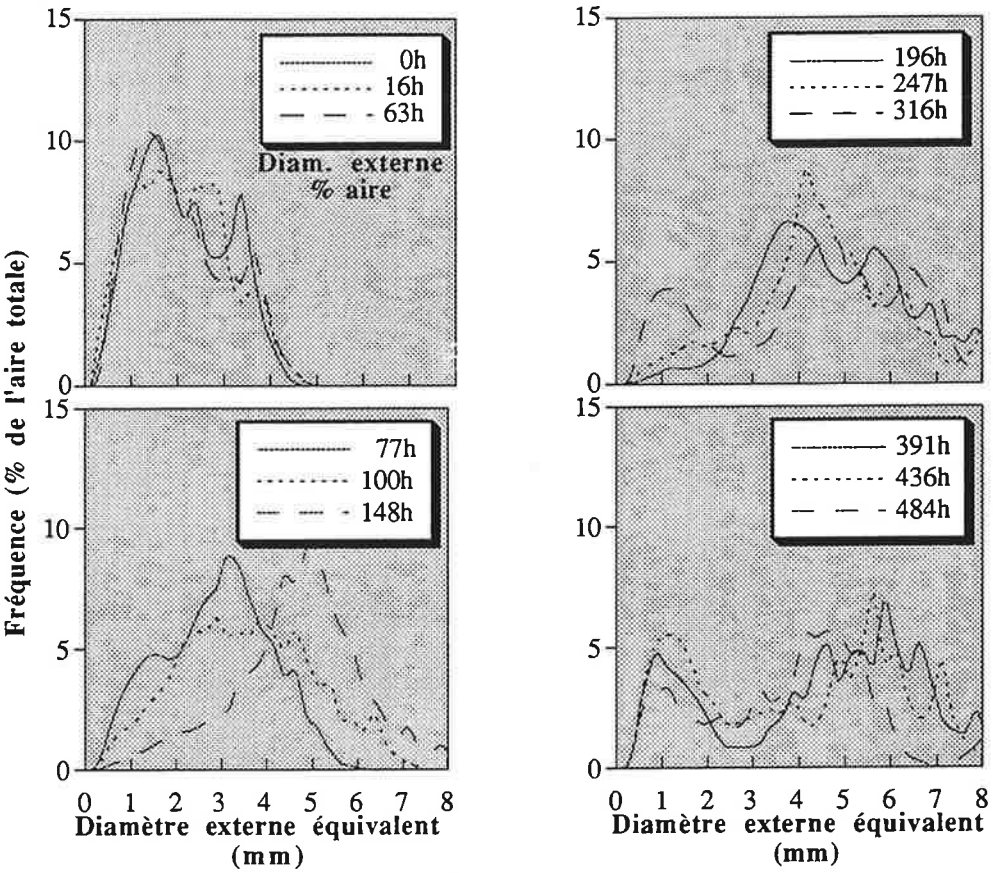


Figure V.7: Distributions des diamètres équivalents (en pourcentage de l'aire totale) lors de la fermentation MC01.

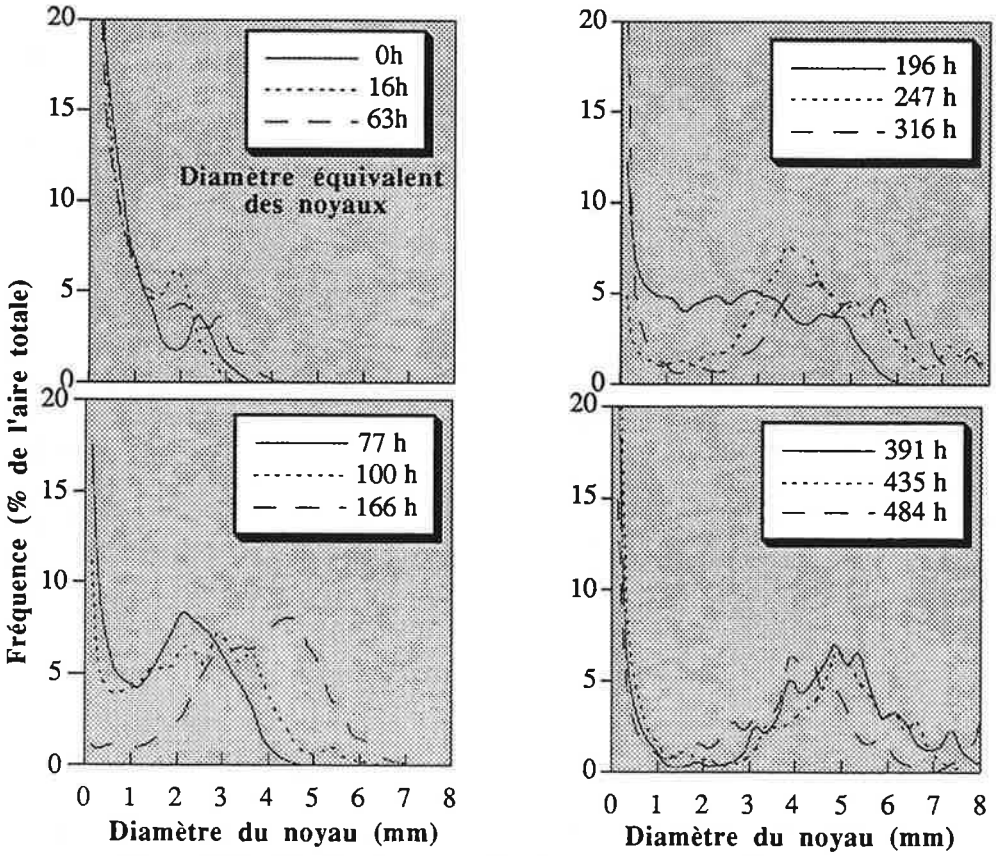


Figure V.8: Distributions des diamètres équivalents des noyaux (en pourcentage de l'aire totale) lors de la fermentation MC01.

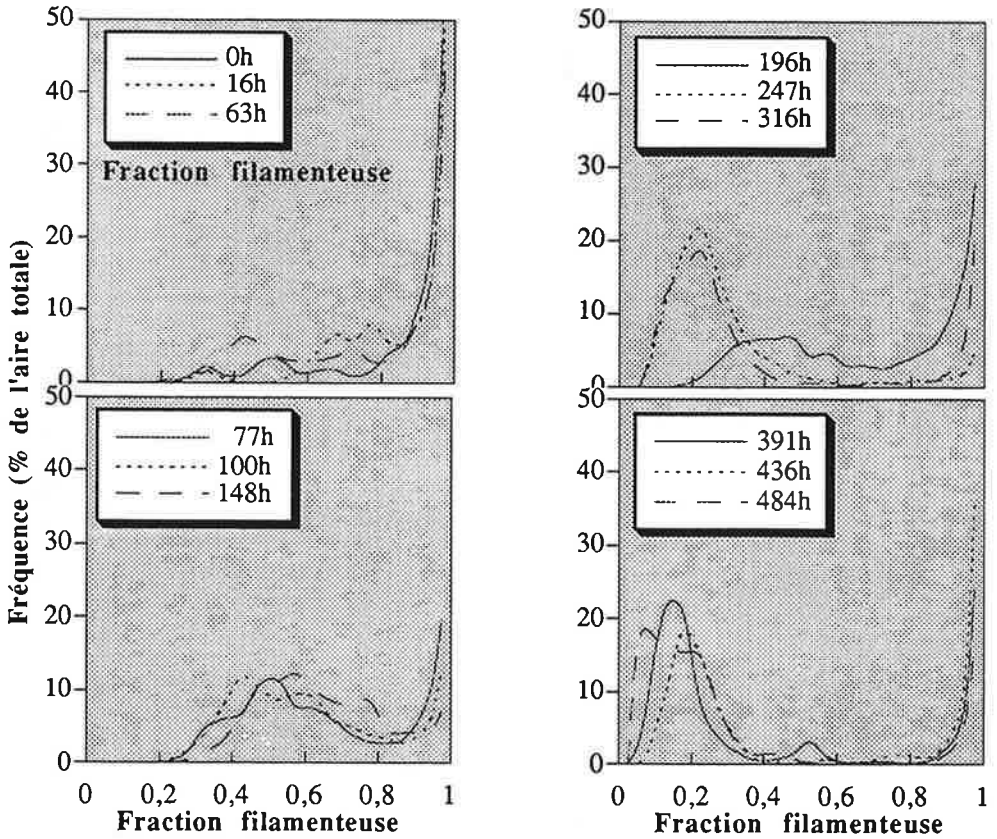


Figure V.9: Distributions de la fraction filamenteuse (en pourcentage de l'aire totale) lors de la fermentation MC01.

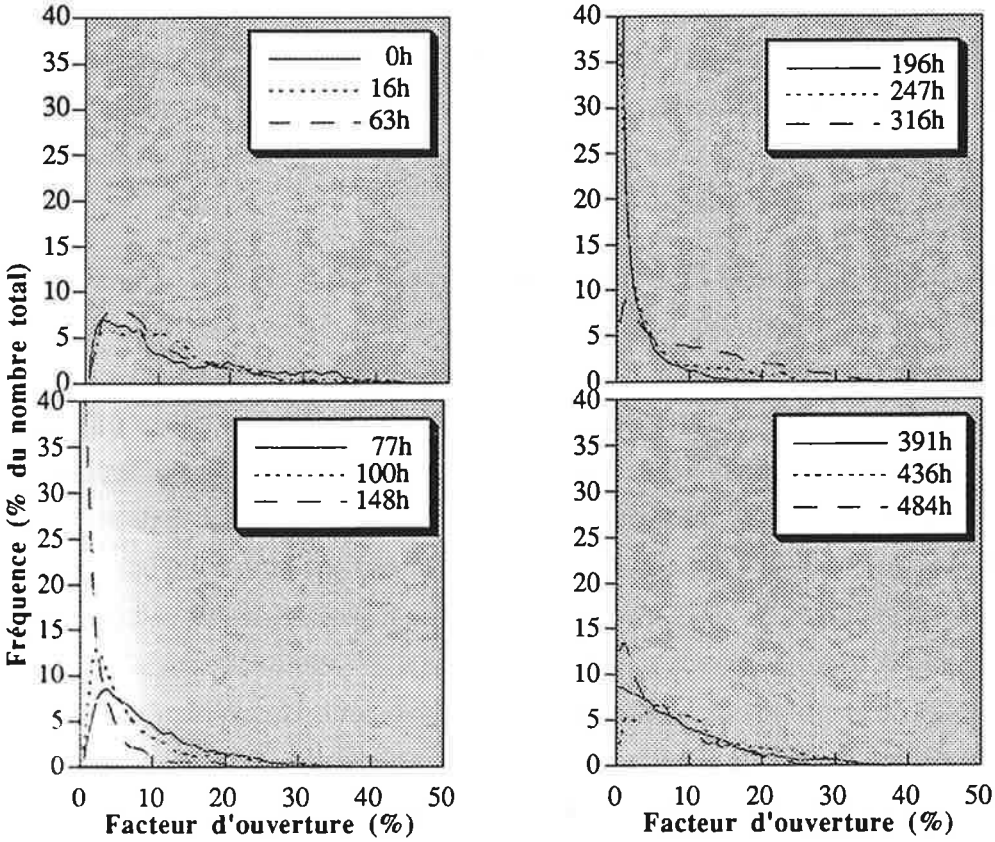


Figure V.10: Distributions des facteurs d'ouverture (en pourcentage du nombre total) lors de la fermentation MC01.

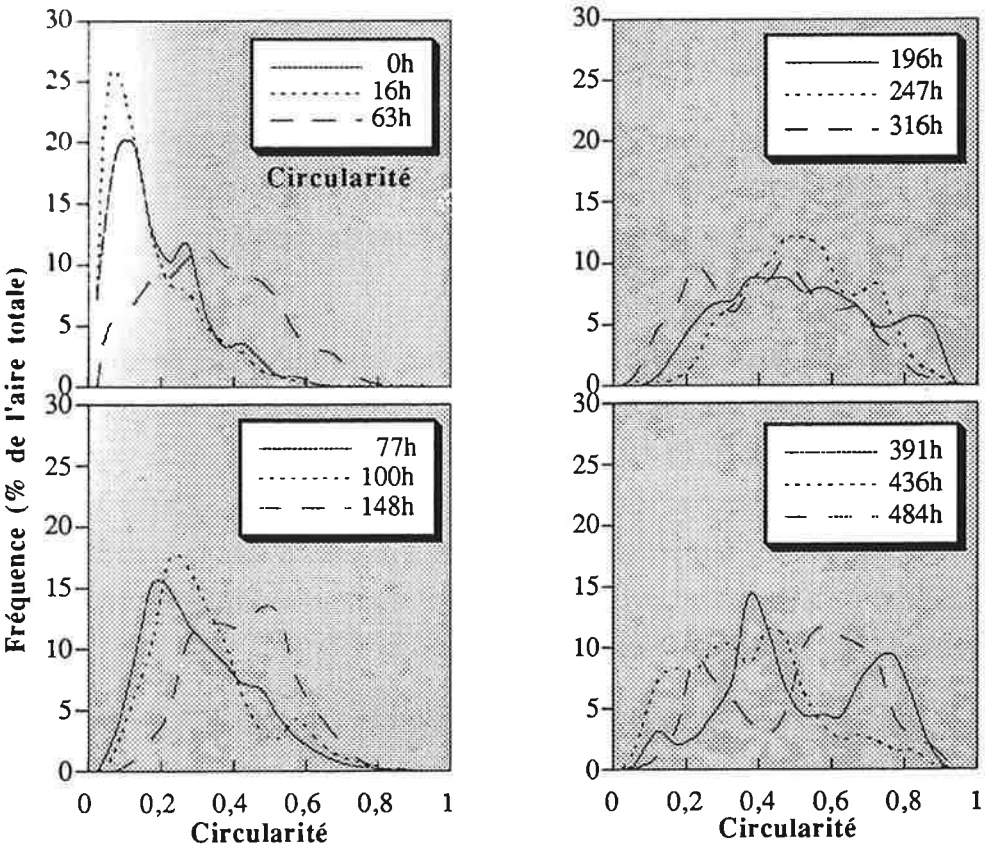


Figure V.11: Distributions de la circularité (en pourcentage de l'aire totale) lors de la fermentation MC01.

nouvelle population d'agrégats à partir de 250h correspond à une diminution importante de la fraction filamenteuse des pellets. Ces derniers présentent même, en fin de culture, des valeurs significatives de particules compactes, quasi-dépourvues de couronne filamenteuse périphérique (valeur de la fraction filamenteuse autour de 0,2). Les agrégats proviennent donc d'un processus d'attrition des couronnes des pellets.

La méthode d'analyse d'images fournit également deux facteurs de forme (circularité et facteur d'ouverture) dont les distributions sont présentées sur les figures V.10 et V.11. Les faibles valeurs du facteur d'ouverture (perte relative de surface après plusieures ouvertures) observées sur les distributions en aire attestent de la compacité de forme des pellets (distributions non montrées). Cependant, la grande dispersion des valeurs de ce facteur sur les distributions en nombre (où les petits agrégats apparaissent prépondérants) démontrent sa dépendance vis à vis de la taille des particules. Ce facteur apparait ainsi peu propice à mettre en évidence les changements morphologiques ayant affectés la couronne filamenteuse des pellets de cette culture. La même remarque quelque peu nuancée peut être formulée pour la circularité (Figure V.11). En effet, si au cours de la croissance la circularité semble évoluer de façon régulière vers des valeurs significative de contours plus réguliers (valeur plus proche de 1), la grande dispersion de la distribution après 200h ne permet pas de distinguer au sein de la biomasse les groupes morphologiques (pellets et agrégats) évoqués précedemment et surtout ne révèle pas la transition morphologique (l'érosion des couronnes filamenteuses) mise en valeur par les graphes de la fraction filmanteuse.

V.1.3. Influence de la limitation en oxygène

Pour déceler une éventuelle influence de la limitation en oxygène sur l'évolution morphologique de la biomasse, une fermentation MC.02 a été réalisée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour MC.01 mais avec un taux d'aération réduit de moitié (0,1 vvm contre 0,2 vvm pour MC.01).

La figure V.12 présente la courbe de biomasse et des concentrations en substrats (oxygène dissous, glucose et ammonium) pour cette fermentation MC.02. En les comparant avec les figures correspondantes de MC.01 (figures V.5), on peut y remarquer la rapide chute de la concentration en oxygène dissous et son maintien à un niveau nul dès la 250ème heure de culture. Une croissance limitée et une faible consommation en glucose en sont la conséquence. Comme souhaitée initialement, la limitation en oxygène intervient avant les limitations en substrats et est bien responsable de l'arrêt de la croissance.

Les principaux paramètres morphologiques des deux fermentations sont rassemblés et comparés sur les figures V.13 et V.14.

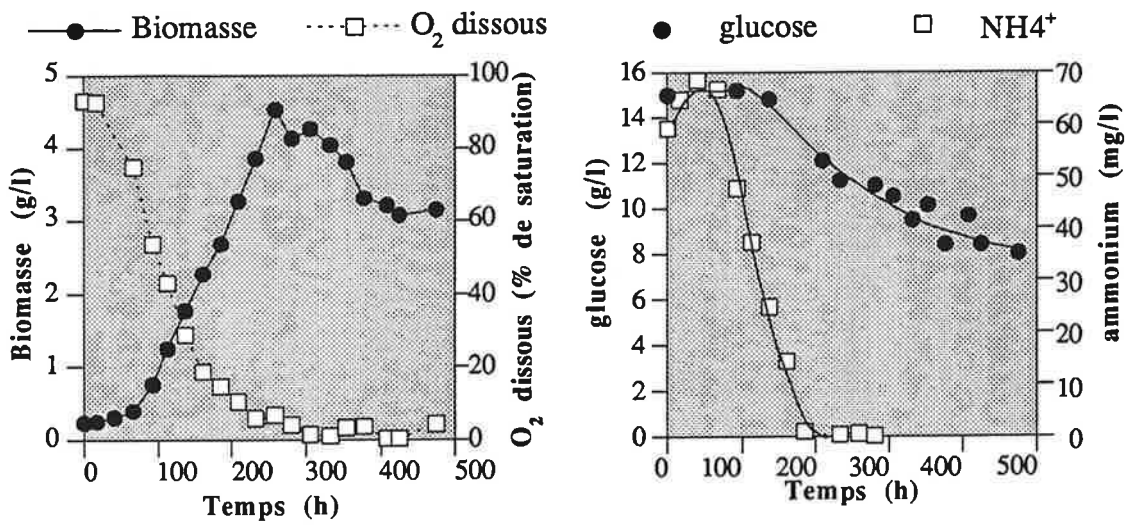


Figure V.12: Evolution de la biomasse (poids sec) et des concentrations en subtrats lors de la fermentation MC.02

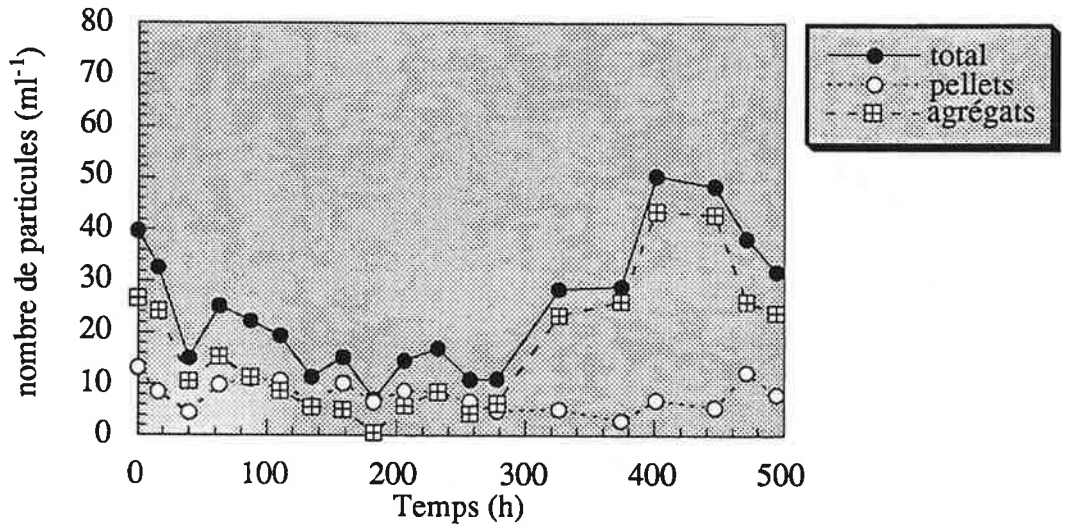
L'évolution du nombre de particules, montrée sur les figures V.13a et V.14a, confirme l'augmentation du nombre d'agrégats, après 250h, chez MCO1 alors que cette augmentation est beaucoup moins prononcé pour MCO2.

La répartition de la biomasse en catégories mycéliennes exprimées en pourcentage de la surface projetée totale (Figure V.13c et V14c) permet d'illustrer l'évolution distincte des zones compactes (noyaux) pour les deux fermentations. Pour MC01, les noyaux conservent une part prépondérante au sein de la biomasse tout au long de la culture (Figure V.13c), et l'accroissent même pendant la phase stationnaire en raison de l'érosion des couronnes (Figure V.13.b).

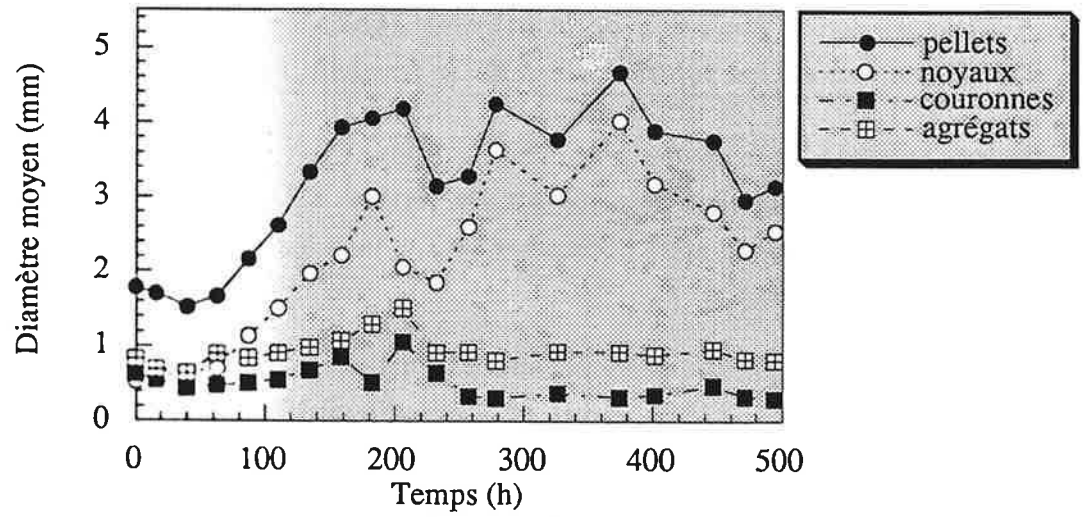
Pour MC02, en revanche, la part des noyaux commence à diminuer dès la fin de la croissance (250 h) (Figure V.14c) simultanément à la réduction de leur diamètre moyen (Figure V.14b). Puisque, dans ce cas, l'épaisseur des couronnes croit de façon linéaire tout au long de la culture on observe une augmentation régulière de leur part relative au sein de la biomasse.

Par ailleurs on peut noter que pour MC.02, la vitesse moyenne de croissance des noyaux (9,8 µm/h) apparaît deux fois plus faible que celle constatée lors de la fermentation MC.01 (20,1 µm/h) (Figure V.13 b et V.14b).

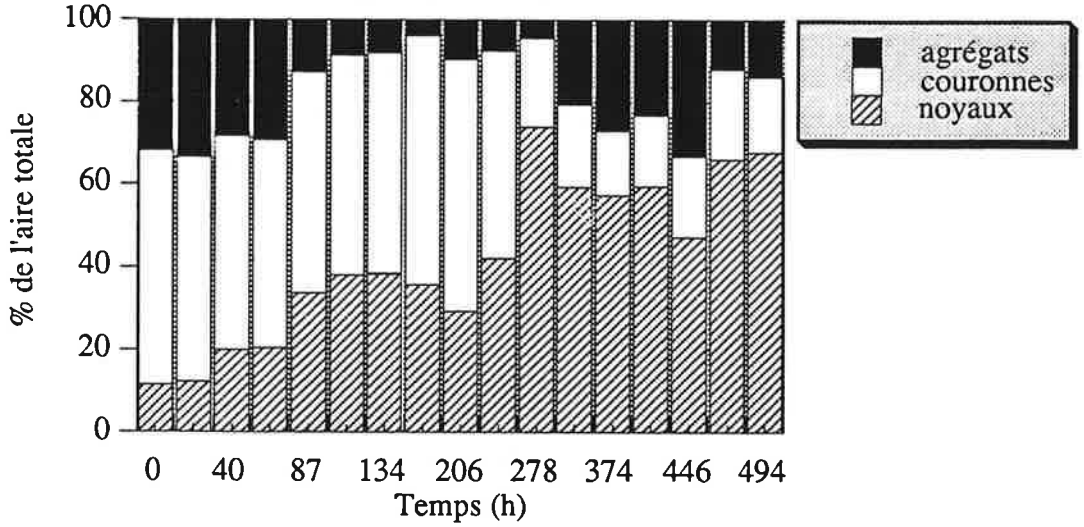
Les distributions de populations, représentées simultanément pour les deux paramètres "diamètre équivalent externe" et "fraction filamenteuse", et exprimées en pourcentage de l'aire totale détectée, complètent cette description (Figures V.15 et V.16). Après 200 h de culture, les deux populations ont encore des compositions assez similaires. Elles comportent chacune deux ensembles de particules; le premier représente des pellets de grands diamètres (4-6 mm) dont la



a)



b)



c)

Figure V.13: Caractéristiques morphologiques de la biomasse lors de la fermentation MC.01: a) nombre de particules b) diamètres et épaisseurs moyens (nnes) c) part relative de chaque catégorie mycélienne.

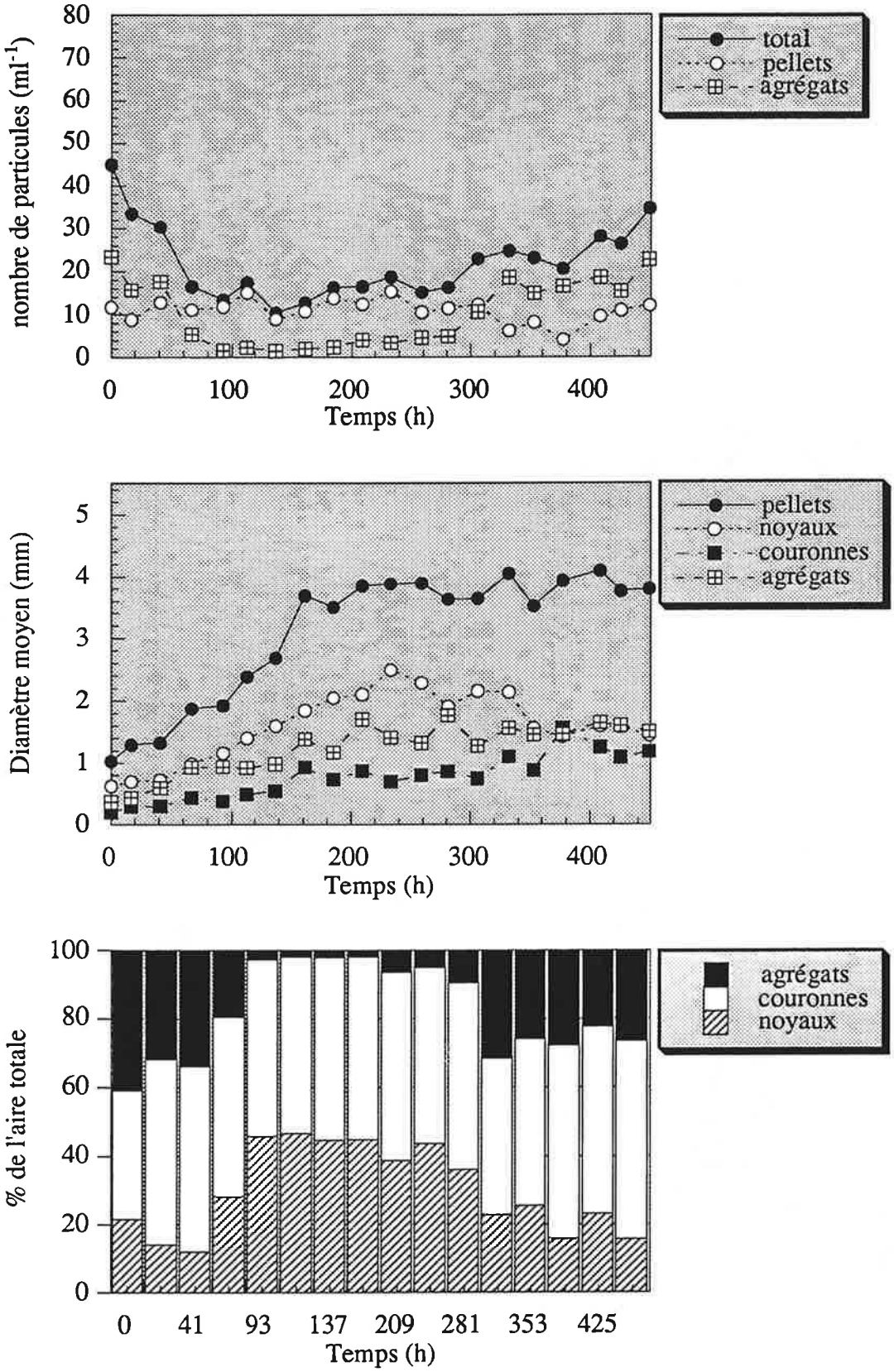


Figure V.14: Caractéristiques morphologiques de la biomasse lors de la fermentation MC.02: a) nombre de particules b) diamètres et épaisseurs moyens (nnes) c) part relative de chaque catégorie mycélienne.

