

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

T H E S E

présentée

pour obtenir

le TITRE de DOCTEUR 3^e CYCLE

Spécialité : Phytopathologie

par

Marie-Christine DURAND

INFLUENCE DE L'HUMIDITE RELATIVE ET DE LA
COMPOSITION GAZEUSE DE L'ATMOSPHERE
SUR LA LETHALITE ET LA MUTABILITE
DES MICROCONIDIES DE *NECTRIA HAEMATOCOCCA*
SOUMISES AUX RAYONNEMENTS UV ET γ

Soutenue le 13 juillet 1982 devant la Commission d'Examen

MM. J. CHEVAUGEON
G. BOMPEIX
A. SILVY
J. MATRICON

Président

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

T H E S E

présentée

pour obtenir

le TITRE de DOCTEUR 3^e CYCLE

Spécialité : Phytopathologie

par

Marie-Christine DURAND

INFLUENCE DE L'HUMIDITE RELATIVE ET DE LA
COMPOSITION GAZEUSE DE L'ATMOSPHERE
SUR LA LETHALITE ET LA MUTABILITE
DES MICROCONIDIES DE *NECTRIA HAEMATOCOCCA*
SOUMISES AUX RAYONNEMENTS UV ET γ

Soutenue le 13 juillet 1982 devant la Commission d'Examen

MM. J. CHEVAUGEON
G. BOMPEIX
A. SILVY
J. MATRICON

Président

Je remercie vivement Monsieur le Professeur CHEVAUGEON qui, en me proposant ce thème de travail m'a permis d'élargir ma formation première de Phytopathologie vers le domaine de la Radiobiologie.

Cette étude a pu être réalisée au C.E.N. de CADARACHE grâce à Monsieur GUERIN de MONTGAREUIL qui m'a accueillie au service de Radioagronomie. Je lui suis très reconnaissante d'avoir mis à ma disposition des moyens particulièrement favorables au bon déroulement de mon stage.

La direction de ce stage a été confiée à Monsieur SILVY, Ingénieur au Laboratoire de Radiogénétique, auquel je tiens à exprimer tous mes remerciements pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour la confiance qu'il m'a témoignée.

A ORSAY, j'ai trouvé une aide scientifique de qualité :

- J'exprime ma profonde gratitude à M.J. DABOUSSI et D. PARISOT pour leur disponibilité constante et leur gentillesse.

- Monsieur CHANET, chercheur à l'Institut du Radium m'a beaucoup conseillée dans le domaine de la Radiobiologie et je l'en remercie vivement.

- Un essai de théorisation a pu être réalisé grâce à Monsieur le Professeur MATRICON, auquel je suis particulièrement reconnaissante d'avoir pris tant d'intérêt pour mon travail.

Je remercie Messieurs les membres du Jury d'avoir bien voulu juger mon travail et notamment Monsieur le Professeur BOMPEIX qui a eu l'amabilité d'accepter la charge de Rapporteur.

Que soient également remerciées les personnes qui ont contribué à la réalisation technique de ce projet :

- Mesdames GERLINGER et MAUGIN pour m'avoir initiée aux techniques culturelles de *Nectria*.

- Monsieur DANIEL pour les manipulations de l'irradiateur γ .

- Mesdames MEUNIER et EYMERY pour la frappe et l'illustration du mémoire.

- Monsieur BALLAC pour les travaux photographiques.

Je tiens également à témoigner de la sympathie de tous, aussi bien à CADARACHE qu'à ORSAY.

Et, je n'oublierai pas de rendre hommage à mes proches dont les encouragements et la présence discrète, ont été un soutien essentiel.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

1 - Description du matériel végétal

2 - Méthodes de cultures

2.1. Milieux de culture

2.2. Technique de mise en culture

2.2.1. Préparation de cultures expérimentales

2.2.2. Suspensions de spores et étalement sur milieu gélosé

2.2.3. Estimation de la viabilité des spores

3 - Conditionnement des spores

3.1. Réalisation des atmosphères

3.2. Mise au point d'une technique de déshydratation des spores

3.2.1. Déshydratation par lyophilisation

3.2.2. Déshydratation sur cristaux de Silicagel

3.2.3. Déshydratation à l'aide de solutions saturées de sels

3.3. Mesure de la teneur en eau des spores de champignons

4 - Méthodes de traitements mutagènes

4.1. Traitements par les rayons UV

4.2. Traitements par les rayons γ

4.2.1. Description de l'appareil utilisé

4.2.2. Différents modes de traitements

4.2.2.1. Spores étalées sur milieu gélosé

4.2.2.2. Spores en suspension dans l'eau

4.2.2.3. Irradiation des spores *in situ*

5 - Courbes de survie

6 - Sélection de mutants

6.1. Mutants de coloration

6.2. Mutants stériles

6.3. Mutants résistants à des inhibiteurs

6.4. Révertants de mutants auxotrophes

7 - Taux de mutations

7.1. Mutants de coloration et mutants de stérilité

7.2. Mutants résistants à des inhibiteurs

CHAPITRE II : EFFET LETHAL DES RADIATIONS

1 - Action des rayonnements UV

2 - Action des rayonnements γ

2.1. Choix d'un protocole pour l'irradiation des spores

2.2. Influence de la composition de l'atmosphère sur la radiosensibilité des microconidies

2.3. Influence de la teneur en eau de l'atmosphère

2.3.1. Choix d'une méthode de déshydratation des spores

2.3.1.1. Lyophilisation des spores

2.3.1.2. Déshydratation des spores sur cristaux de silicagel

2.3.1.3. Déshydratation des spores *in situ* en présence de solutions saturées de sels

2.3.2. Essai d'évaluation de la teneur en eau de spores fongiques

2.3.3. Influence de l'humidité relative de l'atmosphère sur la survie des spores de *Nectria haematococca*

3 - Interprétation théorique des courbes de survie obtenues après irradiation aux rayons UV et aux rayons γ

CHAPITRE III : EFFET MUTAGENE DES RADIATIONS

1 - Choix des caractères se prêtant à une évaluation de la mutabilité

1.1. Mutants morphologiques

1.1.1. Mutants de coloration

1.1.2. Mutants stériles

1.2. Mutants résistants aux inhibiteurs

1.2.1. Détermination de la dose inhibitrice de plusieurs substances fongostatiques

1.2.1.1. Imazalil

1.2.1.2. TCNB et Tridémorph

1.2.1.3. Nitrure de Sodium

1.2.1.4. 8-azaguanine

1.2.1.5. Bénomyl

1.3. Révertants de mutants auxotrophes

2 - Evaluation de la mutabilité

2.1. Taux de mutants spontanés pour les trois catégories choisies

2.2. Taux de mutants pour les 3 caractères choisis après traitement aux U.V.

2.3. Taux de mutants pour les 3 caractères choisis après traitement aux rayons γ

2.3.1. Taux de mutants de coloration en fonction de l'environnement

2.3.1.1. Spores conservées dans des humidités relatives différentes

2.3.1.2. Spores conservées dans des atmosphères gazeuses différentes

2.3.1.3. Conclusion

2.3.2. Taux de mutants stériles

2.3.2.1. Spores conservées dans des humidités relatives différentes

2.3.2.2. Spores conservées dans des atmosphères gazeuses différentes

2.3.2.3. Conclusion

2.3.3. Taux de mutants résistants à la 8-azaguanine

2.3.3.1. Spores conservées dans des humidités relatives différentes

2.3.3.2. Spores conservées dans des atmosphères gazeuses différentes

CONCLUSION

INTRODUCTION

Des traitements aux rayonnements ionisants peuvent être utilisés en agronomie pour augmenter la variabilité génétique des plantes. Les radiations qui provoquent l'induction de mutation sont de nature électromagnétique comme les UV, X, γ , ou de nature corpusculaire comme les rayons α et β . Les UV peu pénétrants ne sont pas utilisés chez les plantes supérieures alors qu'ils le sont fréquemment chez les microorganismes. Généralement, ce sont les rayons γ et les rayons X qui sont employés pour irradier les graines, bourgeons ou plantes entières.

Cependant, la mutagénèse est un processus aléatoire qui ne peut être ni prévu ni dirigé avec certitude et la sélection de caractères intéressants est souvent longue et fastidieuse. En effet les allèles mutés étant le plus souvent récessifs, ils ne s'expriment pas à l'état hétérozygote dans un organisme diploïde ; par conséquent, ils ne peuvent être décelés que par la mise en oeuvre de croisements appropriés. Ces croisements multipliant le nombre d'individus à examiner, on est obligé de limiter l'échantillon. De ce fait, pour que le rendement en mutants soit suffisant, la fréquence des mutations induites dans cet échantillon doit être la plus élevée possible.

On sait que certains facteurs comme l'oxygène, la teneur en eau et la température modifient sensiblement la radiosensibilité des organismes vivants (CONGER et al., 1977). La présence d'oxygène dans l'atmosphère conduit toujours à une augmentation de la radiosensibilité. En effet, les radicaux libres formés par ionisation du matériel irradié réagissent avec l'O₂ et forment des produits hautement toxiques pour les cellules. Cet effet a été observé chez de nombreux organismes : champignons (SOMMER et al., 1964 ; MORTIMER et al., 1965 ; KIEFFER, 1975), bactéries (ALPER et HOWARD-FLANDERS, 1956), spores de fougère (DODD et EBERT, 1970, 1973) et graines de végétaux supérieurs (CALDECOTT, 1961 ; NILAN et al., 1962 ; CONGER et al., 1971). Le rôle de l'eau apparaît plus complexe car on a observé que selon la teneur en eau du matériel étudié on pouvait avoir une augmentation ou une diminution de la radiosensibilité. Généralement, la courbe de radiosensibilité en fonction de la teneur en eau montre un pic de radiorésistance de part et d'autre duquel la sensibilité augmente (NILAN et al., 1962). Les auteurs qui ont travaillé sur des organismes très divers comme des bactéries (BELLAMY et LAWTON, 1955 ; POWERS et al., 1968), des spores de champignons (KLINGMÜLLER, 1962), des levures (WOOD et RANDOLPH, 1961),

des spores de fougère (HOWARD et al., 1966), du pollen de tomate (BROCK et FRANKLIN, 1966) et des graines (SPARRMAN et al., 1959 ; CONGER et al., 1966, 1968 ; s'accordent à dire que la radiosensibilité est maximum quand l'organe est peu ou très hydraté alors que le pic de radiorésistance correspond à une teneur en eau de l'organe traité d'environ 10%. MAHAMA (1980), MAHAMA et SILVY (1982) donnent dans leurs travaux certaines hypothèses sur le rôle de l'eau dans la sensibilité aux rayonnements. Selon eux, la sensibilité des graines aux radiations dépendrait moins de la quantité d'eau que de son état mis en évidence par les courbes de sorption. Ces dernières représentent l'évolution de la teneur en eau des semences en fonction de l'humidité relative de l'air.

Il ressort des données bibliographiques que l'influence de l'oxygène et de la teneur en eau sur la radiosensibilité des organismes ont été essentiellement étudiées au niveau de la survie. Par contre, on a peu d'indication sur les variations de l'effet mutagène, taux et spectre de mutation, en fonction de la dose de rayonnement et de la survie. Cette lacune est imputable aux difficultés rencontrées dans la manipulation des plantes supérieures. Les essais sont très longs car pour de nombreuses plantes on ne peut faire qu'une génération par an, et ils nécessitent des surfaces importantes pour avoir des effectifs suffisants. Au contraire, avec des organismes inférieurs, comme les champignons, les cycles sont très courts. On peut avoir facilement de grands effectifs dans un petit volume. De plus, l'essentiel du cycle étant haploïde, l'effet des mutations est observé directement. Un tel matériel susceptible d'être traité dans les mêmes conditions que les graines pourrait constituer un modèle pour une meilleure connaissance des modalités de l'apparition des mutations chez celles-ci. Nous avons choisi un champignon : *Nectria haematococca* qui produit au cours de son cycle de reproduction asexuelle des spores unicellulaires uninucléées : les microconidies. Cet organisme développe aussi des macroconidies pluricellulaires et des structures de conservation, les chlamydospores, ces dernières présentant une certaine analogie avec les graines.

Dans la mesure où, à Orsay, des mutants de *Nectria haematococca* de différents types avaient été obtenus avec les rayons UV, nous avons comparé l'effet des rayons UV et γ sur la survie des microconidies et sur la mutagénèse pour une même survie. Puis dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence de la composition de l'atmosphère et de son humidité relative sur l'effet léthal et mutagène des rayonnements γ sur les microconidies.

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

1 - DESCRIPTION DU MATERIEL VEGETAL

La souche sauvage, S1, de *Nectria haematococca* (Berk. et Br.) Wr, que nous avons utilisée dans ce travail provient du Centraal Bureau Voor Schimmelcultures de Baarn. Ce champignon a la particularité de croître sous trois formes différentes : un état normal (Photo 1 - N) auquel succède un état différencié qui prend l'aspect d'un secteur (Photo 1 - S) ou d'un anneau (Photo 1 - A) ; jusqu'à présent, il n'a été étudié que pour élucider le déterminisme de ce changement d'état (DABOUSSI, 1979). Des travaux de LAVILLE (1971) nous rappellerons quelques éléments essentiels de la biologie de *Nectria haematococca* nécessaires à la compréhension de notre travail. Du point de vue systématique, c'est un ascomycète dont la forme asexuée est *Fusarium solani* (BOOTH, 1975).

Sur milieu gélosé à base de bouillon de pomme de terre glucosé à 2% (PDA), une spore uninucléée donne naissance à un mycélium blanc puis violacé qui croît uniformément de 4 à 5 mm par jour. Dès 24h le mycélium différencie des spores de reproduction asexuelle, les microconidies. De forme ellipsoïde, elles mesurent en moyenne $8 \mu \times 3 \mu$ et sont majoritairement uninucléées ; certains peuvent devenir bicellulaires lorsqu'elles sont plus âgées (HANLIN, 1971). Les jeunes microconidies constituent donc un matériel convenable pour les mutagenèses. D'autres spores de reproduction asexuelle, les macroconidies, apparaissent environ 5 jours après le début du développement de la culture. Elles sont fusiformes, composées de plusieurs articles (jusqu'à 7), dont chacun est uninucléé, et mesurent environ $35 \mu \times 5 \mu$. Les parois des microconidies et des macroconidies sont hyalines. Pour ces deux types de spores, les noyaux proviennent de la division d'un seul noyau initial du conidiophore (HANLIN, 1971).

Sur les thalles plus âgés (de 15 à 20 jours) on peut observer la présence de chlamydospores qui représentent la forme de conservation du mycélium. Elles sont multinucléées et de ce fait leur utilisation pour des expériences de mutagenèse est moins commode que celle des microconidies.

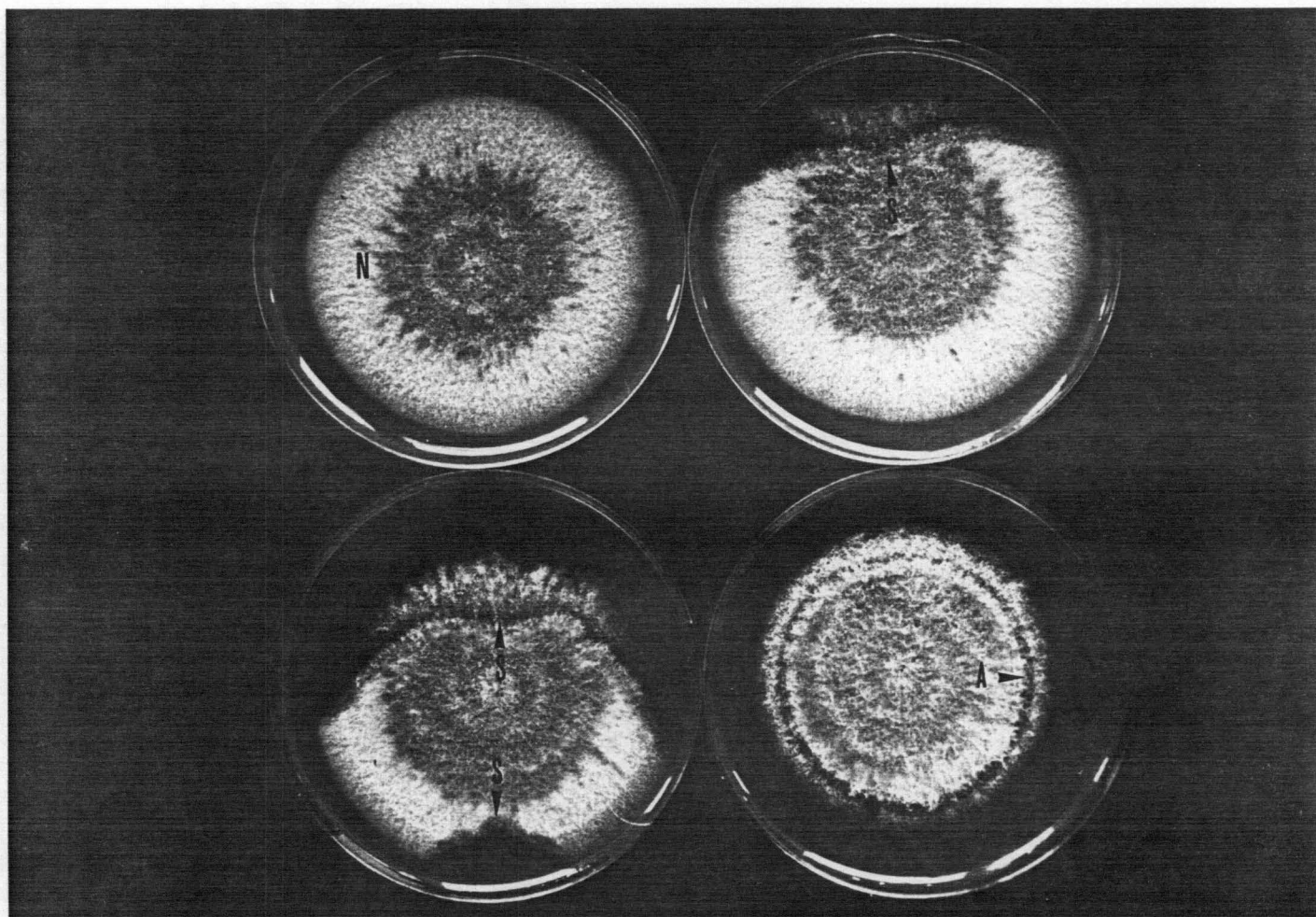


Photo 1

Thalle S1 âgé de 5 jours, sur milieu PDA le chamignon peut croître sous 3 formes : normale (N), secteur (S) et anneau (A).

La souche que nous avons utilisée est homothallique. La formation des périthèces, induite par la lumière, est effective après une dizaine de jours. Les périthèces sont sphériques (diamètre compris entre 210 et 250 μ) et de couleur orangée. Les asques qu'ils contiennent renferment 8 ascospores bicellulaires dont chacun des noyaux est haploïde puisque la méiose suit immédiatement la caryogamie. Ainsi, le cycle de *Nectria haematococca* s'effectue essentiellement en phase haploïde.

Au cours de ce travail nous avons été également conduit à utiliser des souches auxotrophes de *Nectria haematococca* (cf. § 6.4). Contrairement à la souche sauvage prototrophe, ces souches ne peuvent pas croître sur milieu minimum car elles sont incapables de synthétiser un métabolite indispensable mais elles peuvent avoir une bonne croissance sur un milieu complet contenant ce métabolite.

2 - METHODES DE CULTURE

2.1. Milieux de culture

. PDA : Pour cultiver la souche S1, nous avons utilisé le Potato-Dextrose-Agar BIOMERIEUX dont la formule en gramme par litre d'eau distillée est la suivante :

Infusion de pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Gélose	15 g

. PDA + T : Du Triton X100 a été ajouté au PDA à raison de 0,8 g par litre.

Le Triton X100 est un détergent qui a par ailleurs la propriété de ralentir la croissance du mycélium (VAN ET TEN et KOLMARK, 1976) sans altérer autrement la biologie du champignon. Il permet de dénombrer une centaine de thalles par boîte de Pétri sans qu'il y ait d'interaction entre eux. C'est pourquoi nous avons utilisé ce milieu pour établir les courbes de survie et évaluer la proportion de mutants après irradiation.

. PDA avec inhibiteurs : Nous avons ajouté au PDA 6 produits connus pour leurs propriétés fongistatiques : l'imazalil, le 2-4-5-6 tétrachloronitrobenzène (TCNB), le nitrure de Sodium, le tridémorph, le bénomyl, la 8-azaguanine.

Alors que le nitrure de sodium est soluble et que le tridémorph et le bénomyl se dissolvent facilement dans l'eau, l'imazalil et le TCNB doivent être dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) avant d'être incorporés au milieu qui est ensuite autoclavé. Quant à la 8-azaguanine, elle ne supporte pas la stérilisation, c'est pourquoi on mélange la poudre obtenue après broyage du produit commercial au mortier, avec le milieu gélosé stérilisé et refroidi à 60°C.

Suivant les inhibiteurs employés, différentes concentrations ont été utilisées :

Imazalil	1, 5, 20, 50 ppm
TCNB	5, 20, 50, 100 ppm
Nitrure de sodium)	
Tridémorph)	10, 20, 50, 100 ppm
Bénomyl	100 ppm
8-azaguanine	40, 100, 200 ppm

. Milieu minimum (MM) : Ce milieu a la composition suivante :

Phosphate monopotassique	1 g
Sulfate de magnésium, 7H ₂ O	0,5 g
Nitrate de sodium	2 g
Chlorure de potassium	0,5 g
Sulfate ferreux, 7H ₂ O (en solution à 1%, pds/vol)	1 ml
Glucose	20 g
Bacto Agar	25 g
Eau distillée	1 l

Il permet la croissance de la souche S1, mais pas celle de mutants auxotrophes qui requièrent un aminoacide, une base ou une vitamine pour croître.

. Milieu N1 :

"Maltéa" (MOSER)	20 g
Gélose	20 g
Eau	1 l

Ce milieu complet permet la croissance des souches auxotrophes.

2.2. Techniques de mise en culture

2.2.1. Préparation des cultures expérimentales

Afin de disposer à tout moment de thalles jeunes, l'entretien des souches a été effectué par repiquages monospores chaque semaine sur milieu PDA. Les cultures ont eu lieu à 26°C.

Pour la plupart des expériences nous avons utilisé des thalles qui se sont développés sur milieu gélosé recouvert d'une mince feuille de cellophane. Ces thalles ont été obtenus en étalant 0,1 ml de suspension titrant environ 10^6 spores par ml sur la cellophane qui se couvre d'un feutrage mycélien uniforme dans un délai de 2 jours. Cette méthode de culture permet l'obtention d'un grand nombre de spores de même âge et le transfert des cultures dans d'autres conditions d'environnement à tout moment de la croissance du thalle. La cellophane intercalée entre le milieu nutritif et le champignon ne modifie pas les caractères essentiels de la souche (DABOUSSI-BAREYRE, 1979).

2.2.2. Suspension de spores et étalement sur milieu gélosé

Les spores et le mycélium aérien ont été récoltés par grattage de la surface des thalles et mis en suspension dans l'eau distillée. Après agitation, les suspensions ont été filtrées à travers des entonnoirs filtrants de porosité n° 3 qui arrêtent les débris mycéliens et les macroconidies. Le filtrat contient donc une majorité de microconidies unicellulaires qui subiront l'irradiation. Le nombre de spores en suspension dans l'eau a été évalué à la cellule de Thoma. Des aliquots de 0,1 ml ont été ensuite distribués dans chaque boîte de Pétri et étalés sur toute la surface du milieu, après dilution convenable si cela est nécessaire.

2.2.3. Estimation de la viabilité des spores

Les suspensions de spores dont il était souhaitable de connaître la viabilité ont été étalées sur lames gélosées (20 g de gélose DIFCO par litre d'eau distillée). Le taux de germination des spores a été déterminé après un délai d'au moins 6 heures en faisant le rapport entre le nombre de spores ayant émis un tube germinatif et le nombre total de spores (germées et non germées). Les comptages ont été réalisés dans plusieurs champs microscopiques choisis au hasard de façon à dénombrer un total d'environ 1000 spores.

3 - CONDITIONNEMENT DES SPORES

3.1. Réalisation des atmosphères

Des thalles de 3 jours cultivés sur PDA + cellophane ont été maintenus sous atmosphère d'oxygène pur et en anoxie (azote pur à 99,998%). Deux contrôles ont été réalisés : un dans l'air ambiant et l'autre dans l'air reconstitué à partir de 20% d'oxygène et 80% d'azote. La durée du traitement était de 43 heures pour l'oxygène et l'air reconstitué et de 66 heures pour l'azote. Les spores sont restées plus longtemps sous azote pour essayer d'éliminer au maximum l'oxygène. Pour cette expérience nous avons utilisé des récipients en verre de la taille d'une boîte de Pétri, fermés par un couvercle maintenu par des clips, sur lequel sont pratiquées deux ouvertures pour l'entrée et la sortie du gaz. Les boîtes préalablement stérilisées ont été placées en série et contenaient le mycélium avec son substrat gélosé pour éviter le dessèchement du matériel biologique. Afin de préserver la stérilité du dispositif, le gaz passait à travers un filtre avant de pénétrer dans le système (Figure n° 1). A la fin du traitement, les deux orifices ont été obturés et les cultures qui étaient alors âgées de 5 jours (témoins dans l'air reconstitué et thalles sous O_2) ou 6 jours (thalles sous N_2) ont été irradiées dans la boîte en verre qui reste fermée. Les témoins placés dans l'air ambiant étaient âgés de 3 jours seulement.

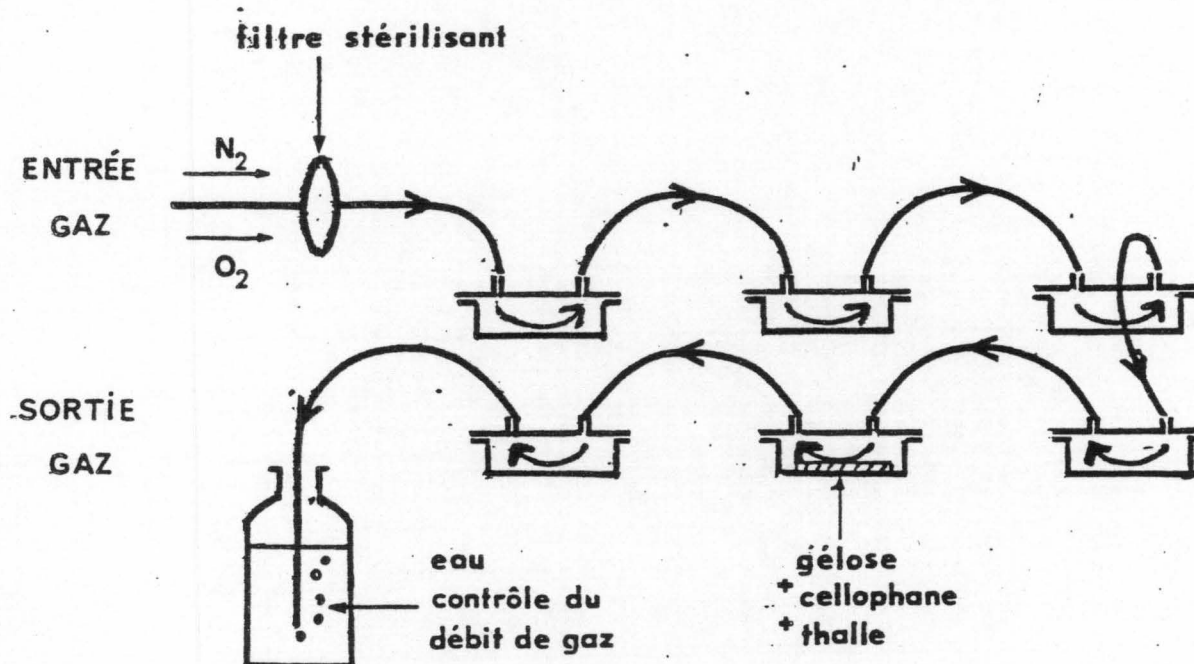


Figure 1 - Schéma du dispositif utilisé pour étudier l'effet de l'environnement gazeux.

3.2. Mise au point d'une technique de déshydratation des spores

3.2.1. Déshydratation par lyophilisation

Dans un premier temps nous avons déshydraté au maximum les spores avant de les réhydrater. Pour cela, nous avons lyophilisé des culots de conidies obtenus par centrifugation de suspensions très concentrées. Après avoir constaté que la viabilité des spores était très faible, plusieurs protecteurs de lyophilisation efficaces chez d'autres organismes ont été testés.

	(malt	18%
* mélange	(lactose	9%
aqueux	(tween 80	0,1%
* lait		
* glycérol		

3.2.2. Déshydratation sur cristaux de silicagel

Une autre méthode a consisté à déshydrater les boîtes de milieu sur lesquelles étaient étalées les spores, au-dessus de cristaux de silicagel jusqu'à dessèchement complet de la gélose (environ 1 semaine). Ensuite, les boîtes ont été placées dans des caissons étanches au-dessus de solutions aqueuses d'acide sulfurique plus ou moins diluées, de manière à obtenir des atmosphères d'humidités relatives (HR) variées (in HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS).

3.2.3. Déshydratation à l'aide de solutions saturées de sels

Une troisième méthode a été expérimentée. Dans celle-ci, les spores ont été placées dans des atmosphères d'humidités relatives variables sans déshydratation préalable. Le mycélium a été cultivé sur cellophane et après 3 jours il a été séparé du milieu et transféré avec la feuille de cellophane dans des petites boîtes de Pétri stériles de 4 cm de diamètre placées dans des dessiccateurs (Figure 2) dont l'humidité relative était maintenue constante grâce à la présence de solutions saturées de sels : un excès d'eau dans l'atmosphère provoque la solubilisation du sel solide et une perte d'eau en provoque sa précipitation. Ce procédé de réalisation des humidités relatives préconisé par de nombreux auteurs (KATAYAMA et NAGAMATSU, 1966 ; GLADSTONES et HUNTER, 1959 ; GLADSTONES et FRANCIS, 1965) était également celui employé par MAHAMA (1980) dont les travaux seront commentés ultérieurement. Le tableau 1 indique la nature des produits utilisés, la valeur théorique des humidités

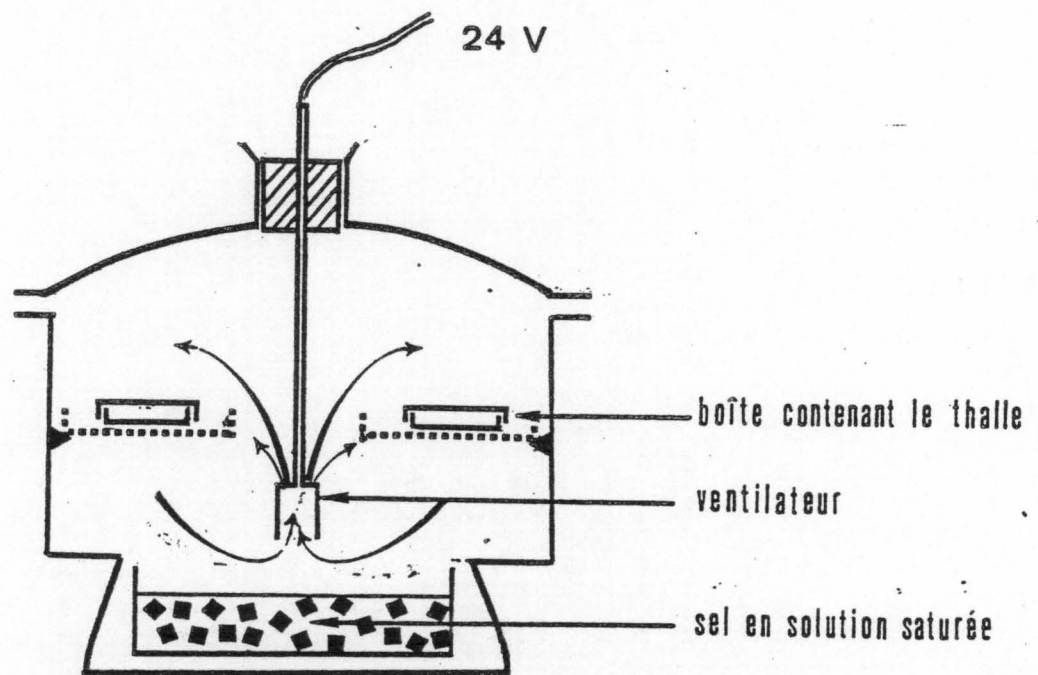


Fig. 2 - Schéma du dispositif expérimental employé pour maintenir les spores dans des humidités relatives variées.

relatives (HRth) correspondantes pour une température de 20°C et celle réellement mesurée (HR réelle) grâce à un hygromètre à point de rosée (DEW POINT HYGROMETER EG/G MODEL 660).

Tableau 1

Sels utilisés \ HR exprimée en %	HRth	HR réelle
CaCl ₂	1	0,8
Na OH	5,5	5,7
H ₃ PO ₄	9	10,1
Li Cl, H ₂ O	12,5	11,9
Acétate de K	20	23
Mg Cl ₂ , 6H ₂ O	33	33
Na ₂ Cr ₂ O ₇ , H ₂ O	52	55
NaCl	76	75
H ₂ O	100	100

On a considéré qu'au bout de 20 jours l'équilibre hydrique s'était établi entre les spores et l'atmosphère. Rappelons que les microconidies de *Nectria* ne germent pas en l'absence d'eau liquide. Après cette période, le taux de germination des spores a été déterminé sur lame gélosée et pour la suite des expériences, seules les humidités relatives pour lesquelles la viabilité était supérieure à 40% ont été retenues. Les boîtes de Pétri ont été enfermées dans des sachets de polyéthylène dès leur sortie des dessiccateurs et ensuite irradiées.

3.3. Mesure de la teneur en eau des spores de champignon

Pour tracer une courbe de sorption traduisant l'équilibre qui s'établit entre l'humidité de l'air et celle des spores il est nécessaire de mesurer la teneur en eau de celles-ci. Dans le cas des graines, on détermine leur teneur en eau en pesant les graines qui ont séjourné à une humidité relative déterminée avant et après déshydratation dans un four à 130°C. Pour ce qui est des spores de *Nectria haematococca*, tracer ce type de courbe implique que l'on dispose d'une dizaine de mg de conidies sèches et cela est difficilement réalisable. En supposant que les spores d'un autre champignon filamenteux auraient un comportement

assez semblable à celles de *N. haematococca*, nous avons défini la courbe de sorption des spores de *Penicillium caseicolum* qui sont produites industriellement et que les laboratoires ROGER ont eu l'amabilité de nous fournir. L'amas de spores se présente sous forme d'un "gâteau". A la réception, elles ont été débarrassées de leur eau par lyophilisation avant d'être placées pendant 20 jours dans des enceintes à humidité relative contrôlée. Au bout de ce temps, elles ont été pesées (poids frais = PF) puis desséchées dans un four à 130°C pendant 18 heures. Après refroidissement, elles ont été à nouveau pesées (poids sec = PS). Pour une humidité relative donnée, la différence entre les deux poids (PF-PS) correspond à la teneur en eau des spores qui est rapportée au poids sec ($\frac{PF-PS}{PS}$).

4 - METHODES DE TRAITEMENTS MUTAGENES

4.1. Traitement par les rayons UV

Les échantillons à traiter ont été irradiés sous une lampe germicide qui délivre des rayons UV de longueur d'onde 254 nm avec une intensité de 12000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ à 15 cm de la source. L'énergie reçue par le champignon a été mesurée grâce à une cellule "photodiode silicone" reliée à un radiomètre et le matériel biologique a été placé à une distance de la source telle qu'il reçoive 100 ergs par seconde et par mm^2 . Des doses d'irradiation variées ont été obtenues en modifiant le temps d'exposition, les valeurs retenues pour établir les courbes étant comprises entre 1000 et 5000 ergs par mm^2 (Tableau 2).

Tableau 2

Dose UV en ergs/ mm^2	1000	2000	3000	4000	5000
Temps d'exposition en secondes	10	20	30	40	50

Les UV sont peu pénétrants ; afin d'obtenir une efficacité optimale du traitement nous avons irradié les spores après les avoir étalées uniformément sur milieu gélosé comme décrit précédemment (§ 2.2.2). Aussitôt après irradiation, les boîtes ont été placées à l'obscurité pour éviter le phénomène de photoréactivation (ECKART et HAYNES, 1977 ; HAYNES et KUNZ, 1980).

Aucune autre méthode n'a été essayée avec les rayons UV, la priorité étaient donnée aux rayons γ .

4.2. Traitement par les rayons γ

4.2.1. Description de l'appareil utilisé

Le champignon a été irradié dans un irradiateur γ contenant 6 sources de ^{60}Co (Photo 2) dont l'activité totale était de 12440 Ci le 1/1/1978. Au 1/1/1981 le débit moyen dans une boîte de Pétri de 12 cm de diamètre placée au centre de la matrice est de 572 kR.h^{-1} (Dosimétrie de FRICKE au sulfate ferreux) (BACQ et ALEXANDER, 1966). La dose d'irradiation est déterminée par la durée de l'exposition en tenant compte de la décroissance radioactive, 1% par mois environ.

4.2.2. Différents modes de traitement

4.2.2.1. Spores étalées sur milieu gélosé

Afin de procéder dans les mêmes conditions que pour le traitement UV, des spores étalées sur milieu gélosé ont été irradiées selon la méthode décrite précédemment (§ 2.2.2).

4.2.2.2. Spores en suspension dans l'eau

L'irradiation a eu lieu sur une suspension de spores convenablement diluée. L'étalement sur boîtes de Pétri a été effectué après le traitement. Les spores provenaient de cultures sur cellophane âgées de 3 jours. Par rapport à la méthode précédente, celle-ci supprime l'interférence possible entre le milieu nutritif et le rayonnement.

4.2.2.3. Irradiation des spores *in situ*

Les thalles ont été cultivés sur cellophane et l'irradiation a porté sur la culture entière en présence de substrat gélosé (mutagenèses effectuées sur des spores dans l'air ambiant, l'air reconstitué, l'oxygène et l'azote) ou non (mutagenèses sur des spores déshydratées). L'âge des spores différait suivant le conditionnement avant irradiation ; elles pouvaient avoir : 3 jours (air ambiant), 5 jours (air reconstitué et oxygène), 6 jours (azote), 23 jours (déshydratation) ou 30 jours (conservation dans l'air ambiant). Cette méthode a l'inconvénient de nécessiter des manipulations indépendantes (mise en suspension et évaluation du nombre de spores avant l'étalement) pour chaque traitement particulier.

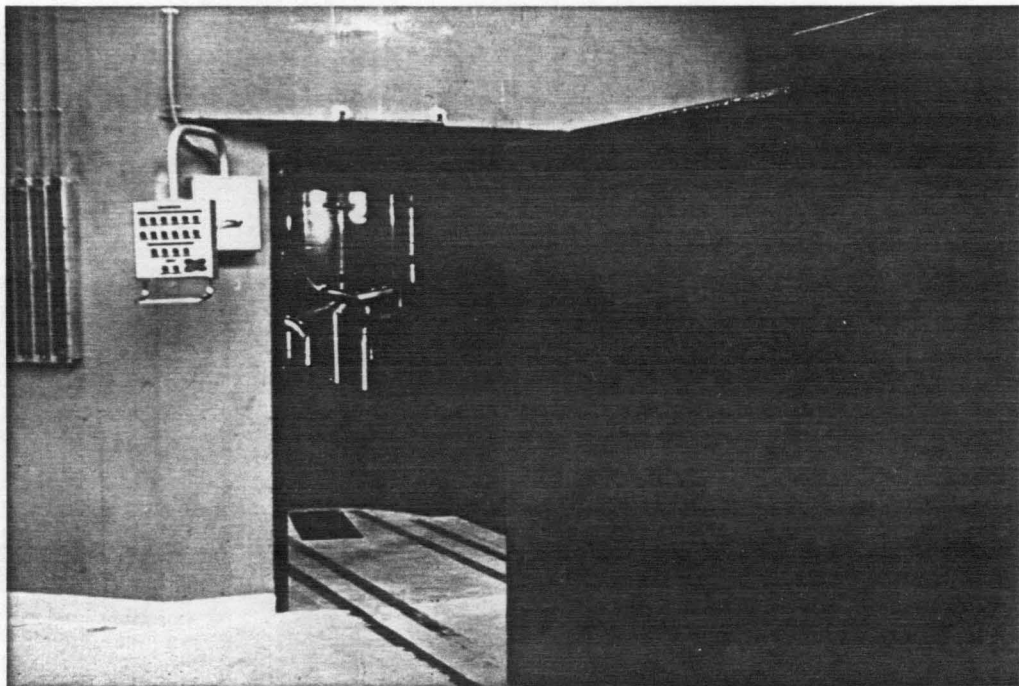


Photo 2 - Irradiateur γ

Les tubes de transfert des sources de ^{60}Co sont visibles au centre de l'appareil (flèche). Pendant l'irradiation celui-ci est fermé par une porte de plomb de 2 m d'épaisseur.

V - COURBES DE SURVIE

Pour chaque dose d'irradiation la lecture s'effectue sur 6 boîtes et chaque manipulation est répétée 3 fois. Sur chaque boîte de PDA + T, on a étalé 0,1 ml d'une suspension titrant aux alentours de 1000 spores par ml. Etant donné les erreurs inhérentes aux manipulations lors des comptages et pipetages, le nombre de spores réellement étalées, n'est pas de 100. On peut estimer ce nombre réel en comptant les thalles qui se sont développés en absence de tout traitement ionisant et déterminer le facteur de normalisation (fn) qui ramène l'ensemble des valeurs expérimentales à une valeur de référence 100. On a calculé également le nombre moyen de thalles qui se sont développés pour une dose donnée. Cette valeur a été corrigée par le facteur de normalisation. Pour chacune de ces valeurs, l'intervalle de confiance de la moyenne a été calculé pour un coefficient de sécurité de 0,95. Afin de faciliter la représentation des courbes nous avons employé une échelle semi-logarithmique avec, en abscisse, les doses (exprimées en ergs par mm^2 pour les UV et en kiloroentgens pour les rayons γ) et en ordonnée, la fréquence de survivants S.

6 - SELECTION DE MUTANTS

6.1. Mutants de coloration

De nombreuses souches productrices de pigments rouges ont été isolées à partir de la souche sauvage S1 ; celle-ci étant de couleur blanc à gris, il est facile de repérer l'apparition de ce changement de coloration.

6.2. Mutants stériles

Dans la souche sauvage, les périthèces sont de teinte rouge orangée, bien visibles au bout de 20 jours. L'observation a lieu à la loupe et nous avons estimé que les thalles qui ne portaient pas de périthèce au bout d'un mois étaient stériles. Parmi les thalles qui ont été comptés comme fertiles, certains avaient pu produire des périthèces vides et être de ce fait stériles (BABAI-AHARY, 1982). La fréquence des mutants stériles a donc été légèrement sous-estimée. La recherche de mutants stériles a souvent été réalisée sur les boîtes qui ont servi à dénombrer les mutants rouges. Certaines des mutations entraînant la coloration rouge s'accompagnent de stérilité, des thalles rouges ont donc été également comptés dans les stériles.

6.3. Mutants résistants aux inhibiteurs

Six inhibiteurs ont été testés pour leur action fongistatique (§ 2.1). Les spores irradiées sur les thalles selon le protocole décrit (§ 4.2.2.3) ont été mises en suspension et étalées à raison de 10^5 conidies par boîte de Pétri, le milieu contenant une dose de produit au moins deux fois supérieure à la dose inhibitrice déterminée.

6.4. Révertants de mutants auxotrophes

Les mutants auxotrophes de *Nectria haematococca* ne peuvent croître sur le milieu minimum (composition § 2.1). Des "révertants" prototrophes ont été recherchés à partir de certains de ces mutants ; pour cela, des microconidies ont été prélevées sur des thalles auxotrophes cultivés sur milieu convenablement supplémenté, puis irradiées selon le protocole décrit précédemment (§ 4.2.2.3) et étalées sur milieu minimum, à raison de 10^5 spores par boîte de Pétri.

7 - TAUX DE MUTATIONS

7.1. Mutants de coloration et mutants de stérilité

Sur milieu PDA + T, des suspensions permettant d'avoir 50 thalles par boîte ont été étalées (24 boîtes par traitement élémentaire). Le nombre de conidies étalées tient compte du nombre de survivants escomptés pour la dose d'irradiation utilisée et de la viabilité des spores lorsqu'elles ont été déshydratées. Le nombre de mutants rouges ou stériles a été estimé globalement sur toute la série de boîtes et il a été rapporté au nombre total de thalles qui ont poussé sur les mêmes boîtes.

7.2. Mutants résistants aux inhibiteurs

Un grand nombre de spores irradiées (environ 10^7) a été étalé sur chaque boîte de milieu PDA additionné d'inhibiteur. Tous les thalles qui ont poussé entre 4 et 7 jours ont été comptés comme mutants résistants. Le nombre de mutants résistants de l'ensemble des boîtes d'un essai a été rapporté au nombre total de thalles qui se seraient développés sur un milieu sans inhibiteur et pour une dose d'irradiation donnée. Afin de déterminer celui-ci, un aliquot de la suspension irradiée a été étalé sur milieu PDA après dilution pour avoir environ 100 spores par boîte.

CHAPITRE II : EFFET LETHAL DES RADIATIONS

1 - ACTION DES RAYONNEMENTS UV

Des spores de 3 jours ont été étalées sur boîtes de Pétri contenant du milieu PDA + T à raison de 100 spores par boîte et ont été exposées à des doses allant de 0 à 5000 ergs par mm^2 . Au bout de 5 jours, on a compté le nombre de thalles qui se sont développés.

La Figure 3 montre la fréquence des survivants en fonction de la dose d'UV. L'allure générale de la courbe est celle obtenue pour de nombreux organismes. La sensibilité d'un organisme aux rayons UV est définie par la dose de rayonnement qui tue 37% de la population (DL37) (HAYNES et ECKARDT, 1979 ; GILET, 1970). Plus la DL37 est grande, plus l'organisme est résistant. La comparaison de plusieurs DL37 montre que par exemple, *N. haematococca* est plus sensible que du pollen de Lis (BREWBAKER et al., 1965) et plus résistant que des cellules de levure (ECKARDT, 1980).

2 - ACTION DES RAYONNEMENTS γ

2.1. Choix d'un protocole pour l'irradiation des spores

2.1.1. Irradiation des spores dans trois conditions différentes

Les spores âgées de 3 jours ont été irradiées dans trois conditions différentes. Elles sont : soit étalées sur le milieu PDA + T, soit *in situ* sur le thalle, soit en suspension dans l'eau distillée stérile (chap. I, § 4.2.2). Dans les deux premiers cas les spores sont irradiées dans l'air ambiant.