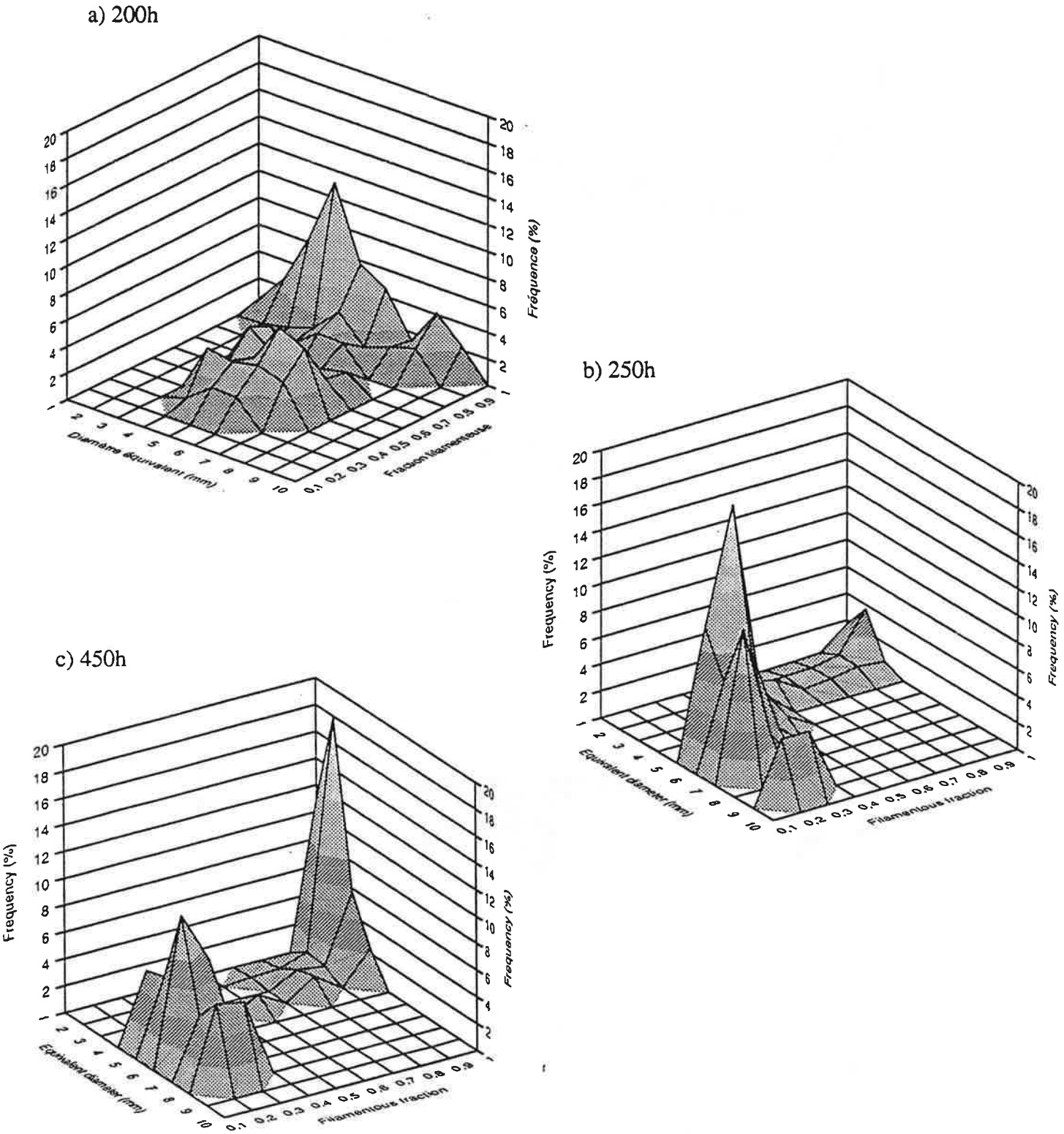


Figure V.15: Distributions en fonctions du diamètre externe et de la fraction filamenteuse pour MC01

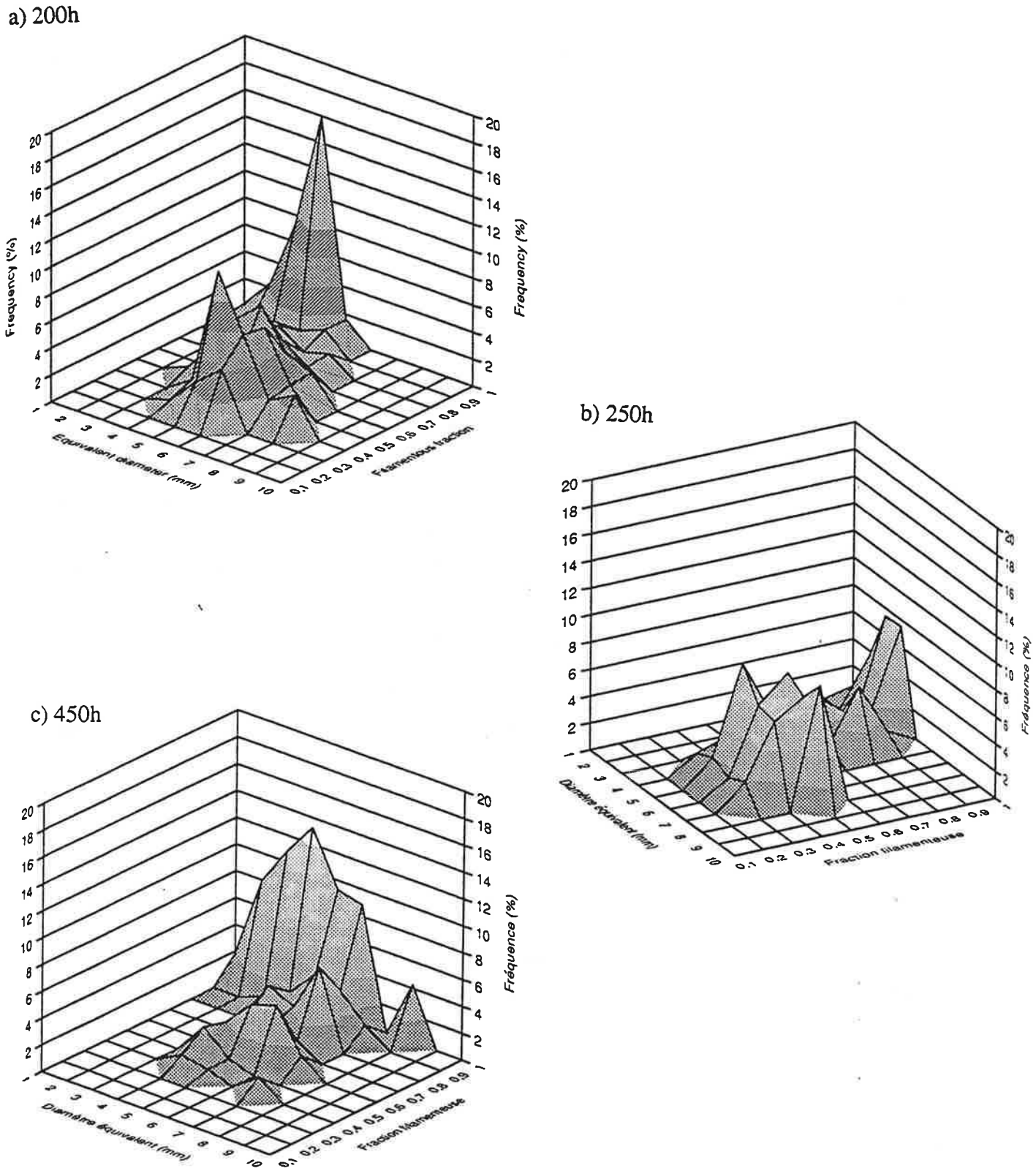


Figure V.16: Distributions en fonction du diamètre externe et de la fraction filamenteuse pour MC02.

fraction filamenteuse est réduite (0,3- 0,5), le second représente des particules purement filamenteuses (fraction filamenteuse proche de 1) d'assez grande taille (3 mm de diamètre équivalent). A partir de 250h, chaque culture connaît une évolution spécifique. Pour MC.01, la biomasse conserve et accentue son caractère bipolaire jusqu'à la fin de la culture. Les particules filamenteuses se fragmentent et augmentent en nombre et surface globale. Les pellets perdent leur couronne (grandes particules avec une fraction filamenteuse proche de 0). En revanche, pour MC.02, ce processus de bipolarisation, amorcé pendant la phase de croissance, n'est pas mené à son terme. Certains pellets conservent une couronne significative (fraction filamenteuse supérieur à 0,3) alors que d'autres se fracturent pour donner naissance à de grands fragments filamenteux. La population reste polydispersée en taille.

V.1.4. Influence des conditions d'agitation

Pour évaluer l'influence du régime d'agitation sur la morphologie de la biomasse, trois fermentations (MC03, MC04, MC05) ont été conduites en réacteur de 2,5 litres utiles respectivement agité à 120, 200, 300 rpm (vitesse en bout de pales: 0,31 m/s, 0,52 m/s, 0,78 m/s). Ces cultures ont été conduites sans régulation de pH pour deux raisons. Tout d'abord, celà permettait de conserver les conditions les plus proches de celles qui avaient permis de découvrir initialement l'activité anti-herpétique de cette souche fongique, ensuite on provoque des contraintes culturales supplémentaires susceptibles d'accélérer les changements morphologiques.

Les figures V.17 a-b présente les courbes de croissance de ces trois fermentations. On peut observer que l'absence de régulation de pH limite considérablement la concentration finale en biomasse (comparée à MC01 ou MC02). De plus, l'agitation, bien que modérée, affecte la croissance de cette souche. Aucune de ces fermentations n'a conduit à l'épuisement du milieu en glucose (courbes non montrées). La plus faible concentration résiduel, obtenue sur MC03, était d'environ 5g/l en fin de culture. Une reprise de croissance, nettement marquée sur MC03 (120 rpm), correspond à des modifications morphologiques qui seront détaillées plus loin.

Les figures V.18 a-c illustrent la composition de la biomasse en catégories mycéliennes pour chacune des vitesses d'agitation. On peut y observer que ces trois cultures se sont développées sous forme de pellet. Les agrégats ne représentent en effet jamais plus de 30% de la biomasse. Ces trois fermentations se distinguent par la part décroissante des couronnes filamenteuses au sein de la biomasse pour les plus fortes vitesses d'agitation.

Les figures V.19a-c montrent les diamètres et épaisseurs moyens (nes) de ces trois catégories mycéliennes. Si les évolutions des diamètres des noyaux sont similaires dans les trois cas jusqu'à 60h, elles divergent ensuite. A 120 rpm, la croissance des noyaux est ralentie après 100h sous l'effet d'une faible disponibilité en oxygène dissous. L'agitation ne permet pas d'assurer une dispersion satisfaisante des bulles d'air. La croisssance sous forme compacte est remplacée par le développement des zones filamenteuses (agrégats mais surtout couronnes périphériques).

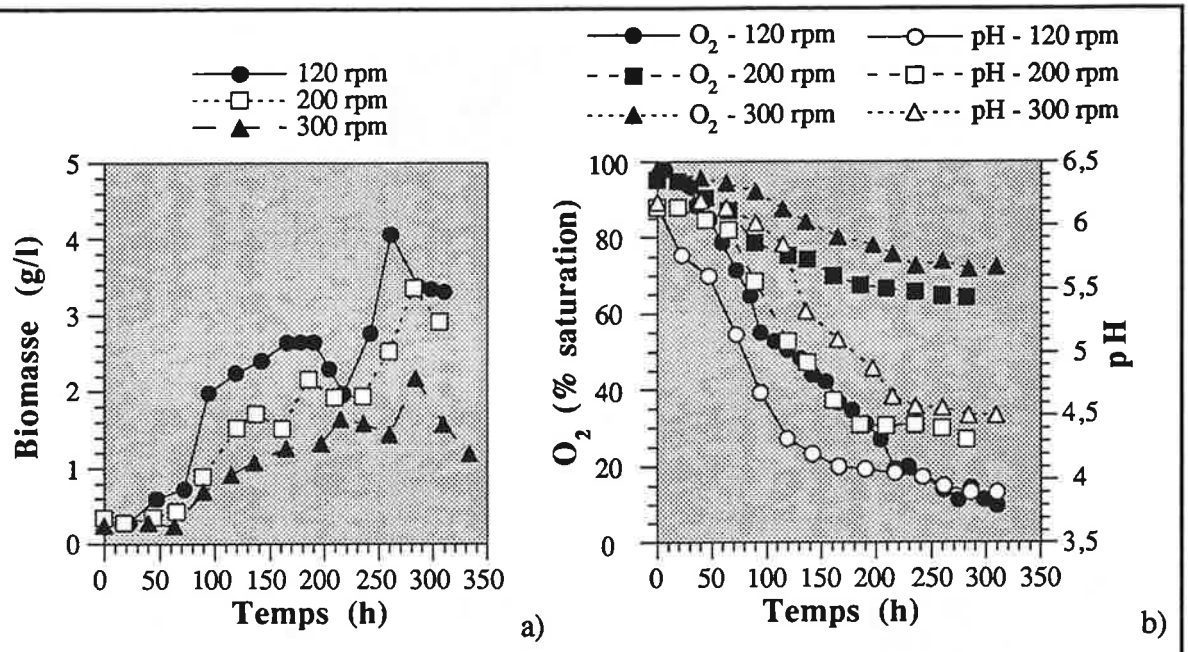


Figure V.17a) Courbes de croissance de M. cucumis en réacteur pour trois vitesses d'agitation (MC03: 120rpm, MC04: 200 rpm; MC05: 300 rpm), b) Evolution du pH et des concentrations en oxygène dissous lors des trois fermentations.

Contrairement aux deux autres cultures, l'essentiel du développement des pellets est assuré par la couronne. A 200 rpm, la croissance des noyaux se poursuit jusqu'à ce que la baisse du pH entraine une baisse du taux de croissance. L'épaisseur moyenne de la couronne reste constante tout au long de la culture à une valeur de 600-700 µm. Dans le cas de MC-09 (300 rpm), le plus faible taux de croissance des noyaux peut être attribué à une érosion excessive de la couronne sous l'effet de l'agitation.

L'effet de l'agitation sur l'épaisseur moyenne de la couronne filamenteuse est démontrée par les figures V.20a-c. L'épaisseur reste constante au cours du temps en présence d'un régime d'agitation soutenu alors qu'elle augmente pour une culture faiblement agité. On peut en outre constater la grande dispersion des valeurs obtenues à 120 rpm. Ceci traduit le développement des particules mycéliennes purement sous forme filamenteuse lâche.

Ces différentes évolutions conduisent à des structures de biomasse en fin de culture, bien distinctes selon les conditions d'agitation. Les figures V.21 a-c illustrent la nature de la biomasse pour chacune de ces fermentations en décrivant simultanément la distribution en diamètre équivalent et la distribution en fonction des valeurs de la fraction filamenteuse. Alors qu'à 120 rpm, la biomasse se compose d'un ensemble hétérogène en taille sans zones compactes, on observe que l'augmentation de la vitesse d'agitation conduit à une bipolarisation marquée de la biomasse. Celle-ci est en effet composée à 200 et 300 rpm de deux sous-populations bien délimitées, les agrégats filamenteux et les pellets.

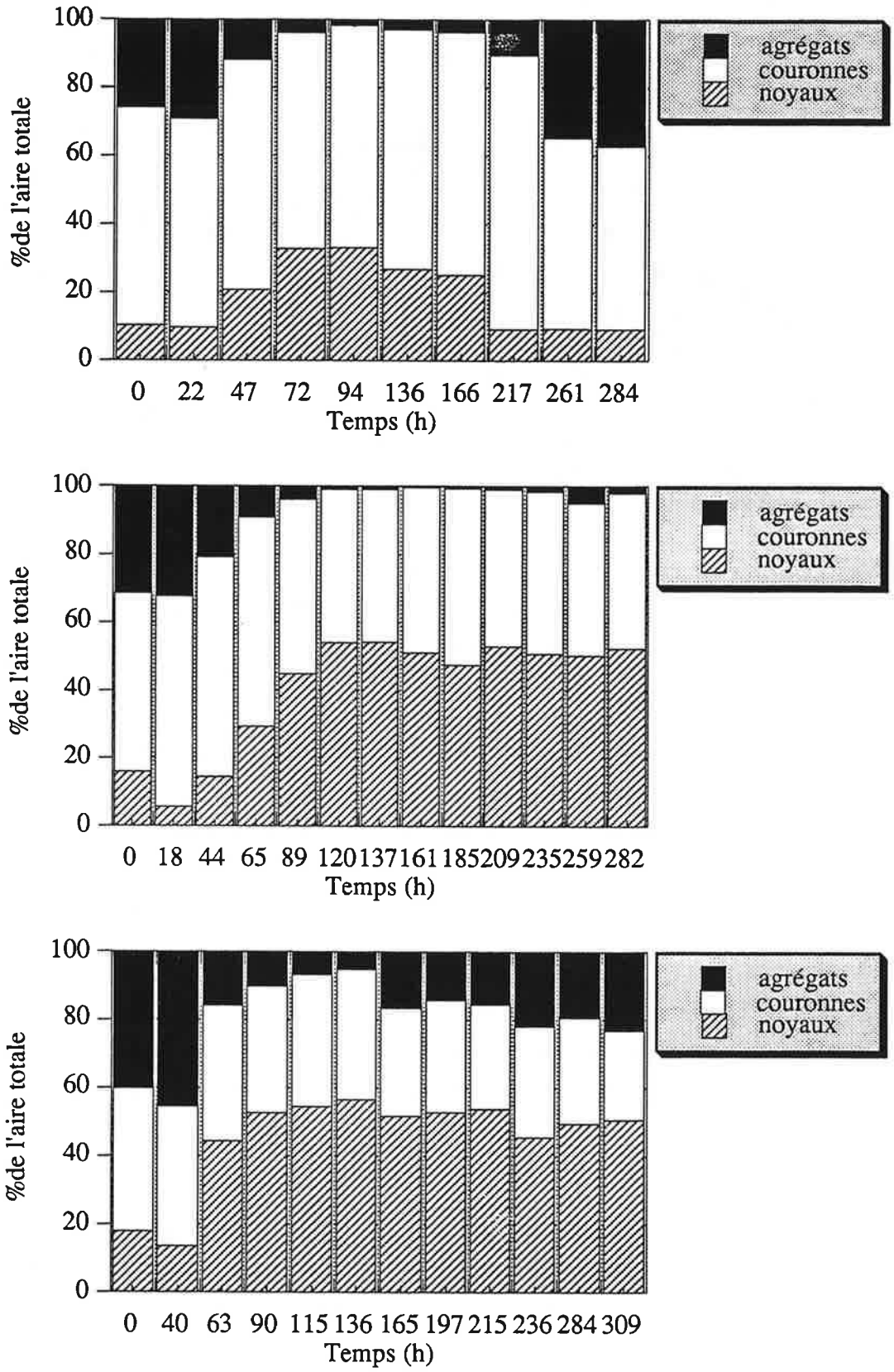


Figure V.18: Part relative des catégories mycéliennes pour trois vitesses d'agitation: a)120 rpm, b) 200 rpm, c) 300 rpm

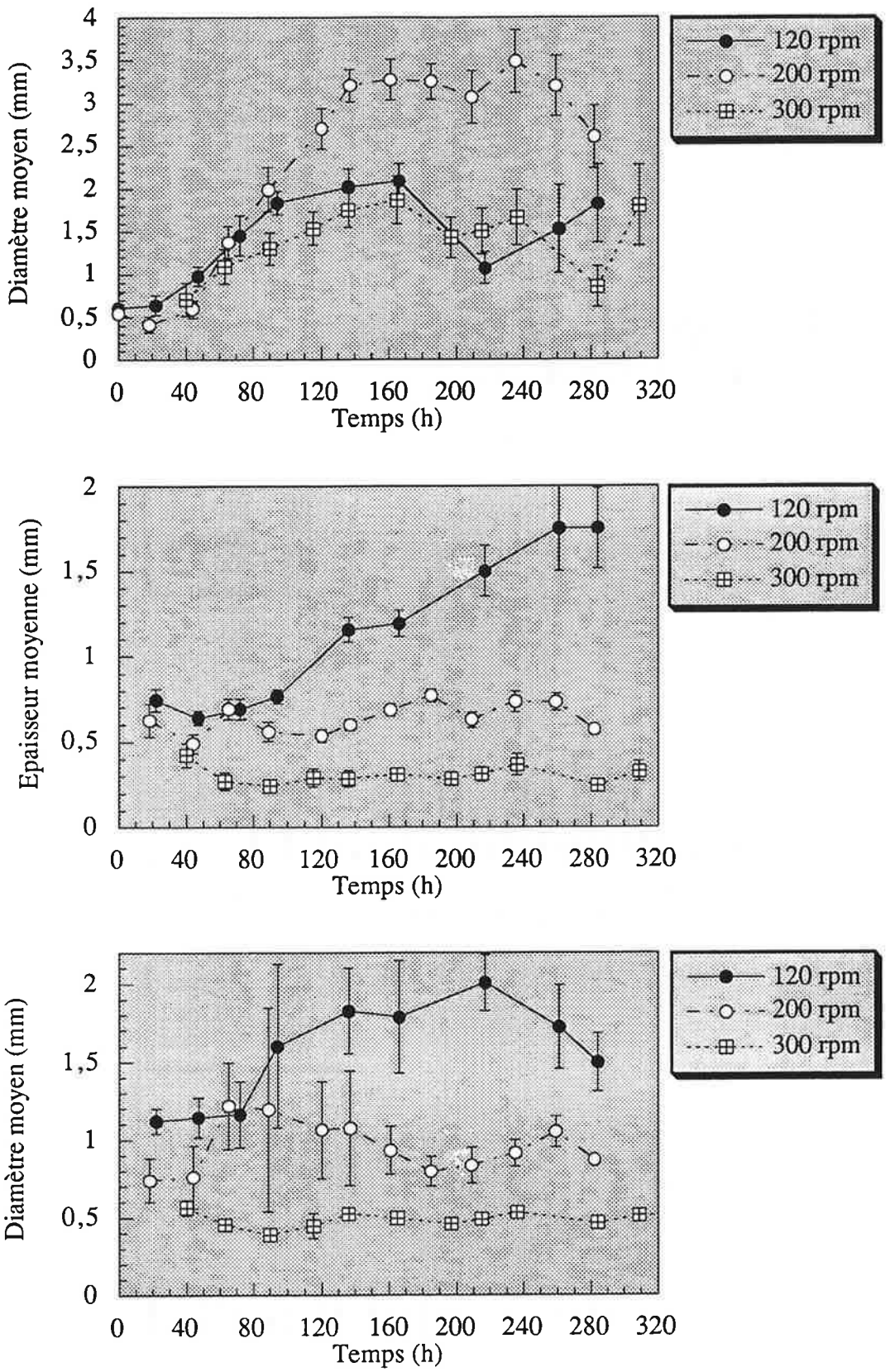


Figure V.19: Evolution du diamètre moyen des pellets (a), de l'épaisseur moyenne des couronnes filamenteuse (b) et du diamètres moyens des agrégats (c) pour trois vitesses d'agitation (120, 200, 300 rpm).

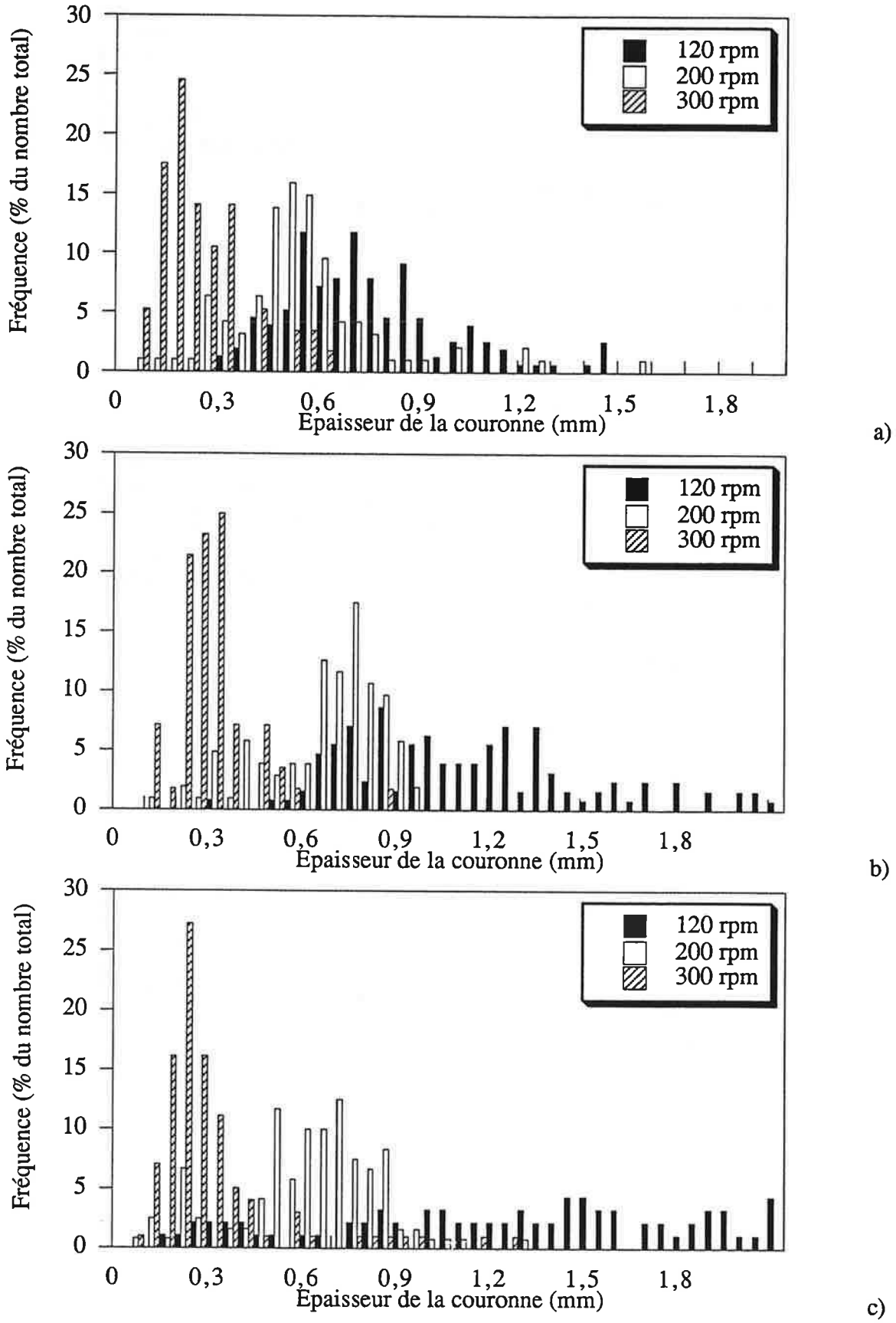


Figure V.20: Distributions de l'épaisseur de la couronne filamenteuse a) à 90h, b) 165 h et c) 215h de culture pour trois vitesses d'agitation (120, 200, 300 rpm).

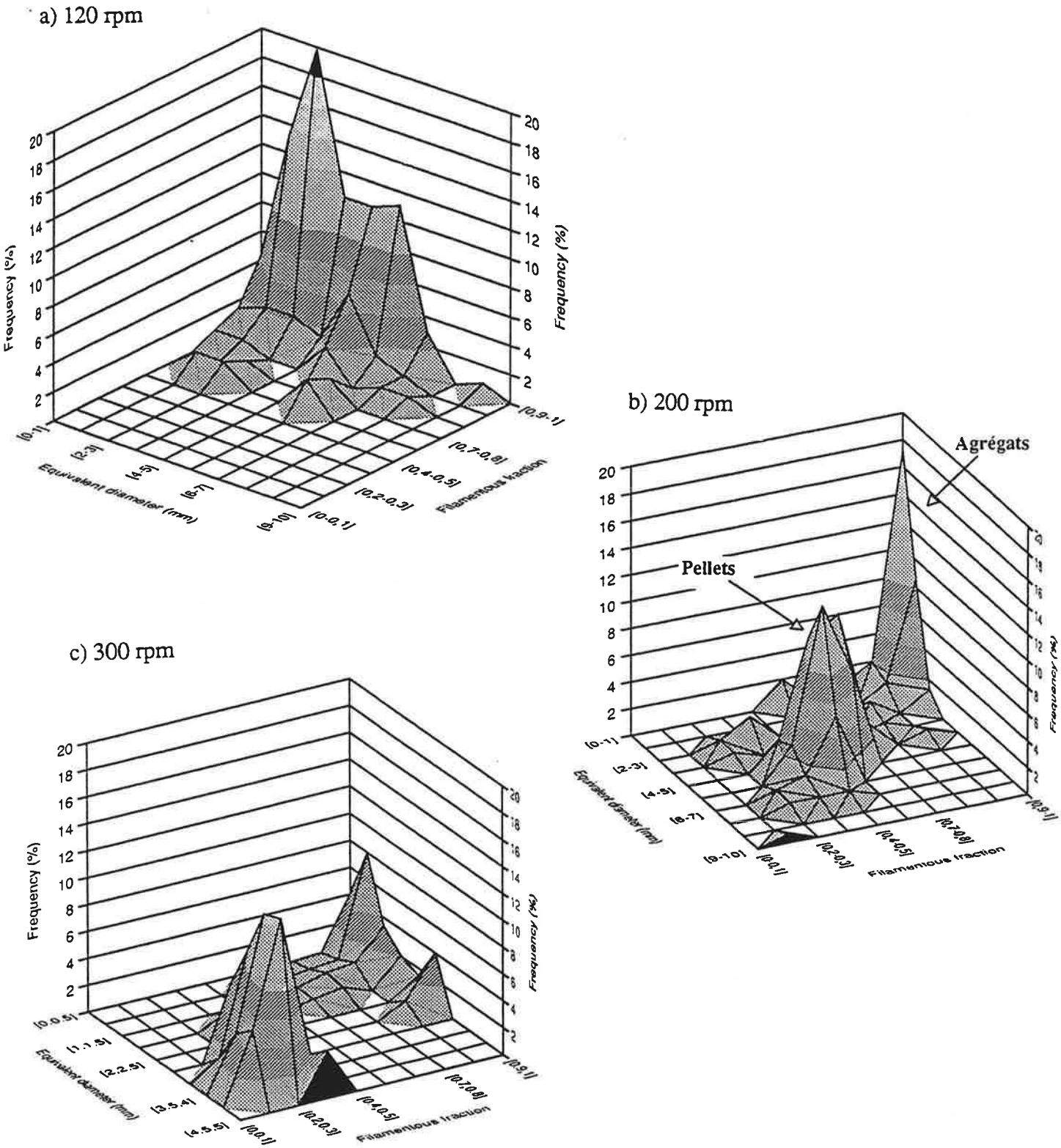


Figure V.21: Distributions de la biomasse en fonction du diamètre externe et de la fraction filamenteuse à 200 h de culture pour trois vitesses d'agitation : a) 120 rpm, b) 200 rpm, c) 300 rpm.

V.1.5. Discussion

A la suite des problèmes de stabilité de l'activité anti-herpétique, développés au chapitre II, il ne nous a pas été possible d'établir une relation entre la production métabolique et la morphologie en cultures immergées de la souche de *M. cucumis*. Nous avons cependant choisi de présenter ces résultats car ils constituent, à notre connaisssance, la première caractérisation morphologique complète d'un Agaricale (Basidiomycète) en cultures immergées.

Les résultats du suivi morphologique de ces diverses fermentations par la méthode d'analyses d'images définies au Chapitre III montrent la capacité de cette méthode à fournir une description complète, qualitative (classification des différentes structures observées en catégories mycéliennes) et quantitative (tailles des différents objets détectés et part relative de chaque type morphologique) des structures morphologiques macroscopiques obtenues dans ce type de fermentation.

Les distributions des différents facteurs mesurés par la méthode (Figure V.6 à V.11) illustrent l'hétérogénéité des biomasses obtenues avec cette souche et soulignent l'importance de les considérer en termes de population et non comme un ensemble d'objets subissant tous une même évolution. Les valeurs moyennes des diamètres et épaisseurs équivalents (Figure V.13 b, V.14 b et V.19) permettent de dégager des tendances évolutives. Toutefois, il faut insister sur le fait qu'elles masquent la dispersion de ces paramètres. Les écarts types qui n'ont pas été représentés pour des raisons de clarté atteignent dans certains cas 30 à 40 % de la valeur moyenne. Les intervalles de confiance montrés sur les figures V.19 a-c pour la comparaison des effets de l'agitation tiennent compte de ces écarts-types mais les modulent grâce au nombre important d'observations réalisées pour chaque catégories. La rapidité de la méthode et sa faible dépendance vis-à-vis du nombre de particules traitées (déjà signalées au § III.3.4) autorisent en effet une mesure en routine de 300 à 400 particules sans allongement rédhibitoire du temps de traitement. On assure donc ainsi une meilleure représentativité statistique des échantillons.

La caractéristique majeure de cette souche en cultures immergées est sa tendance marquée à se développer sous forme de structures mycéliennes compactes à la fois en fioles (résultats non montrés) et en réacteur, comme celà a été illustré par les figures V.13c, V.14c, et V.18. Toutefois les différents essais réalisés permettent de moduler cette caractéristique générale en fonctions des conditions de cultures.

Dans la littérature, les phénomènes qui conduisent à la formation des pellets présentent une grande diversité (Metz et Kossen, 1977; Braun et Vecht-Lifschitz, 1991). Dans le cas d'un inoculum végétatif — le cas représenté par nos cultures — où l'agglomération des spores ne peut pas être mise en cause pour la formation précoce des pellets, les causes les plus fréquemment citées sont un enchevêtrement mécanique aléatoire sous l'effet d'un taux de ramification élevé

des hyphes et/ou des forces de cohésions interhyphales (de nature hydrophobe notamment) liées à la composition des parois. Les variables de procédés influant sur ce type de morphologie et pouvant provoquer la transition vers une forme plus filamenteuse sont elles aussi nombreuses. Nous allons ici passer en revue les différentes influences qui se dégagent des résultats qui viennent d'être présentés.

Influence du taux de croissance:

Le taux de croissance parce qu'il peut conditionner la morphologie des hyphes (notamment leur longeur moyenne et leur taux de ramification), peut également influer sur la formation du réseau mycélien et la densité de l'enchevêtrement. Toutefois le sens de l'influence apparaît dépendant de la souche et ne peut pas donner lieu à une généralisation (Wiebe et Trinci, 1990). Lors des cultures présentées ici la croissance en diamètres des zones compactes (Figure V.13 b, V.14 b) s'est toujours déroulée lors de la phase initiale de croissance de la culture (période du plus fort taux de croissance). Ceci est en accord avec des résultats récents concernant une souche de Basidiomycète (*Lentinus edodes*), maintenue en culture continue, et pour laquelle la morphologie de type pellet n'a pu être obtenue qu'à partir d'un taux de dilution supérieur à $0{,}01h^{-1}$ (Fukushima *et al.*, 1993). En dessous de cette valeur, la morphologie filamenteuse ("pulpeuse") prévalait.

On a par ailleurs pu observé sur nos cultures que le développement du noyau et celui de la couronne filamenteuse sont rarement simultanées et semblent plutôt mutuellement exclusifs. Ces caractéristiques confirment l'influence du taux de croissance en suggérant que lorsque celui-ci tombe en dessous d'une valeur seuil ($\approx 0{,}01h^{-1}$) la densité de la zone filamenteuse périphérique nouvellement formée n'est plus suffisante pour conduire à la formation d'une zone compacte non décolorable. On assiste alors à une extension radiale des couronnes sans qu'elle soit compensée sur la face interne par une compaction. La valeur seuil du taux de croissance est toutefois modulée par d'autres facteurs environnementaux qui vont maintenant être exposés. Une étude spécifique des hyphes (à une autre échelle d'observation) serait nécessaire pour déterminer si ces phénomènes sont corrélés avec une augmentation du nombre de ramifications et un raccourcissement des distances interseptales.

Influence de l'agitation:

Parmi ces autres facteurs, l'influence de l'agitation sur la formation et le maintien d'une morphologie de type pellet est particulièrement importante. Nos résultats (§ V.2.3) montrent qu'une augmentation de la vitesse d'agitation favorise le degré de compacité de la biomasse et nuit à la croissance. Aux niveaux d'agitation étudiés (relativement modérés), l'augmentation de l'agitation ne provoque pas de transition vers une morphologie filamenteuse. Ceci rejoint les observations de Davoust et Hansson (1992) concernant *Absidia* spp. Soulignons ici que les résultats de la littérature sur le sens de l'influence de l'agitation sont contradictoires (Metz et

Kossen, 1977; Märkl et Bronnenmeier, 1985; Braun et Vecht-Lifschitz, 1991). Une tendance souvent rencontrée est tout de même qu'une forte agitation (et les contraintes de cisaillement qu'elle entraine) limite la formation des pellets et produit une morphologie de type filamenteuse (Mitard et Riba, 1988) ou conduit à une réduction de leur taille moyenne (Hotop *et al.*, 1993).

L'effet de l'agitation sur *M. cucumis* apparait sur l'épaisseur moyenne des couronnes. Celle-ci est en effet plus faible à 300 rpm qu'à 200 rpm (Figure V.20) et traduit un processus d'attrition de ces dernières. Cette érosion répétée des zones périphériques filamenteuses ralentit la formation des zones compactes comme le montre les taux de croissance du diamètre moyen des noyaux (25 µm/h à 200rpm contre 10 µm/h à 300 rpm). De tels phénomènes ont été décrits par Taguchi *et al.* (1968) qui en ont déduit une corrélation expérimentale entre la vitesse d'érosion des couronnes et la vitesse de l'agitateur. Cependant cette étude a été réalisée sur des échantillons hors fermentations et donc sans prendre en compte la croissance simultanée (cf. § IV.1.2.3). L'application de la méthode de caractérisation morphologique à des cultures conduites en réacteurs de volumes plus significatifs (quelques m^3) permettrait de rechercher une relation quantitative avec les variables hydrodynamiques de la fermentation. Il serait notamment interéssant de vérifier si le paramètre P/D^3t_c (représentant la puissance moyenne de l'agitateur par unité de volume, P/D^3, et la fréquence de circulation, $1/t_c$), défini par Smith *et al.* (1990) et ayant permis la quantification de l'influence de l'agitation sur les variables morphologiques de la forme filamenteuse de *Penicillium chrysogénum* (Makagiansar *et al.*, 1993), montre sa validité sur les structures macroscopiques tel que les pellets et leur couronne.

Influence du pH:

Les cultures conduites pour évaluer l'effet de l'agitation ayant été réalisées sans régulation de pH, elles ont révélés l'importance de ce paramètre sur la croissance et la morphologie. En effet, l'arrêt de la croissance des noyaux s'est produit sur les trois cultures à la même valeur de pH (4,7). Il a été montré sur la Figure V.4 (p.174) que cette valeur de pH provoque une réduction significative de la croissance. Comme décrit ci-dessus, il est probable que la diminution du taux de croissance qu'entraine la baisse du pH explique la transition morphologique vers une forme plus filamenteuse. Cet effet est particulièrement notable sur MC03 (120 rpm) (Figures V.18 à V.20), où l'influence de l'agitation étant très faible (attesté notamment par un démarrage plus rapide de la croissance), l'essentiel des modifications morphologiques peut être attribué au pH et à ses conséquences.

Une influence plus directe du pH comme facteur modifiant la polarité des parois hyphales a également été décrite (Braun et Vecht-Lifschitz, 1991). Or ces mêmes auteurs présentent les interactions interhyphales (hydrophobes ou electrostatiques) comme des facteurs importants pour le maintien de la cohésion du réseau mycélien des pellets. Il est possible d'envisager qu'ici l'effet du pH sur une réduction du taux de croissance et sur un relachement des interactions interhyphales se conjuguent pour empêcher la formation des structures compactes. Les substrats

du milieu n'étant pas épuisés (notamment le glucose), la croissance se poursuit cependant sous la forme de zones mycéliennes moins denses, les couronnes filamenteuses. Il n'est cependant pas possible de trancher entre l'influence relative des deux facteurs.

Influence de l'oxygène dissous:

Parmi les facteurs cités comme influant sur la cohésion des interactions entre les parois hyphales figure également la concentration en oxygène dissous (Vecht-Lifschitz *et al.*, 1990; Braun et Vecht-Lifschitz, 1991; Olsvik *et al.*, 1993). La fermentation réalisée en conditions d'aération limitantes (MC02 - Figure V.12) nous a permis d'observer qu'elles provoquent là encore le passage d'une morphologie compacte vers des structures plus filamenteuses (Figures V.13 - V.14).

De plus, nous avons constaté que l'épuisement en oxygène entraine un éclatement des pellets en fin de culture, pour MC02 et MCO3, alors que leur intégrité est maintenue sous une meilleure aération (MC01, MC04, MC05) (Figures V.15, V.16). Dans le cas de MC03, la faible agitation est à l'origine de la baisse rapide en oxygène. La culture ayant par ailleurs déjà subit une transition vers une forme filamenteuse sous l'action du pH, on peut supposer que les transferts dans le réacteur en sont encore réduits. L'éclatement des pellets peut traduire une autolyse des zones centrales qui conduit à l'obtention de pellets "creux" fragilisés (Clark, 1962; Hotop *et al.*, 1993).

A ce stade, il est important de signaler une lacune importante dans nos moyens expérimentaux qui a considérablement restreint l'interprétation quantitative des résultats.

Remarque: L'absence d'analyseur de gaz en sortie de fermenteur ne nous a pas permis de déterminer le coefficient respiratoire de la biomasse. Les mesures de concentration en oxygène dissous lors de la fermentation ont été réalisées par l'intermédiaire d'électrodes ampérométriques stérilisables. A l'aide de ce type d'électrodes, l'utilisation d'une méthode cinétique permet, en théorie, de réaliser un bilan de matière sur l'oxygène en évaluant d'abord la consommation globale d'oxygène de la biomasse - lors d'un arrêt de l'aération- puis le coefficient de transfert (Kla) du réacteur - lors de la reprise de l'aération. Cependant cette mesure n'est réalisable en pratique que lorsque la concentration en oxygène dissous est suffisamment élevée pour permettre un suivi significatif de sa chute lors de l'arrêt d'aération. Ceci correspond généralement seulement à la première phase de la culture et ne permet évidemment jamais de déceler l'évolution de la consommation spécifique aux concentrations proches de la limitation.

Ce suivi de la consommation en oxygène n'a pu être réalisé sur une période suffisamment longue pour être significative que sur la fermentation MC01 (Figure V.5). L'interprétation de ces résultats sera discutée en relation avec les limites de la méthode au paragraphe V.3.

V.2 PROPRIÉTÉS MORPHOLOGIQUES DE *Fomes fomentarius*

V.2.1 Influence du milieu de culture sur la croissance et la production de polysaccharides

Afin d'examiner les relations entre croissance, production de polysaccharides et morphologie mycélienne, des cultures menées sur deux milieux, à la fois en fioles agitées et en réacteur, vont être examinées dans ce chapitre.

Les deux milieux utilisés sont le milieu "SC" et le milieu "FF" (cf. p.36). Le premier est un milieu classique décrit pour la production de polysaccharides par *Schizophyllum commune* (Rau *et al.* 1990, Korn, 1993). Le second a été utilisé pour un screening de souches de Basidiomycètes concernant la recherche de métabolites anti-virus de la mosaïque du tabac (Aoki *et al.*,1993). Des composés polysaccharidiques présentant une activité systémique contre ce virus ont ainsi pu être isolés du surnageant de culture de *Fomes fomentarius* sur ce milieu.

Le mode de préparation des cultures et les conditions de fermentations ont été présentées au chapitre II (Tableau II.1, p.39).

Les figures V.22a-d présentent les courbes de croissance et de production de polysaccharides obtenues en fioles agitées (FE01) et en réacteur (FR01), sur milieu "SC". Les figures V.23a-d montrent les courbes similaires obtenues sur mileu "FF" (FE02 et FR02). Les taux de croissances spécifiques (μ) et la productivité spécifique en polysaccharide (Q_{PS}, exprimée en mg de polysaccharide par g de biomasse et par heure) sont également représentés.

Les cultures en réacteur ont été conduites sans régulation de pH pour conserver des conditions analogues à celles des fioles et pouvoir ainsi détecter une éventuelle influence de l'agitation sur la production et la morphologie.

Pour chaque milieu, on observe que les concentrations finales en biomasse sont tout à fait similaires en réacteur et en fioles agitées. Sur milieu "SC", on constate cependant que la culture en réacteur (FR01- Figure V.22b) se caractérise par l'existence d'une phase stationnaire après 70h de culture et une première phase de croissance rapide alors que la culture en fioles (FE01 - Figure V.22a) montre plutôt un ralentissement progressif de la croissance. Sur milieu "FF" (Figure V.23), ces différences sont moins apparentes. On note cependant deux phases de croissance "linéaire" distinctes sur la culture en réacteur. Leur origine sera examinée plus loin sur un plan morphologique. Les différences de régime d'agitation semblent ainsi avoir eu une influence limitée sur la croissance.

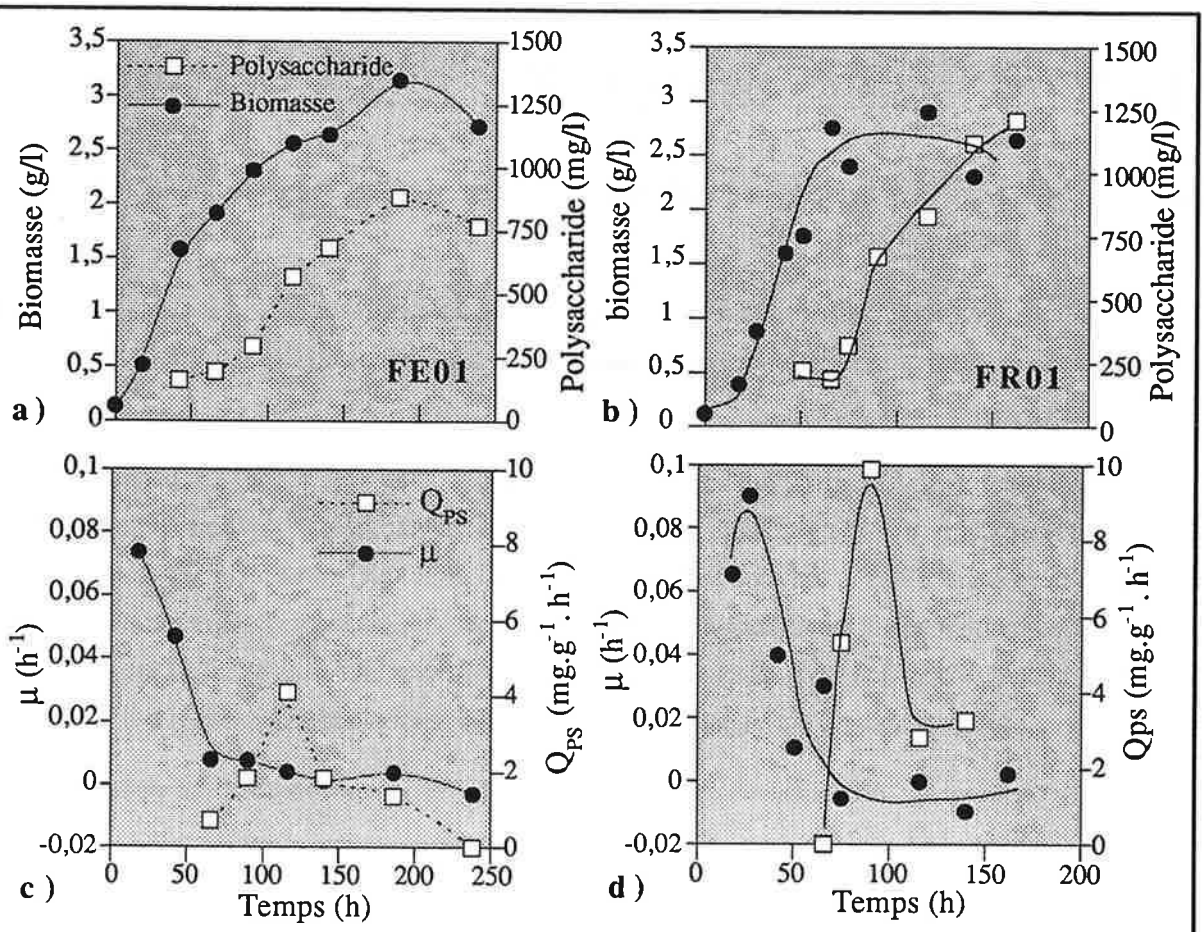


Figure V.22: Courbes de croissance et de production de polysaccharides sur milieu "SC": a) en fioles agitées (FE01), b) en réacteur (FR01). Evolution du taux de croissance (μ) et de la productivité spécifique en polysaccharide (Qps): c) FE01, d) FR01.

	SC		FF	
	FE01 (fioles)	FR01 (réacteur)	FE02 (fioles)	FR02 (réacteur)
$Y_{P/X}$ (%)	27,1	42,6	8,9	17,0
Q_{PS} ($mg.g^{-1}.h^{-1}$)	4,2	9,8	0,6	1,9

Tableau V.I: Rendement ($Y_{P/X}$) et productivité spécifique (Q_{PS}) en polysaccharides.

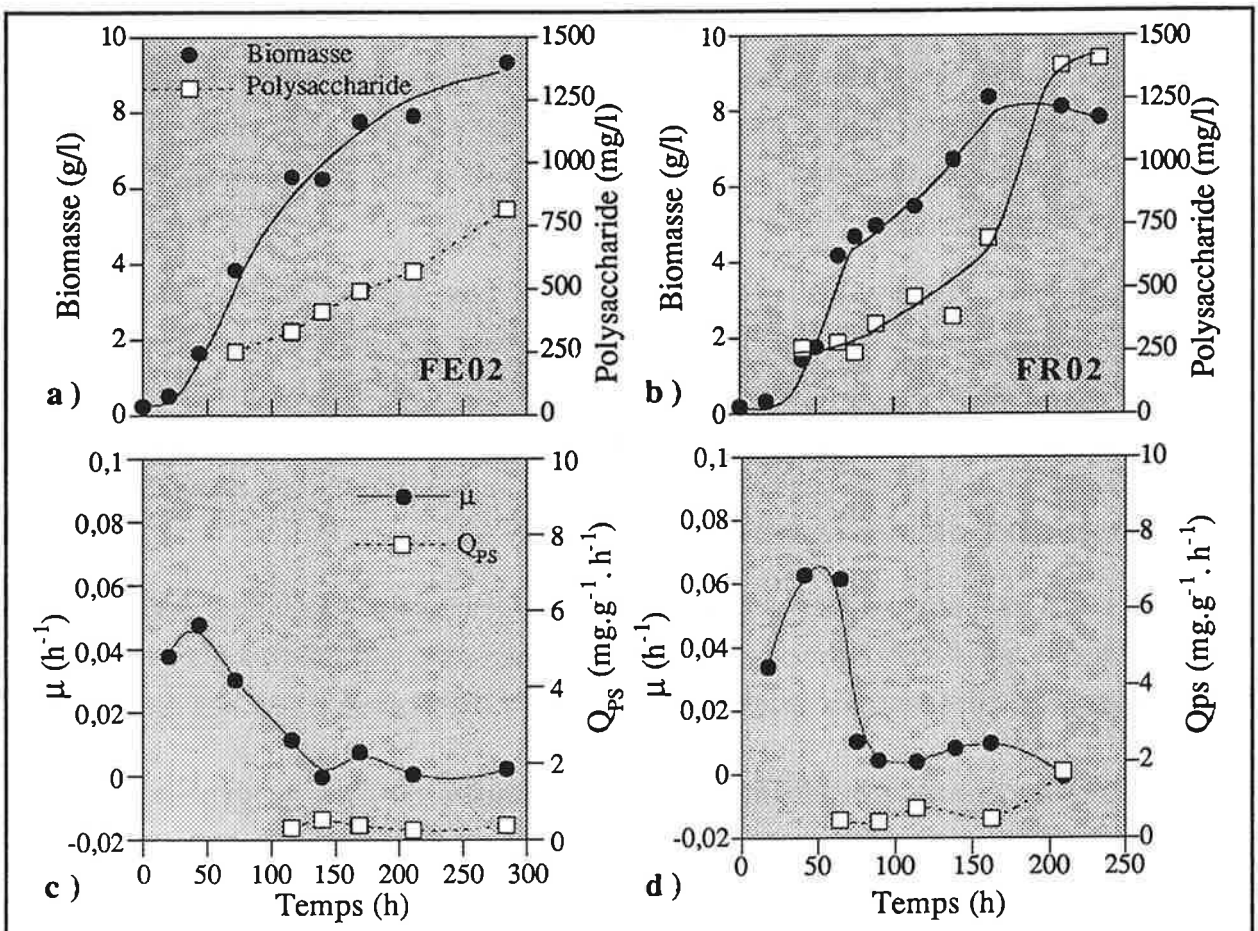


Figure V.23: Courbes de croissance et de production de polysaccharides sur milieu "FF": a) en fioles agitées (FE02), b) en réacteur (FR02). Evolution du taux de croissance (μ) et de la productivité spécifique en polysaccharide (Qps): c) FE02, d) FR02.

En revanche, pour la production de polysaccharide, les différences entre cultures en fioles et en réacteur sont plus nettes et soulignent une concentration finale significativement plus importantes en réacteur. Ces différences sont traduites par les rendements ($Y_{P/X}$, exprimé en g de polysaccharide par g de biomasse x100) et les productivités maximales (Q_{PS}) figurant dans le tableau V.I.

En comparant deux à deux les cultures sur chaque milieu (Figure V.22a et V.23a, d'une part et Figure V.22b et V.23b, d'autre part), on observe que le milieu "FF" permet à la fois de prolonger la durée de la phase de croissance (200 h contre 100 h sur milieu "SC") et de tripler la concentration finale en biomasse par rapport au milieu "SC" (8 à 9 g/l contre 2,5 à 3 g/l) . Toutefois, ces différences importantes ne sont pas répercutées sur la production de polysaccharide dans les mêmes proportions puisque le milieu "FF" ne procure qu'un gain de 27% sur la concentration finale. Le rendement en polysaccharide (est donc nettement inférieur sur milieu "FF" (Tableau V.I).

Les compositions des deux milieux utilisés diffèrent essentiellement par l'absence de malt dans le milieu "SC" et la présence d'un taux important de phosphate de potassium dans "FF". Outre la possible importance de facteurs de croissance contenus dans le malt, l'effet tampon dont est responsable le phosphate semble un facteur important pour expliquer la prolongation de la croissance sur ce dernier milieu.

Les courbes de taux de croissance et de productivité (Figure V.22c-d, V.23c-d) soulignent l'importance d'une réduction du taux de coissance pour déclencher la production du polysaccharide. Les deux phases (croissance et production) semblent en effet découplée comme dans le cas d'une production métabolique secondaire. L'origine supposée des polysaccharides (qui sera discutée en V.2.3), probablement liée à la synthèse pariétale interdit cependant de les considérer comme de véritables métabolites secondaires.

Nous allons maintenant examiner si ces différences apparaissent également sur un plan morphologique (et notamment si les conditions d'agitation en réacteurs affectent la morphologie de la biomasse) et si elles sont susceptibles d'expliquer les différences de production constatées.

V.2.2 Comparaison morphologique des cultures en fioles agitées et en réacteur

Comparaison FE01 - FR01

Les figures V.24 a-b illustrent la différence de structure des biomasses obtenues sur milieu "SC" en fioles agitées (a) et en réacteur (b). Si dans les deux cas, on observe que la biomasse filamenteuse (couronne + agrégat) est largement majoritaire — la part des noyaux reste en effet inférieure à 25% de la surface projetée — sa composition est, en revanche, complètement inversée selon le mode de culture. Dans les fioles, cette biomasse filamenteuse reste majoritairement associée à un noyau et constitue donc des couronnes de pellets. Dans le réacteur, ce sont les agrégats qui dominent.

Les figures V.25 a-c comparent les diamètres moyens des pellets complets, des noyaux (a), des agrégats (c), et les épaisseurs moyennes de couronnes (b), obtenues dans les deux types de cultures. Les différences évoquées ci-dessus concernant les zones filamenteuses sont ici exprimées plus précisément. On observe en effet que le diamètre inférieur des pellets obtenus en réacteur (Figure V.25a) est lié, tout d'abord, à un développement plus tardif des noyaux puis à une érosion de leur couronne après l'arrêt de la croissance (de 450 µm à 280µm). Les agrégats conservent un taille moyenne limitée (350 - 400 µm) pendant la phase de croissance et augmentent rapidement leur nombre probablement sous l'effet d'une attrition des plus grands, liée à l'agitation. Après 75h, ce nombre d'agrégats diminue simultanément à une augmentation régulière mais modérée de leur taille. Cette phase d'agglomération est probablement imputable à une augmentation de la viscosité du milieu — sous l'effet de la concentration en biomasse et/ou

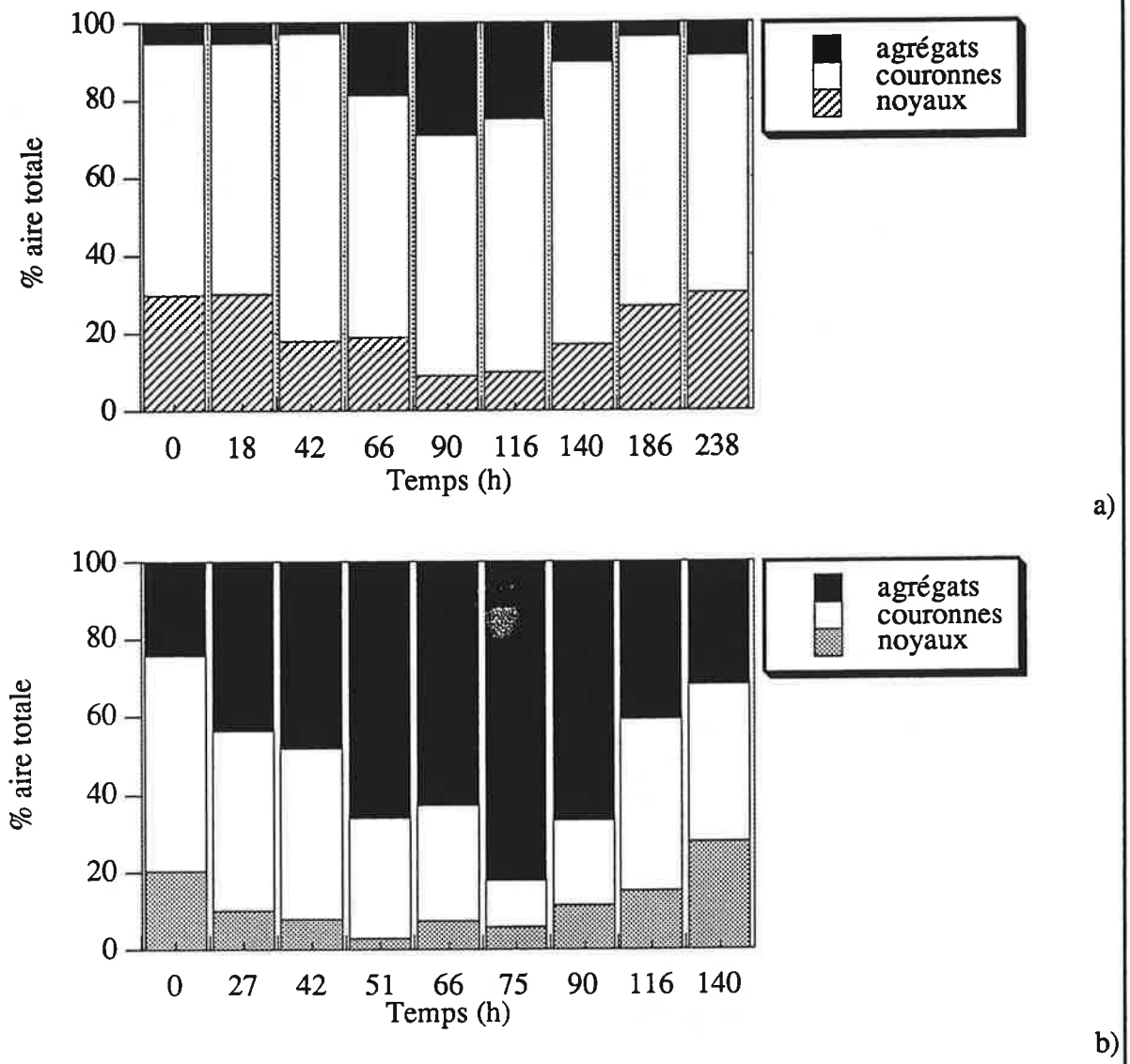


Figure V.24: Part relative des catégories mycéliennes lors de cultures a) en fioles agitées (FE01) , b) en réacteur (FR01), sur mileu "SC".

de l'apparition du polysaccharide — qui contribue à limiter l'effet de l'agitateur dans les zones qui en sont éloignées. Dans les fioles, l'absence de phénomène d'attrition est attesté par la grande taille des agrégats et des couronnes jusqu'à la fin de la culture. L'épaisseur importante des couronnes (550 µm) observées sur la culture en fiole (figure V.25b) associée au nombre majoritaire de pellets en fin de culture (figure V.28) confirme la prédominance de cette catégorie mycélienne au sein de la biomasse.