La Figure 4 résume les résultats obtenus. Il apparaît que les spores en suspension dans l'eau ou étalées sur milieu gélosé ont une radiosensibilité très voisine ; celle-ci est supérieure à celle des spores irradiées *in situ*, c'est-à-dire que pour une même dose d'irradiation, les fréquences des survivants sont plus faibles dans les deux premières conditions que dans la troisième. La différence de sensibilité des spores à l'irradiation pourrait être due à l'état

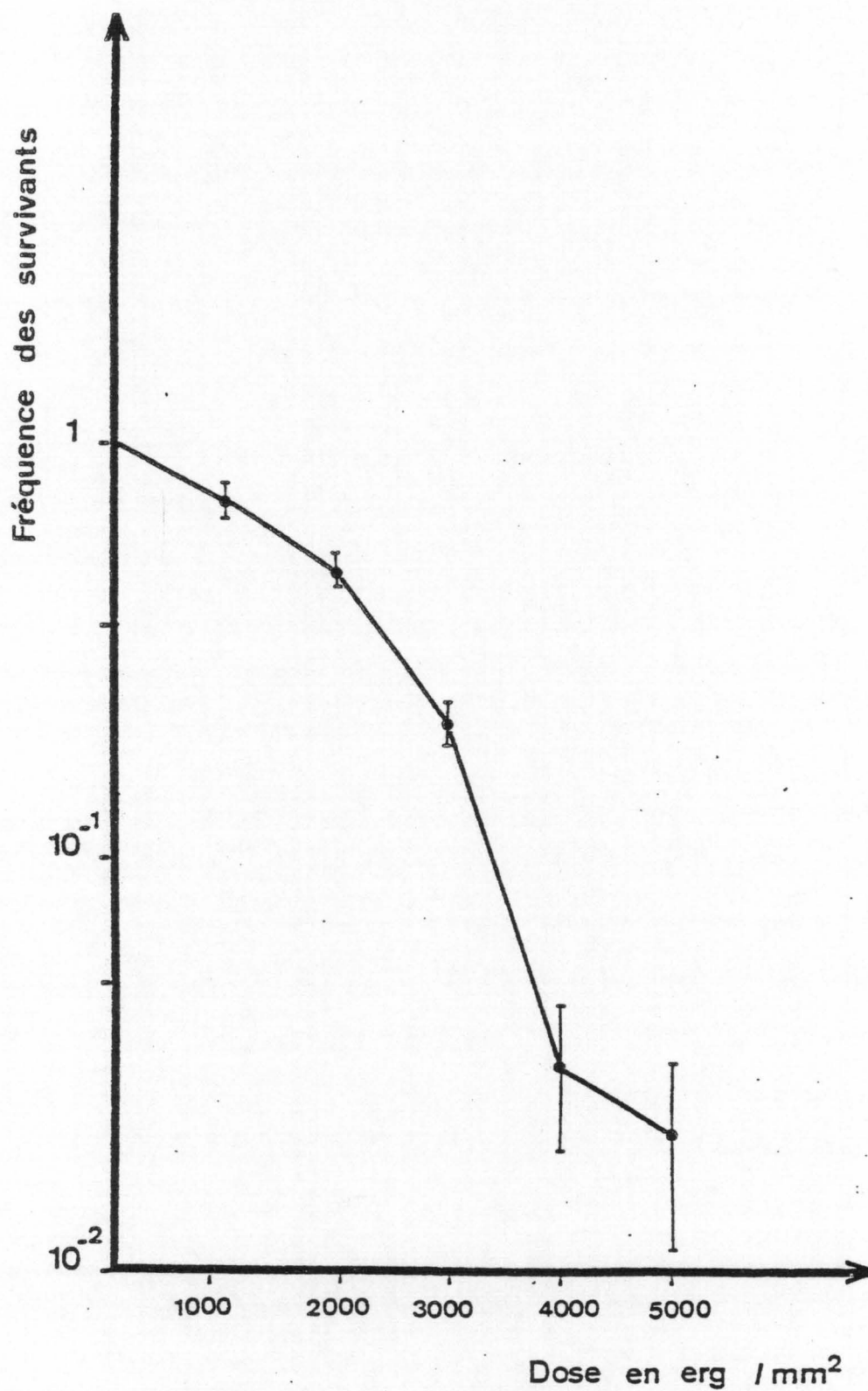


Fig. 3 - Courbe de survie de spores de 3 jours après traitement aux rayons UV
(courbe 1)

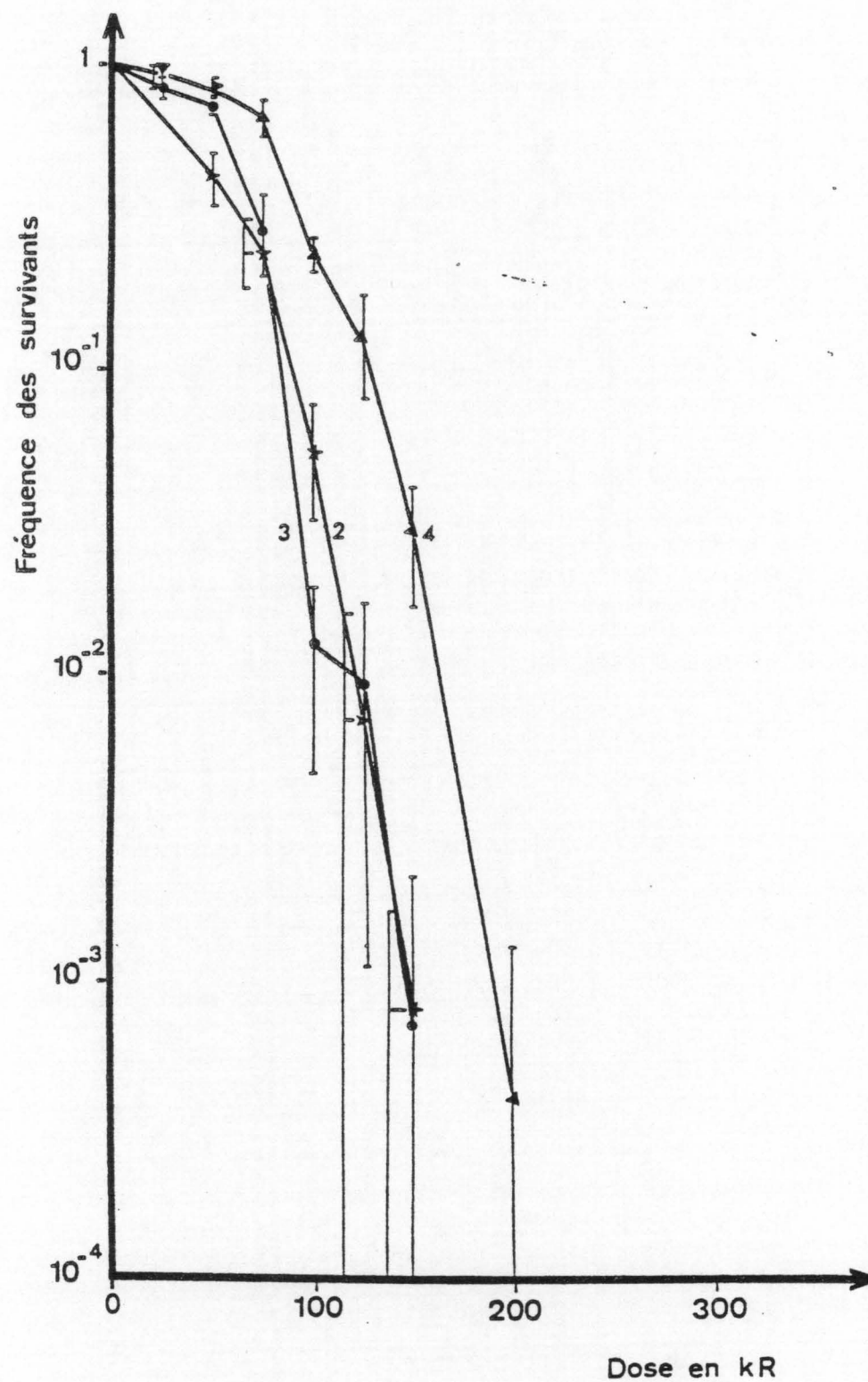
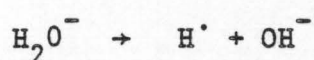
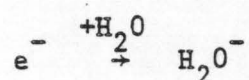
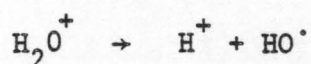
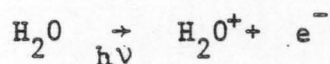


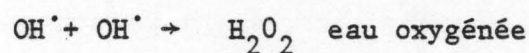
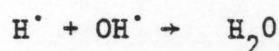
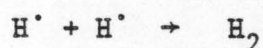
Fig. 4 - Courbes de survie des spores de 3 jours traitées dans 3 conditions différentes par les rayons γ :

- spores étalées sur gélose (- ✱ , courbe 2) ;
- spores en suspension dans l'eau (- ● , courbe 3) ;
- spores *in situ* (- ▲ , courbe 4).

plus ou moins hydraté des spores. En effet dans les deux premiers protocoles, les spores ayant séjourné en milieu aqueux étaient imbibées d'eau ; dans le troisième, elles étaient vraisemblablement moins hydratées. Or sous l'action des rayonnements γ , l'eau subit la radiolyse. Ce processus peut être résumé par les réactions suivantes :



D'une part, les radicaux libres $\text{H}^\cdot$ et $\text{OH}^\cdot$ peuvent se combiner entre eux pour donner des produits stables



Parmi ces produits, seule l'eau oxygénée est toxique. D'autre part, les produits de radiolyse de l'eau pouvant se combiner avec l'oxygène s'il est présent pour former des radicaux hydroperoxydes $\text{HO}_2^\cdot$ toxiques pour les cellules (FRIDOVICH, 1978).



Ceux-ci ont une forte réactivité chimique et peuvent participer à des réactions d'oxydation susceptibles d'altérer les parties glucidiques du DNA, entraînant la rupture des chaînes carbonées. Si elles ne sont pas réparées, ces altérations aboutissent à la mort des cellules. Si les systèmes de réparation interviennent, la lésion peut évoluer vers une mutation lorsque la structure initiale n'est pas reconstituée (WITKIN, 1966 ; HAYNES et KUNZ, 1980).

Parmi les trois protocoles examinés, ceux qui impliquent soit l'étalement de spores sur gélose, soit leur mise en suspension dans l'eau ne conviennent pas pour l'étude de l'effet de la déshydratation.

De plus, alors que l'effet de l'irradiation sur la survie est le même, si le traitement est effectué sur spores étalées sur gélose ou en suspension dans l'eau, la première méthode entraîne des altérations du phénotype de *Nectria* avec stérilité des thalles qui sont dus vraisemblablement à une modification du milieu gélosé par l'irradiation (MUCCHIELLI, 1975 ; MUCCHIELLI et SAINT LEBE, 1975).

Influence de l'âge des spores sur la radiosensibilité

Dans les protocoles des manipulations en atmosphères gazeuses différentes on a utilisé des spores jeunes (âgées de 3 à 6 jours) alors que pour les traitements de déshydratation elles étaient plus âgées (23 jours). Pour comparer ultérieurement les résultats obtenus dans ces deux conditions, nous avons examiné l'influence de l'âge des spores 3 et 30 jours sur leur radiosensibilité (Figure 5).

Il apparaît que les spores plus âgées sont plus sensibles. Le même fait a été observé après irradiation aux rayons γ par CHOU et al., (1970) sur les conidies de *Penicillium expansum* et par MALLA et al., (1967) sur des spores de *P. viridicatum* et *Aspergillus flavus*. La différence de radiosensibilité notée pour des spores d'âge différent implique que pour chaque type de manipulation, on dispose d'un témoin approprié.

2.2. Influence de la composition de l'atmosphère sur la radiosensibilité des microconidies

La radiosensibilité des spores a été étudiée lorsqu'elles étaient placées dans des atmosphères différentes : air ambiant (A), air reconstitué (AR = 1/5 d'oxygène + 4/5 d'azote), oxygène (O_2) et azote (N_2).

Dans un premier temps, nous avons comparé la radiorésistance des spores dans l'air ambiant et l'air reconstitué. Les courbes correspondantes (7 et 8 ; Figure 6) n'apparaissent pas différentes. De ce fait, le témoin choisi pour la comparaison avec les autres conditions (O_2 et N_2) est l'air reconstitué.

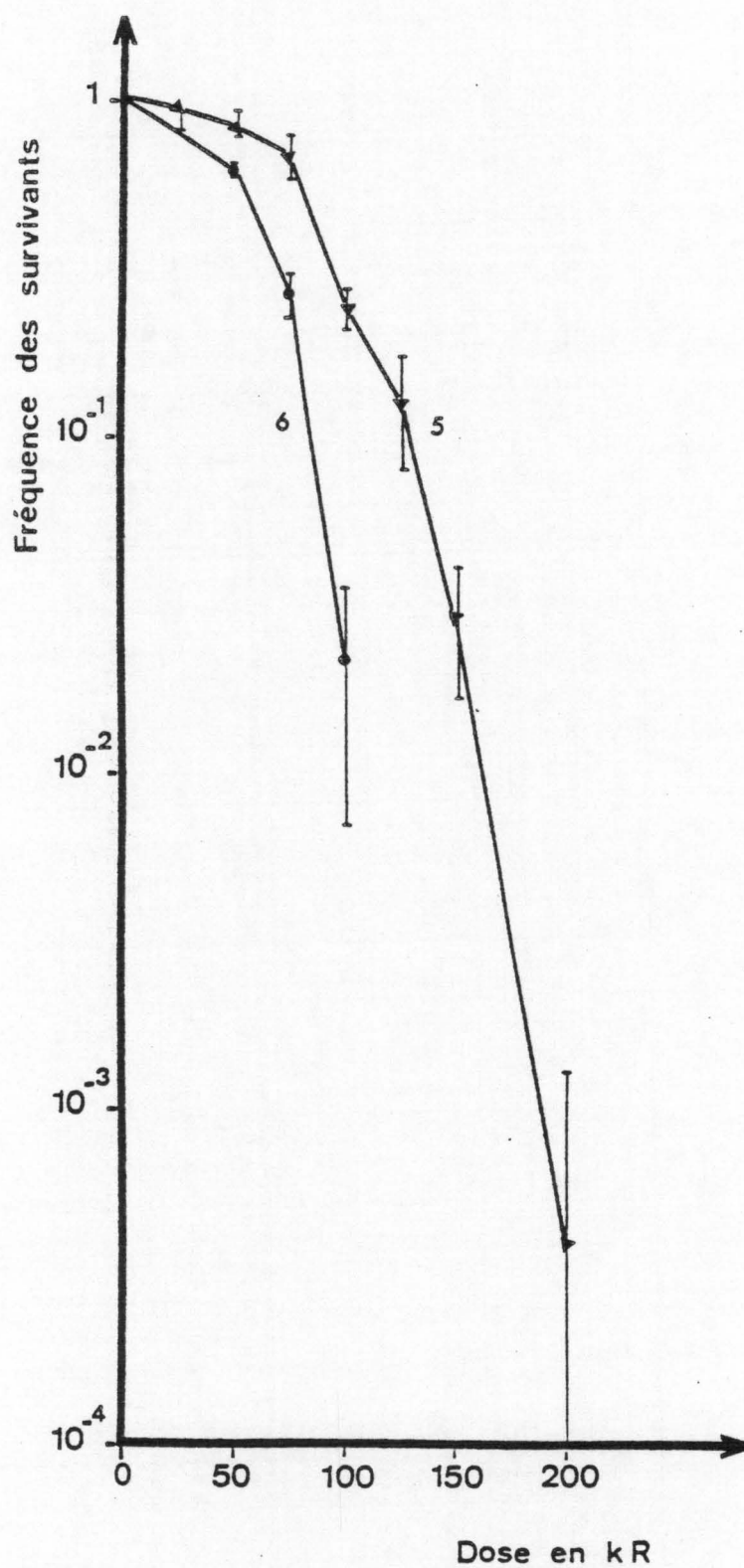


Fig. 5 - Courbes de survie des spores de 3 jours (- ▲, courbe 5) et 30 jours (- ●, courbe 6) traitées par les rayons γ .

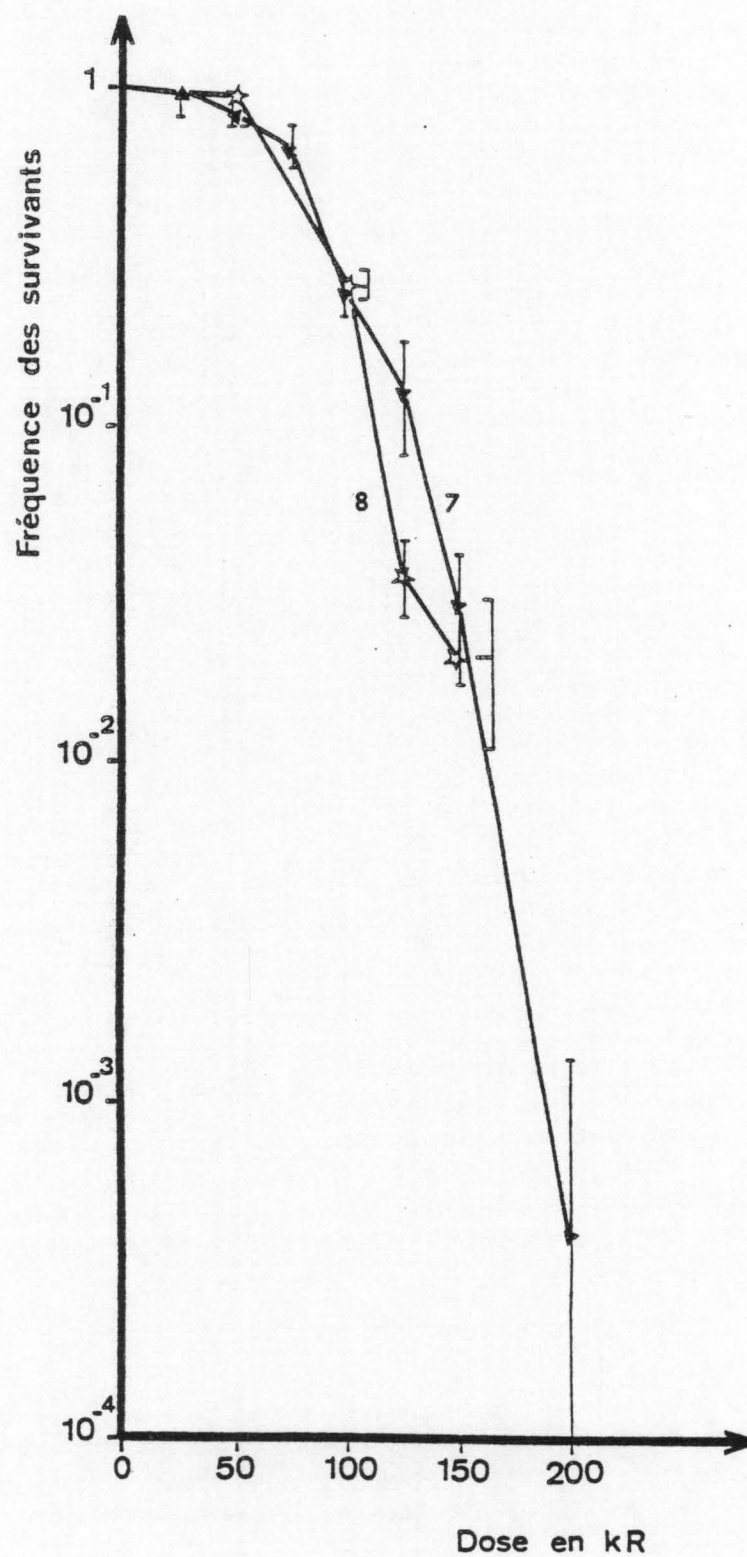


Fig. 6 - Courbes de survie après irradiation γ des spores de 3 jours placées dans l'air ambiant (- Δ , courbe 7) et de spores de 5 jours placées dans l'air reconstitué (- $\star$, courbe 8).

2.2.1. Influence de la quantité d'oxygène dans l'atmosphère

De la comparaison des courbes 8 et 9 (Figure 7), il apparaît que pour une dose de 50 kR, la radiosensibilité sous oxygène est plus grande que dans l'air reconstitué. Mais, pour des doses égales ou supérieures à 100 kR, il n'y a plus de différence entre les deux conditions.

L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer la plus grande résistance vis-à-vis des faibles doses des spores placées dans l'air reconstitué, par rapport à l'oxygène, est la suivante : quand l'oxygène est en très grande quantité (100%) il jouerait aux faibles doses, inférieures à 100 kR, un rôle de révélateur des altérations provoquées par le rayonnement en favorisant des réactions (§ 2.2.3) conduisant à la mort cellulaire. Au-delà d'un certain seuil (100 kR), la différence de teneur en oxygène entre les deux atmosphères (20% et 100% d'O₂) n'influerait plus sur la radiosensibilité des spores, le nombre de lésions étant suffisamment grand.

2.2.2. Radiosensibilité des spores en anoxie

La courbe de survie des spores placées sous azote (courbe 10 - Figure 7) a un tracé assez irrégulier bien que sa forme générale corresponde à celle des courbes précédemment étudiées. Cette hétérogénéité peut être vraisemblablement attribuée à une élimination incomplète et irrégulière de l'oxygène. Si on compare la courbe 10 avec les courbes 8 et 9 (Figure 7), on peut dire qu'une même fréquence de survivants est obtenue pour une dose beaucoup plus importante quand les spores sont irradiées sous N₂. Dans cette condition, les spores ont donc une plus grande radorésistance que sous O₂. On remarque également qu'au-delà de 100 kR pour la courbe 9 et de 200 kR pour la courbe 10, la courbure du tracé est similaire, ce qui pourrait signifier qu'à partir d'une certaine dose seuil les spores ont le même comportement, qu'elles soient placées sous atmosphère d'oxygène ou d'azote.

2.2.3. Commentaires des résultats obtenus

L'effet sensibilisateur de O₂ est bien connu car de nombreux auteurs ont montré que la sensibilité d'organismes aussi divers que des graines (CALDECOTT, 1961 ; CALDECOTT et NORTH, 1961 ; NILAN et al., 1962) ou des microorganismes (ALPER et HOWARD-FLANDERS, 1956 ; POWERS et TALLENTIRE, 1968) est fortement augmentée en présence d'oxygène ; c'est ce qu'on appelle l'effet oxygène dont l'importance est mesurée par l'OER (oxygène enhancement ratio) dans la littérature anglo-saxonne.

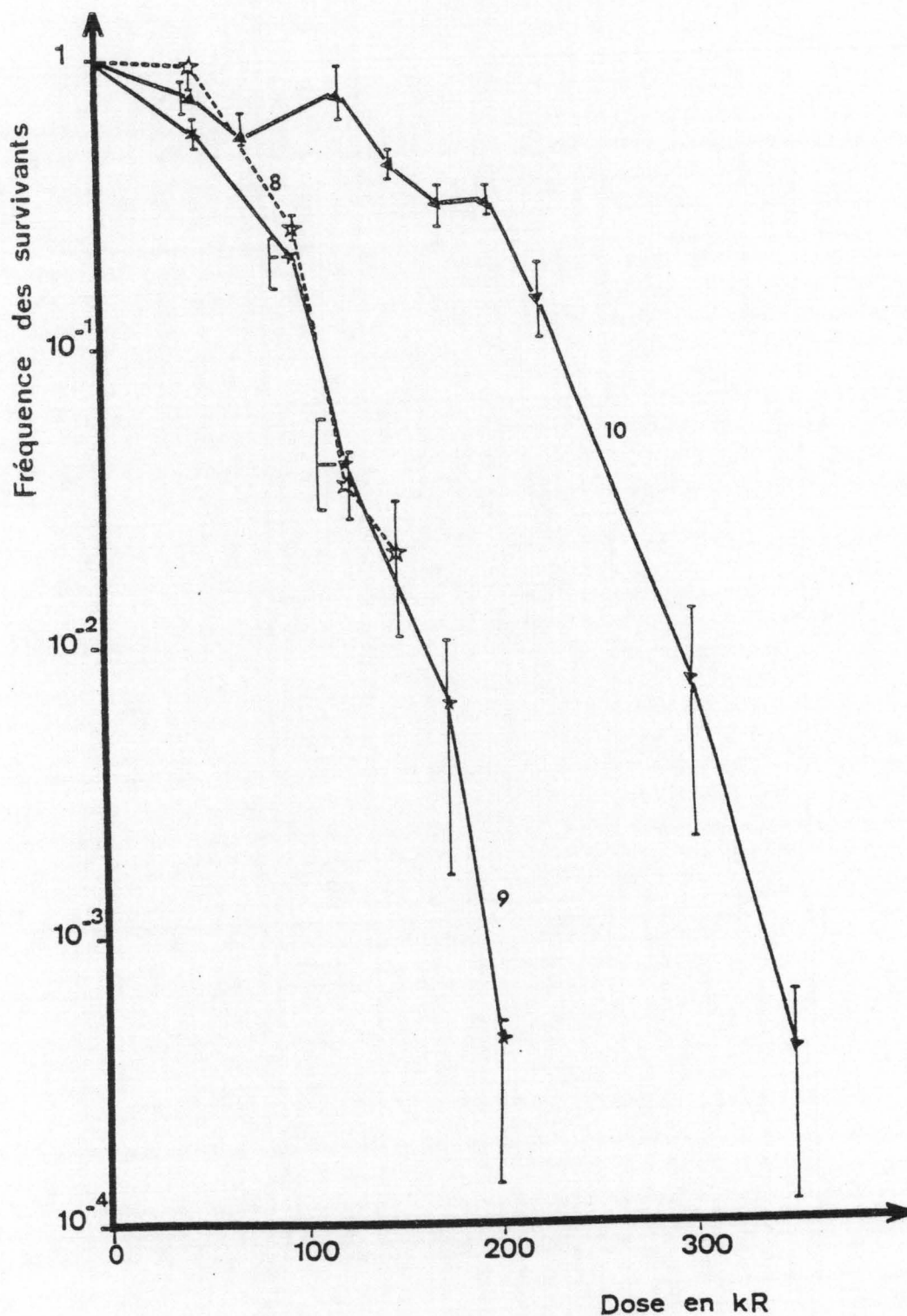
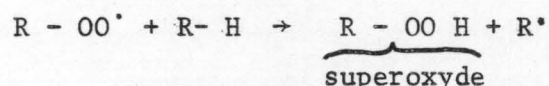


Fig. 7 - Courbes de survie des spores conservées dans des atmosphères de compositions différentes et irradiées par les rayons γ :

- spores de 5 jours placées dans l'air reconstitué ($-\star$, courbe 8) ;
- spores de 5 jours placées dans une atmosphère contenant 100% d'oxygène ($-\star$, courbe 9) ;
- spores de 6 jours placées dans une atmosphère contenant 100% d'azote ($-\blacktriangle$, courbe 10).

Généralement on interprète l'effet néfaste de l'oxygène sur des cellules irradiées par l'interaction qui existe entre les molécules d'O₂ et les radicaux libres formés par l'ionisation du matériel. Les réactions qui ont lieu dans la cellule sont les suivantes :

- quand le matériel est hydraté, les radicaux H[•] et OH[•] formés par radiolyse réagissent avec O₂ pour former des composés toxiques comme nous l'avons décrit (§ 2.1.1) ;
- les radicaux libres instables R[•] peuvent réagir avec O₂ pour former des superoxydes



- les rayonnements ont également une action directe sur la molécule d'O₂ en réagissant avec les électrons pour donner naissance à des ions superoxydes O₂⁻ :
 $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$ (FRIDOVICH, 1978).

2.3. Influence de la teneur en eau de l'atmosphère

Pour tester la radiosensibilité des microconidies en fonction de leur teneur en eau, il était nécessaire d'obtenir des spores ayant des degrés d'hydratation variables. Divers auteurs sont parvenus à modifier la teneur en eau d'organes végétaux variés en les plaçant dans des ambiances d'humidité relative contrôlée, après dessiccation préalable plus ou moins poussée.

Différentes méthodes de déshydratation ont été testées.

2.3.1. Choix d'une méthode de déshydratation des spores

2.3.1.1. Lyophilisation des spores

- Des thalles de 2 jours cultivés sur cellophane ont été congelés à - 30°C. La viabilité des spores récoltées à partir de tels thalles était de 0,2% et devenait nulle après lyophilisation.

- Des culots de spores obtenues à partir de thalles de 24h cultivés sur cellophane ont été congelés à - 30°C. Dans ce cas 22% des spores ont germé mais elles n'ont pas survécu à la lyophilisation.