Comparaison FE02-FR02

Les tendances décrites pour la comparaison précédente sont retrouvées sur le mileu "FF" avec un caractère accentué car ici la culture en réacteur a été conduite à une vitesse d'agitation de 300 rpm. La culture en fioles est composée très majoritairement de pellets (Figure V.26, 90% de la surface projetée est représentée par les couronnes et les noyaux). Les noyaux connaissent un

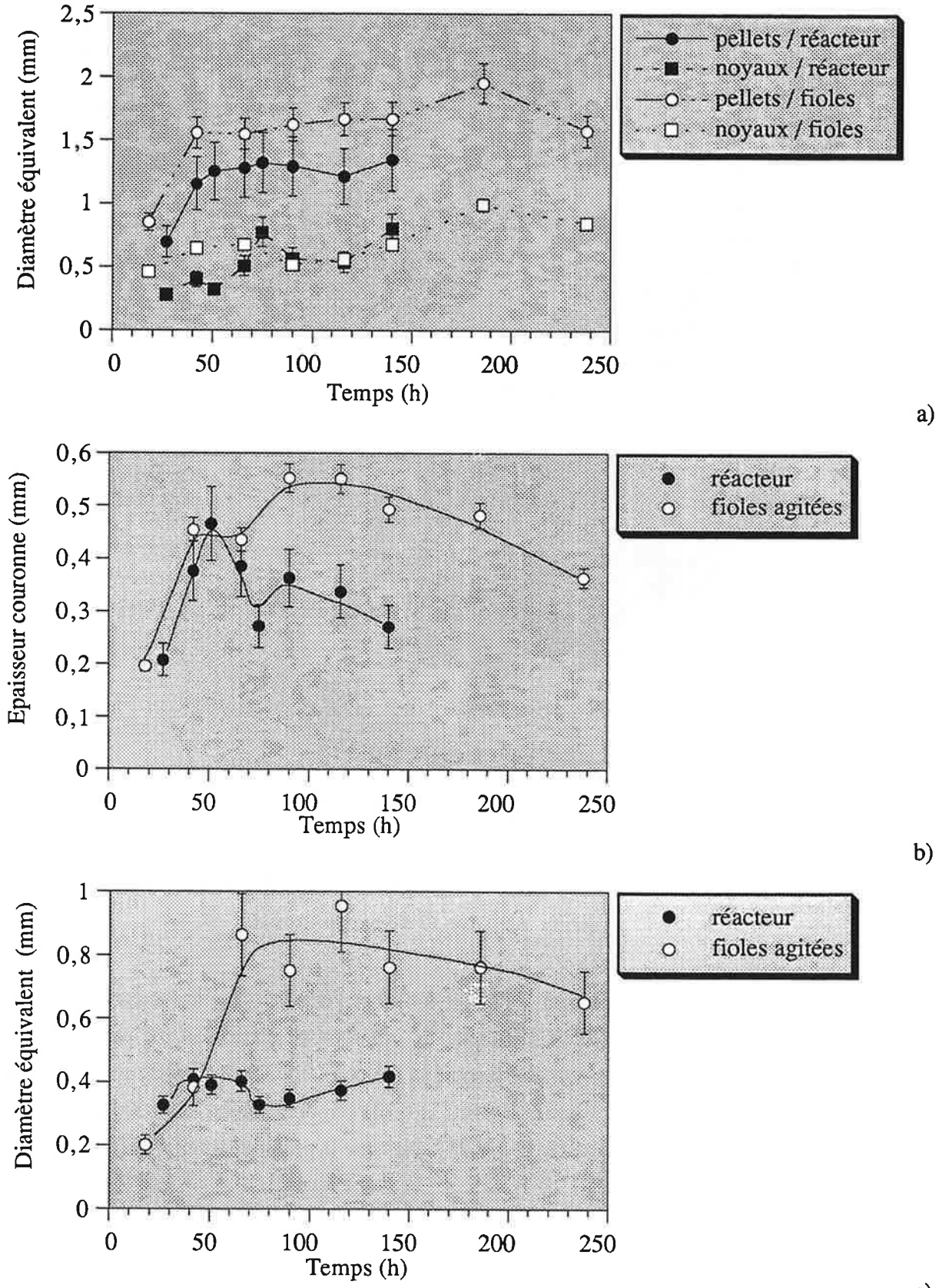


Figure V.25: Evolution du diamètre moyen des pellets et des noyaux (a), de l'épaisseur moyenne des couronnes (b) et du diamètre moyen des agrégats (c) lors de cultures en fioles agitées (FE01) ou en réacteur (FR01), sur mileu "SC".
(les barres représentent un intervalle de confiance de 95 % sur la valeur de la moyenne)

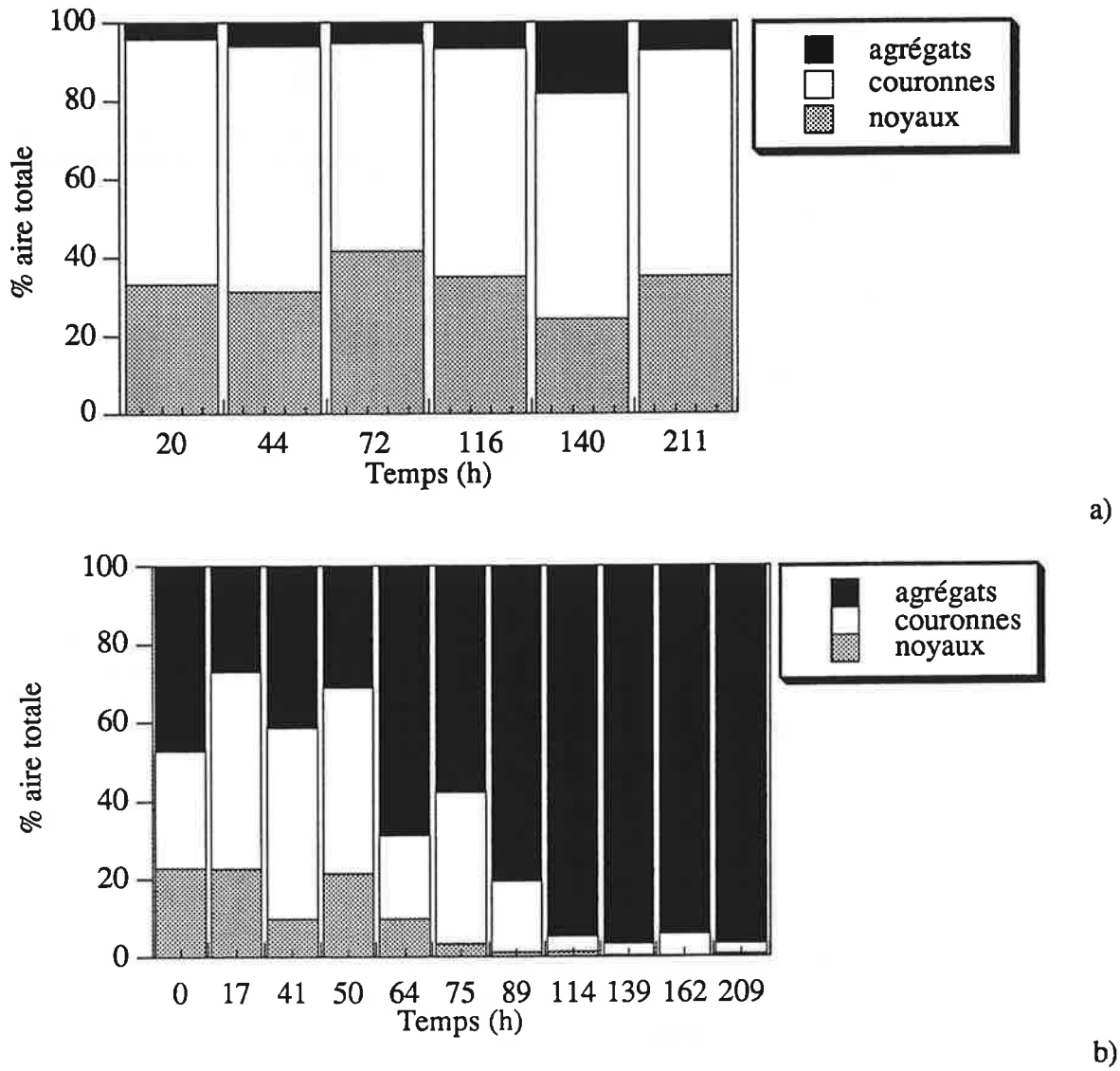


Figure V.26: Part relative des catégories mycéliennes lors de cultures a) en fioles agitées (FE02), b) en réacteur (FR02), sur milieu "FF".

développement en diamètre important pendant la phase de croissance (Figure V.27b) et représentent tout au long de la culture un pourcentage de la surface projetée supérieur à 30%. En réacteur, après une croissance initiale rapide des pellets, essentiellement sous forme de leur couronne (le diamètre moyen des noyaux reste constant), on observe une rupture des pellets après 50h (Figure V.27b). Cette rupture correspond à l'épuisement du milieu en oxygène. Déjà très minoritaire, leur nombre se réduit encore et interdit ensuite de déterminer une moyenne représentative de leur taille. La culture poursuit ensuite sa croissance sur un rythme ralenti ($\mu \approx 0{,}005 h^{-1}$) sous forme exclusivement d'agrégats filamenteux (Figure V.26). Cette seconde phase de croissance ralentie marque le début de la production du polysaccharide à un taux également faible.

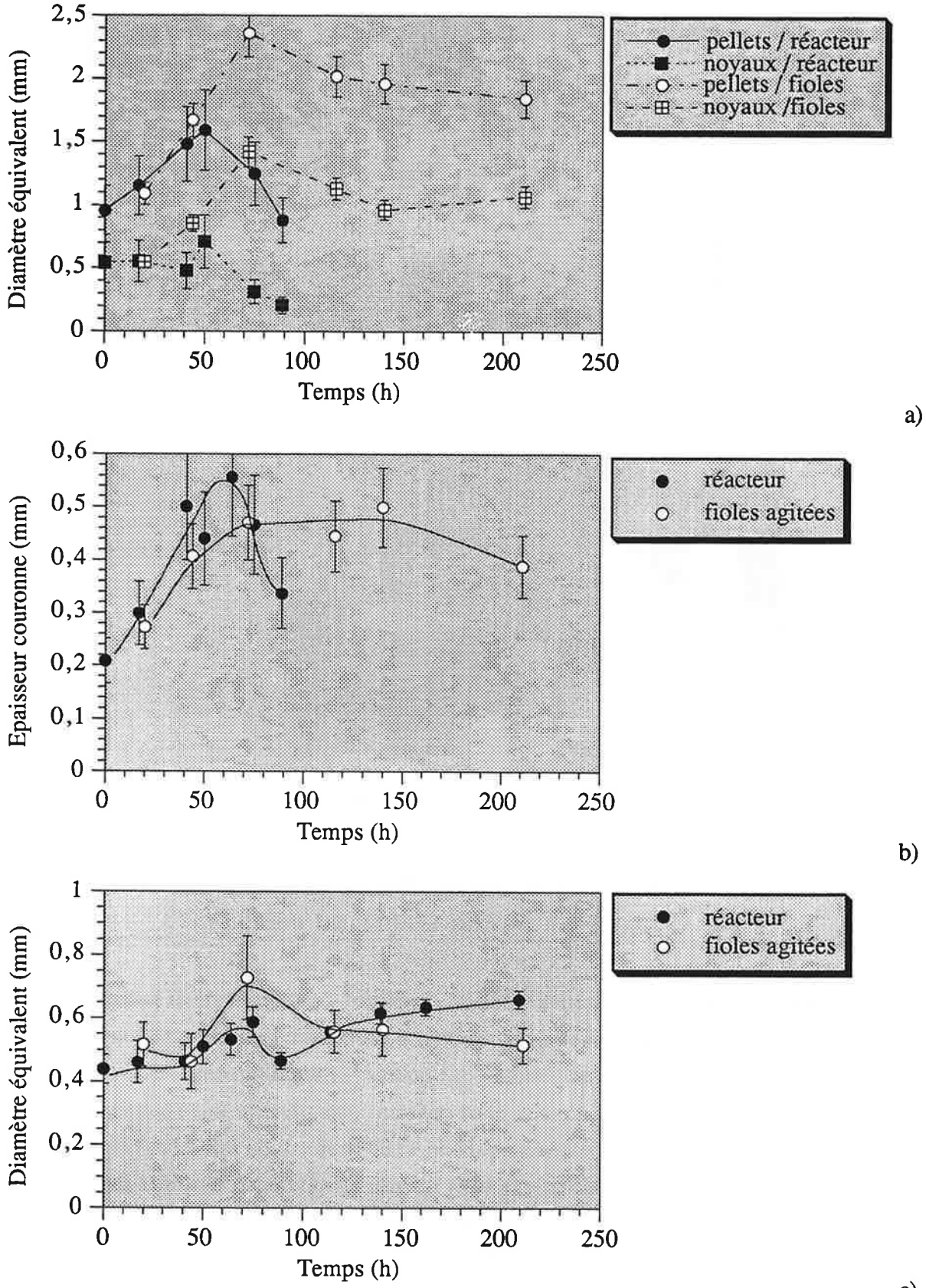


Figure V.27: Evolution du diamètre moyen des pellets et des noyaux (a), de l'épaisseur moyenne des couronnes (b) et du diamètre moyen des agrégats (c) lors de cultures en fioles agitées (FE02) ou en réacteur (FR02), sur mileu "FF".
(les barres représentent un intervalle de confiance de 95 % sur la valeur de la moyenne)

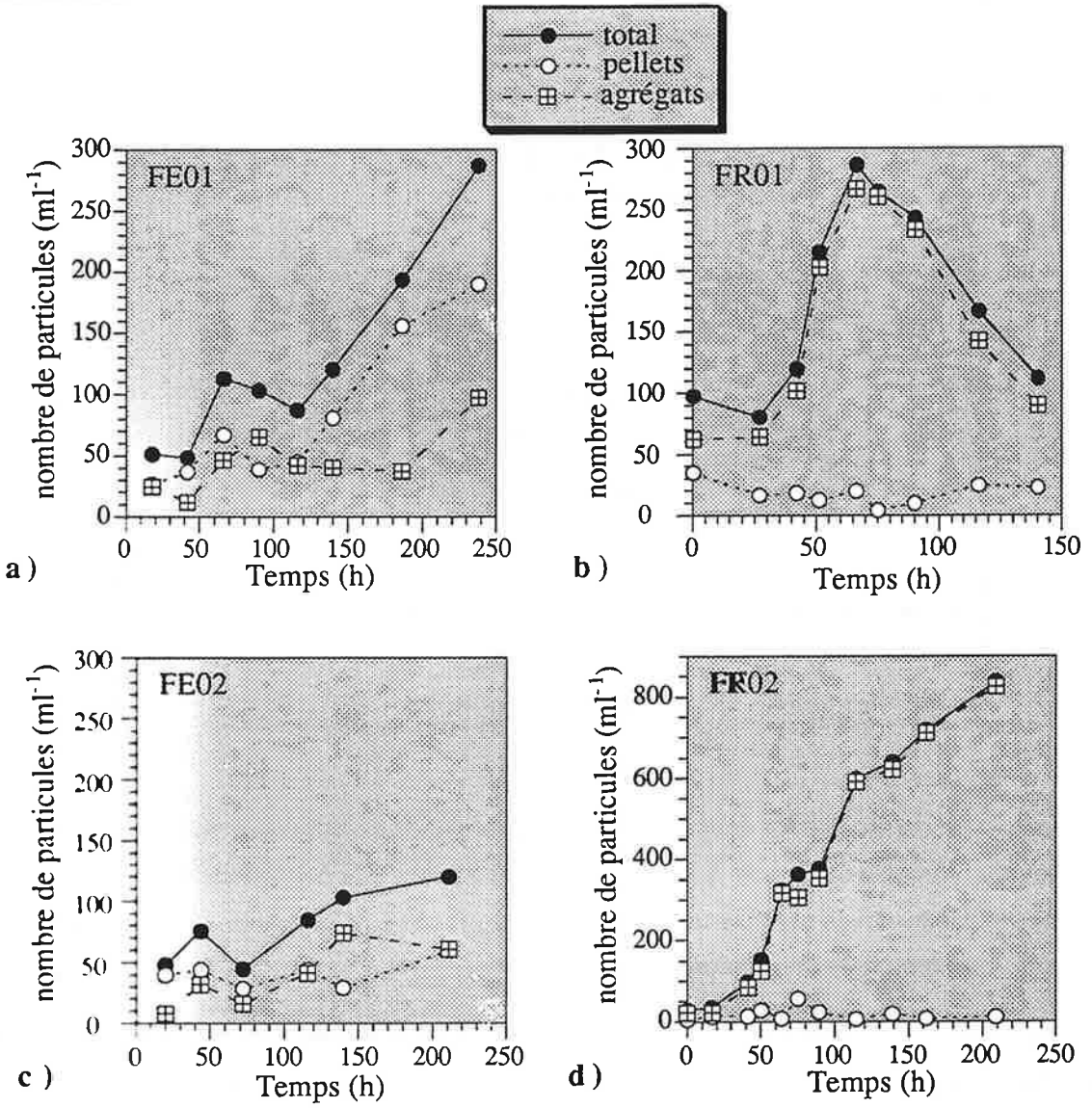


Figure V.28: Evolution du nombre de particules en fioles agitées (FE01, FE02) et en réacteurs (FR01, FR02), sur milieu "SC" (a-b) et sur milieu "FF" (c-d).

Comparaison des deux milieux de cultures

La comparaison morphologique des biomasses sur les deux milieux de culture porte essentiellement sur les cultures en fioles agitées puisque les deux fermentations présentées ici n'ont pas été conduites avec la même vitesse d'agitation.

Sur milieu "FF", on observe une véritable phase de développement des noyaux (0,5 à 1,5 mm) simultanément à l'épaississement des couronnes (Figure V.26 a-b).

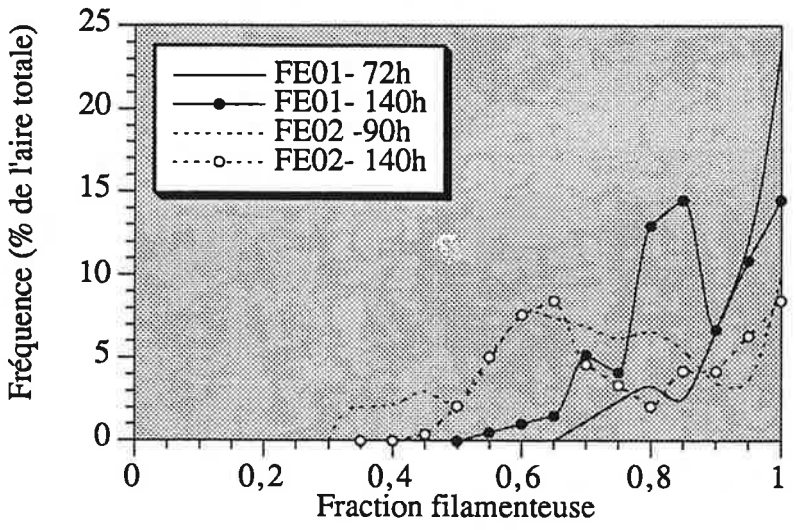


Figure V.29: Distributions des fractions filamenteuses en fioles agitées sur mileu "SC" (FE01) et sur mileu "FF" (FE02).

Sur milieu "SC", la croissance des couronnes est plus rapide en épaisseur mais n'entraine pas la formation de structure compacte. L'allongement des hyphes des couronnes se fait au détriment de la densité de ces zones mycéliennes. La baisse de pH et/ou la limitation en oxygène sur "SC" stoppe plus rapidement la croissance.

Les deux cultures se différencient par leur composition en forme mycélienne compacte (noyaux). Celle-ci est illustrée par les distributions de la fraction filamenteuse exprimée en pourcentage de l'aire totale (Figure V.29). On observe une différence de 20% sur la valeur moyenne de la fraction filamenteuse représentant un gain de 30% en volume équivalent. Les différences de taux de croissance et de durées de croissance, observées au paragraphe V.2.1 (Figures V.22 et V.23) sur ces deux milieux, se traduisent donc au plan morphologique par un degré de compaction accrue de la biomasse dans le cas où la croissance est la plus active (milieu "FF").

V.2.3 Discussion

L'application de la méthode d'analyse d'images, développée au Chapitre IV, à la souche de *Fomes fomentarius*, a permis de dégager des caractéristiques morphologiques qui vont maintenant être présentées.

La morphologie de type "pellet" n'est pas la plus favorable pour la production des polysaccharides. La culture FE02 qui comportent la plus forte proportion de biomasse "compacte" (Figure V.25a) présente aussi les plus faibles productivités, alors que sa courbe de

biomasse diffère assez peu de celle obtenue en réacteur. A l'inverse le pic de productivité correspond, pour les trois cultures où celui-ci est observé (FE01, FR01, FR02), au moment où la culture se composent presqu'exclusivement de formes filamenteuses (couronnes ou agrégats).

Si la morphologie filamenteuse semble favorable à une meilleure production, elle ne détermine toutefois pas, à elle seule, l'orientation métabolique du mycélium. Son influence reste subordonnée à celle du milieu de culture et du taux de croissance qui en découle. Ainsi, les deux fermentations en réacteurs (FR01 et FR02) présentent une structure morphologique très similaire après 80h de culture (Figures V.24b et V.25b) mais le maintien d'un métabolisme orienté vers la croissance sur le mileu "FF" (FR02) ne permet pas d'obtenir une productivité aussi élevée que sur milieu "SC".

Dans le type de cultures testées, la formation de zones mycéliennes compactes est limitée dans le temps aux périodes de croissance les plus actives. La croissance repose essentiellement sur le développement de structures filamenteuses relativement lâches, indépendantes (agrégats) ou associés à un noyau. Ce type de morphologie se distingue nettement de celui observée sur *Macrocystidia cucumis* (§ V.1) où, à l'inverse les zones compactes dominent. L'influence des facteurs génétiques à l'origine de certains comportements morphologiques en cultures immergées (Braun et Vecht-Lifschitz, 1991) est ici clairement illustrée.

Les cultures en réacteurs conduisent à une morphologie de type "pulpeuse" même à des vitesses d'agitation modérées (200 - 300 rpm). L'agitation n'affecte pas la croissance, au contraire de ce qui a été observée pour *M. cucumis*, mais, sous ces conditions, ne permet pas non plus une amélioration significative de la concentration finale. L'influence de l'agitation comme facteur limitant la formation des pellets est une tendance généralement décrite dans la littérature (Metz et Kossen, 1977; Hotop *et al.*, 1993; Tucker et Thomas, 1994). Cependant, on peut remarquer que les vitesses d'agitation uilisées ici (0,3 à 0,8 m/s) sont relativement faibles comparées à celles généralement utilisées pour les fermentations de *Penicillium chrysogenum* (2 à 4 m/s) puisque c'est sur cette souche que porte les études précédemment citées. Il semble donc nécessaire d'envisager l'influence conjuguée d'autres facteurs sur la morphologie observée en réacteur.

La concentration en oxygène dissous figure parmi ces autres facteurs influants, comme nous l'avons déjà signalé en § V.1.4. En effet, une faible disponibilité en oxygène est un paramètre cité comme réduisant l'hydrophobicité des parois hyphales chez *Streptomyces tendae* (Vecht-Lifshitz *et al.*, 1990). Or, les répulsions hydrophobes en surface des hyphes sont considérées comme l'un des phénomènes favorisant le maintien du mycélium sous une forme aggrégée et conduisant à une morphologie de type pellet (Braun et Vecht-Lifschitz, 1991). Ces auteurs suggèrent d'ailleurs que la morphologie de type pellet peut résulter soit d'un processus d'aggrégation spécifique, comparable à celui responsable de la floculation chez les levures, avec notamment l'intervention d'interactions de surface entre des complexes lectino-polysaccharidiques de la paroi, soit d'une agrégation non spécifique où le rôle des interactions

hydrophobes semblerait déterminant. A ces phénomènes physico-chimiques, ils ajoutent cependant un processus purement mécanique qui découle du "piégeage" des hyphes nouvellement formées au sein du réseau filamenteux enchevétré, préexistants (effet "trap-net"). Ce dernier effet explique que même en cas de modifications importantes des conditions de milieu conduisant à un relachement des interactions évoquées précedemment, le réseau filamenteux ne se "déroule" immédiatement. Le rôle des interactions hydrophobes, dont l'intensité peut être modifiée par l'ajout dans le milieu d'agents surfactants, est cependant discuté selon les microorganismes considérés (Metz et Kossen, 1977; Gerin *et al.*, 1993). Ces différentes hypothèses soulignent la compléxité des phénomènes mis en cause ainsi que leur pluralité. Dans le cadre de nos essais, il est intéressant de remarquer que la fragmentation des couronnes, qui est observée de façon beaucoup plus marquée en réacteur qu'en fioles (Figures V.24b et V.25b et Figure V.28), est intervenue dans les deux cas (FR01 et FR02) sous des conditions limitantes en oxygène. Selon le milieu (et probablement selon les conditions de pH), cette fragmentation marque soit la fin de la croissance (FR01), soit une baisse importante du taux de croissance (FR02). Compte tenue des réserves apportées plus haut sur l'intensité du taux de cisaillement imputable à l'agitation, on peut suggérer évoquer un phénomène de fragilisation des parois hyphales, en milieu limitant en oxygène, pour expliquer cette concordance. Des analyses menées à une résolution plus fine, avec notammant les méthodes proposées par Tucker *et al.* (1992) ou Paul *et al.* (1992), pourrraient permettre de déterminer si ces différences de morphologie macroscopique reposent sur des différences au niveau de la structure des hyphes — les distances interseptales ou le taux de vacuolisation caractérisant un possible viellissement — ou si elles sont fondées sur une différence d'hydrophobicité pariétale responsable de la formation de liaisons interhyphales (Gerin et al., 1993).

Ces caractéristiques permettent d'en déduire quelques conséquences sur le procédé de production de ce type de polysaccharide.

La phase de productivité maximale en polysaccharide est de courte durée et intervient dès l'arrêt de la croissance. La phase stationnaire est également courte ou inexistante et, dans ces cultures conduites en mode "batch", elle est suivie rapidement d'une phase de dégénérescence néfaste à la production. Ces caractéristiques suggèrent qu'une telle production serait mieux adaptée à une culture de type continue ou semi-continue. En effet, après une première phase de croissance active en présence d'une forte agitation propre à empêcher la formation des pellets, un faible taux de dilution permettrait de maintenir la biomasse sous ces conditions limitantes pour la croissance mais favorables à la production. Une telle stratégie fermentaire a été proposée et appliquée avec succès, en mode "fed-batch" par Rau *et al.* (1992) pour la production du schizophyllane par *Schizophyllum commune*. Dans ce cas, le maintien de conditions limitantes en oxygène propre à conserver le taux de croissance à une faible valeur et l'utilisation de fortes vitesses d'agitation se sont montrés bénéfiques. Aucune précision n'est fournie sur la morphologie de la biomasse, on peut cependant penser que les fortes conditions d'agitations ont permis de limiter la formation

des structures aggrégées. Ce type d'effet a pu être observé lors de fermentations (non présentées ici) conduites dans notre laboratoire sur une souche de *Schizophyllum commune* (Durant *et al.*, 1994). Une morphologie très similaire à celle décrite pour *F. fomentarius* a été obtenue et l'importance du taux d'agitation sur l'intensité du phénomène de fragmentation a pu être montré dans ce cas. On peut signaler également que des résultats comparables ont été obtenus avec ce même chamignon, dans un réacteur pulsé (Hubstrahlbioreaktor) où une morpholgie de type pellet prédominait (Korn, 1993). Là encore, la productivité en polysaccharide et en biomasse se sont révélées inversement corrélées et le taux d'aération néfaste au delà d'un certain seuil nécessaire à l'obtention d'une concentration en biomasse suffisante. Toutefois, une différence notable doit être souligner avec nos cultures. La production du schizophyllane est directement liée à la phase de croissance et cesse avec celle-ci. Ce polysaccharide est donc produit efficacement avec un taux de croissance réduit mais non nul.

La prédominance de la forme filamenteuse au moment de la formation du polysaccharide suggère que les zones apicales jouent un rôle significatif dans l'origine biosynthétique de ces substances. En raison de l'importance de la biosynthèse des polysaccharides dans le processus de formation de la paroi (Wessels et Siestsma, 1979), il est raisonnable de penser que les mêmes complexes enzymatiques pourraient être à l'origine de la formation de ces polysaccharides exocellulaires. En proposant son modèle du "flux continu", Wessels (1993) (cf. § I.1.2.2) a souligné l'importance des flux excrétoires à l'apex des hyphes, sous l'action notamment des glucanes synthases intégrées dans la paroi. On peut alors envisager que le produit de ces enzymes est complètement mobilisé par la synthèse pariétale en phase de croissance croissance. En revanche, lorsque celle-ci se ralentie, sous l'effet d'une limitation en oxygène ou d'une baisse de pH, les glucanes synthases peuvent rester actives si la concentration en substrats carbonés dans le milieu est encore élevée. Une partie des polymères formés est alors directement excrétée sans être intégrée à la paroi. Rau *et al.*, (1992) ont suggéré par ailleurs une possible inhibition directe des glucanes synthases de *S. commune* sous l'action d'une forte concentration en oxygène. Ceci constitue simplement des hypothèses que les résultats de la présente étude ne suffisent à valider complètement. Par ailleurs, la complexité des phénomènes excrétoires chez les champignons (Peberdy, 1994) imposent de rester prudent quant au mécanisme mis en jeu pour l'excrétion de ces polysaccharides.

Ces résultats, qui montrent l'intérêt du suivi morphologiqe de ces cultures dans l'optique de la définition d'un procédé fermentaire adapté à la production des polysaccharides, appellent cependant quelques remarques concernant des limites ou des améliorations à apporter à la méthode.

V.3. LIMITES DE LA MÉTHODE

Résolution et morphologie macroscopique

Au cours d'essais portant sur l'influence du broyage de l'inoculum sur la morphologie lors de al culture (essais non présentés dans ce rapport), nous n'avons pas pu établir une distribution complète et représentative des fragments directement issus de l'homogénéisation. En effet, la très grande majorité des fragments (notamment après un broyage à l'ultraturax) sont soit perdus lors de la phase de coloration — le tamis utilisé pour la phase de coloration présente une maille de 100 µm et n'est pas adapté à une culture purement filamenteuse— soit non détectés lors de la phase d'analyse d'image. Le seuil de détection est lié d'une part à la résolution utilisée (16 à 40 µm par pixel), et d'autre part, au mode d'acquisition monochrome. Les agrégats mycéliens doivent avoir une taille suffisante pour que leur niveau de gris, lorsqu'on les observe en lumière transmise, permette de les distinguer du fond sans ambiguïté. Il arrive notamment que certaines particules présentent une périphérie filamenteuse extrêmement fine qui n'est pas détectée au moment du seuillage. Ces particules amputées de leur périphérie sont alors le plus fréquemment éliminées lors de la phase initiale de nettoyage par simple érosion / reconstruction. Par ailleurs, on peut signaler que l'introduction d'un test de circularité pour rendre la phase de nettoyage plus sélective dans la distinction entre les petites particules solides du milieu et les petits agrégats mycéliens serait inefficace en raison de l'aspect compacte et sphérique de ces petites particules après la non détection de leur périphérie filamenteuse. Un tel problème, inhérent au mode monochrome, est parfaitement résolu par l'utilisation de l'algorithme de traitement couleur (cf. § IV.2.4) puisque les fragments, même les plus petits, apparaissent en blanc sur un fond sombre. Mais cet algorithme, développé à Birmingham, dans le laboratoire du Docteur C.R. Thomas, n'a pas pu être utilisé en routine pour l'étude des fermentations présentées dans ce chapitre.

Ces difficultés, liées à la résolution, mettent l'accent sur un problème plus général des différentes méthodes d'analyses d'images. Il semble banal de souligner que la résolution utilisée pour l'acquisition des images doit être adaptée au phénomène que l'on souhaite détecter ou mesurer. Cependant, dans le cas des cultures mycéliennes et particulièrement avec le type de souches étudiées ici, la gamme de taille des structures morphologiques présentes au sein de la biomasse couvrent plus de trois ordres de grandeurs selon que l'on considère les hyphes et leur point de ramification (diamètre des hyphes de l'ordre de 3 à 8 µm) ou les formations macroscopiques tels que les pellets (plusieurs millimètres de diamètres). L'impossibilité d'observer sur une même image la totalité de ces structures explique la spécificité des méthodes qui ont été proposées dans la littérature (Thomas, 1992) pour couvrir l'ensemble de la gamme morphologique.