Pour pallier à la létalité des spores après lyophilisation, nous avons utilisé des protecteurs qui avaient été employés avec succès pour *Penicillium caseicolum* et d'autres organismes (GOLDBLITH et al., 1975).

- Utilisation des protecteurs de lyophilisation

Le tableau 3 résume les pourcentages de germination obtenus après congélation et lyophilisation de culots de spores en fonction du protecteur utilisé et de l'âge des spores.

Tableau 3

Age des spores	Milieu dans lequel sont placées les spores	Congélation (-30°C) + lyophilisation	Congélation (-80°C) + lyophilisation
spores 24h	eau	0	0,9
	glycérol	0	0
	lait	0,1	0,2
	malt	48	34
spores 48h	eau	3	3
	lait	-	-
	malt	10	14
spores 72h	eau	1,5	1,5
	lait	51	56
	malt	52	40
spores 120h	eau	1	4
	lait	21	9
	malt	47	13

Il ressort de ces données que le lait et le malt ont un effet protecteur par rapport à l'eau. Les spores de 24h semblent plus fragiles et il paraît plus prudent de travailler sur des spores de 3 jours.

Néanmoins, la viabilité obtenue n'a pas dépassé 50%, donc ce protocole n'a pu être retenu. Un autre argument pour l'abandonner était aussi que l'adjonction de substances complexes peut interférer avec la radiosensibilité des spores (WILSON et POWERS, 1970).

2.3.1.2. Déshydratation des spores sur silicagel

Les spores ont été mises en présence de silicagel jusqu'à dessèchement complet de la gélose. Après réhydratation, aucune spore n'a germé. Le système a donc été abandonné.

Les deux méthodes de déshydratation essayées entraînant une perte considérable de viabilité des spores, nous avons tenté d'adapter aux conidies le procédé utilisé pour modifier la teneur en eau des graines : pour cela, elles ont été placées pendant un certain temps dans des enceintes à humidités relatives contrôlées variées.

2.3.1.3. Déshydratation des spores *in situ* en présence de solutions saturées de sels

Nous avons d'abord étudié l'effet de la conservation (2, 4, 10, 20, 31 jours) sur la viabilité des spores placées dans des humidités relatives de 1%, 40%, 100%. Ces valeurs ont été choisies parce que dans le cas des graines d'*Hibiscus* (MAHAMA, 1980) elles correspondent à trois états différents de l'eau cellulaire qui ont été corrélés à la modification de la radiosensibilité. Les résultats de ces expériences sont très fragmentaires car à la suite d'une erreur de manipulation, les données obtenues pour une humidité relative de 1% n'ont pu être exploitées et les spores que l'on a cru mettre à 40% d'humidité relative ont, en réalité, séjourné à 75% d'humidité relative.

Néanmoins, le tableau 4 montre qu'au bout d'un mois de conservation dans des atmosphères de forte humidité, la faculté germinative des spores était très peu modifiée. De ce fait, nous avons fixé à 20 jours le temps d'équilibration en atmosphère d'humidité relative variable.

Tableau 4 - Pourcentage de germination des spores conservées de 2 à 31 jours dans des humidités relatives variées

HR	Temps de conservation en jours	2 jours	4 jours	10 jours	20 jours	31 jours
75%	1° essai	-	95%	89%	87%	62%
	2° essai	95%	96%	98%	96%	93%
	moyenne	95%	95%	94%	92%	77%
100%	1° essai	96%	97%	100%	99%	98%
	2° essai	99%	98%	98%	97%	95%
	moyenne	98%	98%	99%	98%	96%

Les résultats obtenus lorsque les spores étaient conservées dans des humidités relatives inférieures à 75% sont consignés dans le tableau 5.

Tableau 5 - Pourcentage de germination des spores conservées 20 jours dans des humidités relatives variées

HR	5,5%	9%	12%	23%	33%	55%
% de germination après 18h à 20°C	0,5 à 1%			8%	71%	45%

Nous avons noté que la déshydratation entraîne un allongement du délai d'émission du tube germinatif. Au bout de 14 heures une fraction seulement des spores déshydratées a germé alors que des spores fraîchement récoltées germent en 6 heures; il faut attendre 18 heures pour compter la totalité des spores viables.

Les résultats mentionnés dans le tableau 5 indiquent que le taux de germination diminue lorsque les spores sont placées dans des atmosphères de plus en plus sèches. Pour la suite des expériences nous n'avons conservé que les humidités relatives pour lesquelles le taux de germination était supérieure à 40%. Les conidies ont donc été conservées à 33%, 55%, 75% et 100% pendant 20 jours. Cependant, il est regrettable de ne pas avoir étudié l'effet d'une déshydratation plus poussée correspondant à un troisième état de l'eau dans la cellule. Cela aurait été éventuellement possible car les travaux de BARRAN (1980) sur une espèce

voisine : *Fusarium sulfureum* ont montré que 47% des conidies placées dans une atmosphère d'humidité relative égale à 5% sont encore viables après 10 jours. Malheureusement les essais d'irradiation avaient déjà été commencé sur les spores conservées à 75% et 100% pendant 20 jours ; le temps qui nous était imparti ne nous a pas permis de refaire une série complète de manipulations pour des temps plus courts.

2.3.2. Essais d'évaluation de la teneur en eau des spores fongiques

Avec *N. haematococca*, la détermination de la teneur en eau des spores par pesée aurait nécessité une culture à grande échelle non réalisable au laboratoire. Nous avons donc fait appel à un champignon cultivé industriellement : *Penicillium caseicolum*. La Figure 8 présente la courbe de sorption établie avec les spores de *Penicillium* (courbe a). Elle est comparée avec des courbes de sorption tirées de la bibliographie et concernant d'autres organismes : des spores de *Bacillus* sp. (WALDHAM, 1954) (courbe b), des levures (GUILBOT et LINDENBERG, 1960) (courbe c) et des graines d'*Hibiscus* (courbe d) (MAHAMA, 1980). La courbe de sorption de *Penicillium* a la même allure que celles publiées pour les organismes cités. Etant donné que les courbes de sorption établies pour des organismes aussi divers que des bactéries, des champignons unicellulaires et filamenteux, des plantes supérieures ont la même allure, il ne paraît pas invraisemblable de supposer que la teneur en eau des spores de *Nectria haematococca* évolue de manière analogue en fonction de l'humidité relative de l'air.

Dans ses travaux sur les graines d'*Hibiscus*, MAHAMA (1980) a défini 3 zones A, B, C, sur la courbe de sorption (courbe d) (Figure 8). Selon GUILBOT et LINDENBERG (1960), les 3 parties de la courbe de sorption correspondraient à 3 états de l'eau dans les cellules.

Zone A : pour des humidités relatives de l'air allant de 0 à 15%, l'eau de la cellule ne dépasse pas 8% du poids total de la graine et représente l'eau de constitution ou eau liée. Dans cet intervalle, plus l'humidité est faible, plus les graines sont sensibles.

Zone B : pour des humidités relatives de l'air comprises entre 15 et 55%, la teneur en eau des graines varie très peu, de 8 à 10%, et représente l'eau d'imbibition qui imprègne les colloïdes hydrophiles. C'est dans cette zone que MAHAMA trouve un pic de radiorésistance qui correspondrait à un état particulier de l'eau. Celle-ci serait faiblement adsorbée à la surface des macromolécules et

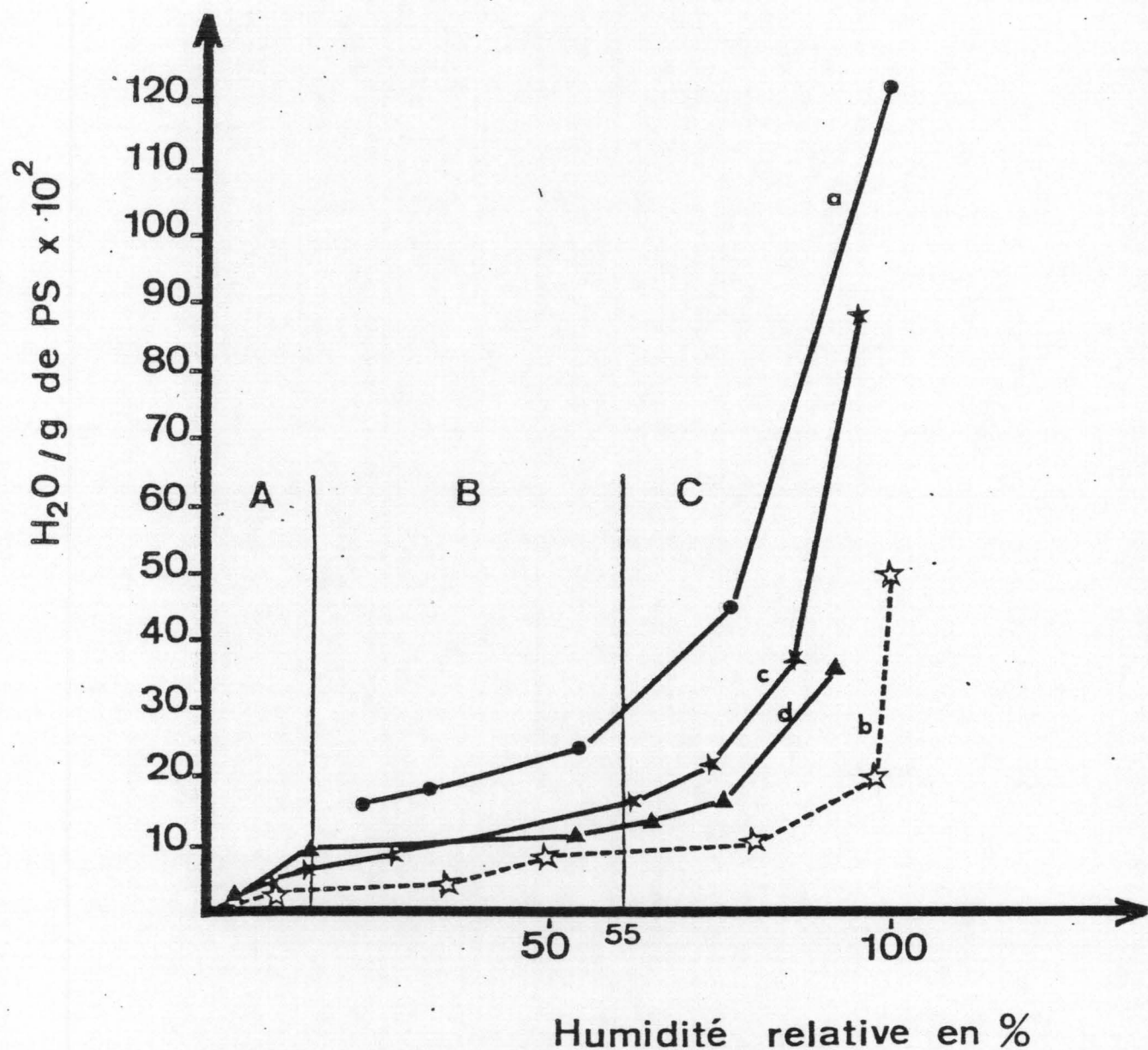


Fig. 8 - Courbes de sorption de divers organismes :

- spores de *Penicillium caseicola* (-●-, courbe a) ;
- spores de *Bacillus* sp. (---☆, courbe b) ;
- levures (-★-, courbe c) ;
- graines d'*Hibiscus* (-▲-, courbe d) sur laquelle sont définies 3 zones (A), (B), (C) :

(A) : eau liée

(B) : eau d'imbibition

(C) : eau libre

formerait une fine pellicule composée de 1 ou 2 couches de façon ordonnée avec des liaisons hydrogène entre les macromolécules. Ces pontages permettraient des transferts d'énergie d'ionisation de la chaîne cible vers d'autres chaînes du réseau, diminuant d'autant l'efficacité de l'irradiation, même en présence d'oxygène (BERGER et al., 1977).

Zone C : pour des humidités de l'air comprises entre 55 et 100% les graines contiennent de l'eau libre en plus de l'eau liée et de l'eau d'imbibition. La quantité maximale d'eau libre ne dépasse pas 40% du poids frais. Cette eau joue deux rôles vis-à-vis des radiations :

- en tant que solution, elle favorise la circulation et la recombinaison des radicaux libres et atténue ainsi beaucoup l'effet oxygène ;
- par contre, elle subit, la radiolyse et les radicaux $\text{OH}^\bullet$ et $\text{H}^\bullet$ se combinent à l'O_2 pour donner des produits toxiques pour la cellule (effet indirect des rayonnements).

Il semble que dans le cas de l'*Hibiscus*, le deuxième effet prédomine sur le précédent ce qui expliquerait l'augmentation brusque de la radiosensibilité à des humidités relatives élevées (MAHAMA, 1980).

Si nous admettons qu'il existe une analogie entre l'évolution de la teneur en eau des spores de *Nectria haematococca* et celle des graines d'*Hibiscus* en fonction de l'humidité relative de l'air, nous avons deux conditions d'humidité atmosphérique (100 et 75% d'humidité relative) pour lesquelles les spores contiennent de l'eau dans les 3 états et deux conditions (33 et 55% d'humidité relative) pour lesquelles elles renferment seulement de l'eau d'imbibition et de l'eau liée ; en revanche nous ne disposons pas de conditions correspondant uniquement à l'eau liée (humidité relative inférieure à 15%).

Pour tenir compte des différences dans les teneurs en eau de différents matériels en équilibre avec une même humidité relative de l'air (Figure 8), les comparaisons ont été faites en référence à l'humidité relative.

2.3.3. Influence de l'humidité relative de l'atmosphère sur la survie des spores de *N. haematococca*

Nous avons comparé d'abord l'effet des radiations sur des conidies provenant de deux types de cultures.

- 1° - des cultures en milieu gélosé placées en humidité relative saturante et irradiées en l'état après 30 jours de croissance ;
- 2° - des thalles cultivés 3 jours sur milieu gélosé recouvert de cellophane, puis transférés avec la cellophane dans un dessiccateur où l'humidité relative était de 100% et conservés ainsi 20 jours avant d'être irradiés.

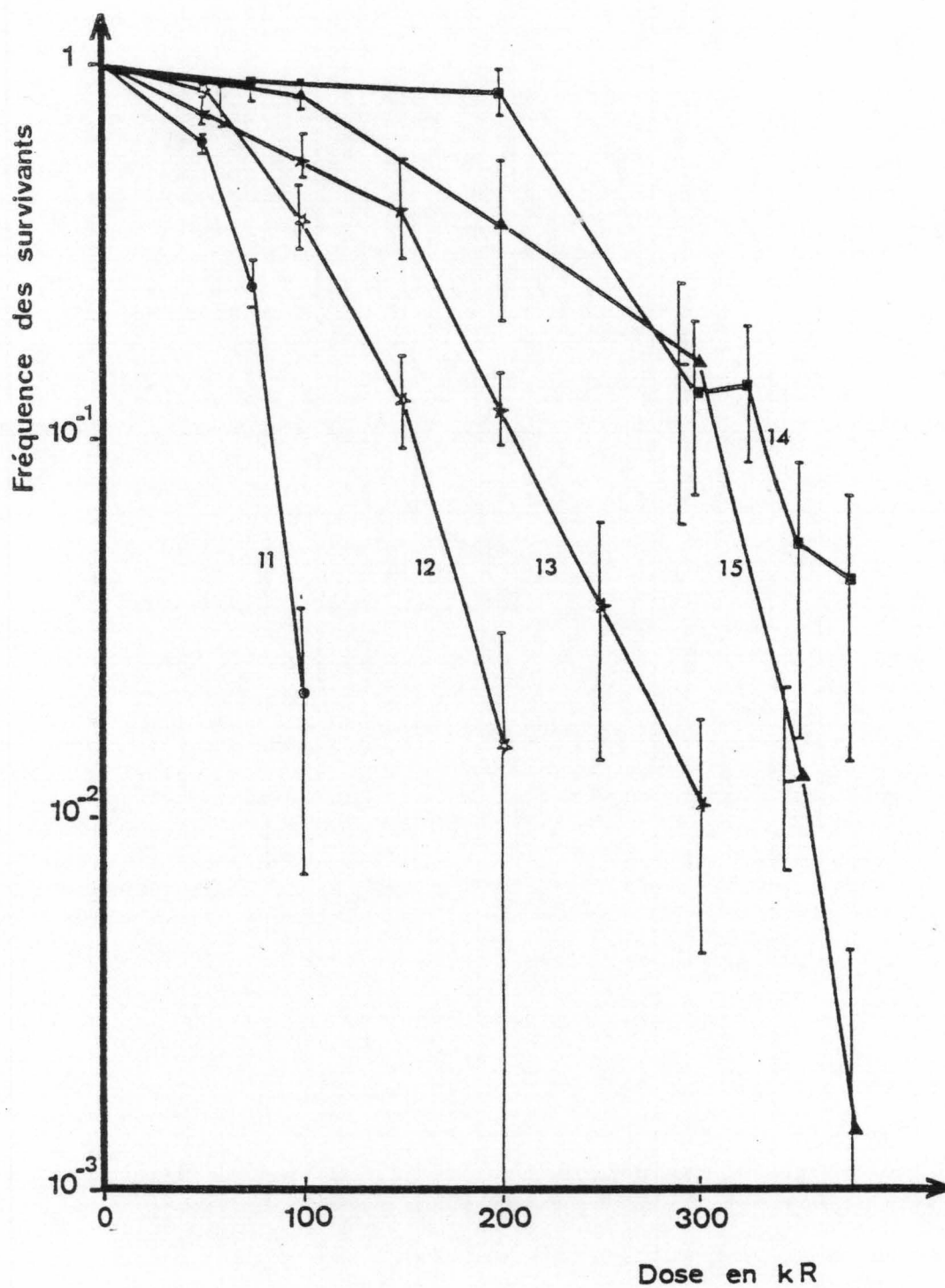


Fig. 9 - Courbes de survie des spores conservées dans des atmosphères d'humidité relative différente et traitées par les rayons γ :

- spores conservées pendant 30 jours dans l'atmosphère ambiante (● , courbe 11) ;
- spores conservées pendant 23 jours dans une atmosphère à 100% d'humidité relative (- ☆ , courbe 12), 75% (- ✕ , courbe 13), 55% (- ■ , courbe 14) et 33% (- ▲ , courbe 15).

Nous avons constaté que les spores conservées 20 jours en dessiccateur étaient plus résistantes (Figure 9 - courbes 11 et 12). Cette différence peut résulter de multiples facteurs : les spores traitées sont dans des états physiologiques différents, de par l'âge et l'état nutritionnel. En effet, dans le cas de thalles ayant séjourné dans le dessiccateur en absence de milieu nutritif, les spores auraient pu se trouver dans un stade de repos, alors que pour les cultures de 30 jours, la population sporale était vraisemblablement plus hétérogène, ne serait-ce que du point de vue de son activité métabolique. La présence du milieu a pu favoriser l'émission de nouvelles spores pendant un certain temps après l'ensemencement. Les courbes 12, 13, 14 et 15 (Figure 9) comparent la radiosensibilité de spores conservées 20 jours à des humidités relatives de 100%, 75%, 55% et 33%. Les courbes pour 33% et 55% sont confondues pour la dose de 300 kR, mais étant donné leur forme générale il semble qu'il y a une hétérogénéité, la courbe pour 55% étant au dessus de la courbe pour 33%. La radiorésistance des spores augmente quand l'humidité relative diminue de 100 à 75% puis atteint un palier si l'on considère que les courbes à 33% et 55% sont confondues ou, passent par un maximum pour décroître ensuite, si l'on admet que la courbe à 55% est au dessus de la courbe à 33%. Ces observations sont en accord avec celles concernant d'autres organismes. Sur des conidies de champignons on a déjà montré que la radiorésistance augmente quand l'humidité relative diminue (STAPLETON et HOLLAENDER, 1952 ; MILTENBERGER et BAUER, 1961 ; KLINGMÜLLER, 1962). Des valeurs constantes de radio-résistance pour les humidités relatives de 33 et 55% ont été aussi obtenues avec des spores de bactéries (POWERS et TALLENTIRE, 1963) tandis qu'avec des graines d'orge (CONGER et al., 1966) et de tomate (SILVY, 1968) on a un maximum vers 55%. Par contre il ne semble pas y avoir un maximum à 33% comme pour l'*Hibiscus* (MAHAMA, 1980).

3 - INTERPRETATION THEORIQUE DE LA FORME DES COURBES DE SURVIE OBTENUES AUX RAYONS UV ET AUX RAYONS γ

Après traitement aux UV et aux γ dans diverses conditions d'environnement, les courbes de survie obtenues présentent toutes un épaulement plus ou moins prononcé suivi d'une partie dont le tracé ne se linéarise jamais.

Nous avons tenté de faire correspondre les courbes obtenues avec des courbes théoriques dont l'expression mathématique est compatible avec une réalité biologique. Le mode d'action des rayons peut être interprété par la "théorie de la cible" qui peut s'énoncer ainsi : La cible désigne une structure cellulaire dont l'inactivation par une ou plusieurs ionisations (impacts ou coups) provoque-rait des effets décelables (mort ou mutation). Selon cette théorie, les effets à l'échelle cellulaire sont dus à des coups atteignant un constituant sensible ; les coups n'atteignant pas une telle cible demeurent inefficaces.

Nous avons envisagé les diverses situations qui peuvent se produire :

1) L'entité étudiée, en l'occurrence la conidie, comporte une seule cible qui peut être inactivée par un seul coup. L'expression mathématique de ce phénomène est :

$$\frac{S}{S_0} = e^{-D/DL37} \rightarrow \text{Log } \frac{S}{S_0} = -\frac{D}{DL37}$$

où S = la fréquence de survivants pour la dose D

S₀ = " " " D = 0

DL37 étant la dose qui donne une fréquence de survivants de 0,37

Cette formule définit une droite (Figure 10).

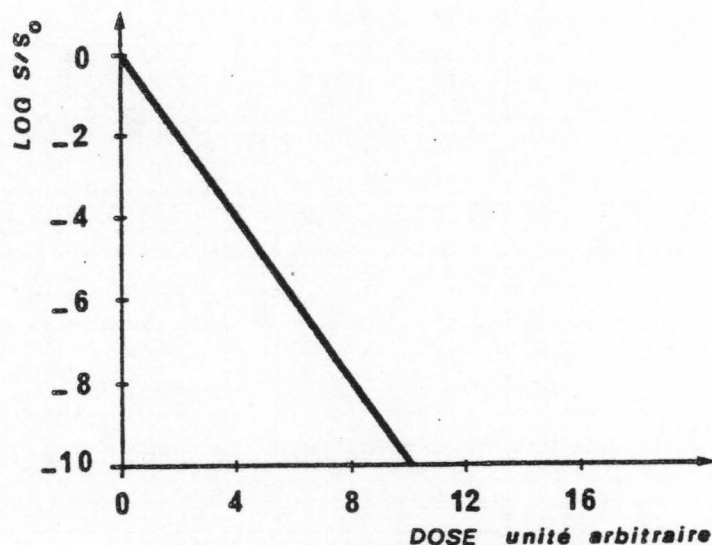


Figure 10

Les courbes expérimentales obtenues n'étant pas des droites, on peut rejeter l'hypothèse selon laquelle une conidie comporte une seule cible inactivée par un seul coup.

2) Une deuxième hypothèse serait qu'une conidie comporte plusieurs cibles inactivées chacune par un seul coup. Ceci se résume par l'expression suivante :

$$\frac{S}{S_0} = \left[1 - (1 - e^{-D/DL})^P \right]$$

P = nombre de cibles

Dorénavant DL représente une unité de dose qui dépend spécifiquement de l'hypothèse envisagée. Dans le cas étudié ici, si $DL = D \quad \frac{S}{S_0} = 0,6$

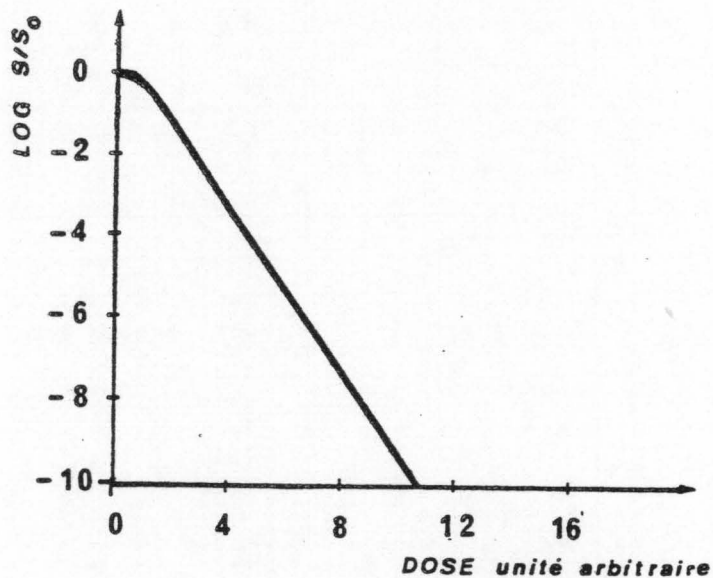


Figure 11

Dans la représentation choisie (Figure 11) le nombre de cibles (P) est égal à 2. Une telle courbe possède deux caractéristiques :

- la tangente à l'origine est horizontale ;
- le tracé se linéarise pour une valeur de D très supérieure à D_0 .

Si P augmente, l'épaule se déplace vers les doses croissantes et il faut utiliser des doses d'irradiation plus fortes pour que le rayonnement soit efficace. Dès que toutes les cibles sont atteintes, on est ramené au cas précédent (1 cible, 1 coup), les courbes étant seulement décalées pour des doses plus fortes (Figure 12).

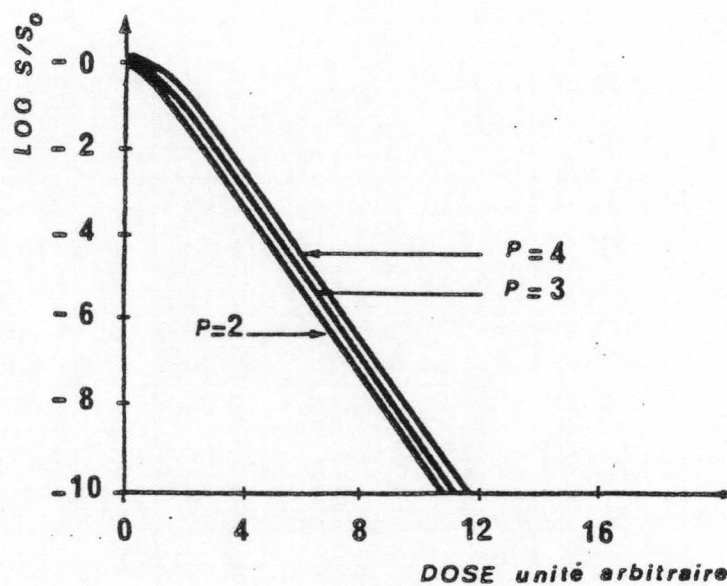


Figure 12

Aucune des courbes expérimentales que nous avons tracées ne correspond à ce modèle car la courbe ne se linéarise pas. Nous avons donc envisagé une troisième hypothèse.

3) La conidie comporte une seule cible ($P = 1$) et il faut plusieurs coups (N) pour entraîner la mort.

L'expression mathématique rendant compte d'une telle hypothèse est :

$$x = \frac{D}{DL} \quad \frac{S}{S_0} = e^{-x} (1 + x)$$

$$\text{Log } \frac{S}{S_0} = -x + \text{Log } (1 + x)$$

$$\text{ici si } DL = D \rightarrow \frac{S}{S_0} = 0,74$$

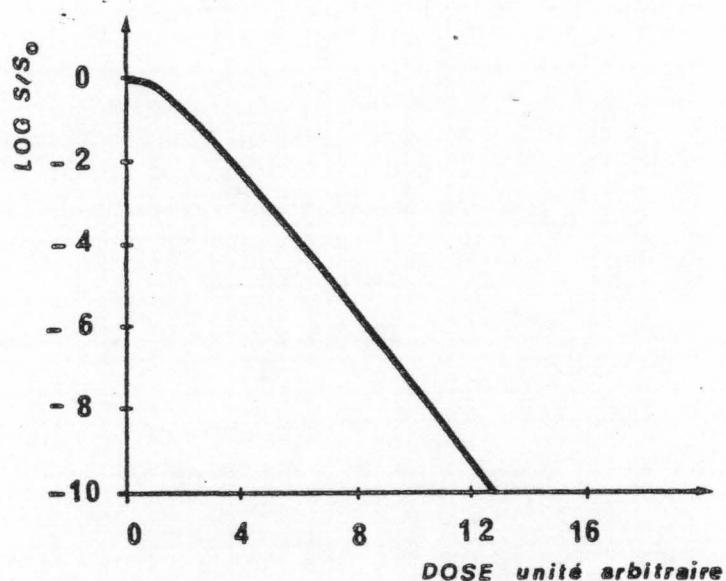


Figure 13

La courbe (Figure 13) possède une tangente horizontale à l'origine mais elle s'infléchit très vite et ne tend vers une droite que pour des valeurs assez élevées de la variable.

Les courbes de survie obtenues après exposition aux rayons UV et γ présentent de telles caractéristiques, mais nous n'avons pas pu établir de correspondance satisfaisante entre les points expérimentaux et la courbe théorique tracée pour $P = 1$, $N = 2$.

L'hypothèse selon laquelle une conidie meurt lorsqu'une seule cible est touchée par 2 coups n'est donc pas convenable.

une conidie meurt lorsqu'une seule cible est touchée par 2 coups n'est donc pas totalement satisfaisant.

4) Nous avons été conduit à envisager le cas dans lequel la létalité dépend de l'inactivation de plusieurs cibles (P) par plusieurs coups (N). Ceci peut se traduire par l'expression mathématique:

$$\frac{S}{S_0} = 1 - \left[1 - e^{-x} \left(\sum_{i=0}^{N-1} \frac{x^i}{i!} \right) \right]^P$$

$x = \frac{D}{D_0}$ variable réduite de la dose

La courbe obtenue à partir de cette formule est représentée dans la Figure 14 où $N = 3$ et $P = 2$.

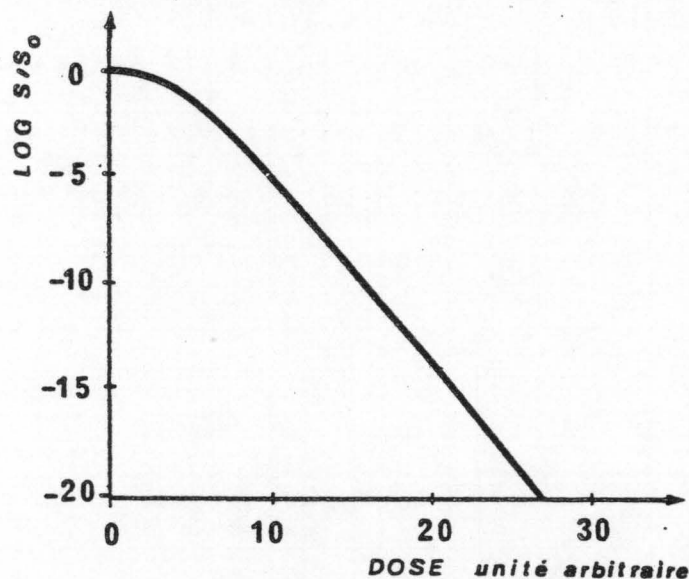


Figure 14

Elle présente un épaulement à tangente horizontale. Celui-ci est d'autant plus long que N a une valeur élevée. Cela signifie que plus il y a de cibles, plus la probabilité de les atteindre diminue. Donc lorsque N augmente, il est nécessaire d'utiliser des doses de rayonnement plus importantes pour saturer le système. Nous avons comparé nos résultats avec la courbe théorique tracée pour $P = 2$ et $N = 3$ (Figures 15, 16, 17, 18). Les valeurs de P et de N ont été ainsi choisies car elles rendent compte du phénomène cumulatif de l'action des rayonnements et sont compatibles avec une réalité biologique.

Le point représentant la dose de rayonnement qui conduit au plus faible nombre de survivants dans chacune des conditions d'environnement examinées, a été placé sur la courbe théorique. A partir de ce point, on a abaissé la perpendiculaire à l'axe des abscisses ce qui permet d'obtenir une échelle de doses qui sera spécifique de chaque condition de traitement. On porte ensuite les fréquences de survivants obtenues pour les doses plus faibles et on regarde comment elles se distribuent par rapport à la courbe théorique. Nous avons établi la correspondance entre nos résultats et la courbe théorique en séparant les courbes par groupes d'expérience (UV, Figure 15 ; âge des spores, Figure 16 ; humidité relatives, Figure 17 ; composition gazeuse de l'atmosphère, Figure 18) afin de ne pas trop alourdir les schémas.

On constate que dans toutes les conditions de traitement (UV - Figure 15 ou γ - Figures 16, 17, 18) les points expérimentaux sont le plus souvent placés au dessus du tracé de la courbe théorique pour les doses fortes et un peu en dessous pour les faibles doses. Cependant on peut estimer qu'ils sont distribués de part et d'autre de la courbe théorique et que le modèle "plusieurs cibles, plusieurs coups par cible" rend mieux compte des modalités d'action des rayons UV et γ sur la létalité des conidies de *Nectria haematococca* que les modèles envisagés précédemment.

Il ressort de cette analyse que toutes les courbes expérimentales présentent une concavité tournée vers le bas, quelle que soit la dose d'irradiation. Les modèles simples décrits ci-dessus ne font intervenir que deux paramètres (nombre de cibles et nombre de coups) et nous avons vu qu'aucun d'entre eux n'explique parfaitement la forme des courbes de survie. Les seuls modèles permettant de rendre compte de celle-ci sont ceux dans lesquels l'efficacité du rayonnement à un instant donné dépend de la totalité du rayonnement déjà reçu (effet cumulatif). Un mécanisme dans lequel une cible est inactivée par plusieurs coups correspond à cette situation mais on peut également envisager un système dans lequel les mécanismes de réparation seraient progressivement détruits.

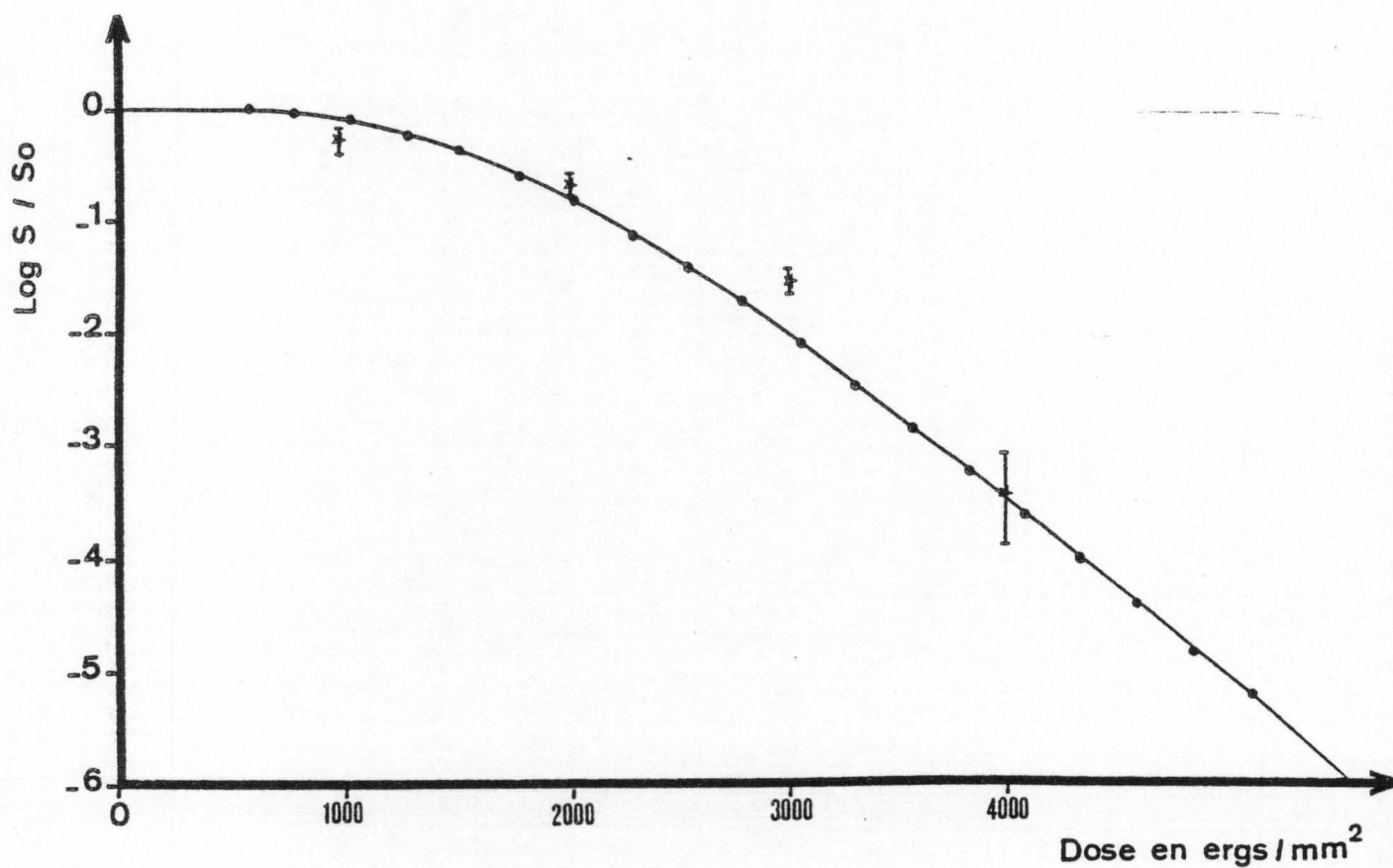


Fig. 15 - Courbe théorique lorsque $P = 2$ $n = 3$

Les points expérimentaux reportés sur le graphe correspondent au traitement aux rayons UV sur des spores de 3 jours étalées sur milieu gélosé.

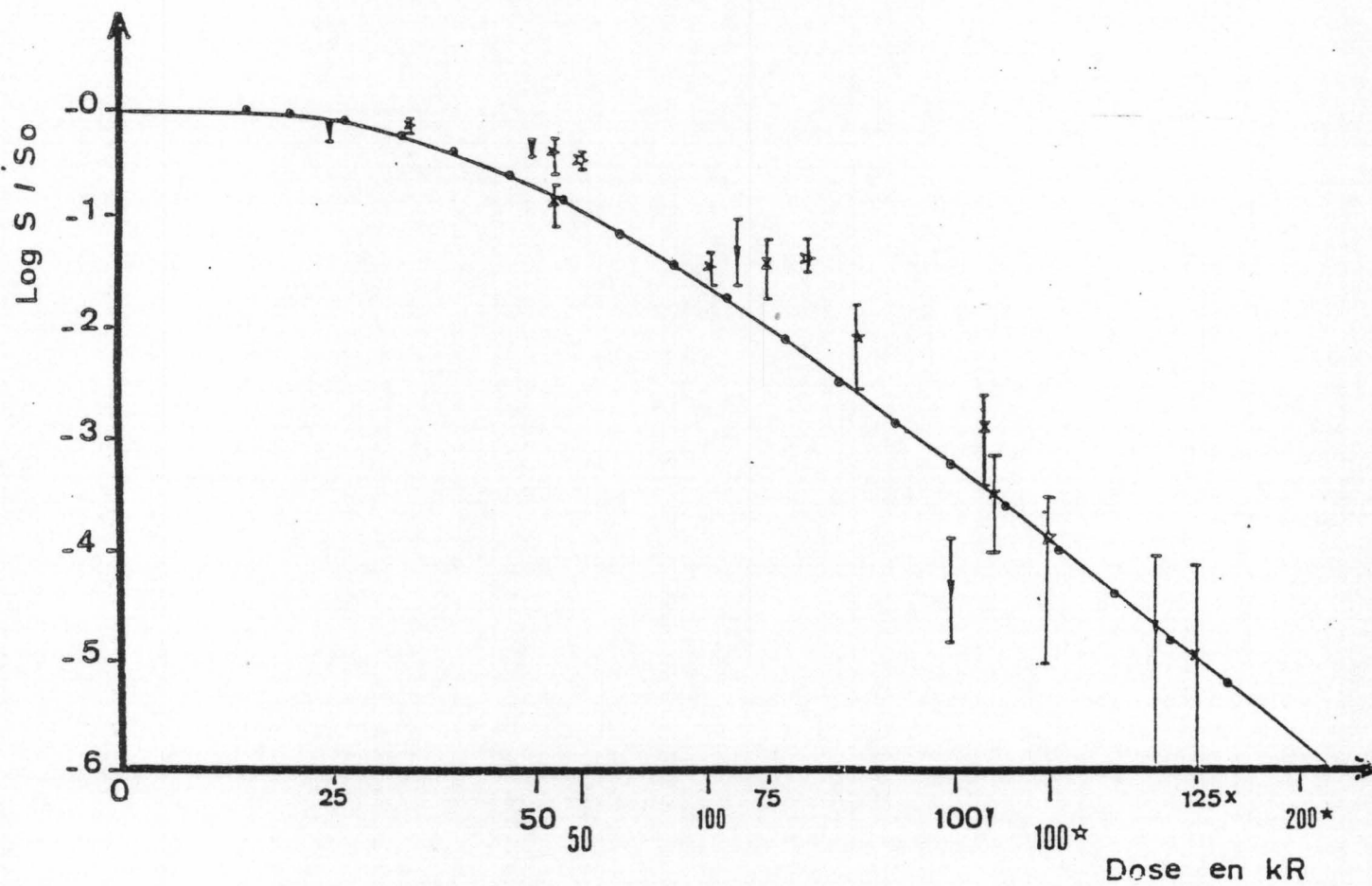


Fig. 16 - Courbe théorique lorsque $P = 2$ $n = 3$

Les points expérimentaux reportés sur le graphe correspondent aux traitements aux rayons γ sur :

- des spores de 3 jours sur PDA (v)
- des spores de 3 jours *in situ* (x)
- des spores de 3 jours dans l'eau (x)
- des spores de 30 jours *in situ* (x)

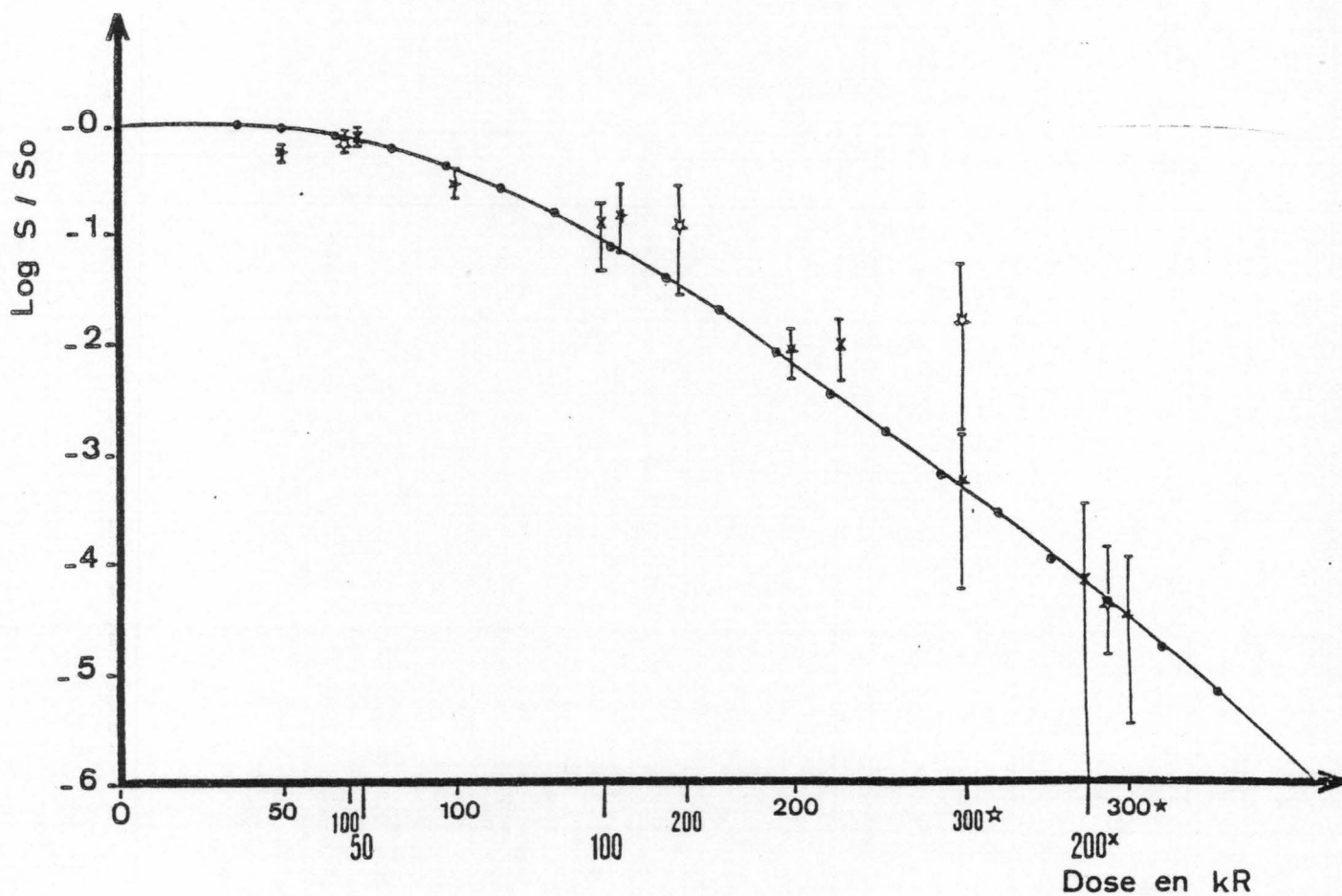


Fig. 17 - Courbe théorique lorsque $P = 2$ $N = 3$

Les points expérimentaux reportés sur le graphe correspondent aux traitements aux rayons γ sur des spores conservées dans des humidités relatives de 33% (☆), 75% (✱) 100% (x)

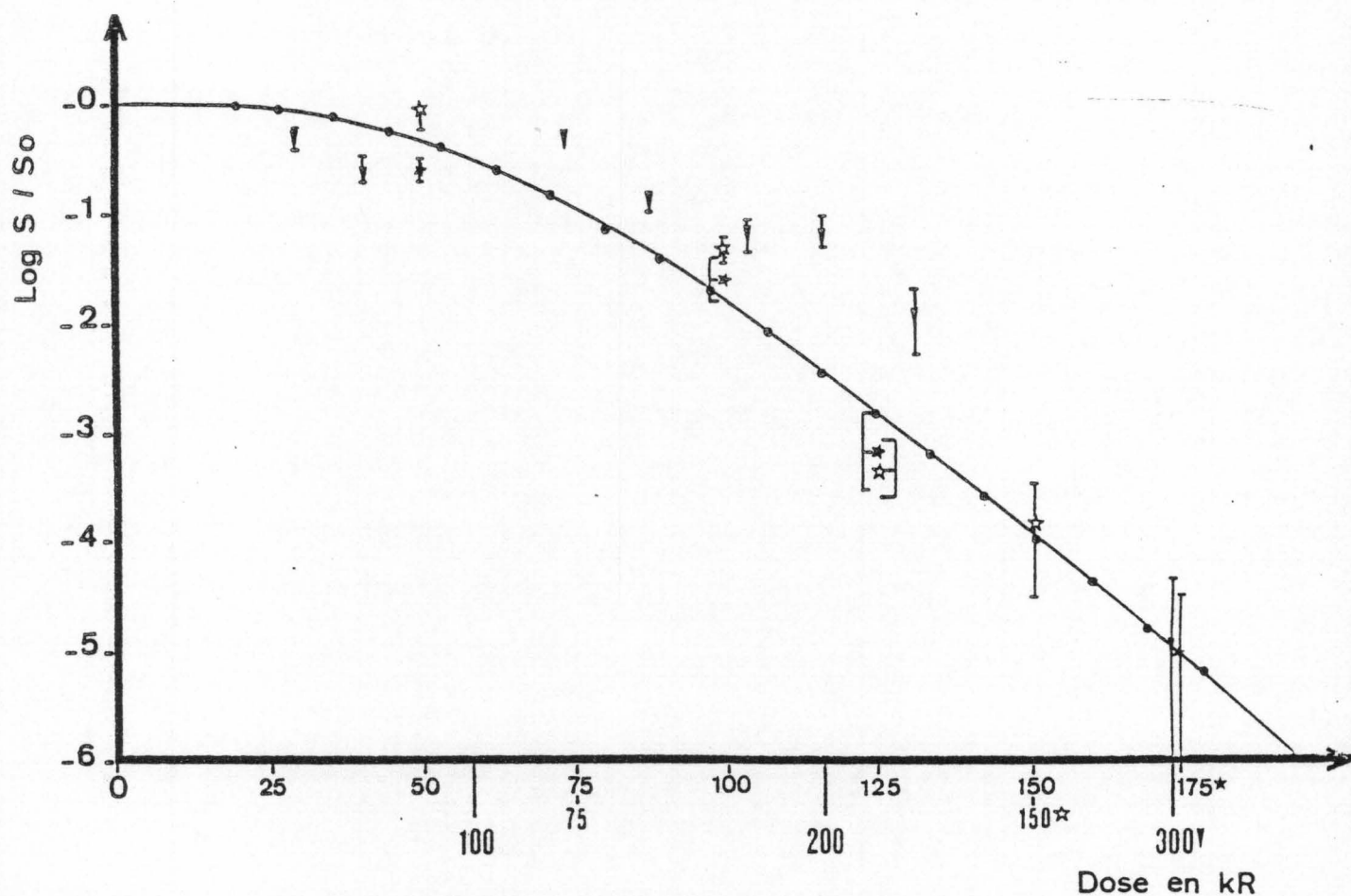


Fig. 18 - Courbe théorique lorsque $P = 2$ $N = 3$

Les points expérimentaux reportés sur le graphe correspondent aux traitements aux rayons γ sur des spores conservées :

- dans l'atmosphère contenant 100% d'oxygène ($\star$)
- dans l'atmosphère contenant 100% d'azote ($\blacktriangledown$)
- dans l'air reconstitué ($\star\blacktriangledown$)

CHAPITRE III : EFFET MUTAGENE DES RADIATIONS

En plus de l'action létale des rayonnements, nous avons testé leur effet mutagène en suivant la fréquence d'apparition de divers mutants.