Au cours de cette étude, nous avons fait le choix d'étudier les structures macroscopiques de la biomasse afin de déterminer si leur propriétés sont suffisamment significatives pour en tirer des

informations sur le comportement cultural des souches étudiées. Ce type de méthode est évidemment destinée spécifiquement aux types de cultures où ces formations macroscopiques représentent une part prépondérante de la biomasse. Avec l'exemple de l'application de notre méthode aux cultures de *Fomes fomentarius* nous avons traité un cas où les cultures en réacteur apparaissent comme typiquement pulpeuses. Nous abordons les limites d'utilisation de notre méthode. Il apparaît en effet que ces différents agrégats se caractérisent non pas par leurs propriétés diffusionnelles — ils ont tous une taille et une densité suffisamment faible pour que la diffusion interne des substrats ne semble pas limitante — mais plutôt par les propriétés morphologiques (longueur et taux de ramifications) des hyphes qui les composent. L'étude de l'influence de la morphologie sur le comportement métabolique de la souche est alors étroitement liée aux conséquences de cette morphologie sur les paramètres hydrodynamiques de la culture (contrainte de cisaillement, rhéologie du bouillon). Ce type d'étude est plus directement adaptée à l'algorithme proposé par Tucker *et al.* (1992) (cf. § III.1.8) qui a permis d'établir une corrélation entre la circularité des agrégats et les propriétés rhéologiques de cultures mycéliennes typiquement "pulpeuse" (Tucker et Thomas, 1993; Tucker, 1994). Après avoir montré l'importance de la biomasse filamenteuse pour la production des polysaccharides, une étude plus fine de la nature des agrégats et de leur implications rhéologiques seraient probablement intéressante.

En changeant à nouveau l'échelle d'observation et en considérant la structure interne des hyphes, notamment leur taux de vacuolisation, l'étude de la différenciation hyphale pourrait également apporter des informations complémentaires sur le déclenchement de la production des polysaccharides. Ce type d'étude a été appliquée avec succès dans le cas de la production de pénicilline (Paul *et al.*, 1994). L'origine métabolique des polysaccharides est complètement différente de celle de la pénicilline, cependant, la détection d'hyphes fortement vacuolées, caractéristiques d'un ralentissement de la croissance, pourrait peut-être se révéler pertinente.

Limites des facteurs de formes

Les deux facteurs de formes (circularité et facteur d'ouverture), calculés par le programme de traitement d'images, se sont révélés peu significatifs pour différencier les différentes catégories mycéliennes. Comme nous l'avons déjà souligné au Chapitre III (§ III. 3.3), la raison en est probablement leur grande dépendance vis à vis de la résolution et donc de la taille des particules. Ainsi la circularité est particulièrement dépendante du périmètre de la particule. Or, sur une particule représentant seulement quelques pixels en surfaces, le "lissage" du périmètre inhérent à la nature discréte du réseau de pixels est important par rapport à la dimension originale du contour. En revanche, sur une particule de plusieurs milliers de pixels en surface, cette effet de lissage à moins de conséquence sur la dimension du périmètre détecté. Le périmètre d'une telle grande particule apparait donc beaucoup plus riche en détails que celui d'une petite. Quelle que soit sa forme, la circularité sera donc surévaluée (plus proche de 1, forme plus circulaire) pour

une petite particule. On peut noter par ailleurs qu'en mode monochrome, mode selon lequel toutes les analyses présentées dans ce chapitre ont été réalisées, les niveaux de gris des hyphes décolorées (couronnes filamenteuses) et ceux du fond de l'image sont assez proches. Une différence d'une unité sur l'échelle des niveaux de gris peut donc conduire à une variation de contour relativement importante et par conséquent à une variation de circularité également notable. Ce problème disparait avec l'utilisation du mode d'acquisition couleur puisque les zones décolorées apparaissent claires sur un fond sombre. Pour le facteur d'ouverture, défini par Reichl *et al.* (1992), le problème a des origines quelque peu différentes mais conduit aux mêmes conclusions. Ainsi, on constate que la perte relative de surface peut être du même ordre de grandeur pour un petit objet, même assez régulier, et pour un grand objet, beaucoup plus irrégulier de contour. La valeur de ce facteur apparaît en pratique beaucoup plus dépendante de la taille de l'objet que de sa forme. Il est en revanche efficace et significatif si l'on compare des objets présentant une bonne homogénéité en taille.

Ces raisons nous ont conduit à peu utiliser dans la pratique ces deux facteurs de forme. La combinaison des autres paramètres mesurés et calculés (notamment la fraction filamenteuse) se sont montrés suffisamment riches en informations pour l'interprétation des résultats. On peut toutefois suggérer que l'utilisation de l'aire convexe d'une particule en comparaison avec son aire réelle, comme celà a été proposé par Cox et Thomas (1992), permet probablement d'obtenir une description de la nature de la couronne ("pelucheuse" ou lisse) moins dépendante de la taille de la particule. La dimension fractale des objets pourrait également être considérée. Un algorithme de calcul de cette dimension a d'ailleurs été testé sur quelques particules. Toutefois, il allonge considérablement le temps de traitement (environ 15 s par particules) et n'a donc pas été utilisé en routine ou pour l'examen complet d'un échantillon. Cette voie semble cependant intéressante à explorer.

Difficultés d'extrapolation des surfaces projetées en volume

La distinction entre les zones que nous dénommons "filamenteuses" (décolorées) et "compactes" (colorées) repose sur le temps nécessaire à l'éthanol pour traverser la couche mycélienne externe et venir rincer les zones plus internes. La taille de la couronne ne nous renseigne pas sur la densité des zones centrales. En effet, celles-ci peuvent être restées colorées soit parce qu'elles sont situées au centre d'un agrégat de grande taille relativement lâche (sans pour autant que leur densité soit véritablement différente de celle des zones périphériques), soit parce qu'elles présentent une compacité accrue par rapport à la couronne périphérique et donc qu'elles opposent une résistance diffusionnelle plus importante. La méthode de "coloration 1" et de traitement d'images développée dans le cadre de cette étude (Chapitre IV) ne permettent pas de distinguer entre ces deux origines possibles pour la présence d'une zone colorée (noyau) au sein d'un enchevêtrement mycélien.

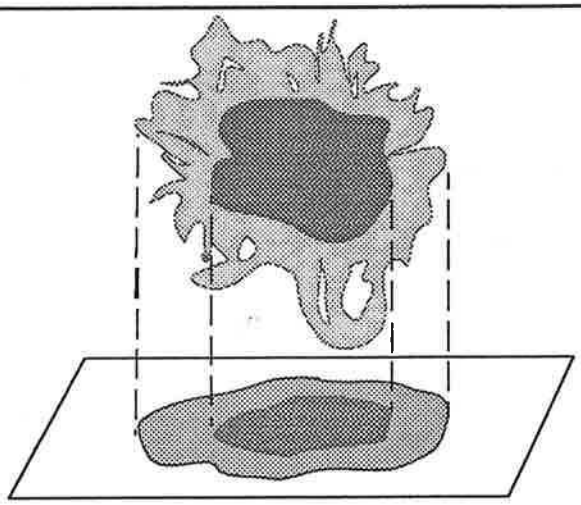


Figure V.30: Représentation en projection d'un pellet doté d'une couronne filamenteuse dense.

Ce phénomène n'a pas de conséquence sur l'interprétation qualitative des résultats (qu'elle qu'en soit l'origine, ces zones sont confrontées à une limitation diffusionnelle). En revanche, il est beaucoup plus pénalisant lorsque l'on souhaite quantifier l'importance relative de ces différentes formes morphologiques non plus seulement en aire projetée mais en volume et donc indirectement en masse. Pour réaliser une évaluation volumique de la biomasse à partir de sa représentation projetée, l'approximation la plus évidente consiste à considérer ces particules comme des sphères dont le diamètre à la même valeur que celui l'aire projetée, assimilée à un disque. Pour une zone compacte, l'approximation peut fournir une valeur approchée assez représentative. En revanche pour les zones périphériques, au contours beaucoup plus irrégulièrs, le problème devient insoluble . Cette notion est illustrée par la figure V.30. Ainsi, en considérant les pellets comme des sphères, on surévalue le volume des couronnes filamenteuses qui généralement ne se présente pas sous la forme d'un volume plein et homogène mais dont la représentation projetée peut fournir une surface pleine sous l'effet de la superposition des différentes couches mycéliennes de la périphérie.

Nous allons traiter ici un exemple qui va illustrer la traduction de ce phénomène en termes d'estimation de la densité moyenne de la biomasse.

La figure V.31a présente l'évolution des volumes équivalents occupés par chaque catégorie mycélienne. Ces volumes sont obtenus en considérant chaque particule comme une sphère et en calculant sont volume à partir de son diamètre équivalent. Ils sont exprimés par unité de volume de bouillon de culture et représente donc la fraction volumique équivalente des différentes

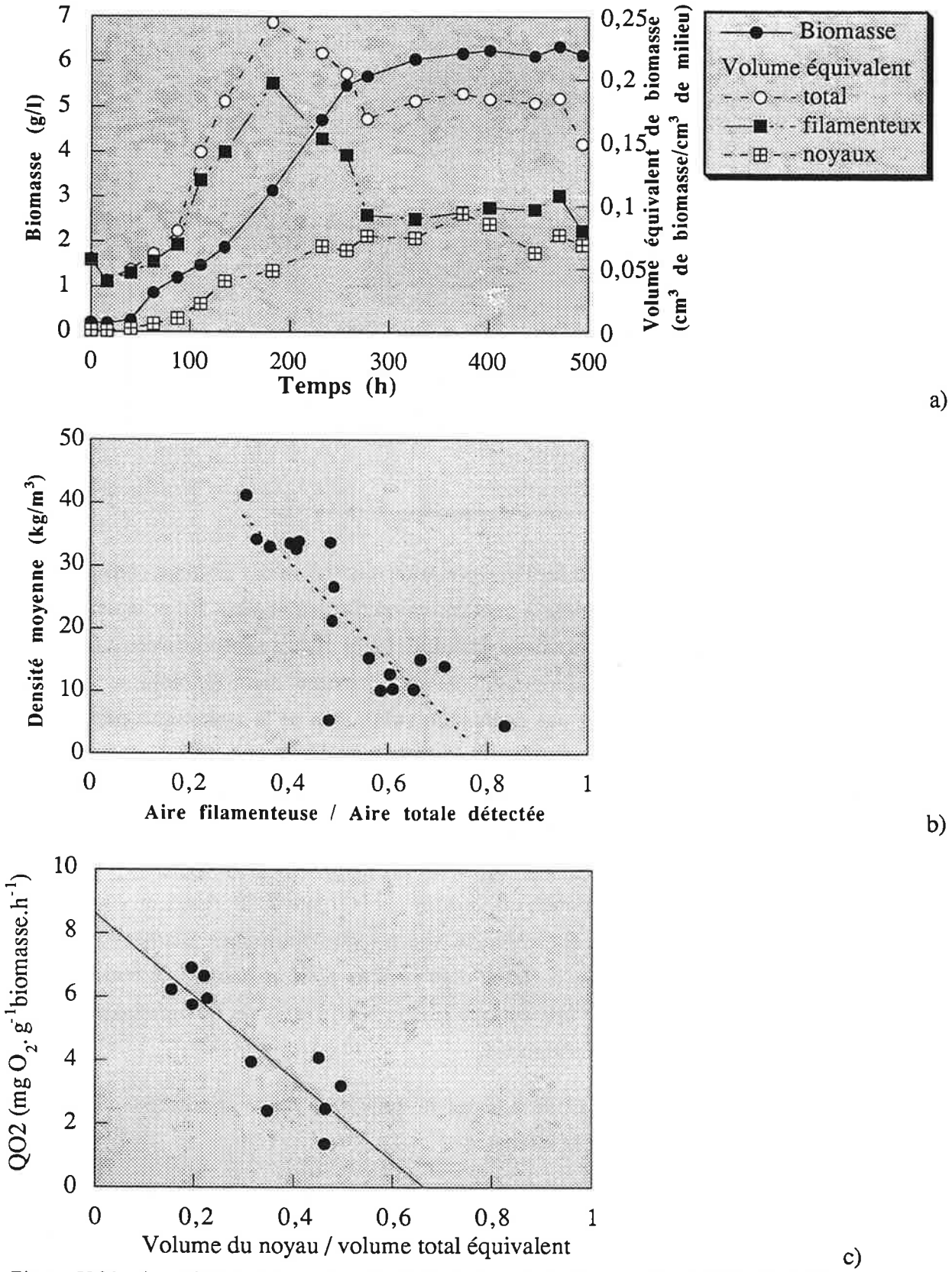


Figure V.31: a) Evolution des volumes équivalents lors de la fermentation MC02 de la biomasse compacte (noyaux) et filamenteuse (couronnes + agrégats); b) Variation de la densité moyenne de la biomasse (poids sec/volume équivalent) en fonction de la fraction filamenteuse détectée. c) Consommation spécifique en oxygène de la biomasse en fonction de la fraction volumique du noyau.

catégories mycéliennes. La catégorie "filamenteuse" regroupe les couronnes et les agrégats. On y observe une augmentation très rapide du volume filamenteux pendant la croissance alors que les couronnes évoluent peu en épaisseur. Cette augmentation est le résultat mathématique de la différence de volume entre deux couronnes de même épaisseur entourant deux sphères de diamètres différents. Ces volumes ont été calculés pour permettre la détermination d'une densité moyenne de la biomasse, exprimées en poids sec (kg) par unité de volume équivalent de biomasse humide.

La Figure V.31b montre que la densité de la biomasse diminue lorsque la fraction filamenteuse détectée augmente comme on pouvait s'y attendre logiquement. En théorie, une telle courbe devrait permettre d'établir la densité moyenne des zones compactes (intersection avec l'axe des ordonnées) et celle des zones filamenteuses (valeurs de la densité quand la fraction filamenteuse est égale à 1). Cependant on constante que cette dernière valeur est négative et donc aberrante. Cette corrélation a été répétée sur les différentes cultures et le résultat ne provient pas d'une erreur expérimentale. Il traduit simplement l'artefact évoqué plus haut et inhérent aux méthodes d'analyse d'images qui ne permetttent de caractériser les particules qu'à travers leur représentation projetée sur un plan (l'image). La pente excessive traduit donc la surévaluation des volumes filamenteux. Sous cette forme, aucune correction valide n'a pu être établie.

Une autre corrélation fréquemment recherchée lors des études morphologiques est celle qui permet d'établir la fraction métaboliquement active de la biomasse. La consommation spécifique en oxygène peut représenter un bon paramètre permettant d'évaluer le degré d'activité métabolique de la biomasse. Une simplification pour ce type de biomasse consiste à considérer le pellet comme une sphère présentant une couronne responsable de la croissance, ne présentant pas de limitations diffusionelles et un noyau central, ne recevant plus de substrats, notamment l'oxygène (van Suijdam *et al.*, 1982). Cette représentation schématique conduit à considérer que la consommation d'oxygène au sein de la biomasse suit une cinétique d'ordre 0. Elle est maximale au dessus d'une valeur critique de la concentration en oxygène dissous et nulle dès que cette concentration tombe sous la valeur critique. Si il est connu que la consommation en oxygène suit une cinétique michaélienne pour des concentrations en oxygène dissous variant entre une valeur nulle et la concentration critique (Kobayashi *et al.*, 1973), la simplification exposée ci-dessus se justifie par la faible valeur de la concentration critique ($\approx 0.5.10^{-3}$ kg.m^{-3}) (van Suijdam *et al.*, 1982).

A partir de ce concept, on peut définir un rendement η exprimant le rapport entre le volume de la zone active et le volume total du pellet (Korn, 1993). En considérant l'approximation précédente sur la consommation d'oxygéne (cinétique d'ordre 0), ce rendement peut être traduit directement par le rapport entre la consommation spécifique réelle du pellet (QO_2) et sa consommation spécifique maximale du pellet en oxygène (consommation qu'il aurait si aucune zone ne

présentait de limitations diffusionnelles et que donc tout le volume contribuait à la consommation). Ce rendement peut donc être exprimé par l'équation [4.17]:

$$\eta = \frac{\text{Volume}_{\text{couronne}}}{\text{Volume}_{\text{total}}} = 1 - \left(\frac{\text{Volume}_{\text{noyau}}}{\text{Volume}_{\text{total}}}\right) = \frac{QO_2}{QO_{2\,max}} \qquad [4.17]$$

En représentant graphiquement QO_2 en fonction de la fraction volumique des noyaux (calculée pour l'ensemble de la biomasse), on doit obtenir, en théorie, une droite dont la pente est la consommation spécifique maximale, $QO_{2\,max}$, et passant par le point (Vnoyau/Vtotal=1; QO_2=0) montrant une consommation nulle pour un pellet théorique composé uniquement d'un noyau.

La figure V.31C montre la corrélation entre la consommation spécifique en oxygène de la biomasse et la fraction compacte de la biomasse. L'application expérimentale de cette relation à la fermentation MC01 est représentée sur la figure V.31c. La pente calculée n'est pas significative car elle correspond à une consommation négative aberrante pour une fraction volumique supérieur à 0,7. Ces résultats soulignent à nouveau la surestimation du volume des zones filamenteuses et donc la sous-estimation de la fraction volumique des noyaux. Ils montrent les limites des représentations en deux dimensions fournies par les méthodes d'analyses d'images.

Cependant, l'évolution de la consommation spécifique en fonction de la fraction volumique des zones restées colorées illustre le bien fondé du critère diffusionnel développé avec la méthode d'analyses d'images proposée ici. En effet, même si la corrélation expérimentale, réalisée sur la seule fermentation (MC01) pour laquelle nous disposions de données complètes sur l'évolution de la consommation en oxygène, n'est pas excellente, elle suffit néanmoins à démontrer que les zones colorées (les noyaux) ont une activité respiratoire minime et peuvent bien être considérées comme des zones inactives.

Insistons ici à nouveau sur le fait que l'exemple qui vient d'être exposé n'est pas destiné à proposer une caractérisation complète de la consommation d'oxygène au sein des pellets. Les processus diffusionnels et réactionnels sont plus complexes et font intervenir d'autres notions non évoquées ici (Kobayashi *et al.*, 1973; Michel *et al.*, 1992). L'objectif est simplement de souligner la mauvaise représentativité des fractions volumiques calculées à partir des résultats de l'analyse d'image.

La définition d'un modèle de la croissance fongique sous forme d'agrégats mycéliens dépassait le cadre de cette étude. On peut cependant suggérer que la recherche d'une corrélation plus fine entre la représentation projetée des différentes catégories mycéliennes et leur fraction volumique (et donc indirectement massique) au sein de la biomasse permettrait d'apporter une contribution importante à la définition d'un modèle de croissance structuré morphologiquement pour ce type de biomasse agrégée. L'hétérogénéité des particules présentes au sein de la population et la diversité de leur comportement (croissance, cassure, érosion, ...) démontrent, par ailleurs, la

nécessité de considérer la biomasse en termes de population et non comme un ensemble présentant une évolution moyenne. Un modèle efficace et précis nécessiterait donc la résolution d'un bilan de population (Ramkrishna, 1979; Edelstein et Hadar, 1983; Nielsen, 1992).

Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté les paramètres morphologiques auxquels la méthode d'analyse d'image, développée au Chapitre IV, permet d'accéder. Nous avons examiné leur signification sur deux souches présentant des types morphologiques très différents et appartenant à deux familles majeures des Basidiomycètes.

L'utilisation pratique de la méthode s'est révélée parfaitement compatible avec un suivi en routine de fermentations (durée de traitement limitée à 20-25 minutes). Cependant, dans sa configuration actuelle, la procédure de coloration reste contraignante en manipulation et impose la présence d'un opérateur pendant toute sa durée. Une attention particulière devra être portée à l'optimisation de cette phase.

L'ensemble des paramètres morphologiques recueillies par la méthode fournissent une description complète des caractères macroscopiques de la biomasse et sont adaptées à une interprétation des modifications morphologiques intervenant au cours de la culture.

Les deux souches ont montré des types morphologiques très distincts:

- *M. cucumis* se caractérise par la prédominance des structures compactes (grands pellets aux noyaux compactes). L'agitation, dans la gamme de vitesses utilisées ici (0,3 - 0,8m/s), favorise accentue la compacité de la biomasse. Cependant, la sensibilité de la souche aux contraintes de cisaillement est très marquée et une limitation nette de la croissance intervient dès 300 rpm (0,8 m/s). Cette sensibilité est illustrée par un phénomène d'attrition des zones filamenteuses périphériques des pellets. La transition d'une morphologie compacte vers une forme filamenteuse relachée a été observée sous des conditions limitantes en oxygène et en pH, ce dernier facteur jouant un rôle particulièrement important pour le déroulement optimal de la croissance. L'absence de production métabolique détectable n'a pas permis de corréler ses particularités morphologiques à des comportements physiologiques plus précis de la biomasse.

- *F. fomentarius* présente une morphologie plus proche du type "pulpeux". La formation de structures compactes n'est intervenue que lors des phases de croissance les plus intenses et de façon plus notable sur le milieu "FF" et en fioles agitées. Les conditions favorables à la production de polysaccharide sont un faible taux de croissance et des conditions limitantes en oxygène. La productivité est accrue lorsque les zones filamenteuses non fragmentées

(couronnes) dominent. Ces données suggèrent qu'un procédé de fermentation continu serait plus adapté à ce type de production et permettrait de maintenir les conditions limitantes sur une plus longue période. Il faut noter que lors de cette étude, nous avons considérer la fraction polysaccharidique totale et que l'influence des conditions de culture sur la proportion de glucanes et d'hétéroglucanes au sein de cette fraction n'a pas été examinée mais mériterait d'être effectué dans l'optique d'une optimisation des conditions de production des composés immunosuppresseurs.

La méthode d'analyses d'images est bien adaptée à la description d'une morphologie du type "pellet" mais a montré ses limites pour une caractérisation fine de la culture plus pulpeuse obtenue avec *F. fomentarius*.

L'impossibilité de traduire les données issues de l'analyse d'images en termes de volumes constitue une limite importante commune à l'ensemble des méthodes proposées à ce jour pour la caractérisation d'une biomasse sous forme de pellet. Nous proposons dans le prochain chapitre, en guise de perspectives, une technique de coloration destinée à surmonter les contraintes imposées par la représentation de la biomasse en projection en introduisant une composante cinétique dans le processus de caractérisation morphologique.

Chapitre VI

Perspectives:

Méthode d'étude des propriétés diffusionnelles des pellets

Chapitre VI

Perspectives:

Méthode d'étude des propriétés diffusionnelles des pellets

Comme nous l'avons souligné au paragraphe V.3, les données fournies par l'analyse d'images sur des objets de formes irrégulières sont difficiles à convertir en volume et interdisent de déterminer les fractions volumiques (et donc massiques) occupées par chacune des catégories mycéliennes. Par ailleurs, la méthode de coloration développée au chapitre IV, "coloration 1", offre une classification "binaire" de la biomasse (colorée ou non), qui ne fournit pas d'information quantifiable sur la densité de celle-ci.

Pour tenter de pallier ces différentes contraintes, nous proposons ici une nouvelle méthode de coloration de la biomasse à l'aide de phénolphtaléine. La décoloration de cet indicateur selon le pH, associée à une mesure par analyse d'images, permet de suivre la cinétique de diffusion des ions H^+ au sein des pellets. Cette méthode est nommée "coloration 2" pour la différencier de la précédente méthode, à base de cristal violet, décrite au chapitre IV.

Le développement de cette méthode sur un aspect pratique et son exploitation théorique sont en cours de réalisation. Elle n'a été appliquée, à titre d'exemple, qu'à quelques pellets lors d'essais réalisés à l'Université de Birmingham. Cette méthode est présentée ici à titre de perspectives pour le prolongement du travail qui vient d'être exposé.

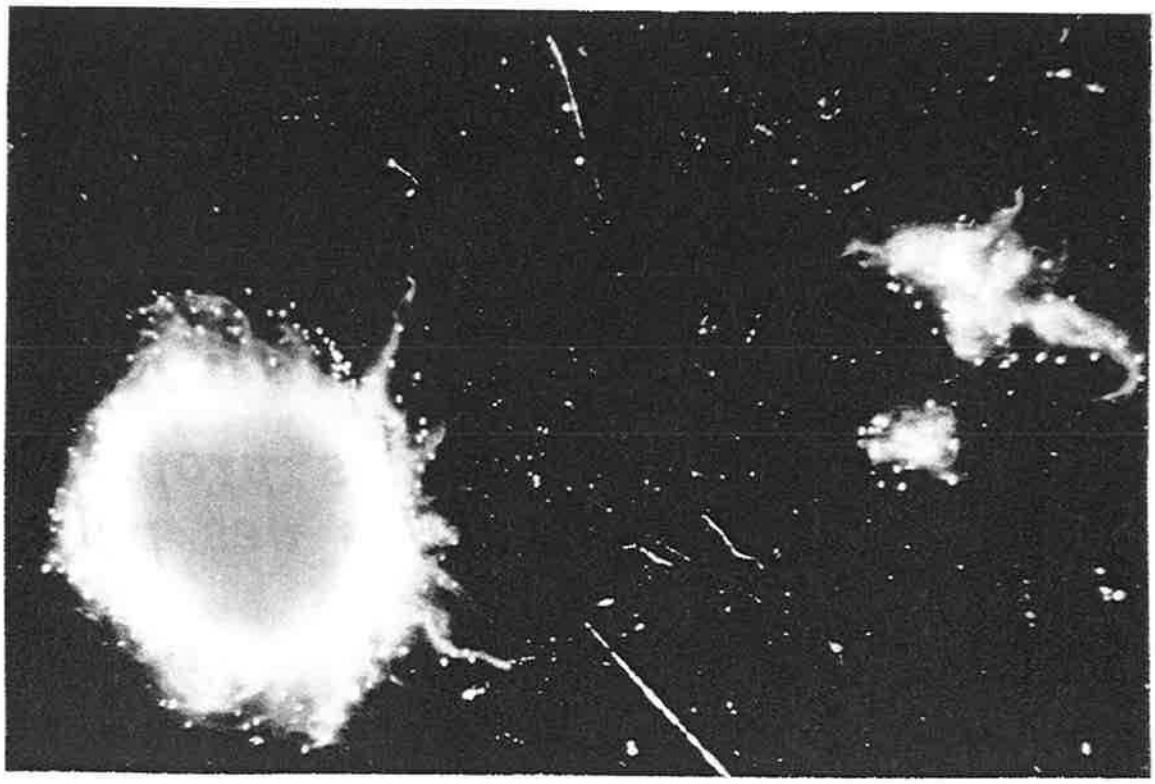


Figure VI.1: Pellet coloré par la phénolphtaléine observé lors de la phase de décoloration en solution acide.

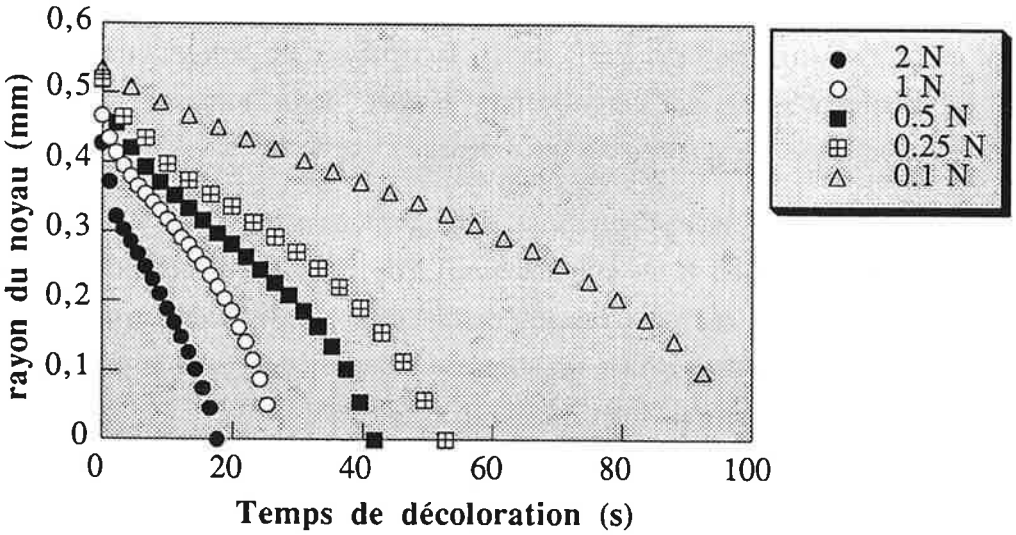


Figure VI.2: Evolution du rayon équivalent du noyau d'un même pellet lors de la décoloration en fonction des concentrations initiales en acide.

VI.1 MÉTHODE DE COLORATION

La biomasse, récupérée par filtration, est resuspendue dans une solution de NaOH (0,1 N). La solution colorante est une solution de phénolphtaléine (1% m/v) dissoute dans l'éthanol à 80% et maintenue sous sa forme alcaline, colorée, par ajout de NaOH. (concentration finale 0,1N).

Cette solution colorante est ajoutée à la suspension de biomasse à raison de 4% (v/v). Les pellets sont conservés en contact de la phénolphtaléine pendant 5 à 10 min de façon à permettre sa diffusion jusqu'au centre.

Après élimination de la solution colorante (par filtration), la biomasse est placée immédiatement dans en milieu acide (H2S04 à différentes concentrations selon les essais). Lors des essais préliminaires présentés ici, nous avons étudié des pellets isolés. Après coloration, chaque pellet a ainsi été placé dans une coupelle en verre contenant 3ml de la solution acide et disposée directement sous la caméra video.

La diffusion de l'acide au sein de la biomasse provoque la décoloration de la phénolphtaléine. La différenciation nette entre les zones décolorées (forme acide incolore de la phénolphtaléine) et la zone centrale colorée, dont le pH est encore supérieur à la limite de décoloration de l'indicateur colorée, permet de suivre la progression du front réactionnel. La figure VI.1 présente un tel pellet en cours de décoloration.

Le suivi de la décoloration est réalisée par analyse d'images selon un simple algorithme. L'appareillage et les conditions d'éclairage sont identiques à ceux déjà décrits pour l'algorithme couleur au Chapitre IV et correspondent à l'appareillage du Biochemical Engineering Center de l'Université de Birmingham. L'acquisition est effectuée en utilisant uniquement le canal vert de la caméra vidéo. Une série de 23 images numériques (maximum de la capacité mémoire de l'analyseur) est succssivement acquise, à intervalles de temps réguliers (1 à 4s selon les essais), pendant la décoloration du pellet.

La zone centrale encore colorée en rouge présente une faible valeur de niveau de gris (proches du noir) sur le plan vert des images numériques. La zone périphérique décolorée présente au contraire des valeurs élevées de niveaux de gris (proches du blanc). Comme celà a déjà été décrit au Chapitre IV, un simple seuillage automatique permet de détecter la seule zone périphérique. Par différence avec l'image du pellet complètement décoloré, on peut alors en déduire sur chaque image, la surface projetée du noyau au cours du temps. On obtient ainsi la cinétique de progression du front réactionnel au sein du pellet en l'exprimant en diamètre équivalent du noyau encore coloré en fonction du temps.