1 - CHOIX DES CARACTERES SE PRETANT A UNE EVALUATION DE LA MUTABILITE

Trois catégories de mutants ont été retenues : des mutants morphologiques, des mutants résistants à un inhibiteur et des "révertants" prototrophes d'un auxotrophe.

1.1. Mutants morphologiques

Les caractères morphologiques dont les modifications peuvent être aisément repérées sont nombreux. Parmi ceux-ci on peut citer : la texture du mycélium, la vitesse de croissance des thalles, leur pigmentation, les phases du développement des appareils reproducteurs Deux d'entre eux ont été choisis : la pigmentation des thalles (Photo 3) et la formation des organes de reproduction sexuelle (Photos 4-5).

1.1.1. Les mutants de coloration

Des mutants dont le mycélium est coloré en rouge ont été obtenus à partir de la souche sauvage gris-violacé (Photo 3). Les pigments produits par ces mutants sont les mêmes que ceux qui sont synthétisés par la souche sauvage, mais les quantités libérées sont très supérieures. Il s'agit de naphthoquinones ; dix composés ont été identifiés (PARISOT, 1981). Suivant leur concentration, la couleur des thalles est plus ou moins foncée, les mutants rouges sont donc très polymorphes, leur couleur allant du rose au brun en passant par le rouge vif (Photos 6, 7, 8, 9, 10, 11). D. PARISOT (1981) a pu montrer que la production des pigments dépend du fonctionnement d'au moins six gènes dont certains sont représentés par plusieurs formes alléliques ; elle est donc contrôlée par un système polygénique.

1.1.2. Les mutants de fertilité

La fertilité des thalles est également sous la dépendance d'un système polygénique : actuellement on connaît 4 gènes agissant sur la fertilité sans entraîner la pigmentation rouge des thalles (DABOUSSI, 1979) auxquels viennent s'ajouter 4 des 6 gènes impliqués dans les processus de coloration puisqu'ils ont aussi une action sur la formation des périthèces (PARISOT, 1981).

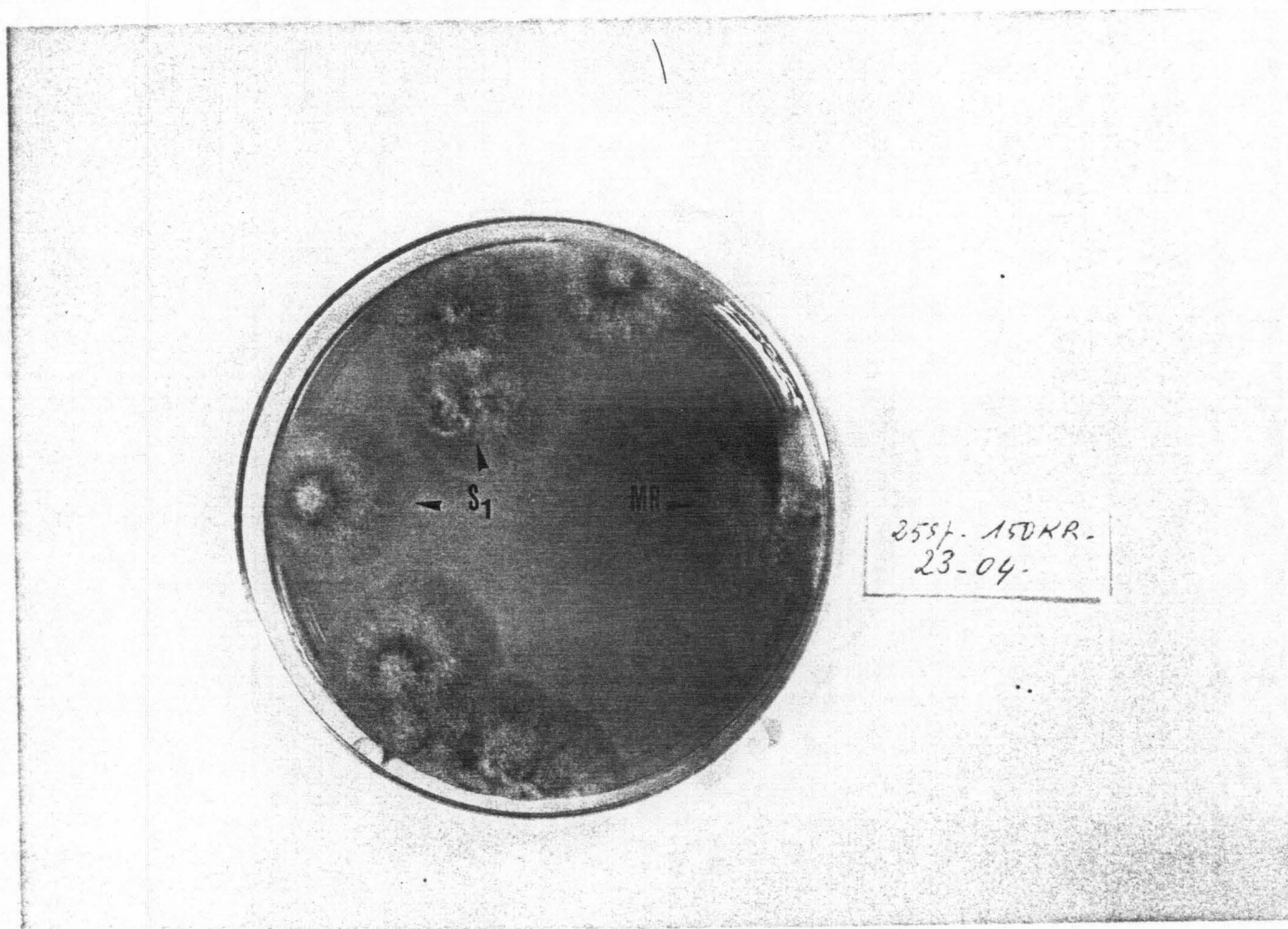


Photo 3

Mutant de coloration rouge (MR) parmi des thalles de phénotype sauvage (S1).

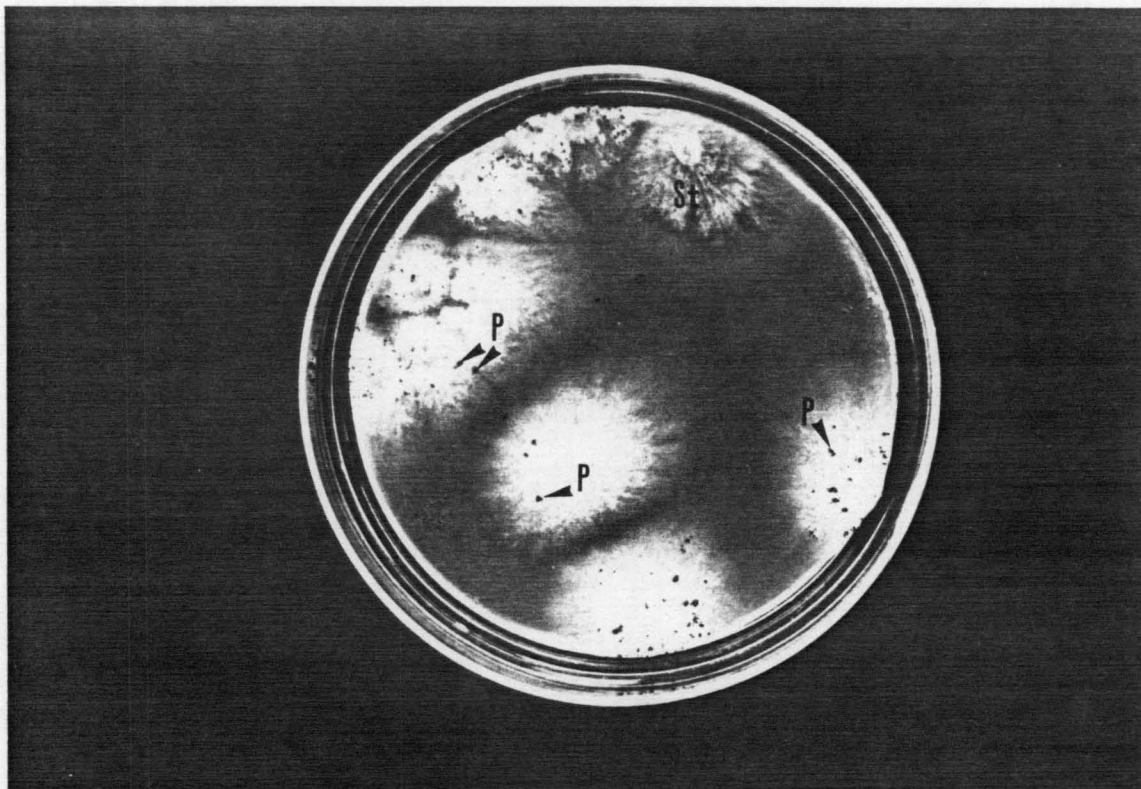


Photo 4 - Thalles de 30 jours issus de spores traitées par les rayons γ . Un des thalles (St) n'a pas formé de périthèces (P).

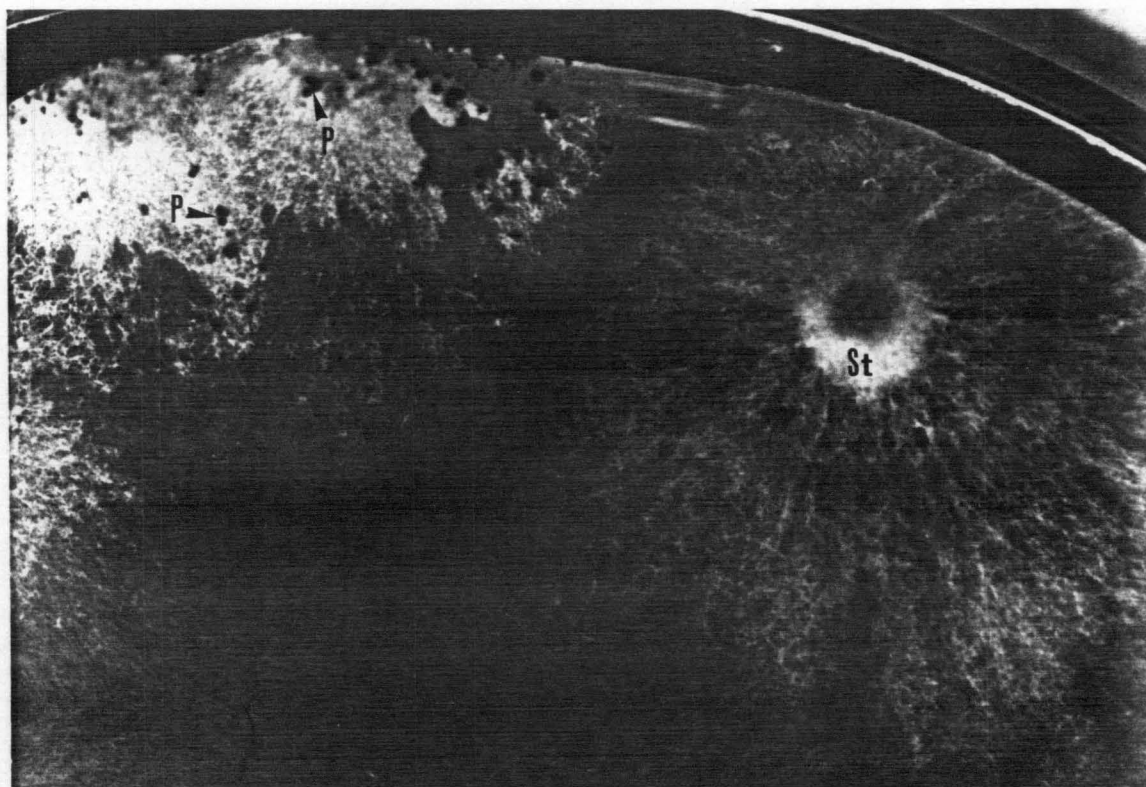
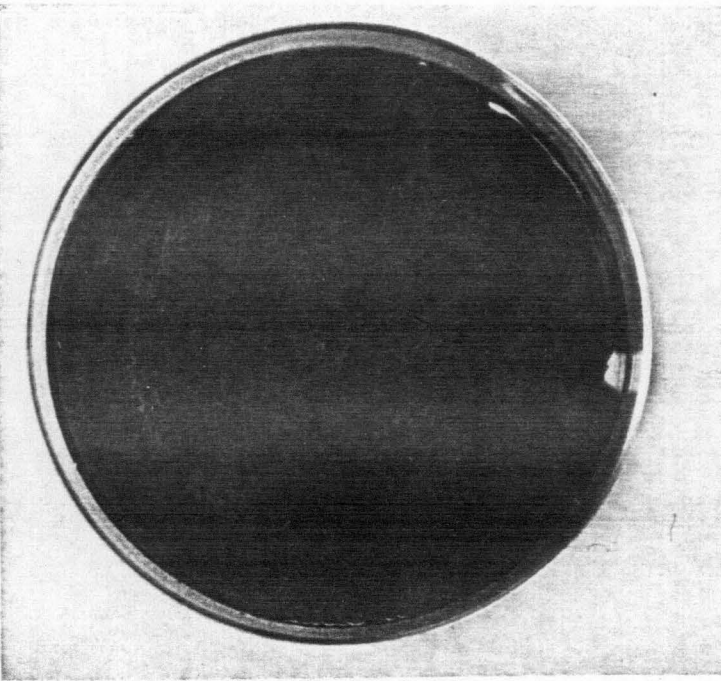
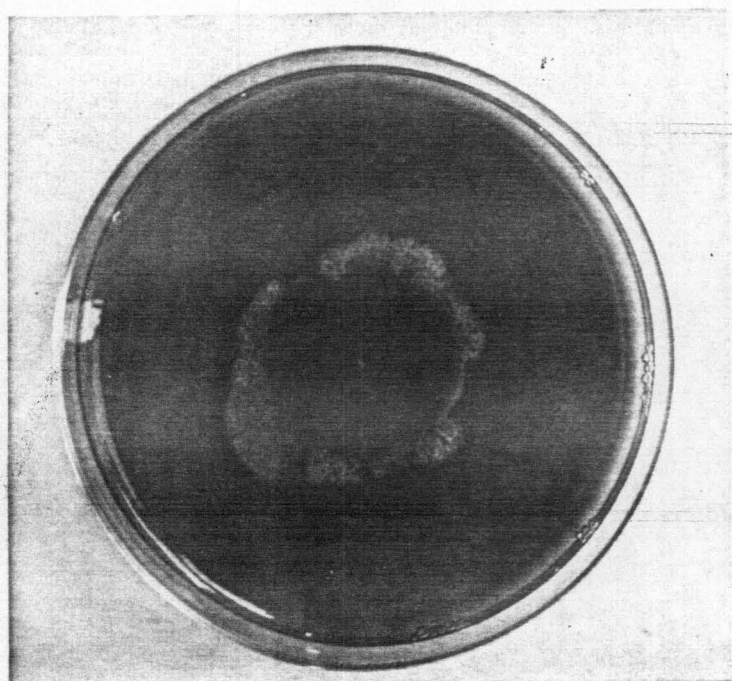
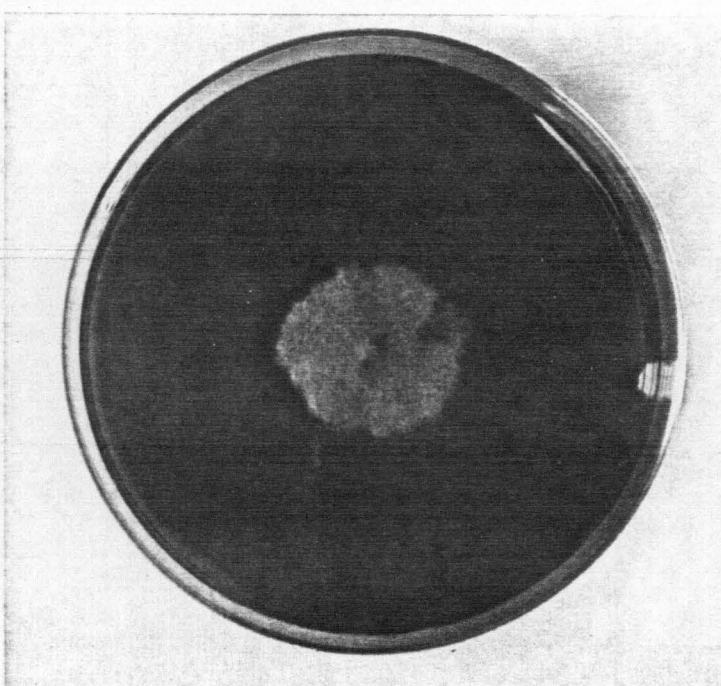
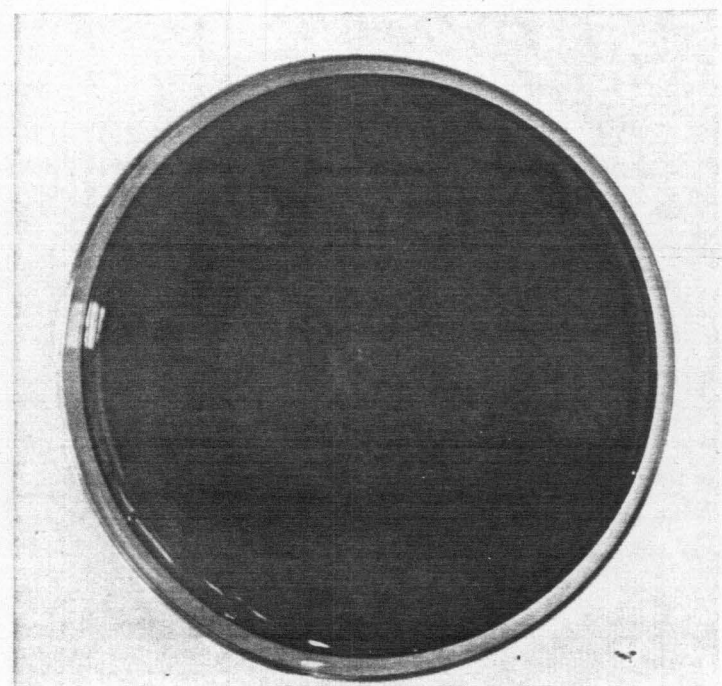
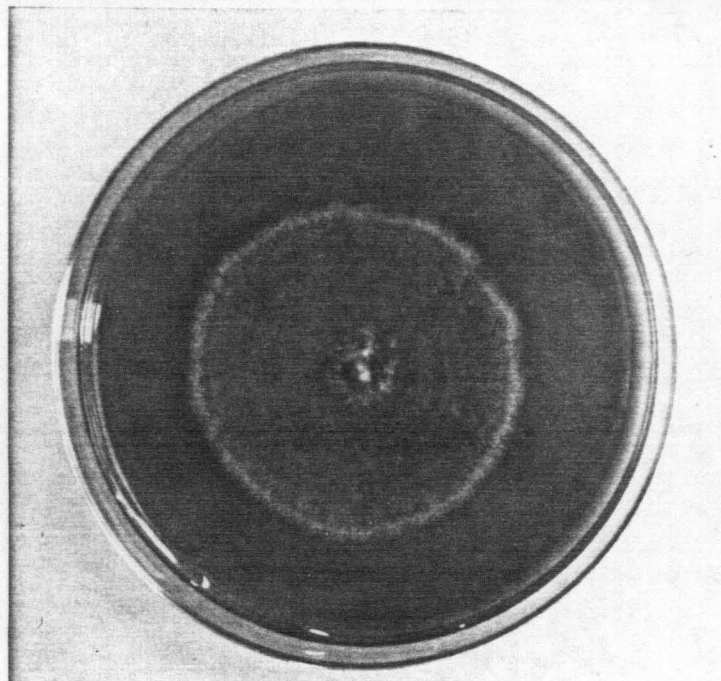
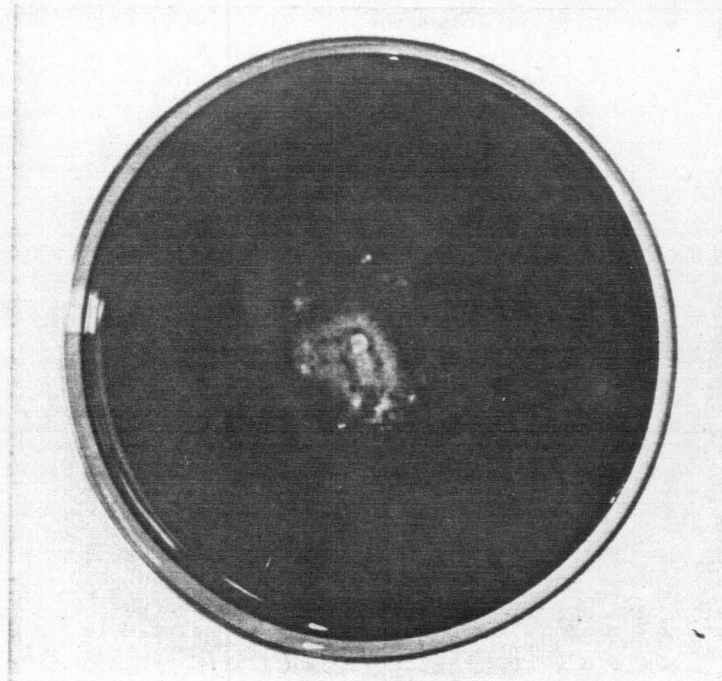


Photo 5 - Détail de la photo précédente - St, thalle stérile, P, périthèces.



Photos 6, 7, 8, 9, 10, 11 - Quelques types de mutants rouges observés après irradiation des spores.

1.2. Mutants résistants aux inhibiteurs

Jusqu'à maintenant, aucun mutant résistant n'avait été recherché chez cette souche de *Nectria haematococca*. Le fait que de nombreux mutants de *Fusarium* sp. résistants à des fongicides variés ont été décrits (GEORGOPOULOS, 1962 ; KAPPAS et GEORGOPOULOS, 1970 ; THANASSOULOPOULOS et al., 1971 ; SOZZI et GESSLER, 1980) suggérerait qu'il devait être relativement aisé d'en obtenir avec *N. haematococca*. L'isolement de tels mutants est facilité parce que le crible de sélection est positif. En effet, sur le milieu contenant l'inhibiteur, seuls les clones ayant muté vers la résistance se développeront. (Photo 12).

1.2.1. Détermination de la dose inhibitrice de plusieurs substances fongistatiques

Avant de rechercher ce type de mutant, il est nécessaire de connaître la concentration qui bloque la croissance de la souche sauvage. L'action inhibitrice de six substances a été déterminée avec des suspensions titrant respectivement 10^3 spores et 10^6 spores par ml.

1.2.1.1. Imazalil

Les résultats mentionnés dans le tableau 6 indiquent que lorsque l'on étale 10^5 spores par boîte de Pétri, 0,02% d'entre elles sont capables de donner des thalles sur le milieu contenant 20 ppm d'imazalil. Il faut augmenter la dose jusqu'à 100 ppm pour que toute croissance cesse. En revanche lorsque l'on étale 10^2 spores par boîte de Pétri (sur un total de 28 boîtes), à partir de 20 ppm, on ne note plus aucune croissance car le nombre de sporesensemencées est insuffisant pour que l'on puisse dénombrer des thalles capables de se développer.

Tableau 6

Concentration d'imazalil en ppm		1	5	10	20	50	100
% de thalles obtenus après 8 jours	avec 10^2 spores/boîte	91%	58%	5,6%	0	0	0
	avec $1,5.10^5$ spores/boîte				0,02%	0,001	0

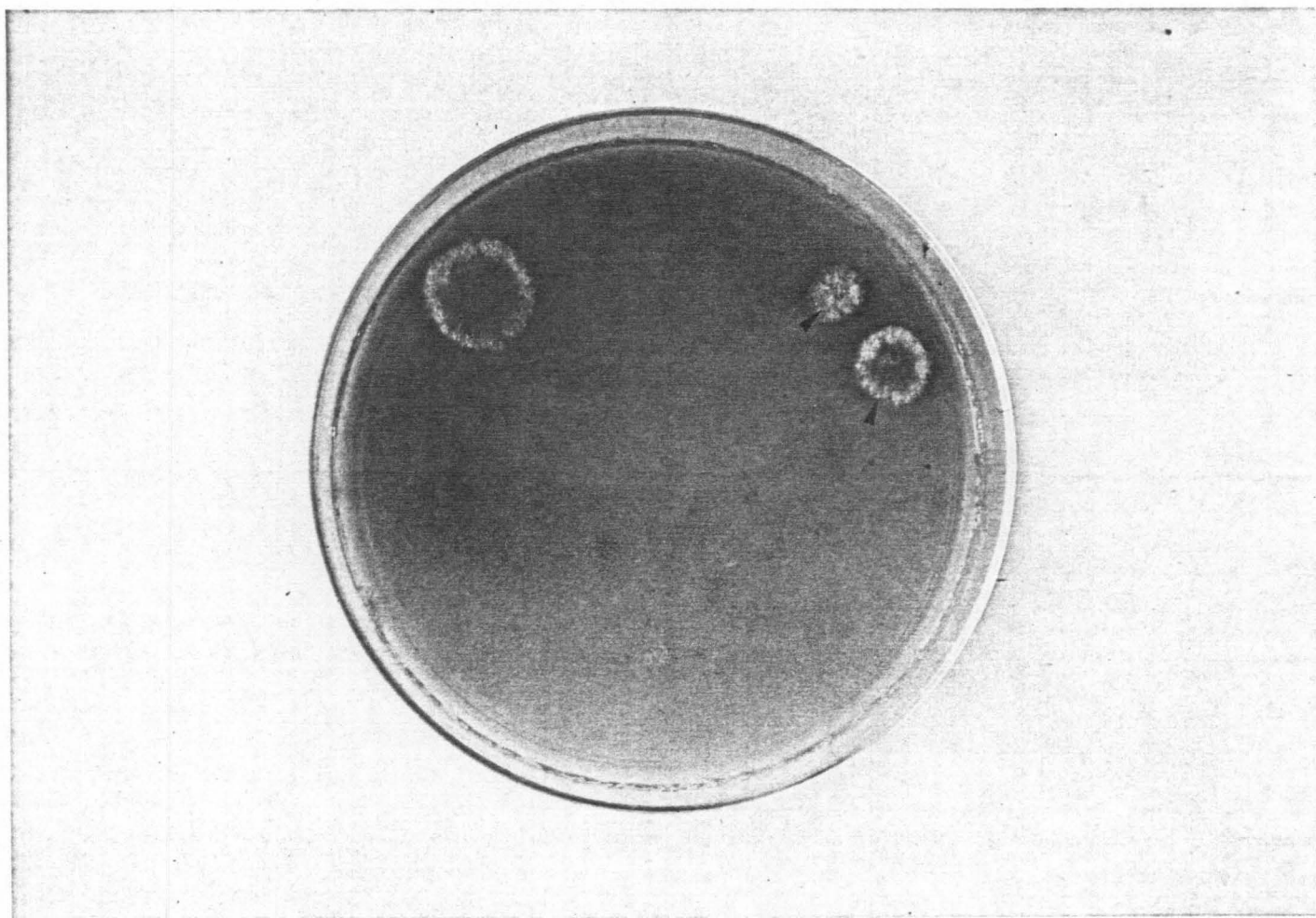


Photo 12

Thalles mutants résistants à la 8-azaguanine (flèches), se développant sur milieu inhibiteur .

1.2.1.2. Tétrachloronitrobenzène (TCNB) et tridémorph

Les résultats obtenus sont portés dans les tableaux suivants (7 et 8).

Tableau 7

Concentration de TCNB en ppm		0	5	20	50	100
% de thalles croissant après 8 jours	avec 10^2 spores/boîte	100%	10,5%	9,5%	12,3%	9,3%
	avec 6.10^4 spores/boîte	C*	C	C	C	C

C* : microthalles confluent

Tableau 8

Concentration de tridémorph en ppm		0	10	20	50	100
% de thalles croissant après 8 jours	avec 10^2 spores/boîte	100	15,1	12,1	11,6	17,9
	avec 6.10^4 spores/boîte	C*	C	C	C	C

C* : microthalles confluent

Lorsque les concentrations de TCNB ou de tridémorph augmentent, le pourcentage de thalles qui se développent sur les milieux additionnés d'inhibiteur varie peu. Néanmoins, les thalles ont un diamètre de plus en plus petit et ils relarguent des pigments rouges, ce qui est un phénomène souvent observé lorsque le champignon se trouve dans des conditions défavorables. Pour les gammes de concentration essayées, nous n'avons pas trouvé de doses bloquant la croissance même si le nombre de spores étalées par boîte est faible : le TCNB et le tridémorph ne peuvent donc être retenus pour la recherche de résistants car il faudrait ajouter des quantités trop importantes de substance au milieu nutritif pour bloquer la croissance de *Nectria haematococca*.

1.2.1.3. Nitrure de Sodium

Les résultats obtenus avec le nitrure de sodium (NaN_2) sur des étalements de 10^2 spores ou de 6.10^4 spores par boîte de Pétri indiquent une très bonne efficacité de ce produit pour des concentrations faibles (10 ppm) (Tableau 9).

Tableau 9

Concentration de NaN_2 en ppm		0	10	20	50	100
% de thalles croissant après 8 jours	avec 10^2 spores/boîte	86	0	0	0	0
	avec 6.10^4 spores/boîte	C*	0	0	0	0

C* : microthalles confluent

1.2.1.4. 8-azaguanine

La 8-azaguanine inhibe la croissance de *Nectria haematococca* lorsque sa concentration dans le milieu est élevée (100 à 200 ppm, Tableau 10). Une observation réalisée sur des boîtes contenant 200 ppm de produit,ensemencées avec 10^5 spores a montré que celles-ci ont germé, mais que la croissance des filaments s'est arrêtée. Cependant, au-delà de 8 jours, de nombreux thalles peuvent à nouveau démarrer.

Tableau 10

Concentration de 8-azaguanine en ppm	0	40	100	200
% de thalles croissant après 5 jours, avec 10^5 spores/boîte	C*	C*	0	0

C* : microthalles confluent

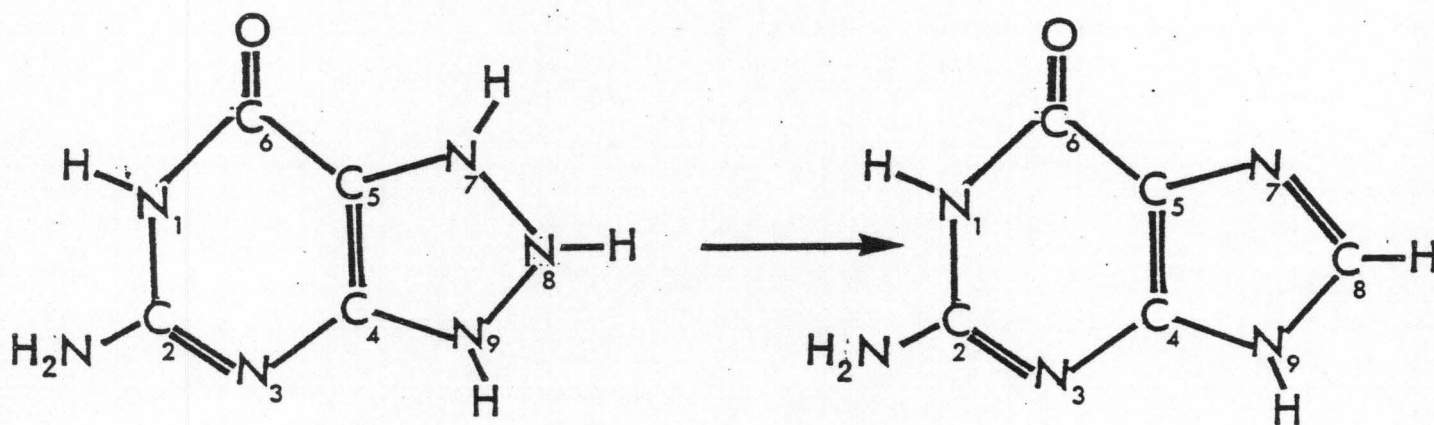
1.2.1.5. Bénomyl

Seule, la dose de 100 ppm a été essayée. Lorsqu'on étale 4.10^4 spores par boîte, environ 0,5% d'entre elles donnent des thalles qui croissent très lentement et sont colorés en rouge. Il semble que pour inhiber complètement la croissance de *Nectria* des quantités importantes de produit soient nécessaires.

Il ressort des résultats de ces essais que sur les six produits utilisés, seuls trois d'entre eux bloquent la croissance de *Nectria haematococca* à des doses qui peuvent être attribuées à une efficacité réelle de la molécule active ; ce sont l'imazalil, la 8-azaguanine et le nitrure de Sodium. La 8-azaguanine a finalement été retenue pour les raisons suivantes :

- 1 - un mutant résistant spontané est apparu durant les essais réalisés avec cette substance, ce qui suggère que la fréquence de mutations induites doit être relativement élevée ;
- 2 - aucun mutant résistant au nitrure de Sodium n'a pu être obtenu, ni spontanément, ni après irradiation de 10^8 microconidies avec une dose d'UV entraînant une létalité de 95% ;

Nous allons donner maintenant quelques renseignements sur le mode d'action de la 8-azaguanine. C'est un analogue de la guanine. Le groupement $=CH$ à la position 8 de la guanine est remplacé par N



GUANINE

8-AZAGUANINE

ALEXANDER et al., (1971) ont montré que lorsque la 8-azaguanine est incorporée dans l'ARN messager le mécanisme de traduction est fortement altéré : les chaînes polypeptidiques demeurent incomplètes et certaines restent attachées aux ribosomes.

1.3. Révertants de mutants auxotrophes

Les souches auxotrophes de *N. haematococca* ne poussent pas sur milieu minimum. Il est donc facile de sélectionner les thalles révertants qui se développent sur ce milieu après irradiation de nombreuses spores. Comme dans la recherche de résistants aux inhibiteurs, nous disposons là d'un crible positif.

Dans un premier temps, nous avons étudié 4 mutants : Lys255, PAB421, Bio⁻ et Arg154 provenant de la collection de M.J. DABOUSSI afin de pouvoir choisir celle qui se prêtait le mieux à une sélection de "révertants" prototrophes. Les critères retenus étaient : une bonne sporulation, des spores ayant une capacité germinative élevée et enfin, l'aptitude à réverser spontanément ou après exposition aux UV.

Les souches exigeant soit la lysine (Lys255) soit l'acide para-aminobenzoïque (PAB421) produisent des spores dont l'aptitude à germer est trop faible (0,1% pour la première et 30% pour la seconde) pour qu'elles puissent être utilisées dans la recherche de mutants prototrophes. En effet, pour avoir quelque chance d'obtenir un prototrophe à partir d'auxotrophes, il est souhaitable de traiter un effectif de 10^6 à 10^7 spores car les fréquences d'apparition de ce type de mutants sont de l'ordre de 10^{-5} , 10^{-6} (MORTIMER et al., 1965 ; HAYNES and ECKART, 1979). Or avec les souches Lys255 et PAB et le protocole retenu, il serait nécessaire d'irradier un grand nombre de thalles afin de réunir une telle quantité de spores viables. Les dimensions de l'irradiateur ne permettant de traiter que 3 cultures à la fois, ces souches n'ont pas été retenues.

La souche Bio⁻ requérant la biotine pour sa croissance, différencie de nombreuses spores viables. Elle paraissait donc convenable pour la recherche de "révertants". Cependant, aucun thalle prototrophe n'est apparu après une mutagénèse préliminaire sur 10^7 spores viables, effectuée à Orsay avec une dose d'UV entraînant une létalité de 85% des conidies. Par conséquent, cette souche a été abandonnée.

La souche arg154, requérant l'arginine pour sa croissance, manifeste en culture une certaine instabilité. En effet on observe assez fréquemment l'apparition de plages de mycélium prototrophe sur les thalles auxotrophes. Il est possible d'augmenter la fréquence d'apparition de ces "révertants" en exposant les thalles à des rayonnements UV de 5000 ergs/mm^2 . Pour pouvoir irradier cette souche au moyen des rayons γ selon le protocole mis au point, il est nécessaire d'obtenir une sporulation meilleure que celle permise sur milieu complet N1. Diverses formules ont été essayées : le milieu PDA additionné de 100 mg d'arginine s'est révélé favorable à une bonne production de spores viables. La souche arg154 se présente donc comme un bon matériel pour cribler des "révertants". Afin de déterminer si la restauration de la prototrophie était due à une réversion (mutation dans le gène muté initialement) ou une suppression (mutation dans un autre gène), deux des souches prototrophes isolées après une mutagénèse UV sur thalles ont été analysées génétiquement en les croisant avec la souche de référence I4mod (BABAI et al., 1981). Aucun recombinant arg^- n'a été obtenu dans la descendance, ce qui est en faveur de deux événements de mutation réverse. La souche arg154 constitue donc un matériel convenable pour éprouver l'action de divers facteurs sur l'efficacité mutagène des rayons dans un gène bien précis. Malheureusement, la mise au point de ce système monogénique a été longue et nous n'avons pas eu le temps de l'utiliser pour le comparer aux trois systèmes polygéniques étudiés.

2 - EVALUATION DE LA MUTABILITE

Pour notre étude nous n'avons donc considéré que les mutants de pigmentation rouge, les mutants stériles et les mutants résistants à la 8-azaguanine. Nous avons essayé de comparer les fréquences d'induction de ces 3 types de mutants suivant le mode d'irradiation, UV ou γ , et en ce qui concerne les irradiations γ , en fonction des conditions d'environnement variées auxquelles ont été soumises les conidies.

2.1. Taux de mutations spontanées pour les 3 caractères choisis

Les taux de mutants spontanés sont reportés dans le tableau 11. Ils ont été établis pour des spores de 5 jours récoltées sur des thalles cultivés dans des conditions d'humidité saturante.

Tableau 11

	Mutants de coloration	Mutants stériles	Mutants résistants à la 8-azaguanine
Fréquence de mutants spontanés	$0,1 \cdot 10^{-3}$	$0,2 \cdot 10^{-3}$	$0,6 \cdot 10^{-7}$

Il ressort de ce tableau que les caractères mutants de coloration et mutants de stérilité apparaissent avec une fréquence beaucoup plus importante que les mutants résistants à la 8-azaguanine ; cela est sans doute dû au fait que le nombre de gènes impliqués dans l'apparition de la pigmentation ou de la différenciation des organes de reproduction est plus grand que ceux régissant le caractère de sensibilité à la 8-azaguanine.

Dans la mesure où les taux de mutation spontanés sont faibles, les valeurs obtenues pour les taux de mutants induits n'ont pas été corrigées en retranchant les premiers. Néanmoins, il aurait été intéressant de s'assurer que les taux de mutants spontanés restent faibles dans toutes les conditions examinées.

2.2. Taux de mutations pour les 3 caractères choisis, après traitement aux UV

Les mutants ont été recherchés pour une seule dose : 3800 ergs/mm^2 , qui correspond à une survie de 5%. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 12.

Tableau 12

Type de mutant recherché	Mutants de coloration	Mutants stériles	Mutants résistants à la 8-azaguanine
Taux de mutants en fonction du nombre de survivants	$4,8 \cdot 10^{-2}$	$9,86 \cdot 10^{-2}$	$2,76 \cdot 10^{-5}$

On remarque que le taux de mutants stériles est environ le double de celui des mutants de coloration. Ceci est dû vraisemblablement au nombre de gènes qui sont impliqués dans le contrôle de ces caractères. En effet nous avons vu que la synthèse de pigmentation dépendait d'au moins 6 gènes et que la stérilité dépendait d'au moins 8 gènes (§ 1.1.1 et § 1.1.2).

Par contre, la résistance à la 8-azaguanine dépend d'un système oligogénique et apparaît avec un taux beaucoup plus faible que les deux caractères précédents.

2.3. Taux de mutation pour les 3 caractères choisis après traitement aux rayons γ

2.3.1. Taux de mutants de coloration en fonction de l'environnement

2.3.1.1. Spores conservées dans des humidités relatives différentes

Quand on considère l'évolution du taux de mutants en fonction de la dose de rayonnement γ , on constate deux types de comportement (Figure 19) :

- pour les spores placées en atmosphère avec 100% d'humidité relative (dans les dessiccateurs ou dans l'air de l'enceinte de culture), les taux de mutants augmentent nettement lorsque la dose croît ;
- en revanche, avec les spores placées en conditions plus sèches (HR de 75, 55 et 33%), les taux de mutants varient peu pour des doses croissantes.

Il s'ensuit que lorsqu'on utilise une dose de rayonnement assez élevée : 125 kR par exemple, les taux de mutants sont 4 à 5 fois plus élevés à 100% d'humidité que pour des HR inférieures ou égales à 75%.

Quand on porte l'évolution du taux de mutants en fonction de la fréquence des survivants (Figure 20), on note que pour les deux conditions de forte humidité le taux de mutants augmente quand la survie diminue.

Cependant, la mutabilité apparaît différente selon l'état physiologique des spores traitées. Ainsi pour une survie de 15%, les spores conservées à 100% d'humidité relative en l'absence de milieu, 23 jours, mutent deux fois plus que les spores de 3 jours maintenues sur milieu nutritif.

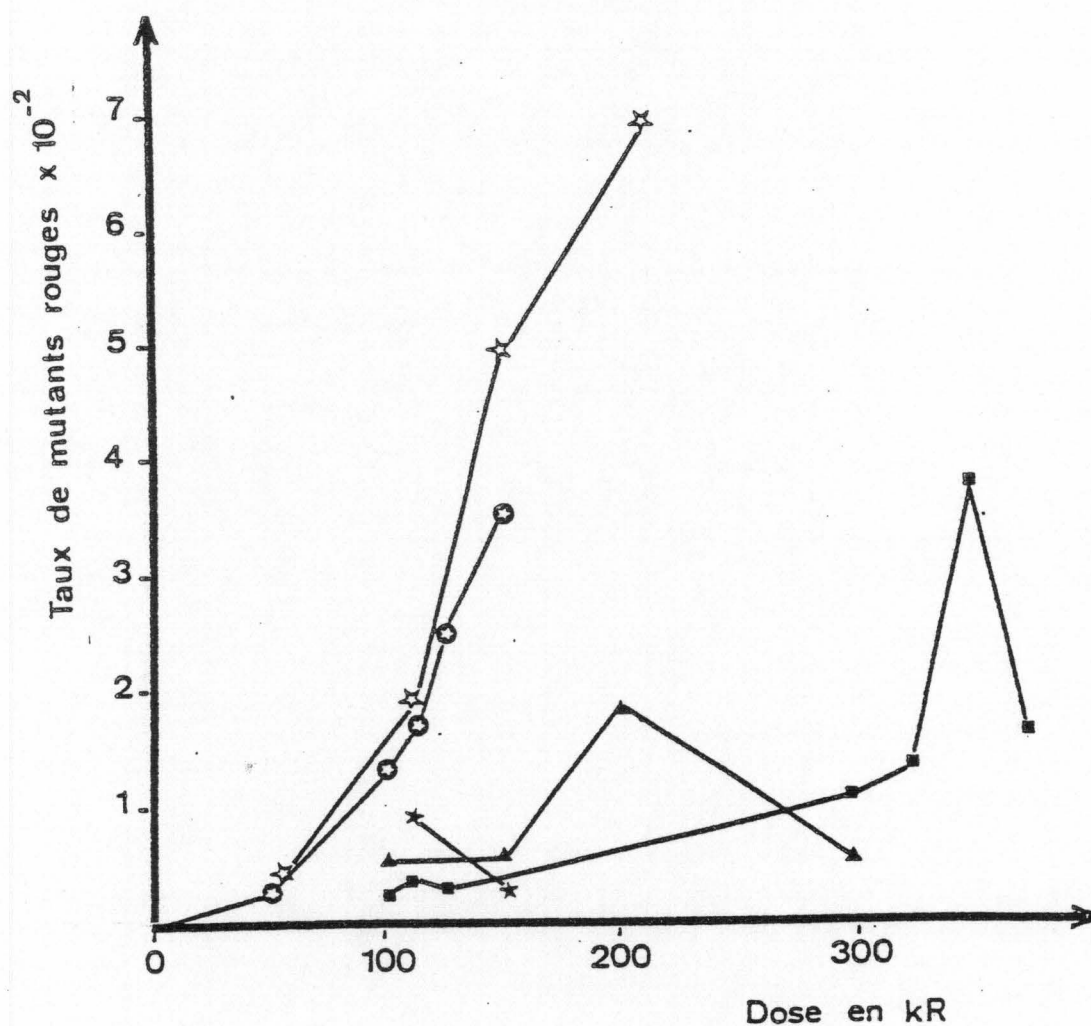


Fig. 19 - Taux de mutants "rouges" en fonction de la dose d'exposition aux rayons γ et des conditions de conservation des spores dans des humidités relatives (HR) différentes.

- spores de 3 jours, HR = 100% (- ○) ;
- spores de 23 jours, HR = 100% (- ☆) ;
- spores de 23 jours, HR = 75% (- ✕) ;
- spores de 23 jours, HR = 55% (- ■) ;
- spores de 23 jours, HR = 33% (- ▲) .

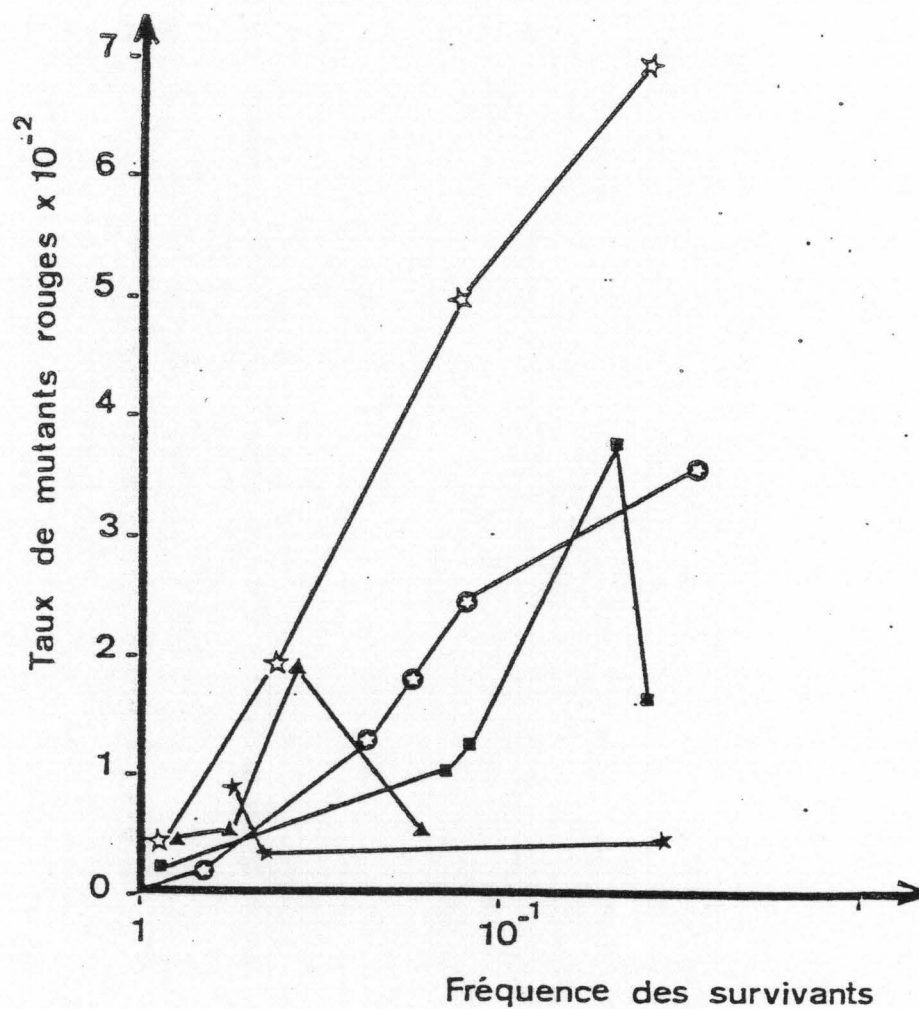


Fig. 20 - Taux de mutants "rouges" en fonction de la fréquence de survivants et des conditions de conservation des spores dans des humidités relatives (HR) différentes.

- spores de 3 jours, HR = 100% (- ●) ;
- spores de 23 jours, HR = 100% (- ☆) ;
- spores de 23 jours, HR = 75% (- ★) ;
- spores de 23 jours, HR = 55% (- ■) ;
- spores de 23 jours, HR = 33% (- ▲) .

2.3.1.2. Spores conservées dans des atmosphères gazeuses différentes

Lorsque la dose d'irradiation augmente, le taux de mutation augmente dans les trois conditions. Mais le taux de mutants obtenus pour une même dose est plus faible lorsque les spores sont en présence d' N_2 que lorsqu'elles sont en présence d' O_2 (Figure 21).

Lorsque la fréquence de survivants diminue, le taux de mutation augmente dans la même proportion dans les trois cas (Figure 22).

2.3.1.3. Conclusion

En ce qui concerne les caractères de coloration, le taux de mutation maximum est obtenu lorsque les spores sont conservées dans des atmosphères à humidité relative élevée et pour des doses d'irradiation élevées. Il semble donc que les produits de radiolyse de l'eau favorisent l'apparition de mutants de coloration, par contre l'oxygène n'influe pas sur l'apparition de ce caractère muté.

L'état physiologique des spores semble être également un facteur important pouvant entraîner des différences dans la mutabilité.

2.3.2. Taux de mutants stériles

2.3.2.1. Spores conservées dans des humidités relatives différentes

Si on examine les taux de mutants en fonction de la dose de rayonnement γ , les variations constatées sont difficilement interprétables (Figure 23) : en effet, à partir de 200 KR en atmosphère saturée d'eau, la survie est quasiment nulle il aurait fallu augmenter considérablement les effectifs irradiés pour obtenir des survivants en nombre suffisant. Il semble cependant que des humidités relatives de 33 ou 55% soient plus favorables à l'obtention de mutants stériles qu'un air contenant 100% d'humidité. Ce fait est plus évident lorsqu'on porte les taux de mutants en fonction de la fréquence des survivants (Figure 24) : on voit nettement que, pour des humidités de 33 et 55%, le taux de mutants augmente quand la survie diminue ; en revanche, il plafonne aux alentours de 5.10^{-2} dès que la fréquence des survivants descend en dessous de 7% dans l'air saturé d'eau.