Le résultat d'une application de la méthode sur un même pellet avec différentes concentrations d'acide est présenté sur la figure VI.2. On y observe la dépendance de la vitesse de décoloration en fonction de la concentration initiale d'acide.

VI.2 EXPLOITATION DES RÉSULTATS

Par analogie aux processus de diffusion dans les corps poreux et comme celà a déjà été décrit pour l'estimation des transferts d'oxygène au sein de pellet (Kobayashi *et al.*, 1973, van Suijdam *et al.*, 1982), le coefficient réel de diffusion des ions H^+ dépend de la densité de l'enchevêtrement hyphal et donc de la fraction de vide de la biomasse.

Van Suijdam *et al.* (1982) ont proposé une corrélation entre la fraction vide des pellets et la masse volumique de la biomasse:

$$\varepsilon_p = 1 - \frac{\overline{\rho}}{(1-\varepsilon_h).\rho_s} \qquad [6.1]$$

où ε_p est la fraction vide du pellet, ε_p, la fraction vide des hyphes ($\approx$ 0,75), $\overline{\rho}$, la masse volumique moyenne du pellet (kg/m^3) et ρ_s, la masse volumique sèche de la biomasse sèche (kg/m^3).

Selon ces mêmes auteurs, cette relation permet d'exprimer le coefficient de diffusion réel de l'oxygène en fonction de la masse volumique de la biomasse et du coefficient de diffusion théorique dans l'eau:

$$D_{e.O2} = \left(1 - \frac{\overline{\rho}}{350}\right).D_{O2} \qquad [6.2]$$

où D_{O2} est le coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'eau (m^2/s) et $D_{e.O2}$, coefficient de diffusion réel dans le pellet.

Ainsi à partir de la connaissance de ce coefficient de diffusion réel, on peut en déduire une estimation de la masse volumique de la biomasse. L'intérêt de la méthode présentée ici réside dans le fait qu'elle fournit les données nécessaires à la modélisation du processus de diffusion des ions H^+ au sein de la biomasse et donc qu'elle peut permettre indirectement d'accéder aux valeurs du coefficient réel de diffusion.

Contrairement à ce qui se passe lors de la diffusion de l'oxygène dans les pellets, les ions H^+ ne sont pas consommés, sous l'effet de l'activité métabolique de la biomasse, selon une cinétique de type Michaèlienne. En revanche, au cours de leur progression, ces ions sont "consommés" par la réaction acide-base à l'origine de la décoloration de la phénolphtaléine. Le phénomène observé lors de cette décoloration correspond donc au cas d'une diffusion en régime transitoire

accompagnée d'une réaction irréversible et instantanée (vitesse de réaction infinie). La modélisation d'un tel cas dans une géométrie plane est traitée par Sherwood et Pigford (1952). La transposition à une géométrie sphérique (cas d'un pellet dans une première approche) est en cours de réalisation.

En comparant les profils de décoloration théoriques issus de la modélisation aux profils déterminés expérimentalement il est possible d'évaluer si le coefficient de diffusion — et donc indirectement la masse volumique — est constant au sein des pellets ou si au contraire on y distingue un phénomène de zonation de la densité de l'enchêtrement hyphale

Queques développements pratiques de la méthode sont à l'étude pour permettre son application à un échantillon complet et non plus seulement à des pellets individualisés. Il faut noter en effet que pendant la durée de l'acquistion les pellets doivent rester immobiles pour que le traitement et les mesures ultérieures soient significatifs. Ceci nécessite la conception d'une cellule spécifique assurant à la fois la filtration de la suspension de biomasse, sa visibilité par la caméra, sa décoloration par la solution acide et enfin l'immobilité des pellets. Pour cette dernière contrainte l'utilisation d'un support fibreux a été envisagée.

Conclusion

La méthode présentée dans ce chapitre complète la méthode préalablement décrite au Chapitre IV en y ajoutant une composante cinétique. Un critère d'ordre diffusionnel est à nouveau utilisé pour caractériser les propriétés de la biomasse sous forme agrégée, mais la possibilité de quantifier la vitesse de ce processus diffusionnel constitue un avantage important par rapport à la première méthode.

La modélisation de ce phénomène diffusionnel devrait permettre d'obtenir des informations sur la masse volumique des pellets et sur la variation de celle-ci en fonction du rayon. L'objectif, à moyen terme, de cette méthode est de parvenir à une évaluation directe de la concentration en biomasse sous forme agrégée comme cela est déjà réalisé pour la forme filamenteuse (Packer *et al.*, 1992). L'obtention de telles données (sur la concentration en biomasse et la densité interne des pellets) devrait apporter une contribution importante à la définition d'un modèle de croissance structuré morphologiquement comme cela a également déjà été réalisée pour la forme filamenteuse (Nielsen, 1993).

Conclusion générale

Conclusion générale

Cette étude a porté sur les propriétés culturales et les potentialités métaboliques de deux souches de Basidiomycètes : *Macrocystidia cucumis* (Agaricales) et *Fomes fomentarius* (Aphyllophorales).

D'une part, sur des surnageants de culture de *M. cucumis,* un agent inhibant, *in vitro*, le développement du virus Herpes Simplex type 1 a été détecté. La détection a été réalisée par l'intermédiaire d'un test ELISA mis au point au laboratoire. La production ou la stabilité du ou des métabolite(s) antiviraux s'est cependant révélée trop erratique pour permettre une caractérisation du composé actif.

D'autre part, des fractions polysaccharidiques, isolées de cultures de *F. fomentarius,* ont montré, *in vitro*, une forte inhibition de la réaction proliférative des lymphocytes du sang périphérique, stimulés par la concanavaline A ou par des cellules présentatrices allogéniques. Les fractions actives ont été caractérisées et sont composées d'hétéroglucanes (glucose, mannose, galactose) associés à une fraction peptidique (5-8%). Les résultats actuels ne permettent pas de préciser le rôle de la fraction peptidique dans l'activité. Ce type d'activité immunosupppressive n'a à notre connaissance jamais été décrit à partir de telles souches fongiques.

De façon à définir les relations entre propriétés culturales, activités métaboliques et morphologie mycélienne, une première méthode d'analyse d'images a été développée afin d'autoriser, en routine, des mesures et une classification morphologique de la biomasse obtenue lors des fermentations. La méthode repose sur un procédé de coloration permettant une différenciation rapide des zones mycéliennes en fonction de leur accessibilité au milieu.

L'influence des conditions d'aération et d'agitation sur la croissance de *M. cucumis* a été examinée à l'aide de la méthode d'analyse d'images. Cette souche a montré une grande sensibilité aux contraintes de cisaillement. En dehors des conditions limitantes, la croissance se réalise sous forme de noyaux compacts présentant une couronne filamenteuse dont l'extension radiale est fonction de l'intensité de l'agitation. Sous conditions limitantes en oxygène et / ou en pH, la biomasse connaît une transition morphologique vers une structure plus filamenteuse. La modification de l'intensité des interactions interhyphales sous l'effet d'un changement de pH ou

de la concentration en oxygène dissous a pu être évoquée pour expliquer la transition morphologique.

La production de polysaccharides par *F. fomentarius* a été comparée sur deux milieux de cultures. Les résultats ont révélé que production et croissance sont inversement corrélées. De plus, les conditions d'agitation en réacteur et une limitation en oxygène, en favorisant la forme filamenteuse (biomasse "pulpeuse", sous forme de grands agrégats sans structure compacte), permettent d'améliorer les rendements en polysaccharide sans que la concentration en biomasse soit affectée. Cette constatation permet de suggérer que les mêmes complexes enzymatiques sont à l'origine d'une part de la synthèse pariétale, en conditions optimales de croissance, et d'autre part de l'excrétion des polysaccharides lorsque la croissance ralentit.

Enfin une seconde technique de coloration a été proposée, à titre de perspectives. Basée sur la décoloration de pellets préalablement colorés à l'aide de phénolphtaléine, cette méthode permet de suivre, par analyses d'images, la progression d'un front de diffusion au sein des pellets. L'exploitation des résultats en termes de modélisation du processus diffusionnel devrait permettre d'évaluer le coefficient réel de diffusion au sein des pellets et fournir ainsi une estimation de la densité de l'enchevêtrement mycélien.

Ces différents résultats permettent de proposer quelques remarques sur l'utilisation des Basidiomycètes en fermentations.

- Les espèces étudiées représentent deux exemples de souches appartenant aux deux ordres majeurs des Basidiomycètes. La multiplicité des espèces au sein de ces deux ordres obligent à une certaine prudence quant à la généralisation des résultats présentés ici. On peut simplement noter une certaine analogie entre les caractères morphologiques de *F. fomentarius* et ceux d'une espèce plus fréquemment décrite, *Schizophyllum commune*, appartenant également aux Aphyllophorales (Rau *et al.*, 1992; Durant *et al.*, 1994).

- Les paramètres (agitation, aération, pH...) influants sur la croissance du mycélium secondaire des Basidiomycètes en cultures immergées sont proches de ceux généralement décrits pour les Deutéromycètes. Deux différences notables sont cependant importantes à signaler.

    1) Le taux de croissance réduit des souches étudiées ici (généralement très inférieur à 0,05 h^{-1}) renforce leur sensibilité aux conditions de cultures (taux de cisaillement, oxygène dissous, pH). Ceci limite la plage de variation des variables de procédés disponibles pour un contôle et entraine une faible productivité des fermentations en mode discontinu (batch). La longueur des cultures, comme l'influence sur la productivité du type morphologique dominant, sont donc des arguments en faveur du développement de procédés de type continu ou semi-continu. Même si sur un plan industriel, le maintien de la stérilité pendant de longues périodes peut s'avérer

critique, de tels procédés procureraient probablement des améliorations sensibles de productivité globale (les résultats obtenus avec *F. fomentarius* le suggère) et permettrait un meilleur contrôle des caractères morphologiques et métaboliques de ces souches. La viabilité économique de telles cultures en dépend fortement.

2) Les interactions interhyphales spécifiques (complexe lectino-polysaccharidiques) ou non spécifiques (liaisons hydrophobes), dont l'importance est soulignée lors du processus de formation du basidiocarpe, semble également avoir une influence particulière lors des cultures immergées. Les transitions morphologiques importantes observées sous des conditions de cultures relativement proches (influence de la vitesse d'agitation sur *M. cucumis* notamment) suggèrent, en effet, l'existence d'une action "amplificatrice" jouée par d'autres facteurs que les paramètres hydrodynamiques de la culture.

- La nécessité de conserver les souches sous forme végétative accentue les risques de modifications des caractères génotypiques, déjà renforcés par la nature dicaryotique du mycélium. De plus, ce mycélium secondaire se montre très sensible aux conditions de cultures sur un plan métabolique et physiologique. Le processus de différenciation cellulaire majeur intervenant lors de la formation du basidiocarpe (carpophore) en est un exemple remarquable. Ces différentes caractéristiques peuvent être invoquées pour expliquer la production erratique des métabolites anti-HSV en relation avec la remise en culture de colonies d'âges variables. Ceci constitue évidemment un frein majeur à l'utilisation de telles souches sur un plan industriel.

Ces remarques confirment que la diversité du métabolisme secondaire des Basidiomycètes rend leur utilisation particulièrement prometteuse pour la découverte de nouveaux principes actifs. Cependant les difficultés culturales inhérentes à cette fongique illustrent les besoins de connaissances approfondies de leur comportement en cultures immergées pour un bonne maitrise de leur production métabolique.

L'analyse d'images, comme cela a été illustré dans cette étude, est un outil adapté à l'obtention d'informations morphologiques macroscopiques corrélables avec le métabolisme. Son utilisation peut concerner à la fois les cultures préliminaires nécessaires à la définition du procédé le mieux adapté à la production recherchée, et les cultures de production pour permettre un contrôle du procédé par modification des variables influantes sur la morphologie mycélienne.

Le critère diffusionnel, défini par les deux méthodes d'analyses d'images développées lors de cette étude, constitue une nouvelle alternative pour la caractérisation morphologique des pellets et agrégats mycéliens. Le développement d'un tel critère, notamment dans le cadre de la seconde méthode de coloration (phénolphtaléine), devrait fournir une meilleure quantification des paramètres morphologiques en termes de concentration en biomasse et une définition plus précise des limitations diffusionnelles au sein de la biomasse. Ces dernières pouvant être

déterminantes pour l'orientation du métabolisme secondaire, on peut ainsi suggérer l'emploi de cette méthode pour contribuer à la définition d'un modèle structuré morphologiquement de la croissance et/ou de la production métabolique d'une biomasse mycélienne sous forme agrégée.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams, H.L., Thomas, C.R. (1988), The use of image analysis for morphological measurements on filamentous microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 707-712.

Afnor (1978), Recueil de normes françaises de la statistique. Tome 1.(2ème edition). Ed. AFNOR - Paris.

Ainsworth, G.C. (1971), Ainsworth and Bisby's Dictionnary of Fungi, 6ème édition, Commonwealth Mycol. Inst. Kew - U.K.

Ainsworth, G.C. (1973), The Fungi. An advanced treatise. Vol. IV A et B Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K., Sussman, A.S. (Eds.), Academic Press - New York - Londres.

Albersheim, P., Valent, B.S. (1978), Host pathogen interactions in plants. *J. Cell Biology* **78**: 627-643.

Anderson, J.B. (1982), Bifactorial hetereothallism and vegetative diploïdy in *Clytocybe tabescens*. *Mycologia* **74**: 911-916.

Anke, T. (1989), Basidiomycetes: a source for new bioactive secondary metabolites. In: *Bioactive metabolites from microorganisms*. Progress in industrial microbiology - vol.27, ed. M.E. Bushell & U. Gräfe, pp 51-66. Elsevier. London.

Anke, T., Oberwinkler, F., Steglich, W., Schramm, G. (1977), The strobilurins - New antifungal antibiotics from the Basidiomycete Stobilurus tenacellus (Pers. ex Fr.). *J. Antibiot.* **30**: 806-810.

Anke, T., Werle, A., Bross, M., Steglich, W. (1990), Antibiotics from Basidiomycetes XXXIII. Oudemansin X, a new antifungal E-ß-methoxyacrylate from *Oudemansiella radicata* (Relhan Ex Fr.) Sing. *J. Antibiot.* **43**: 1010-1011.

Aoki, M., Tan, M., Fukushima, A., Hieda, T., Kubo, S., Takabayashi, M., Ono, K., Mikami, Y. (1993), Antiviral substances with systemic effects produced by Basidiomycetes such as *Fomes fomentarius*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 278-282.

Archibald, F., Paice, M.G., Jurasek, L. (1990), Decolorization of kraft bleachery effluent chromophores by *Coriolus* (*Trametes*) *versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 846-853.

Backens, S., Steglich, W., Baüerle, J., Anke, T. (1988), Hydroxystrobilurin D, ein antifungishes antibiotikum aus kulturen von *Mycena sanguinolenta* (Agaricales). *Liebigs Ann. Chem.* 405-409.

Barba, J., Yuan, L., Gil, J. (1992) Cell contour extraction on multi-threshold images. *Path. Res. Pract.* **188**: 449-453.

Bartnicki-Garcia, S. (1973), Fundamentals aspects of hyphal morphogenesis. *Symposia of the Society for General Microbiology.* **23**: 245-267.

Belmar-Beiny, M.T., Thomas, C.R. (1991), Morphology and clavulinic acid production of Streptomyces clavuligerus: effect of stirrer speed in batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 456-462.

Beppu, T. (1992), Secondary metabolites as signals for cellular differentiation. *Gene* **115**: 159-165.

Berdy, J. (1989), The discovery of new bioactive microbial metabolites: screening and identification. *in:Bioactive metabolites from microorganisms.* Progress in industrial microbiology - vol.27, ed. M.E. Bushell & U. Gräfe, pp 3-25. Elsevier. London.

Binyami, N. (1976), Fleshy fungi of north and central Israel.II. *Israel J. Botany*, **25**: 62-78.

Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. (1973), New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **54**: 484-489.

Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, Ph., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y., Veau, P. (1990), Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Larpent, J.P. (Ed.), Masson - Paris.

Bradford, M.M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Brauer, H. (1991), Growth of fungi and bacteria in the reciprocating jet bioreactor. *Bioprocess Eng.* **6**: 1-13.

Braun, S., Vecht-Lifschitz, S.E. (1991), Mycelial morphology and metabolite production. *Trends Biotechnol.* **9**: 63-68.

Brobst, K.M. (1972), Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives. *In*: Methods in carbohydrate chemistry. vol.6, pp. 3-8, Whistler R.L., BeMiller, J.N. (Eds.), Academic Press - New York.

Bu'lock, J.D. (1975), Secondary metabolism in Fungi and its relationships to growth and development. *In*: The filamentous fungi. Industrial mycology. vol.1, pp. 33-58. Smith, J.E., Berry, D.R. (Eds.), Edward Arnold (Publishers) Ltd - Londres.

Burnett, J.H. (1979), Aspects of the structure and growth of hyphal walls. *In:* Fungal walls and hyphal growth. (British Mycological Society Symposium Series), pp. 1-25. Burnett, J.H., Trinci, A.P.J. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

Butler, G.M. (1984), Colony ontogeny in basidiomycetes. *In*: The ecology and physiology of the fungal mycelium. (British Mycological Society Symposium Series), pp. 53-71. Jennings, D.H. Rayner, A.D.M. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

Casselton, L.A., Economou, A. (1985), Dikaryon formation. *In*: Developmental biology of higher fungi (British Mycological Society Symposium Series), pp. 213-229. Moore, D., Casselton, L.A., Wood, D.A. et Frankland, J.C. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

Chang, S.T., Miles, P.G. (1991) Recents trends in world production of cultivated edible mushrooms. *Mushroom J.* **503**: 15-18.

Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y., Fukuoka, F. (1970), Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.)Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.* **30**: 2776-2781.

Chiyokichi, I., Ohashi, Y., Suzuki, F. (1991), Anti-virus substances and process for producing the same. Brevet européen. EP 0 464 311 A2.

Clarke, D.S. (1962), Submerged citric acid fermentation of ferrocyanide-treated beet molasses: morphology of pellets of Aspergillus niger. *Can. J. Microbiol.* **8**:133-136

Claydon, N. (1985), Secondary metabolic products of selected agarics. *In*: Developmental biology of higher fungi (British Mycological Society Symposium Series), pp. 561-579. Moore, D., Casselton, L.A., Wood, D.A. et Frankland, J.C. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

Collinge, A.J., Trinci, A.P.J. (1974), Hyphal tips of wild type and spreading colonial mutants of Neurospora crassa. *Arch. Microbiol.* **99**: 353-368.

Collins, P., Appleyard, G.A., Oliver, N.M. (1982), Sensitivity of herpes simplex virus isolates from acyclovir clinical trials. *Am. J. Med.* **73**: 380-382.

Costello, P.J., Monk, P.R. (1985), Image analysis method for the rapid counting of Saccharomyces cerevisiae, *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 863-866, cité par Thomas (1993).

Coster, M., Chermant, J-L. (1985) Précis d'analyse d'images, Ed. CNRS - Paris.

Cox, P.W., Thomas, C.R. (1992), Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 945-952.

Dreyfus, M., Chapelle, I.H. (1994), Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. in *The discovery of Natural products with therapeutic potential.* (Gullo, V.D. ed.), pp. 49-80, Butterworth-Heinemann, Boston.

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.

Durant, G., Crawley, G, Formisyn, P. (1994), A simple staining procedure for the characterisation of Basidiomycetes pellets by image analysis. *Biotechnol. Tech..* **8**: 395-400.

Edelstein, L., Hadar, L., (1983) A model for pellet size distributions in submerged mycelial cultures. *J. Theor. Biol.* **105**: 427-452.

Edwards, R.L, Maitland, D.J., Whalley, A.J.S. (1991), Metabolites of the Higher Fungi; Part 26. Cubensic acid, a novel polysubstituted C_{22} fatty acid from the fungus Xylaria cubensis (Mont. Fr. with substituents and substitution patern similar to the macrolide antibiotics. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**: 1411-1417.

Elliot, T.J. (1985), Developmental genetics - from spore to sporophore. *In*: Developmental biology of higher fungi (British Mycological Society Symposium Series), pp. 451-465. Moore, D., Casselton, L.A., Wood, D.A. et Frankland, J.C. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

Erkel, G., Anke, T., Gimenez, A., Steglich,W. (1992), Antibiotics from Basidiomycetes XLI: Clavicoronic acid, a novel inhibitor of reverse transcriptases from Clavicorona pyxidata (Pers. ex FR.) Doty. *J. Antibiot.* **45**: 29-37.

Erkel, G., Anke, T., Velten, R., Steglich, W. (1991) Podoscyphic acid, a new inhibitor of avian myeloblastosis virus and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase from a *Podoscypha* species. *Z. Naturforsch.* **46c**: 442-450.

Fachet, J., Abel, G., Jusupova, S., Imre, S., Katona, E., Erdei, J., Szöllösi, J., Chihara, G. (1989), Potentiation of non-specific host defence by polysaccharides like lentinan: possible mechanisms. *Int. J. Immunother.* **4**:167-176.

Fermin, C.D., Gerber M.A. Torre-Bueno, J.R. (1992) Colour thresholding and objective quantification in bioimaging. *J. Microsc.* **167**: 85-95.

Flandroy, L. (1993), Savez-vous planter les champignons...à la mode des Chinois? *Biofutur* **121** (mai): 38-43.

Flook, A. (1987) The quantitative measurement of particle shape. *Acta Stereol.* **6**(3): 1009-1021.

Friel, J.J., Prestridge, E.D. (1994) Image processing as a precursor to image analysis *Eur.Microscopy and Analysis* **3**:45.

Fukushima, Y., Okada, K., Kawai, G., Motai, H. (1993), Efficient production of mycelium of Lentinus edodes by a continuous culture and the effect of lignin on growth. *J. Ferment. Bioeng.* **76**: 45-48.

Furue, H. (1987), Biological characteristics and clinical effect of Sizofilan (SPG). *Drugs of today* **23**(6): 335-346

Garcia-Mendoza, C. (1992), Cell wall structure and protoplast reversion in basidiomycetes. World *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**(S1): 36-38.

Gerin, P.A., Dufrene, Y., Bellon-Fontaine, M.N., Asther, M., Rouxhet, P.G. (1993), Surface properties of the conidiospores of *Phanerochaete chrysosporium* and their relevance to pellet formation. *J. Bacteriol.* **175**: 5135-5144.

Gomaa, K., Kraus, J., Franz, G., Röper, H. (1991), Structural investigations of glucans from cultures of *Glomerulla cingulata* Spaulding &von Schrenk. *Carbohydr. Res.* **217**: 153-161.

Gonzalez-Blanco, P.C., larralde-Corona, C.P., Viniegra-Gonzalez, G. (1993), Image processing technique for measuring specific growth rates of *Gibberella fujikuroi. Biotechnol. Techniques* **7**: 57-62.

Grant-Allen, D., Robinson, C.W. (1990), Measurement of rheological properties of filamentous fermentation broths. *Chem. Eng. Sci.* **45**: 37-48.

Gross, B., Asther, M. (1989), Arômes de Basidiomycètes: caractéristiques, analyses et production. *Sci. Aliments* **9**: 427-454.

Haas, A., Matheron, G., Serra, J. (1967) Ann. Mines **12**:767.

Haltrich, D., Preiss, M., Steiner, W. (1993), Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of Schizophyllum commune. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 854-860.

Hara, M., Yoshida, M., Morimoto, M., Nakano, H. (1987), 6-deoxyilludin M, a new antitumor antibiotic: fermentation, isolation and structural identification. *J. Antibiot.* **40**: 1643-1646.

Hassebrauk, K., Niemann, E., Schuhmann, G., Zych, H. (1962), Handbuch der Planzenkrankheiten, Vol.3 "Basidiomycètes", Sorauer, P. (ed.), Paul Parey - Berlin.

Hayes, W.A., Nair, N.G. (1975), The cultivation of *Agaricus bisporus* and other edible mushrooms. *In*: The filamentous fungi. Industrial mycology. vol.1, pp. 212-248. Smith, J.E., Berry, D.R. (Eds.), Edward Arnold (Publishers) Ltd - Londres.

Heim, J., Anke, T., Mocek, U., Steffan, B., Steglich, W. (1988), Antibiotics from Basidiomycetes. XXIX: Pilatin, a new antibiotically active marasme derivative from cultures of *Flagelloscypha pilatii* agerer. *J. Antibiot.* **41**: 1752-1757.

Heim, R. (1980) Basidiomycètes. In: Encyclopaedia Universalis, vol.3, pp.23-29.

Hemmersdorfer, H., Leuchtenberger, A., Wardsack, C., Ruttloff, H., (1987), Influence of culture conditions on mycelial structure and polygalacturonase synthesis of *Aspergillus niger*. *J. Basic Microbiol.* **27**: 309-315.

Hofsten, B.V., Ryden, A. (1975), Submerged cultivation of a thermotolerant Basidiomycete on cereal flours and other substrates. *Biotechnol. Bioeng.* **17**: 1183-1197.

Hotop, S., Möller, J., Niehoff, J., Schügerl, K. (1993), Influence of the preculture conditions on the pellet size distribution of *Penicillium chrysogenum* cultivations. *Proc. Biochem.* **28**: 99-104.

Hotta, H., Hagiwara, K., Tabata,K., Ito, W., Homma, M. (1993), Augmentation of protective immune responses against sendai virus infection by fungal polysaccharide schizophyllan. *Int. J. Immunopharmac.* **15**(1): 55-60

How Tan, Y., Moore, D. (1992), Convenient and efficient methods for *in vitro* cultivation of mycelium and fruiting bodies of *Lentinus edodes*. *Mycol. Res.* **96**: 1077-1084.

Ikekawa, T., Saitoh, H., Feng, W., Zhang, H., Li, L., Matsuzawa, T. (1992), Antitumor activity of *Hypsizigus marmoreus*. I. Antitumor activity of extracts and Polysaccharides. *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 1954-1957.

Jackman, P.J.H., (1989), Image analysis *In*: Computers in Microbiology: a practical approach. Bryant, T.N.et Wimpenny, J.W.T. (eds.), IRL Press, Oxford.

Jennings, D.H. (1984), Water flow throug mycelium. *In*: The ecology and physiology of the fungal mycelium. (British Mycological Society Symposium Series), pp. 143-164. Jennings, D.H. Rayner, A.D.M. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

Jones, C.L., Lonergan, G.T., Mainwaring, D.E. (1993), The use of digital image segmentation to quantify an aminoanthraquinone dye biotransformation by white-rot fungi. *Biotechnol. Techniques* **7**: 645-650.

Jong, S.C., Donovick, R. (1989), Antitumor and antiviral substances from fungi. *Adv. Appl. Microbiol.* **34**: 183-262.

Kaneko, Y., Chihara, G., Taguchi, T. (1989), Activity of Lentinan against cancer and AIDS. *Int. J. Immunotherapy* **4**: 203-213.

Kiho, T., Sakai, M., Ukai, S., Hara, S., Tanaka, Y. (1985), Anti-inflammatory effect of the polysaccharide from the fruit bodies of *Auricularia* species. *Chem. Pharm. Bull.* **39**: 798-800.

Kiho, T., Sakushima, M., Wang, S., Nagai, K., Ukai, S. (1991), Polysaccharides in fungi. XXVI. Two branched (1->3)-ß-D-glucans from hot water extract of *Yu er*. *Chem. Pharm. Bull.* **39**: 798-800.

Kiho, T., Shiose, Y., Nagai, K., Ukai, S. (1992a), Polysaccharides in Fungi. XXIX. Structural features of two antitumor polysaccharides from fruiting bodies of *Armillaria tabescens*. *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 2212-2214.

Kiho, T., Shiose, Y., Nagai, K., Ukai, S. (1992b), Polysaccharides in Fungi. XXX. Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from fruiting bodies of *Armillaria tabescens*. *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 2110-2114.

Kiho, T., Yoshida, I., Nagai, K., Ukai, K. (1989), (1->3)-α-D-glucan from an alkaline extract of *Agrocybe cylindracea,* and antitumor activity of itd O-(carboxy-methyl)ated derivatives. *Carbohydr. Res.* **189**: 273-279.

Kiho,T., Katsuragawa, M., Nagai, K., Ukai, S. (1992c), Structure and antitumor activity of a branched (1->3)-ß-D-glucan from the alkaline extract of *Amanita muscaria*. *Carbohydr. Res.* **224**: 237-243.

Kirk, T.K., Farrell, R.L. (1987), Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 465-505.

Kobayashi, H., Suzuki, H. (1976), Kinetics studies of α-galactosidase containing mold pellets on PNPG hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* **18**:37-51.

Kobayashi, T., Van Dedem, G., Moo-Young, M. (1973), Oxygen transfer into mycelial pellets. *Biotechnol. Bioeng.* **15**:27-45.

Koga, J., Ohashi, Y., Hiratani, H. (1990), Prevention and treatment of herpes virus infections. Brevet européen. EP 0 382 551 A2.

Koga, J., Ohashi, Y., Hiratani, H. (1991), Anti-viral fraction of aqueous *Lentinus edodes* extract. EP 0 437 346 A1.

Kopp, M., Rouster, J., Fritig, B., Darvill, A., Albersheim, P. (1989), Host-pathogen interactions. XXXII. A fungal glucan preparation protects Nicotianeae against infection by viruses. *Plant Physiol.* **90**: 208-216.

Korn, A. (1993), Verfahrenstchnische untersuchung der produktion von werstoffen mit pilzen im Hubstrahl-bioreaktor. Thèse, Technische Universität Berlin.

Kubo, I., Kim, M., Wood, W.F., Naoki, H. (1986), Clitocine, a new insecticidal nucleoside from the mushroom *Clitocybe inversa*. *Tetrahedron Let.* **27**: 4277-4280.

Kühner, R., Romagnesi, H. (1984), Flore analytique des champignons supérieurs. (Agarics, Bolets, Chanterelles), Masson - Paris.

Kuhnt, D., Anke, T., Besl, H., Bross, M., Heermann, R., Mocek, U., Steffan, B., Steglich, W. (1990), Antibiotics from Basidiomycetes. XXXVII. New inhibitors of Cholesterol biosynthesis from cultures of *Xerula menalotricha* Dörfelt. *J. Antibiot.* **43**: 1413-1420.

Langlois, M., Allard, J.P., Nugier, F., Aymard, M. (1986) A rapid and automated colorimetric assay for evaluating the sensitivity of herpes simplex strains to antiviral drugs. *J. Biol. Standardization* **14**: 201-211.

Lauer, U., Anke, T., Hansske, F. (1991), Antibiotics from basidiomycetes. XXXVIII. 2-Methoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone, a thromboxane A_2 receptor antagonist from *Lentinus adhearens*. *J. Antibiot.* **44**: 59-65.

Leatham, G.F. (1985), Growth and development of *Lentinus edodes* on a chemically defined medium. *In*: Developmental biology of higher fungi. (British Mycological Society Symposium Series), pp. 403-427. Moore, D., Casselton, L.A., Wood, D.A. et Frankland, J.C. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

Lemiere, J.P., Molin, P., Gervais, P. (1991), L'analyse d'images, une technique pour l'étude et le suivi in situ de fermentations sur milieu solide. in *Recueil des communications courtes* - 3ème Congrès Français de Génie des Procédés (ed. GFGP), pp.7-8.

Leonhard, K., Anke, T, Hillen-Maske, E., Steglich, W. (1987), 6-méthylpurine, 6-Methyl-9-ß-D-ribofuranosylpurine and 6-hydroxyméthyl-9-ß-D-ribofuranosylpurine as antiviral metabolites of Collybia maculata (Basidiomycetes). *Z. Naturforsch.* **42c**: 420-424.

Liu, T., Yu, D., (1993), Morphological measurements on Penicillium chrysogenum broths by rheology and filtration methods. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 777-784.

Lysek, G. (1984), Physiology and ecology of rythmic growth and sporulation in fungi. *In*: The ecology and physiology of the fungal mycelium. (British Mycological Society Symposium Series), pp. 323-342. Jennings, D.H., Rayner, A.D.M. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

MacNeil, B., Kristiansen, B., Seviour, R.J. (1989), Polysaccharide production and morphology of *Aurebasidium pullulans* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 1210-1212.

Makagiansar, H.Y., Ayazi Shamlou, P., Thomas, C.R., Lilly, M.D. (1993), The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum. Bioproc. Eng.* **9**: 83-90

Mantripragada, S.S., Hyunh, V.M., Fackrell H.B. (1990), Image analysis of biological systems with microcomputers. *Int. J. Biomed. Comput.* **26**: 271-281.

Märkl, H., Bronnenmeier, R., (1985), Mechanical stress and microbial production. *In*: Fundamentals of Biochemical Engineering, vol.2, pp. 370-392. Brauer, H. (ed.), VCH Verlagsgesellshaft, Allemagne.

Martin, A., (1983), Submerged production of Agaricus campestris mycelium in peat extracts. *J. Food. Sci.* **48**: 206-207.

Meier, H. (1965), Fractionation by precipitation with bryum hydroxyde. *In*: Methods in carbohydrate chemistry. vol. V, pp. 45-46. Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Wolfrom, M.L. (eds), Academic Press, New York.

Metz, B. (1976), From pupl to pellet: an engineering study of the morphology of moulds. Thèse, Université Technologique de Delft - Hollande, cité par Tucker (1994).

Metz, B., De Bruijn, E.W., Van Suijdam, J.C. (1981), Method for quantitative representation of the morphology of molds.*Biotechnol. Bioeng.* **23**: 149-162.

Metz, B., Kossen, N.W.F. (1977), The growth of molds in the form of pellets. A litterature review. *Biotechnol. Bioeng.* **19**: 781-799.

Metz, B., Kossen, N.W.F., Van Suijdam, J.C. (1979), The rheology of molds suspensions. *Advances in Biochemical Engineering* **11**: 103-156.

Michel, F.C., Grulke, E.A., Reddy, C.A. (1992), Determination of the respiration kinetics for mycelial pellets of Phanerochaete chrysosporium. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1740-1745.

Mitard, A., Riba, J.P. (1988), Morphology and growth of *Aspergillus Niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 835-840.

Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., Asakura, A. (1990), Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsusake", the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2889-2896.

Moss, M.O. (1984) The mycelial habit and secondary metabolite production. *In*: The ecology and physiology of the fungal mycelium. (British Mycological Society Symposium Series), pp. 127-142. Jennings, D.H. Rayner, A.D.M. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

Münzer, S. (1989), Produktion und charakterisierung eines von Schizophyllum commune ATCC 38548 gebildeten extrazellulären β-1,3-glucans. Thèse, Technische Universität Braunschweig.

Nestaas, E., Wang, D.I.C., (1981a), A new sensor, the "filtration probe", for the quantitative characterization of the penicillin fermentation. I. Mycelial morphology and culture activity. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 2803-2813.

Nestaas, E., Wang, D.I.C., (1981b), A new sensor, the "filtration probe", for the quantitative characterization of the penicillin fermentation. II. The monitor of mycelial growth. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 2815-2824.

Nestaas, E., Wang, D.I.C., (1983), Computer control of the penicillin fermentation using the filtration probe in conjonction with a structured process model. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 781-796.

Nielsen, J., (1993), A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 715-727.

Nigam, P., Prabhu, K.A. (1991a), Influence of sugars ont the activity of cellulase system from two Basidiomycétes cultures. *J. Basic Microbiol.* **31**: 279-283.

Nigam, P., Prabhu, K.A. (1991b), Effect of cultural factors on the cellulase biosynthesis in submerged bagasse fermentation by Basidiomycetes cultures. *J. Basic Microbiol.* **31**: 285-292.

Nugier, F. (1992), Etude de la résistance des virus herpès simplex à l'acyclovir: Epidémiologie, caractérisation phénotypique et génotypique des mutants. Thèse, Université C. Bernard - Lyon I, France.

Nugier, F., Colin, J.N., Aymard, M., Langlois, M. (1992), Occurence and characterisation of acyclovir-resistant Herpes Simplex Virus isolates: report on a two-year sensitivity sreening survey. *J. Med. Virol.* **36**: 1-12.

Nugier, F., Collins, P., Larder, B.A., Langlois, M., Aymard, M., Darby, G. (1991), Herpes Simplex virus isolates from an immunocompromised patient who failed to respond to acyclovir treatment express thymidine kinase with altereted substrate specificity. *Antiviral Chem. Chemother.* **2**: 295-302.

Ohno, N., Adachi, Y., Suzuki, I., Sato, K., Nishijima, Oikawa, S., Yadomae, T. (1986), Characterisation of the antitumor glucan obtained from liquid cultured *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 1709-1715.

Ohno, N., Miura, T., Saito, K., Nishijima, M., Miyazaki, T., Yadomae, T. (1992), Physicochemical characteristics and antitumor activities of a highly branched fungal (1->3)-ß-D-glucan, OL-2, isolated from *Omphalia lapidescens*. *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 2215-2218.

Ohno, N., Saito, K., Nemoto, J., Kaneko, S., Adachi, Y, Nishijima, N., Miyazaki, T., Yodomae, T. (1993), Immunopharmacological characterization of a highly branched fungal (1->3)-ß-D-glucan, OL-2, isolated from *Omphalia lapidescens*. *Biol. Pharm. Bull.* **16**: 414-419.

Olsvik, E.S., Kristiansen, B. (1992a), On-line rheological measurements and control in fungal fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 375-387.

Olsvik, E.S., Kristiansen, B. (1992b), Influence of oxygen tension, biomass concentration and specific growth rate on the morphological properties of a filamentous fermentation broth. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 1293-1299.

Olsvik, E.S., Tucker, K.G., Thomas C.R., Kristiansen, B. (1993), Correlation of Aspergillus niger broth rheological properties with biomass concentration and and the shape of mycelial aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 1046-1052.

Packer, H.L., Kesharvaz-Moore, E., Lilly, M.D., Thomas, C.R. (1992), Estimation of cell volume and biomass of *Penicillium chrysogenum* using image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 384-391.

Packer, H.L., Thomas, C.R. (1990), Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 870-881.

Patanckar, D., Liu, T., Oolman, T., (1993), A fractal model for the characterisation of mycelial morphology. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 571-578.

Patanckar, D., Oolman, T., Johnson, S, Berggren, M. (1992), Ultrasonic characterisation of mycelial morphology as a fractal structure. *Ultrasonic Imaging* **14**: 86-95.

Paul, G.C., Kent, C.A., Thomas, C.R. (1992), Quantitative characterization of vacuolization in *Penicillium chrysogenum* using image analysis. *Trans IChemE.* **70**(C): 13-20.

Paul, G.C., Kent, C.A., Thomas, C.R. (1993), Viability testing and characterisation of germination of fungal spores by automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 11-23.

Paul, G.C., Kent, C.A., Thomas, C.R. (1994) Image analysis for characterizing differentiation of *Penicillium chrysogenum. Trans IChemE.* **72**(C): 95-105.

Peberdy, J.F. (1994), Protein secretion in filamentous fungi — Trying to understand a highly productive black box. *Tibtech.* **12**: 50-57.

Péguet-Navarro, J., Mouton, C, Caux, C., Dalbiez-Gauthier, C., Banchereau, J., Schmitt, D. (1994), Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. *Eur. J. Immunol.* **24**: 884-891.

Pèrez Losantos, A., Bascones Carretero, J.C. (1981), Notas micologicas navarras. I. Novedades provinciales y de la España peninsular. *Anales Jard. Bot. de Madrid*, **38**: 19-23.

Pichon, D., Vivier, H., Pons, M.-N. (1993)., Growth monitoring of filamentous microorganisms by image analysis. In: Proceedings of the 5th international Conference on Computer Applications in Fermentation Technology. Keystone, Colorado, USA, 29 march - 2 april 1992.

Pichon, D., Vivier, H., Pons, M.N.(1991), Suivi de la croissance de cellules animales sur microporteur par analyse quantitative d'images. 3ème Congrès Français de Génie des Procédés - 9/91- *in*: Récents Progrès en Génie des Procédés. **5**(13): 7-12.

Pons, M.N., Vivier, H., Rémy, J.F., Dodds, J.A. (1993), Morphological characterisation of yeast by image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 1352-1359.

Pons, M.N., Wagner, A., Vivier, H., Marc, A. (1992), Application of quantitative image analysis to a mammalian cell line grown on microcarriers.*Biotechnol. Bioeng.* **40**: 187-193.

Pover, P.S. (1990a), Colony counting and other petri-dish applications of image analysis, *Binary* **2**: 77-79, cité par Thomas (1993).

Pover, P.S. (1990b), Images of microbiology, Laboratory Equipment Digest, September 1990, 59 et 63, cité par Thomas (1993).

Prosser, J.I., Trinci, A.P.J. (1979), A model for hyphal growth and branching. *J. Gen. Microbiol.* **111**: 153-164.

Ramkrishna, D. (1979), Statistical models of cell population. *Adv. Biochem. Eng.* **11**: 1-47.

Ramkrishna, D., (1985), The status of population balances. *Rev. Chem. Eng.* **3**: 49-95.

Rau, U., Gura, E., Olszewski, E., Wagner,F. (1992), Enhanced glucan formation by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. *J. Ind. Microbiol.* **9**:19-26.

Rau, U., Müller, R.-J., Cordes, K., Klein, J. (1990), Process and molecular data of branched β-1,3-D-glucans in comparison with xanthan. *Bioprocess Eng.* **5**: 89-93.

Raudaskoski, M., Salonen, M. (1984), Interrelationships between vegetative development and basidiocarp initiation. *In*: The ecology and physiology of the fungal mycelium. (British Mycological Society Symposium Series), pp. 291-322. Jennings, D.H., Rayner, A.D.M. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

Reichl, U., Buschulte, T.K., Gilles, E.D. (1990a), Study of the early growth and branching of *Streptomyces tendae* by means of image processing system. *J. Microscopy* **158**: 55-62.

Reichl, U., Yang, H., Gilles, E.D. (1990b), An improved method for measuring the interseptal spacing in hyphae of *Streptomyces tendae* by fluorescenec microscopy coupled with image processing. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 207-210.

Reichl, U., King, R., Gilles E.D. (1992),.Characterization of pellets morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 164-170.

Robert, J.C., Durand, R. (1979), Light and temperature requirement during fruit-body development of a Basidiomycete mushroom, Coprinus congregatus. *Physiol. Plant.* **46**: 174-178.

Roels, J.A., Van den Berg, J., Voncken, R.M., (1974), The rheology of mycelial broths. *Biotechnol. Bioeng.* **16**: 181-208.

Roizman, B. (1991), Classification and nomenclature of viruses. *Arch. Virol.* **suppl.2**: 103-110.

Saito, K., Nishijima, M., Miyazaki, T. (1990), Further examination on the structure of an alkali-soluble glucan isolated from *Omphalia lapidescens* (Studies on fungal polysaccharides. XXXVI). *Chem. Pharm. Bull.* **38**: 1745-1747.

Sanglier, J-J. (1993), Immunosuppresseurs d'origine microbiologique. *L'information du biotechnicien* **1**(2): 81-87.

Sanglier, J-J, Haag, H., Hock, T., Fehr, T. (1993), Novel biactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.* **144**: 633-642.

Sarkar, S., Soga, J., Whitley, R.J., Chatterjee, S. (1993), Antiviral effect of the extract of culture mediumof *Lentinus edodes* mycelia on the replication of herpes simplex virus type 1. *Antivir. Res.* **20**: 293-303.

Schlegel, H.G.(1976), Allgemeine Microbiologie. Thieme, G. (Ed.), Sttutgart.

Schröder, D., Krambeck, C., Krambeck, H.J. (1991), How to count and size fluorescent microbial plankton with digital image filtering and segmentation. *Acta stereol* **10**: 123-129.

Scott, J.E. (1965), Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. *In*: Methods in carbohydrate chemistry. vol. V, pp. 38-44. Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Wolfrom, M.L. (eds), Academic Press, New York.

Serra, J. (1982), Image analysis and mathematical morphology. Academic Press.

Sevag, M. G. (1934), *Biochem. Z.* **273**: 419, cité par Staub, A.M. (1965), Removal of proteins. *In*: Methods in carbohydrate chemistry. vol. V, pp. 5-6. Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Wolfrom, M.L. (eds), Academic Press, New York.

Sherwood, T.K., Pigford, R.L. (1952), Theory of unsteady-state absorption in the stagnant liquid. Rapid, second order, irreversible reaction *in*: Absorption and extraction. pp. 333-337, McGraw-Hill, New York.

Shinmio, A, Davis, J;, Nomoto, F., Tahara,T., Enatsu, T., (1978), Catabolite repression of hydrolases in *Aspergillus niger*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 59-68.

Shügerl, K., Bayer, T., Niehoff, J., Möller, J., Zhou, W., (1988), Influence of cell environment on the morphology of molds and the biosynthesis of antibiotics in bioreactors. *in Proceedings of the 2nd International Conference on Bioreactor Fluid Dynamics* (Cambridge), R. King (ed.), Elsevier.

Sieracki, M.E., Viles, C.L., Webb, K.L. (1989), Algorithm to estimate cell biovolume using image analysed microscopy. *Cytometry* **10**: 551-557.

Smith, J.E., Berry, D.R. (1974a), Sexual reproduction. *In:* An introduction to fungal development, pp. 211-281. Academic Press, London.

Smith, J.E., Berry, D.R. (1974b), The vegetative state. *In:* An introduction to fungal development, pp. 106-155. Academic Press, London.

Smith, J.E., Berry, D.R. (1974c), Differentiation, secondary metabolism and industrial mycology. *In:* An introduction to fungal development, pp. 282-308. Academic Press, London.

Smith, J.J., Lilly, M.D., Fox, R.I., (1990), The effect of agitation on the morphology and penicillin production of Penicillium chrysogenum. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 1011-1023.

Smith, M.G., Calam, C.T., (1980), Variations in inocula and their influence on the productivity of antobiotics fermentations. *Biotechnol. Lett.* 2:261-266.

Solomons, G.L. (1975), Submerged culture production of mycelial biomass. *In*: The filamentous fungi. Industrial mycology. vol.1, pp. 249-264. Smith, J.E., Berry, D.R. (Eds.), Edward Arnold (Publishers) Ltd - Londres.

Song, C.H., Cho, K.Y., Nair, N.G. (1987), A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. *Mycologia* **79**(6): 866-876.

Sorimachi, K., Niwa, A., Yamazaki, S., Toda, S., Yasumara, Y. (1990), Anti-viral activity of water-solubilized lignin derivatives in vitro. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 1337-1339.

Stadler, M., Anke, T., Dasenbrock, J., Steglich, W. (1993), Phellodonic acid, a new biologically active hirsutane derivative from Phellodon melaleucus (Thelephoraceae, Basidiomycetes). *Z. Naturforsch.* **48c**: 545-549.

Stärk, A., Anke, T., Mocek, U., Steglich, W. (1991), Omphalone, an antibiotically active benzoquinone derivative from fermentations of *Lentinellus omphlodes*. *Z. Naturforsch.* **46c**: 989-992.

Sugano, N., Choji, Y., Hibino, Y., Yasumura, S., Maeda, H. (1985), Anticarcinogenic action of an alcool-insoluble fraction (LAP1) from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Cancer Lett.* **27**: 1-6.

Sugano, N., Hibino, Y., Choji, Y., Maeda, H. (1982), Anticarcinogenic action of water-soluble and alcool-insoluble fraction from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Cancer Lett.* **17**: 109-114.

Suzuki, H., Iiyama, K, Yoshida, O., Yamazaki, S., Yamamoto, N., Toda, S. (1990), Structural characterization of the immunoactive and antiviral water-solubilized lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Agric. Biol. Chem.* **54**: 479-487.

Suzuki, H., Okubo, A., Yamazaki, S., Suzuki, K., Mitsuya, H., Toda, S. (1989), Inhibition of the infectivity and the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **160**: 367-373.

Suzuki, I., Itani, T., Ohno, N., Oikawa, S, Sato, K., Miyazaki, T., Yadomae, T. (1985), Effect of a polysaccharide fraction from *Grifola frondosa* on immune response in mice. *J. Pharm. Dyn.* **8**: 217-226.

Taguchi, H., Yoshida, T., Tomita, Y., Teramoto, S. (1968), The effects of agitation on disruption othe mycelial pellets in stirred fermentors. *J. Ferment. Technol.* 46: 814-822.

Takasawa, H., Kashino, S. (1991), Incarnal. A new antibacterial sesquiterpene from Basidiomycetes. *Chem. Pharm. Bull.* **39**: 555-557.

Thomas, C.R. (1992), Image analysis: Putting filamentous microorganisms in picture. *Trends Biotechnol.*, **10**: 343-348.

Thomas, C.R. (1993), Application of image analysis in Biotechnology. (XVI Conférence Internationale des Industries Chimique). *Récents Progrès en Génie des Procédés*, **24**: 17-29.

Tochikura, T.S., Nakashima, H., Ohashi, Y., Yamamoto, N. (1988), Inhibition (in vitro) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of Lentinus edodes mycelia. *Med. Mocrobiol. Immunol.* **177**: 235-244.

Trinci, A.P.J. (1974),. A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *J. Gen. Microbiol.* **81**: 225-236

Trnovec, T., Hrmova, M. (1993), Immunomodulators polysaccharides: chemistry, disposition and metabolism. *Biopharmaceutics and Drug disposition.* **14**: 187-198.

Tucker, K.G., Chalder, S., Al-Rubeai, M., Thomas, C.R. (1994), Measurement of hybridoma cell number, viability and morphology using fully automated image analysis. *Enz. Microb. Technol.* **16**: 29-35.

Tucker, K.G., Kelly, T., Delgrazia, P., Thomas, C.R. (1992), Fully automatic measurement of mycelial morphology by image analysis. *Biotechnol. Prog.* **8**: 353-359.

Tucker, K.G., Thomas, C.R. (1992), Mycelial morphology: the effect of spore inoculum level. *Biotechnol. Lett.* **14**: 1071-1074.

Tucker, K.G., Thomas, C.R. (1993), Effect of biomass concentration and morphology on the rheological parameters of *Penicillium chrysogenum* fermentations broths. *Trans IChemE* **71**(C): 111-117.

Tucker, K.G. (1994), Relationship between mycelial morphology, biomasss concentration and broth rheology in submerged fermentations. Thèse, Dept. Chemical Engineering - Université de Birmingham, Angleterre.

Tucker, K.G., Thomas, C.R. (1994), Inoculum effects on fungal morphology: shake flasks versus agitated bioreactors. *Biotechnol. Tech.* **8**: 153-156.

van Suijdam, J.C., Hols, H., Kossen, N.W.F. (1982), Unstructured model for the growth of mycelial pellets in submerged cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 177-191.

van Suijdam, J.C., Metz, B. (1981), Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 111-148.

Vecht-Lifshitz, S.E., Ison, A.P. (1992), Biotechnological applications of Image analysis: present and future prospects. *J. Biotechnol.* **23**: 1-18.

Vecht-Lifshitz, S.E., Magdassi, S., Braun, S. (1990), Pellet formation and cellular aggregation in Streptomyces tendae. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 890-896.

Wecker, A., Onken, U. (1991), Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol. lett.* **13**: 155-160.

Wessels, J.G.H. (1993), Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytol.* **123**: 397-413.

Wessels, J.G.H., Sietsma, J.H. (1979), Wall structure and growth in *Schizophyllum commune*. *In:* Fungal walls and hyphal growth. (British Mycological Society Symposium Series), pp. 27-48. Burnett, J.H., Trinci, A.P.J. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

Wiebe, M.G., Trinci A.P.J. (1991), Dilution rate as a determinant of mycelial morphology in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 75-81.

Wood, D.A. (1985), Production and role of extracellular enzymes during morphogenesis of basidiomycete fungi. *In*: Developmental biology of higher fungi (British Mycological Society Symposium Series), pp. 375-387. Moore, D., Casselton, L.A., Wood, D.A. et Frankland, J.C. (eds.), Cambridge University Press, Cambridge.

Worgan, J.T. (1968), Culture of the Higher Fungi. *Progr. Ind. Microbiol.* **8**: 73-139.

Yamanaka, T., Sagara, N. (1990), Development of basidia and basidiospores from slide-cultured mycelia in *Lyophyllum tylicolor* (Agaricales). *Mycol. Res.* **94**: 847-850.

Yanaki, T., Ito, W., Tabata, K., Kojima, T., Norisuye, T., Takano, N., Fujita, H. (1983a), Correlation between the antitumor activity of a polysaccharride schizophyllzn and itds triple-helical conformation in dilute aqueous solution. *Biophys. Chem.* **17**: 337-342.

Yanaki, T., Nishii, K., Tabata, K., Kojima, T. (1983b), Ultrasonic degradation of *Schizophyllum commune* polysaccharide in dilute aqueous solution.*J. Appl. Polym. Sci.* **28**: 873-878.

Yang, H., Reichl, U., King, R., Gilles, E.D. (1992), Measurement and simulation of the morphological development of filamentous microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 44-48.

Yang, H., King, R., Reichl, U., Gilles, E.D. (1992), Mathematical model for apical growth, septation and branching of mycelial microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 49-58.

Zadrazil, F., Grabbe, K. (1983), Edible mushrooms. *In:* Biotechnology: a comprehensive in 8 vol., vol.3, pp.145-187. Rehm, H.J., Reed, G. (Eds). Verlag Chemie, Weinheim.

Zhou, W., Holzhauer-Rieger, K., Dors, M., Schügerl, K., (1992) *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 848-854.

Publications

Publications associées à cette étude

Articles :

- Durant, G., Crawley, G., Formisyn, P. (1994) A simple staining procedure for the characterisation of Basidiomycetes pellets by image analysis, *Biotechnol. techniques*, **8**(6): 395-400.
- Durant, G., Cox, P.W., Formisyn, P., Thomas, C.R. (1994) Improved image analysis algorithm for the characterisation of mycelial aggregates after staining, *Biotechnol. techniques,* **8**(11): 759-764.

Posters :

- Durant, G., Crawley, G., Formisyn, P. (1992) Application de l'analyse d'images à l'étude de la morphologie de la biomasse lors de fermentations fongiques, Poster à la journée d'étude du Groupe Français de Génie des Procédés: "Analyse d'images dans les procédés biotechnologiques et agro-alimentaires", Massy, Déc. 1992. (Poster également présenté aux Carrefours de la Fondation Rhones-Alpes Futur - Nov. 1992)
- Durant, G., Crawley, G., Formisyn, P. (1993) Etude par analyse d'images de l'influence des conditions d'agitation lors de fermentations fongiques, Poster au 4ème Congrès Français de Génie des Procédés, Grenoble, Sep. 1993.
- Durant, G., Cox, P.W., Crawley, G., Formisyn, P., Thomas, C.R. (1995) Investigation into and modeling of the diffusion of ions H^+ into fungal pellets. 7th European Congress on Biotechnology, Nice, Fév. 1995, accepté pour présentation

BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES
Volume 8 No.6 (June 1994) pp.395-400
Received 13th April

A SIMPLE STAINING PROCEDURE FOR THE CHARACTERISATION OF *BASIDIOMYCETES* PELLETS BY IMAGE ANALYSIS

G. Durant*(1), G. Crawley(2), P. Formisyn(1)

(1)Bioprocédés, (2) Chimie Physique des Processus Industriels

Ecole des Mines de St Etienne, 158 cours Fauriel, 42023 St Etienne cedex 2, FRANCE

SUMMARY

A simple staining procedure, associated with image analysis, was used to discriminate two zones (the filamentous zones and the compacted cores) in aggregates of fungal biomass according to their accessibility for an agent of the medium. The application of the method to batch fermentations of *Schizophyllum commune* showed a higher proportion of loosely entangled particles (clumps) and thinner filamentous outer zones obtained at a high agitation speed (500 rpm) compared to low agitation speeds (120-200 rpm).

INTRODUCTION

Fermentation of fungal species such as *Penicillium* and *Aspergillus* (from the *Deuteromycetes* class) are commonly used in industrial processes. *Basidiomycetes* represent another class of fungi (higher fungi) whose secondary metabolic potential is vast but still scarcely exploited. Anke and his coworkers have highlighted the interest in this class of fungi by isolating many new bioactive compounds. Most of these new antibacterial, antifungal, antiviral, cytotoxic and phytotoxic metabolites have been reviewed by Anke (1989). Among the various chemical structures described, polysaccharides seem to be a very promising group of compounds (Kiho *et al.*, 1992 a-b; Hotta *et al.*, 1993). Two polysaccharides, lentinan and schizophyllan, respectively isolated from *Lentinus edodes* and *Schizophyllum commune*, are in clinical use in Japan due to their antitumoral properties (Fachet *et al.*, 1989; Furue, 1987).

In submerged culture, *Basidiomycetes* usually grow in agregated to pelleted form (Song *et al.*, 1987). For *Deuteromycetes*, and by extension for *Basidiomycetes*, pellet morphology is usually classified into three groups (Clarke, 1962): fluffy pellets (a compact central core surrounded by a looser outer zone); smooth pellets (a compact core with limited lateral growth); and pellets with hollow cores. However, the definition of a pellet and specifically the distinction between pellets and clumps (loosely entangled aggregates) remains vague (and somewhat subjective) since it concerns the classification of continuous types of hyphal networks according to the density of the entanglement.

In the last several years, the morphological characterisation of filamentous microorganisms grown in submerged culture has seen significant progress due to the developement of image analysis technology (Thomas, 1992). Several image analysis methods have been published to charaterise aggregated forms of the mycelium and

to attempt to carry out a classification of these aggregates in a reproducible way. Reichl *et al.* (1992) determined the mean grey value of the biomass particles examined with a bright field illumination. The distinction between pellets and filamentous mycelium was then based on an interactively pre-established limit. This criterion implies the manipulation of numerical images which is time-consuming for most image analysers. Cox and Thomas (1992) developed a morphological criterion to define a pellet as a particle whose 2D projected representation contains a solid zone reducible to a unique central point after an "ultimate skeletonisation". The central zone is detected after successive "opening" operations which remove undetected areas within the annular zone of the particle. This analysis, carried out on binary images, is much faster than the former one but the identification and removal of annular undetected areas may well be magnification dependent. Pichon *et al.* (1993) used a fuzzy logic algorithm to classify particles as pellets or clumps according to their morphological characteristics *i.e.* the numbers of holes in the outer zone.

We propose here a method for classification and characterisation of fungal particles using a diffusional criterion *i.e.* a criterion more closely related to the physiological behaviour of the biomass. The method is based on a simple stain which can be quickly rinsed in loosely entangled zones of biomass (clumps or filamentous outer zones) whereas more compacted zones (pellet cores) remain coloured. The enhanced contrast which results from this colouration/decolouration shortens the identification step of the different particle types and therefore simplifies the image analysis algorithm. Moreover this method is specifically adapted to cultures where large particles are predominant and where their 2D-representation causes an overestimation of their density due to the overlapping of the different filamentous layers.

MATERIAL AND METHODS

Strains and culture conditions

Schizophyllum commune, strain 283, used in this study, was isolated from tissue plugs of fruiting bodies and is deposited in the Mycothèque of the Faculté de Pharmacie, University Claude Bernard Lyon I (France). For the maintenance and fermentation of *S.commune*, a medium containing glucose 30 g/l, yeast extract 3 g/l, KH_2PO_4 1 g/l, $MgSO_4$ 0.5 g/l (pH 5.3) was used. Inoculum cultures were grown in 500 ml-Erlenmeyer flasks, containing 150 ml of medium . They were inoculated with 5 plugs (diameter 1cm) obtained from 7 day-old colonies on petri dishes, and then homogenised with a impeller blender and incubated for 3 days on a rotary shaker (120 rpm, 24°C). After homogenisation, the inoculum was transferred to a 7l stirred-tank reactor containing 4.85 l of the medium. The reactor was unbaffled and equipped with two vortex/antivortex impellers, pH and O_2 electrodes and temperature regulation (24°C). The agitation speed was kept constant for the duration of each fermentation. Between fermentations, however, it was varied from 120 to 500 rpm. The aeration rate was held at 0.2 vvm for all fermentations.

Staining procedure

Samples taken from the fermentation were first diluted as required (2 to 10 fold) to achieve a final number of pellets per ml between 10 and 50. To 20ml of a diluted sample, 0.4 ml of a 2%-*cristal violet* commercial solution was added (Color Gram 1 - Biomerieux - France). After 5 min, the excess of staining solution was removed using a stainless steel sieve (100 µm mesh) and the biomass was resuspended in 20 ml of a fixative solution (1/50 diluted commercial *lugol* solution - Color Gram 2 - Biomerieux - France) for 1 min. The fixative solution was removed by filtration and after a water rinse, the biomass was resuspended in water. Two volumes of ethanol were then poured over it and ensured an immediate solubilisation of the *lugol-cristal violet* complex in the zones through which the ethanol could quickly flush. After 45s, the ethanol was removed by filtration and a final rinse with water stopped the decolouration process. The biomass was then resuspended in a defined volume of water.

Image analysis

The coloured diluted sample was spread over a glass box so that the biomass suspension layer was about 2 mm thick and the probability of particles overlapping was low. The sample was illuminated from underneath with a light box. The image acquisition was carried out using a tube type monochromatic video camera (Hammamatsu C2400-1, tube Chalnicon). It was equipped with a zoom lens giving 10 to 26x final magnification on the monitor. The image analyser was a Morphopericolor (Matra MS2i) connected to a Kennitec 486-33 PC. The programs for data acquisition and analysis were written in Borland Pascal (version 7.0).

In order to obtain a representative number of particles (150 to 400), the analysis of a sample required the capture of a series of images (between 20 to 30). The image resolution was 512 x 512 rectangular pixels (40x31 µm/pixel for a 10-fold magnification) with 64 grey levels. Gain and offset of the camera were pre-calibrated in order to set the level of the image background at the white level (63) and to obtain the largest range of grey levels within the sample. These set-up conditions were kept constant for all the samples. The first step of the image processing consisted of an interactive thresholding (gray intensity slice) to select the filamentous decoloured zone. The compact zones, which remained coloured, were then retrieved by an automatic dropping of the low threshold to the zero grey level. This step was carried out on the first image and the threshold values thus defined were kept for the whole series of images. In this way, two series of coupled binary images were obtained: one composed only of the filamentous zones (peripheral annular zones of pellets and clumps); the other of the whole objects (peripheral annular zones and cores together). Clumps are thus defined as particles whose detected areas are identical in both series of images whereas pellets contain a zone which is only present in the second series. The images were then cleaned up in two steps. Particles clipped by the edges of the image were first eliminated and small debris from solid particles of the medium or from isolated mycelia were removed by an erosion operation followed by a rebuilding of the remaining particles. A single erosion step (of one pixel) was usually sufficient. Characterisation of each particle was obtained from the following measurements:

- the projected areas of the filamentous zone and the compact zone respectively, from which the equivalent circular diameters of the core and the whole pellet can be calculated;
- the filamentous fraction, *i.e.* the ratio of the filamentous area to the total particle area;
- the mean equivalent thickness of the annular zone, *i.e.* the half-difference between the total equivalent diameter and the core equivalent diameter;
- two shape factors: the circularity ($(4\pi.\text{Area})/(\text{Perimeter}^2)$) and the mean relative area loss after four openings of increasing step (Reichl *et al.*, 1992), which quantify irregularities in the particle contours.

RESULTS

Repeatability

Five samples taken from a *S. commune* shake flask culture were independantly coloured and analysed. The distributions of the mean equivalent thickness of the filamentous outer zone obtained for each sample did not present any significant difference (Kolmogorov-Smirnov test - $c<1.36$). Several pellets have been analysed at magnifications of between 5 and 25x. In each case, the variation in detected core areas was less than 5% of the mean.

Coloration time influence

Although the first step of the image processing is interactive, it has only a small effect on the reproducibility of the method. Under the preset conditions of the contrast calibration, the particles from a sample, which did not undergo the final decolouration step of the staining procedure, could be almost entirely selected using the lowest grey level (black level). Only the thin outer zone, made brighter by the transmitted light halo, could not be selected by this level (figure 1a-c, 1a'-c'). The enhanced contrast thus caused by the colouration is strong enough to be detected by the very first gray levels and the influence of the thresholding choice by the operator is limited to a small range and mainly concerns the external limits of the objects.

Figure 1

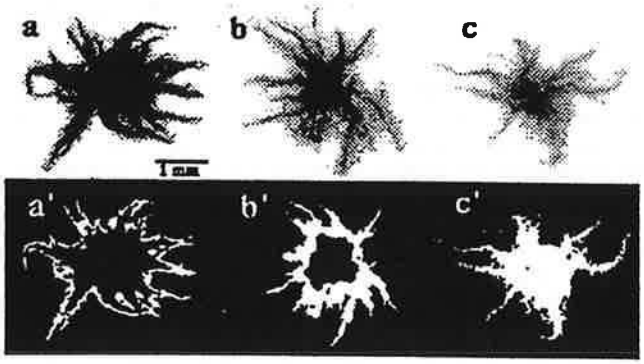


Figure 2

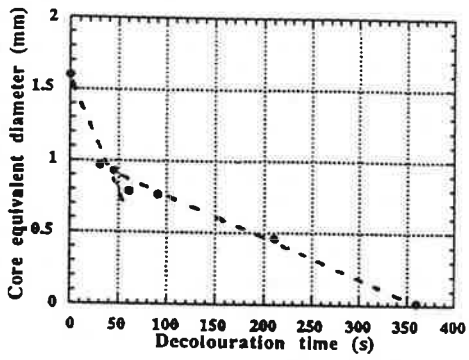


Figure 1 a-b-c: Digital images (64 grey levels) of the same pellet (under different orientations) after several colouration / decolouration cycles. a) before decolouration - b) after 45s of decolouration - c) after complete decolouration. Figure 1 a'-b'-c': Corresponding binary images of the outer zone (thresholds: low=1; high=60).
Figure 2: Variation of the detected core equivalent diameter of the pellet presented in figure 1 with the decolouration time. (Between each decolouration cycle, the pellet was restained. Each value is the mean of five acquisitions of the same pellet under different orientations. Coefficient of variation < 3%).

As described above, the classification of mycelial aggregates remains subjective in the setting of a clear limit between clumps and pellets. The most significant subjectivity of the classification carried out by this method remains in the choice of the decolouration time. The influence of this time on the detected core area of the pellet is shown in figure 2. In this study, 45s was chosen as the decolouration time. For most of the pellets examined, it corresponded to a change in the decolouration rate.

Application to Basidiomycetes fermentation

We have evaluated the efficiency of the method to determine the particle size distribution and characterise morphological changes of the biomass under various agitation speeds. Figure 3 shows the variation with time of the biomass concentration of *S. commune* for three agitation speeds (120 - 200 - 500 rpm). Figures 4a-c show the relative proportions of the three morphological types during these fermentations. For low agitation speeds (120-200 rpm) , most of the biomass (more than 80% of the projected area) appeared in a pelleted form (core and filamentous annular zone) and no significant changes in the proportions were observed over the fermentation time (figures 4a,b). For a higher agitation speed (500 rpm), a rapid increase in the number of clumps (data not shown) and in their percentage of the total area (figure 4c) took place towards the end of the growth phase. At the same time, the relative area of the pellet filamentous outer zones decreased. The intensity of the agitation was responsible for the attrition of the peripheral layer of the pellets and provoked the appearance of a predominant population of clumps.

The reduction of the mean equivalent thickness of the filamentous zones (clumps and filamentous outer zone of the pellets) as shown by the distributions of figure 5 confirms the effect of agitation on the breakage of the filamentous zones.

Figure 3

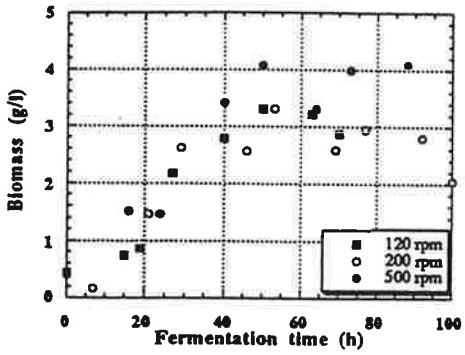


Figure 4 a

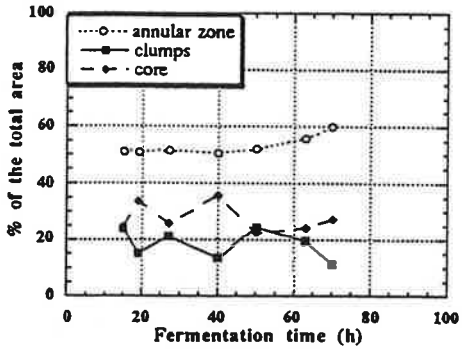


Figure 4 b

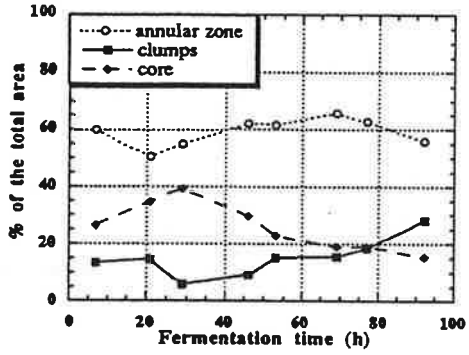


Figure 4 c

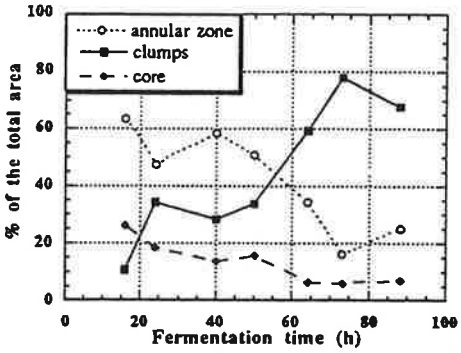


Figure 3: Comparison of the variation of the biomass dry weight with time for various agitation speeds.
Figure 4 a-b-c: Variation of the three morphological types (as a percentage of the total projected area) during fermentation for agitation speeds of a) 120 rpm b) 200rpm c) 500 rpm.

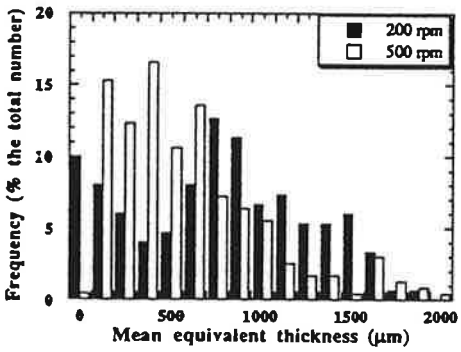


Figure 5: Comparison of the frequency distribution of the mean thickness of the filamentous zones at the end of the growth phase (45-50h) for two agitation speeds.

DISCUSSION

The method presented here is a new alternative for the classification and the measurement of mycelial biomass in aggregated form by image analysis. Due to the transfer of the recognition phase of the compact zones to the early thresholding step, made possible by the staining procedure, the image processing requires only basic operations currently available on most commercial image analysers. The treatment time remains short and convenient for a routine analysis of fermentation samples. Typically, a 400 particle-sample, spread over 25

images, required 5 min for the analysis (1.3 s per pellet). The total time of treatment was about 20 min; *i.e.* colouration (10 min), image capture (5 min), and image and data analysis (5 min).

As the criterion used in this method to distinguish between compacted zones and loosely aggregated ones is not of a morphological type, it does not depend on the resolution of the image. The application of the method to the detection and the characterisation of morphological changes of the biomass for different agitation speeds in *Basidiomycetes* fermentations showed that it is convenient for the analysis of large particles. The 2D-representation of this type of large aggregate frequently caused an overlapping of the external filamentous layers which then appeared as a solid zone hardly distinguishable from a real compacted zone from a morphological point of view. In the method presented here, these zones are differentiated on the basis of their staining retention.

This method is a first attempt at classifying fungal biomass in aggregates according to what might be described as its "diffusional" properties *i.e.* how readily an agent can access different parts of the biomass. Its application to the study of the influence of culture conditions on biomass morphology could provide useful information for modelling the growth of such pellet populations. However, practical considerations on the colouration method, which prevent the routine determination of a decolouration rate for the pellets of a whole fermentation sample, and the nature of the staining used (complex of *lugol-cristal violet*) hinder a more precise definition of the correlation between the solubilisation rate of the complex by an alcoholic solution and the diffusion kinetics of substrates or oxygen within the pellets. Under examination are modifications of the staining procedure in order to follow the diffusion kinetics within pellets. Associated with rapid image analysis, this could provide information about the biomass density of pellets.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Prof. G. Thomas (Dept. CPPI, Ecole des Mines) and Miss C. Landt (TU-Berlin) for their help in the initial stages of the study and Dr. C. R. Thomas (School of Chemical Engineering, University of Birmingham) for his advice given on this manuscript.

REFERENCES

Anke,T. (1989). In: *Bioactive metabolites from microorganisms*. Progress in industrial microbiology - vol.27, ed. M.E. Bushell and U. Gräfe, pp 51-66. Elsevier. London
Clarke, D.S. (1962). Can. J. Microbiol. **8**:133-136
Cox, P.W., Thomas, C.R. (1992). Biotechnol. Bioeng. **39**: 945-952
Fachet, J., Abel, G., Jusupova, S., Imre, S., Katona, E., Erdei, J., Szöllösi, J., Chihara, G. (1989). Int. J. Immunother. **4**:167-176
Furue, H. (1987). Drugs of today. **23**(6): 335-346
Hotta, H., Hagiwara, K., Tabata, K., Ito, W., Homma, M. (1993). Int.J.Immunopharmac. **15**(1): 55-60
Kiho, T., Shiose, Y., Nagai, K., Ukai, S. (1992a). Chem. Pharm. Bull. **40**(8): 2110-2114
Kiho,T., Katsuragawa, M., Nagai, K., Ukai, S. (1992b). Carbohydr. Res. **224**: 237-243
Pichon, D., Vivier, H., Pons, M.-N., (1993). In: Proceedings of the 5th International Conference on Computer Applications in Fermentation Technology. Keystone, Colorado, USA, 29 Mar-2 Apr 1992.
Reichl, U., King, R., Gilles E.D. (1992). Biotechnol. Bioeng. **39**: 164-170
Song, C.H., Cho, K.Y., Nair, N.G. (1987). Mycologia **79**(6): 866-876
Thomas, C.R. (1992). Trends Biotechnol. **56**(2): 204-207

Improved image analysis algorithm for the characterisation of mycelial aggregates after staining

G. Durant [1*], P.W. Cox[2], P. Formisyn[1], C.R. Thomas[2]

[1] Laboratoire d'Ingénierie de l'Environnement, Ecole des Mines de St Etienne, 158 cours Fauriel, 42023 St-Etienne Cedex 2, FRANCE

[2] School of Chemical Engineering, University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, B15 2TT, U.K.

SUMMARY

A colour image processing algorithm is presented to identify and measure morphological features of mycelial aggregates in biomass stained with crystal violet to discriminate filamentous regions and compacted cores. The method improves the accuracy and allows automation of the previous monochrome procedure (Durant *et al.*, 1994). It has been applied to the characterisation of aggregates from a shake-flask culture of *Fomes fomentarius* (Basidiomycete) presenting extended filamentous outer zones. The area of the whole pellet, core, and annular regions of each pellet were measured. The convex area ratio and annular fullness were estimated and means of each samples were calculated.

INTRODUCTION

In the last few years, the development of image analysis methods has allowed significant advances in the morphological characterisation of filamentous microorganisms (Thomas, 1992). These methods cover the whole range of morphology encountered in mycelial fermentations — from germination of spores (Paul *et al.*, 1993) to pelleted forms (Reichl *et al.*, 1992; Cox et Thomas, 1992), including dispersed and loosely aggregated mycelia *i.e.* "clumps" (Tucker *et al.*, 1992). They have been exploited in studies of engineering aspects of the fermentations *e.g.* correlating biomass morphology and the rheology of the broths (Olsvik *et al.*, 1993; Tucker and Thomas, 1993) or how the agitation speed can affect mycelial morphology (Makagiansar *et al.*, 1993). The use of image analysis has also provided very valuable information about the physiology of fungal biomass— *e.g.* the differentiation of *Penicillium chrysogenum* hyphae which might be related to the rate of penicillin production (Paul *et al.*, 1994).

Despite the consequences of diffusional limitations on metabolic activity and its regulation (Hermersdörfer *et al.*, 1987; Braun and Vecht-Lifschitz, 1991), none of the previous methods was designed to establish a relationship between the morphological features of clumps or pellets and their accessibility to substrates in the medium. Recently, an image analysis method was described for this purpose (Durant *et al.*, 1994). The method is based on a simple preliminary staining procedure in which loosely entangled zones of the mycelial biomass (clumps or filamentous outer zones) are quickly rinsed of stain whereas more compact zones (pellet cores) remain coloured. The contrast resulting from this staining helps the selection of both zones by an interactive thresholding carried out in monochrome digital images.

The new algorithm proposed here is an improvement on this previous method. It benefits from colour image acquisition to improve the accuracy of the detection of both of the mycelial zones, defined by the staining

procedure. It also eliminates the interactive step required when the monochrome method is used and therefore could allow fully automatic image processing.

MATERIAL AND METHODS

Fungal strain and culture conditions

The fungus used was *Fomes fomentarius* (Basidiomycete, Polypore). It was isolated from tissue plugs of fruiting bodies and is deposited at the Mycothèque of the Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon I (France) as the strain n°1082. The strain is studied for its ability to produce polysaccharides whose immunological properties will be described elsewhere. For maintenance and polysaccharide production, the medium contained glucose 30g/l, yeast extract 3g/l, KH_2PO_4 1g/l, $MgSO_4$ 0.5g/l (pH 5.3). Inoculum cultures were grown in 500 ml-Erlenmeyer flasks containing 150 ml of medium. They were inoculated with 5 plugs (diameter 1 cm) obtained from 7 day-old colonies on petri dishes. After homogenisation with an impeller blender (2000 rpm, 20 mm cutting blades, 2 min), the cultures were incubated for three days on a rotary shaker (120 rpm, 75 mm amplitude of rotation, 24°C). After another homogenisation, this culture was used as an 8% v/v inoculum for the production culture in shake flasks.

Staining procedure

Immediately after sampling, one volume of a fixative solution (5% w/v acetic acid, 2.5% w/v formaldehyde in water) was added to the broth. Samples were kept at 4°C until analysis. They were then stained with crystal violet. The colouration / decolouration procedure, prior to the image analysis, was carried out as previously described (Durant *et al.*, 1994).

Image analysis

Samples were spread over a glass box and observed from underneath using only the ambient illumination from neon ceiling lights. This provided primarly indirect illumination giving a good rendering of the colours on a dark background.

The CCD colour camera (model XC-007 Sanyo Electric Co., Basel, Switzerland), mounted on a adjustable stand, was fitted with a macroscopic zoom lens allowing magnifications to the images in the range of 10 to 40 µm/pixel. The image analyser was a Quantimet 570 (Leica Cambridge plc., Cambridge, U.K.).

In this new method, images capture is carried out in RGB (Red-Green-Blue) mode but only the green and blue channels are used in the subsequent processing. The flow diagram of the algorithm is shown in figure 1. The blue channel image is of the whole pellets but also includes halos, which are probably caused by a slight desorption of the stain after rinsing. These prevent direct identification of the cores by thresholding of the blue image alone. The green channel is of the filamentous regions.

The green image D2 (see figure 1) is thresholded, on this highly contrasted image, the filamentous zones (decolourised) can be detected in a range of high grey levels (typically between 200-256) to give the binary image B1. This thresholding operation can be carried out conveniently by an automatic detection. Image B1 is then cleaned up by an erosion / reconstruction step and by a feature accept based on a shape factor (the circularity) of the objects. The solid particles, whose shape is rather regular and spherical, can be easily

distinguished from the filamentous zones by their shape, and are not retained. This gives B1' containing only the filamentous zones.

The digital difference between the blue (D1) and the green (D2) images provides a new 8-bit image (D3) (see figure 1) in which the only zones having a high intensity are the cores and the halos. The centre of the cores is most intense, and these can be identified by a suitable thresholding. This gives binary image B2 which contains partial cores and possibly solid particles which also hold the stain.

On B2, the removal of the solids by the same operation that were used on B1 would not be efficient since the binary representations of the partial cores (the intensive blue part of the cores) and the solid particles can be very close in shape and size. The elimination of these particles must be achieved by two further steps (see figure 1). The first one is a detection of the holes in B1'. These holes are made up of some background areas and of the blue zones. They are stored in B3. The second step is an intersection operation (logical "AND") between B2 and B3. The solid particles, absent in B3, are thus eliminated in the resulting image, B4. The cores are then rebuild using the partial cores of B4 as a seed and the image of the holes, B3, as a template. B4', the image of the cores alone, is thus obtained. A logical "OR" operation between B4' and B1' gives a binary image of whole mycelial objects, B5. Mycelial particles on which no blue coloured zone remains are described as "clumps". They do not appear on B4' and their representation is the same on B1' and B5. The three binary images, B1', B4' and B5, are used in the measurement phase to characterise respectively the filamentous zones, the whole particles and the cores.

The measurements applied to these zones are the same than those already described by Cox and Thomas (1992). They include perimeter, detected area and convex area. Equivalent diameter (for the each whole pellet and core), equivalent mean thickness (for the filamentous annular zone), circularity ratio, annular fullness (annular convex area / annular area) and convex area ratio (core convex area / whole pellet convex area) can then be calculated from the previous measurements and means found for each sample.

RESULTS

As illustrated by figures 2 a-c, the colouration procedure provided a sharp contrast between the filamentous decolourised zones and the blue-stained cores. On the green channel (figure 2b-c), the external and internal limits of the filamentous decolourised zones appeared as steep gradients on the intensity profile. This type of profile is suitable for an automatic detection based on the sign or value changing of the gradient. A direct thresholding on the blue channel (figure 2a, 2c) was hindered both by the similar intensity values of the white filamentous zones and the blue core, and by the frequent presence of a stain halo. Nevertheless, the use of this channel was required to distinguish which of the dark zones on the green channel corresponded to a coloured zone and which represented the background (holes in the projected surface).

The figures 3a-b present the growth curve and some morphological chararacteristics of the biomass during a shake-flask culture of *Fomes fomentarius*. The biomass was mainly constituted of pellets. The clumps were few and never represented more than 20% of the total projected area (data not shown). Figure 3a illustrates that the growth of the pellets mainly occured by the development of the annular zones as their mean area closely followed both the evolution of the whole pellet area and the growth curve. Three phases were

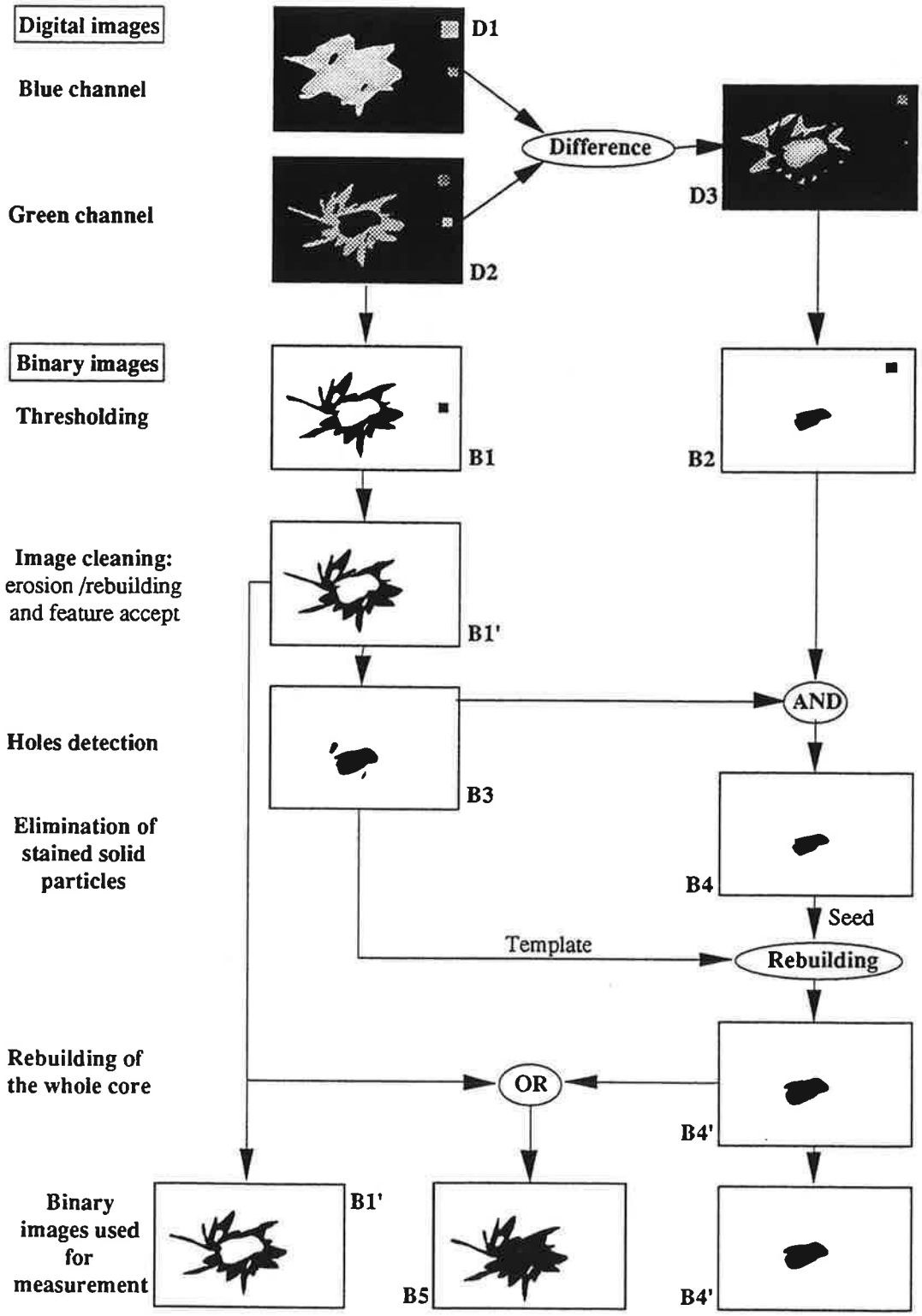


Figure 1: Flow diagram of the image processing algorithm for the analysis of the stained mycelial agregates.

observed. In the first, the initial growth phase (until 40 h) was characterised by the fast development of the annular zones which triggers the simultaneous formation of the cores. Next, the reduction of the biomass growth rate was also observed in the reduced and nearly linear growth rate of the annular zone Degeneration then began. The low values of the convex area ratio (figure 3b) stress the typical "hairy" type of the pellets which have relatively small cores. The irregularity of the peripheral regions increased only slightly during the

DISCUSSION

The new algorithm presented here completes and improves the previous monochrome method (Durant *et al.*, 1994) intended to characterise aggregated mycelial biomass by a specific staining of the zones according to their accessibility to the surrounding medium. In Durant *et al.* (1994), the results of the staining were detected by the consequential increased light absorption (and thus increased contrast). Although most of the time, this was satisfactory for interactive detection, in specific particles it could originate artefacts affecting the accuracy of the detection *e.g.* poor detection of thin fully decolourised regions whose intensity was similar to the image background, or dependance of the contrast on the intrinsic opacity of some particularly thick regions confusing the operator choice for the core limit. Using the new colour procedure, thin decoloured zones were clearly distinguishable from the dark background. Moreover, the difference betweeen the coulour composition of both of the zones provided a more reliable criterion of separation than the earlier method. Automation of the detection and image processing could therefore be easily implemented, improving the reproducibility. As the automatic thresholding operation is not available on all analysers, an "edge detection" (gradient detection) superimposed on the grey image of the green channel could also be used as an alternative to help the operator to determine a reproducible limit of the core or to calibrate the threshoding levels, although this would not be so efficient. The present highly reproducible algorithm is also more convenient for standardisation and comparison of measurements carried out in different places, and remains nearly as short as the monochrome algorithm (5-10 min).

The evolution of the fungal biomass presented here, must be considered as an "extreme" example designed to emphasize the ability of the method to characterise large mycelial aggregates with an extended annular zone. Such particles could only be defined as compact according to a morphological criterion taking into account the fullness of the annular region. The concept of the "diffusionnal" criterion to distinguish sub-region in the biomass aggregates, developed in this paper and in Durant *et al.* (1994), can be used to reveal details morphological features of pellet structure.

REFERENCES

Braun, S., Vecht-Lifschitz, S.E. (1991), *Trends Biotechnol.* **9**: 63-68.

Cox, P.W., Thomas, C.R. (1992), *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 945-952.

Durant, G., Crawley, G.M., Formisyn, P. (1994), *Biotechnol. Tech.* **8**: 395-400.

Hemmersdorfer, H., Leuchtenberger, A., Wardsack, C., Ruttloff, H., (1987), *J. Basic Microbiol.* **27**: 309-315.

Makagiansar, H.Y., Ayazi Shamlou, P., Thomas, C.R., Lilly, M.D. (1993), *Bioproc. Eng.* **9**: 83-90

Olsvik, E., Tucker, K.G., Thomas, C.R., Kristiansen, B. (1993), *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 1046-1052.

Paul, G.C., Kent, C.A., Thomas, C.R., (1994), *Trans IChemE.* **72** (c): 95-105.

Paul, G.C., Kent, C.A., Thomas, C.R., (1993), *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 11-23.

Reichl, U., King, R., Gilles E.D. (1992), *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 164-170.

Thomas, C.R. (1992), *Trends Biotechnol.*,**10**:10, 343-348

Tucker, K.G., Kelly, T., Delgrazia, P., Thomas, C.R., (1992), *Biotechnol. Prog.* **8**: 353-359.

Tucker, K.G., Thomas, C.R., (1993), *Trans IChemE* **71**(C): 111-117.

Gilles DURANT: ***Caractérisation morphologique des agrégats mycéliens en fermentations : Application à deux souches de Basidiomycètes produisant des métabolites à activités pharmacologiques***

THESE DE DOCTORAT

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I - FACULTE DE PHARMACIE (I.S.P.B.L.)

RÉSUMÉ:

Cette étude a porté sur les propriétés culturales et les potentialités métaboliques de deux souches de Basidiomycètes : *Macrocystidia cucumis* (Agaricales) et *Fomes fomentarius* (Aphyllophorales).

D'une part, sur des surnageants de culture de *M. cucumis*, un agent inhibant, *in vitro*, le développement du virus Herpes Simplex type 1 a été détecté. La production ou la stabilité du ou des métabolite(s) antiviraux s'est cependant révélée trop erratique pour permettre une caractérisation du composé actif.

D'autre part, des fractions polysaccharidiques, isolées de cultures de *F. fomentarius*, ont montré, *in vitro*, une forte inhibition de la réaction proliférative des lymphocytes du sang périphérique, stimulés par la concanavaline A ou par des cellules présentatrices allogéniques. Les fractions actives ont été caractérisées et sont composées d'hétéroglucanes (glucose, mannose, galactose) associés à une fraction peptidique (5-8%). Les résultats actuels ne permettent pas de préciser le rôle de la fraction peptidique dans l'activité.

De façon à définir les relations entre propriétés culturales, activités métaboliques et morphologie mycélienne, une première méthode d'analyse d'images a été développée afin d'autoriser, en routine, des mesures et une classification morphologique de la biomasse obtenue lors des fermentations. La méthode repose sur un procédé de coloration permettant une différenciation rapide des zones mycéliennes en fonction de leur accessibilité au milieu. L'influence des conditions d'aération et d'agitation sur la croissance de *M. cucumis* et les conditions préférentielles pour la production des polysaccharides par *F. fomentarius* ont pu être définies à partir des paramètres morphologiques.

Une seconde technique de coloration a ensuite été proposée pour suivre par analyses d'images la progression d'un front de diffusion au sein des pellets et fournir ainsi une évaluation de la densité de l'enchevêtrement mycélien en fonction de la vitesse du processus diffusionnel.

Le critère diffusionnel défini par ces deux méthodes d'analyses d'images constitue une nouvelle alternative pour la caractérisation morphologique des pellets et agrégats mycéliens. Ses perspectives en terme de connaissance et de modélisation de la croisssance de telles biomasses apparaissent particulièrement importantes pour les fermentations fongiques industrielles.

MOTS-CLÉS: Basidiomycètes - Fermentations - Analyse d'images - Morphologie mycélienne - Polysaccharides - Immunomodulateur - Antiviral

JURY:

Monsieur le Professeur	H. Brauer
Monsieur le Docteur	P. Formisyn
Monsieur le Docteur	J-J. Sanglier
Monsieur le Docteur	C.R. Thomas
Monsieur le Docteur	G. Valla
Monsieur le Professeur	J. Villard

DATE DE SOUTENANCE: 14 Novembre 1994

ADRESSE DE L'AUTEUR: 6, sente de la croix neuve
77850 HERICY