Contrairement à ce qui a été observé pour les mutants de coloration, l'état physiologique des spores n'influe pas sur la mutabilité vers le caractère stérile.

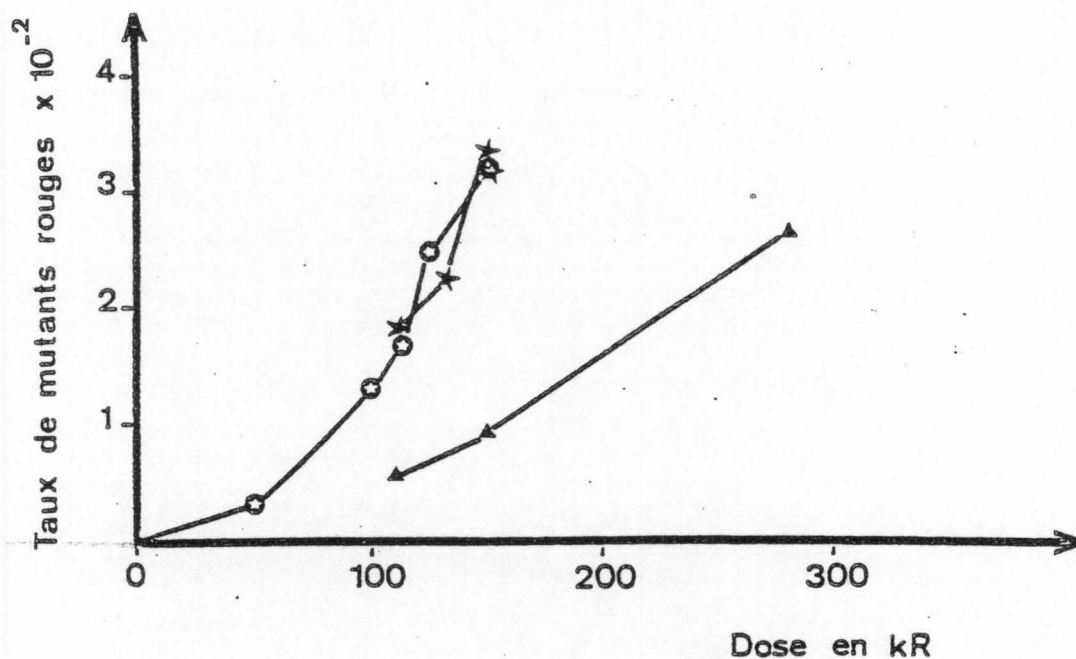


Fig. 21 - Taux de mutants "rouges" en fonction de la dose d'exposition aux rayons γ .

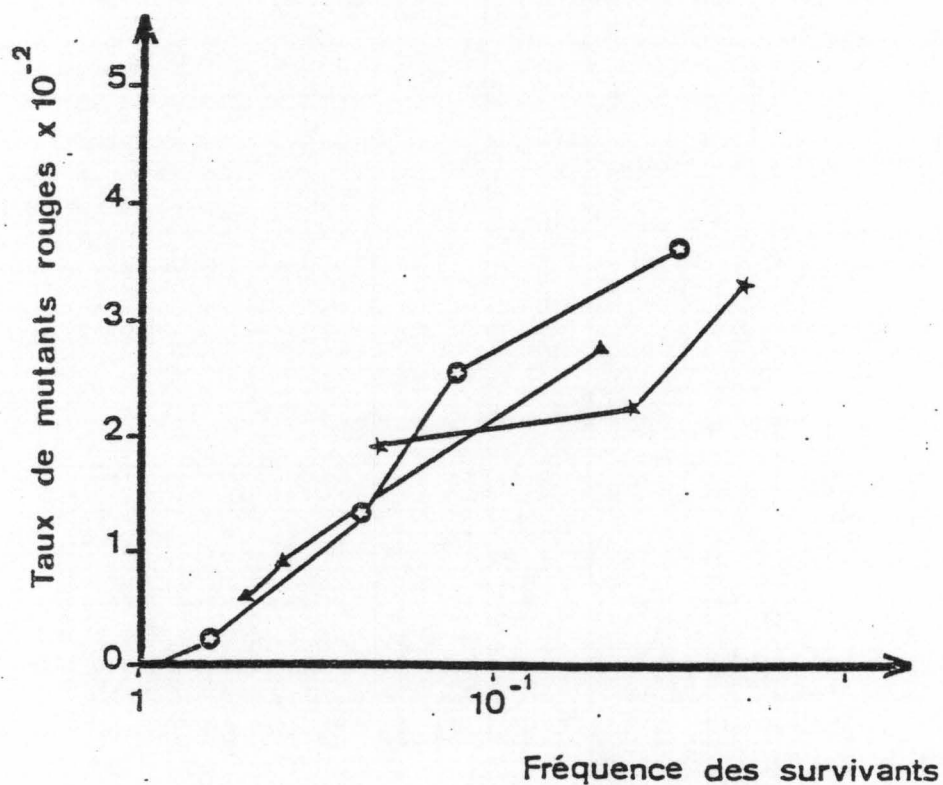


Fig. 22 - Taux de mutants "rouges" en fonction de la fréquence de survivants. Les spores ont séjourné dans des atmosphères de composition différente :

- spores conservées 3 jours dans l'air ambiant (· - ⊕) ;
- spores conservées 5 jours dans l'air contenant 100% d'oxygène (· - ★) ;
- spores conservées 6 jours dans l'air contenant 100% d'azote (· - ▲).

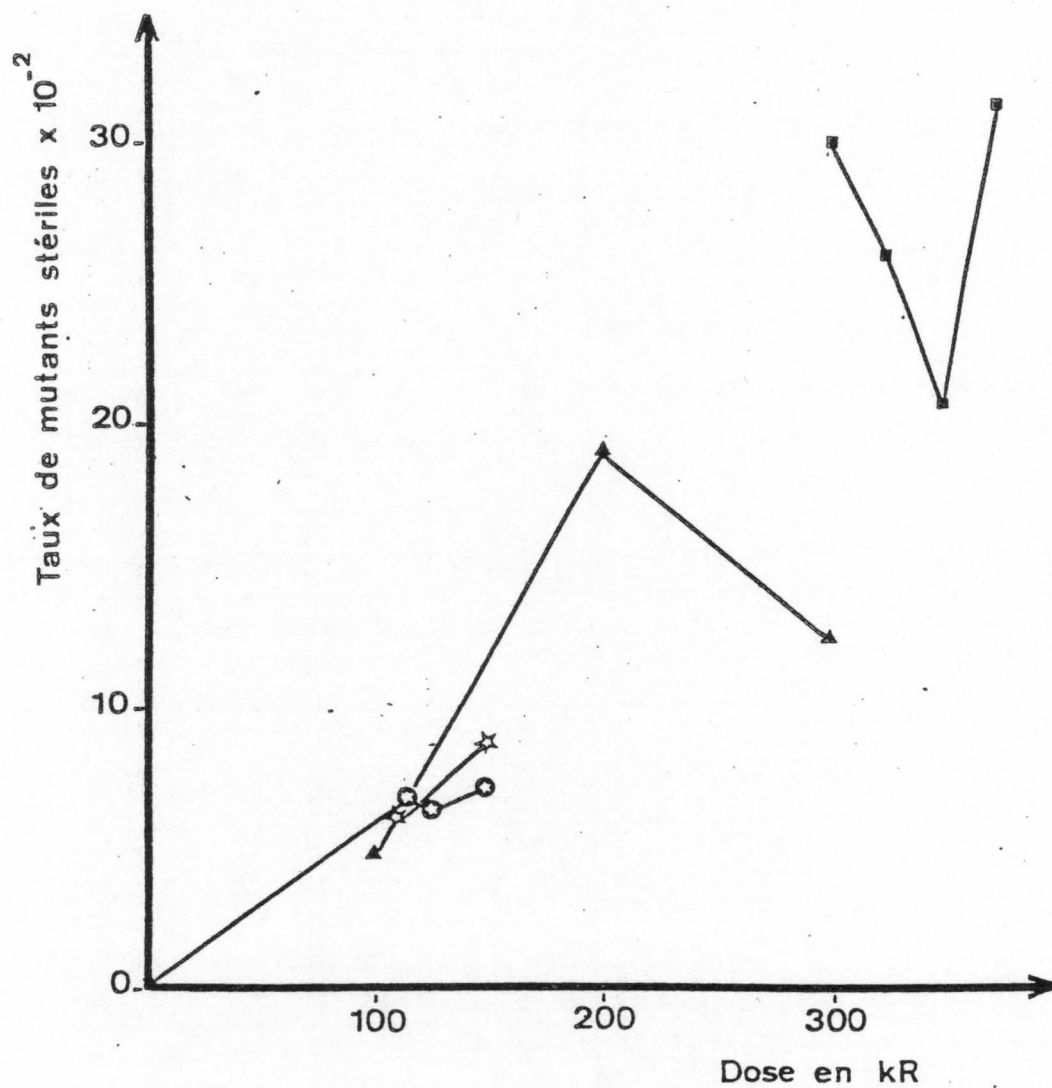


Fig. 23 - Taux de mutants stériles en fonction de la fréquence de survivants et des conditions de conservation des spores dans des humidités relatives (HR) différentes :

- spores de 3 jours, HR = 100% (- ●) ;
- spores de 23 jours, HR = 100% (- ☆) ;
- spores de 23 jours, HR = 55% (- ■) ;
- spores de 23 jours, HR = 33% (- ▲) .

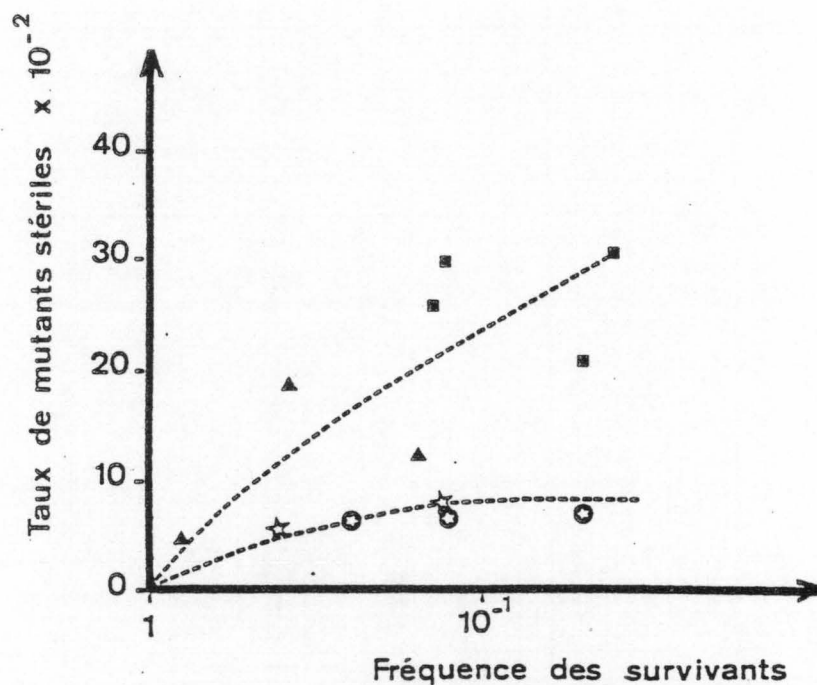


Fig. 24 - Taux de mutants stériles en fonction de la fréquence des survivants.

Les courbes expérimentales n'ont pas été tracées, nous avons seulement porté sur le graphe un tracé approximatif rendant compte de deux familles de point :

- celles correspondant à des humidités relatives de 100% (☆) et (⊙) ;
- celles correspondant à des humidités relatives de 55% (■) et 33% (▲).

2.3.2.2. Spores conservées dans des atmosphères gazeuses différentes

Bien que nous disposons seulement de quelques points expérimentaux, il semble que, comme pour le caractère de coloration, l'oxygène ne modifie pas la mutabilité vers le caractère stérile (Figures 25 et 26).

2.3.2.3. Conclusion

La mutabilité pour le caractère stérile ne semble augmentée qu'en irradiant les spores en atmosphère d'humidité relative faible (55 et 33% HR).

On peut penser que les événements mutagènes qui conduisent à la stérilité soient différents de ceux qui provoquent une modification de coloration. Mais d'autre part, comme on ne disposait pas de spores témoins conservées pendant 20 jours dans les enceintes à 55% et 33% d'humidité relative on ne peut écarter l'hypothèse selon laquelle l'apparition de nombreux thalles mutants serait consécutive au mode de conditionnement lui-même.

2.3.3. Taux de mutants résistant à la 8-azaguanine

2.3.3.1. Spores conservées dans des humidités relatives différentes

L'allure de la courbe représentant l'évolution du taux de mutants parmi des spores de 23 jours placées dans un air à 100% d'humidité, en fonction de la dose de rayons γ (Figure 27) est différente de celle de la courbe tracée pour les mutants de coloration dans des conditions similaires : elle passe par un maximum pour une dose d'environ 100 kR. En ce qui concerne l'évolution des taux de mutants obtenus en atmosphère plus sèche (33, 55 et 75%), on ne note pas de variations notables quand la dose croît.

Des courbes de forme similaire sont obtenues également quand on porte les taux de mutants en fonction des fréquences de survivants (Figure 28) : pour 100% d'humidité relative, un maximum de mutants est recueilli quand on a 50% de survie ; avec les humidités plus faibles, le taux de mutants varie peu avec la survie et il est 3 à 4 fois plus petit qu'à 100% d'humidité relative. Le fait que la mutabilité soit supérieure pour des fréquences de survivants relativement élevées est original. En effet, chez de nombreux organismes, on obtient un maximum de mutants

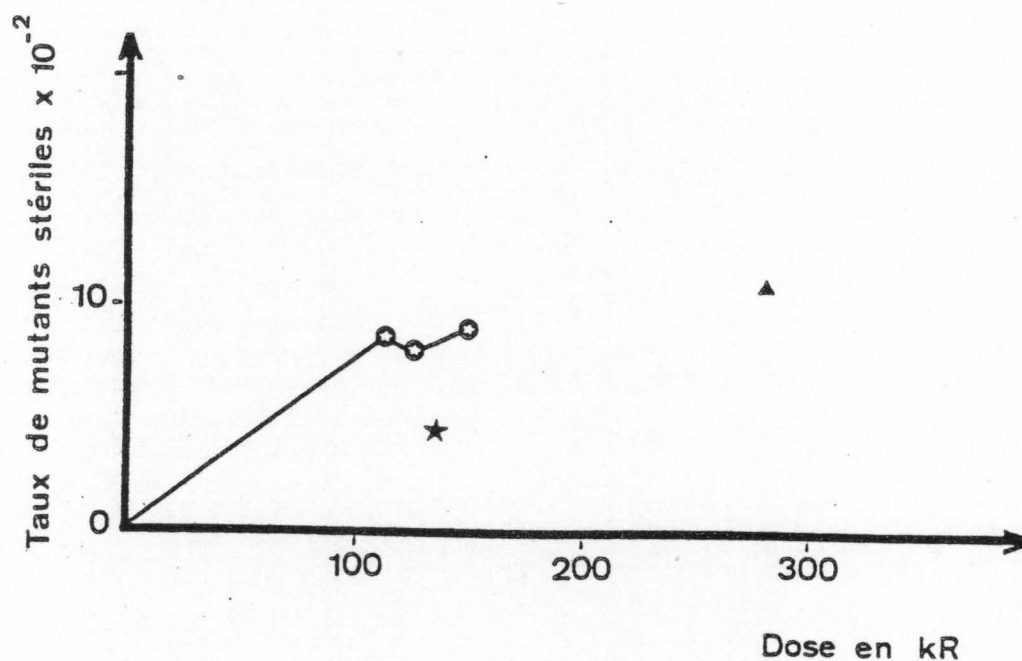


Fig. 25 - Taux de mutants stériles en fonction de la dose d'exposition aux rayons γ .

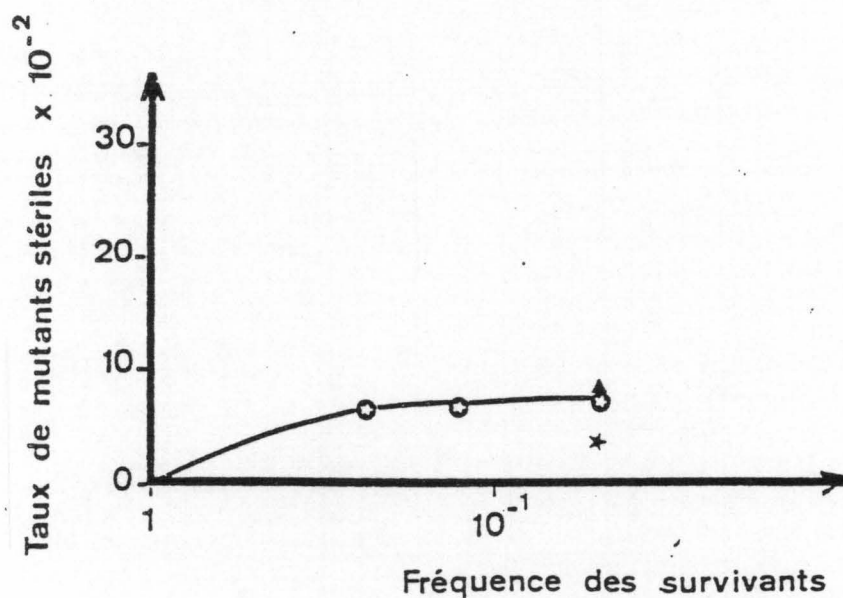


Fig. 26 - Taux de mutants stériles en fonction de la fréquence de survivants. Les spores ont séjourné dans des atmosphères de composition différente :

- spores conservées 3 jours dans l'air ambiant ($\odot$) ;
- spores conservées 5 jours dans l'air contenant 100% d'oxygène ($\star$) ;
- spores conservées 6 jours dans l'air contenant 100% d'azote ($\blacktriangle$).

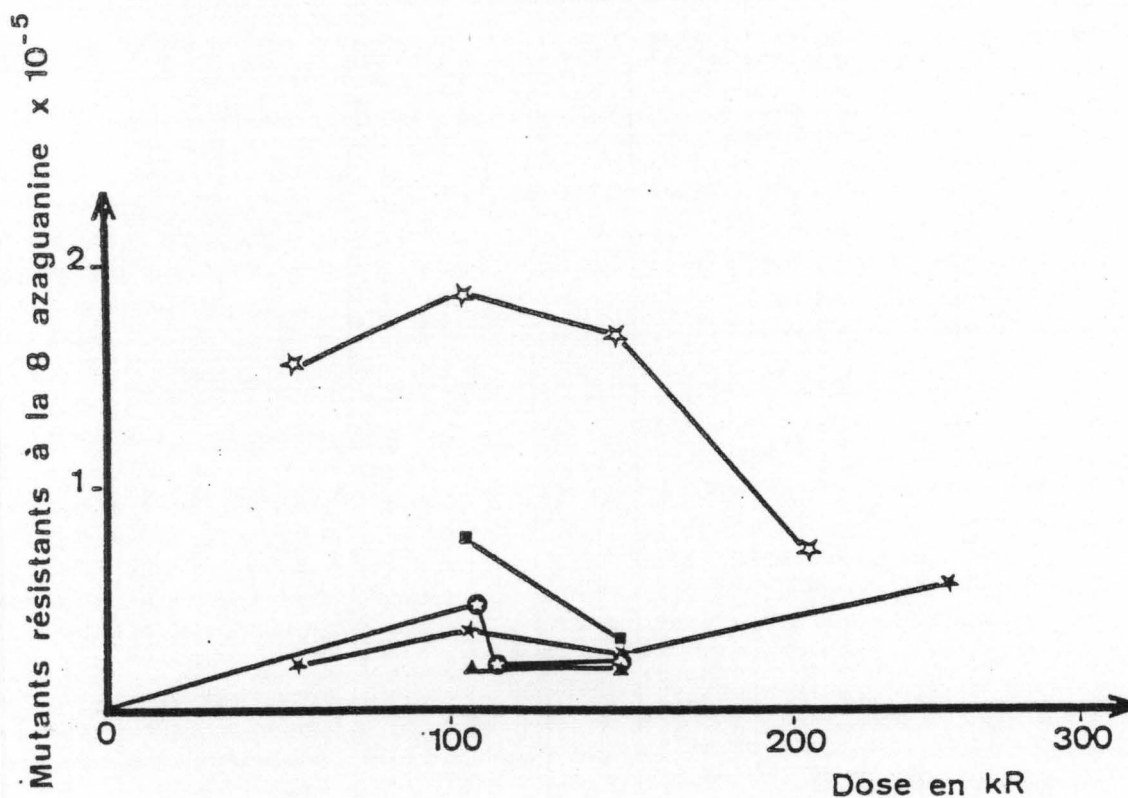


Fig. 27 - Taux de mutants résistants à la 8-azaguanine en fonction de la dose d'exposition aux rayons γ et des conditions de conservation des spores dans des humidités relatives (HR) différentes :

- spores de 3 jours, HR = 100% (- ○) ;
- spores de 23 jours, HR = 100% (- ☆) ;
- spores de 23 jours, HR = 75% (- ✕) ;
- spores de 23 jours, HR = 55% (- ■) ;
- spores de 23 jours, HR = 33% (- ▲) .

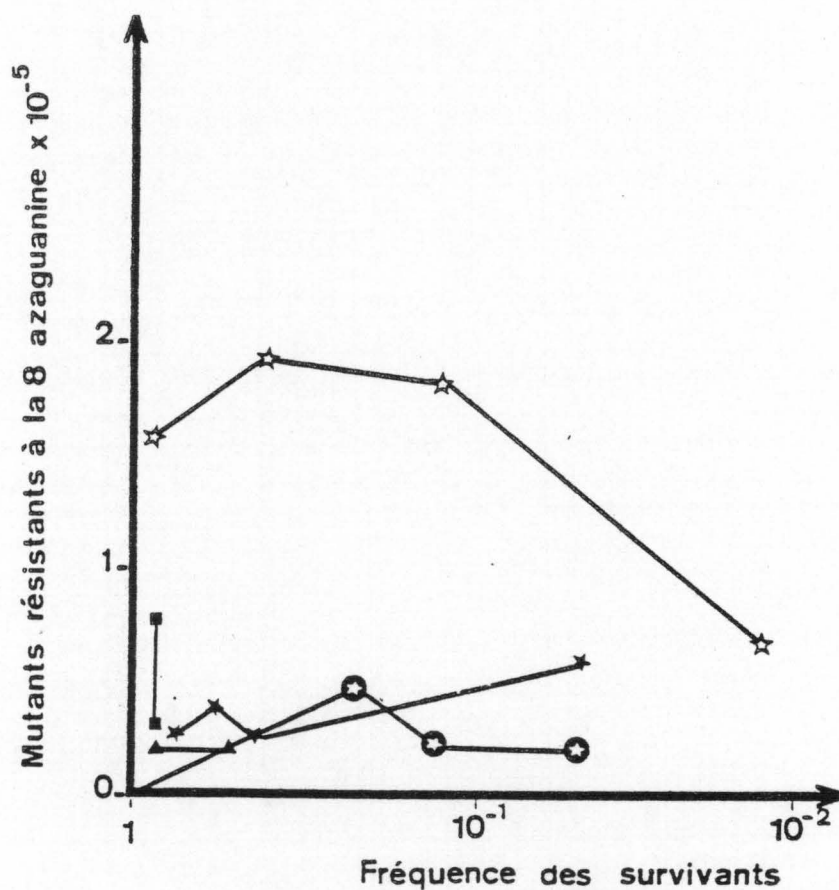


Fig. 28 - Taux de mutants résistants à la 8-azaguanine en fonction de la fréquence des survivants et des conditions de conservation des spores dans des humidités relatives différentes :

- spores de 3 jours, HR = 100% (-●) ;
- spores de 23 jours, HR = 100% (-☆) ;
- spores de 23 jours, HR = 75% (-✕) ;
- spores de 23 jours, HR = 55% (-■) ;
- spores de 23 jours, HR = 33% (-▲) .

avec des doses entraînant une forte létalité (MUNSON et GOODHEAD, 1977). Deux types d'hypothèses peuvent expliquer ce comportement :

1) L'échantillon irradié serait formé de deux populations : l'une, minoritaire, est très mutable, l'autre, majoritaire, est moins mutable. Normalement, l'existence de deux populations de sensibilités différentes aurait dû se manifester lors de l'étude de la létalité : les courbes représentant les fréquences de survivants en fonction de la dose auraient dû comporter une rupture de pente. Toutefois, il est possible que celle-ci n'apparaisse pas si l'une des populations est très minoritaire. En revanche, l'existence de cette population serait décelable sur la courbe expérimentale représentant le taux de mutants en fonction de la dose : elle apparaît dans la partie du tracé correspondant à des doses inférieures à 150 kR. Au-delà de cette valeur, tous les individus de cette petite population sont mutés et le tracé correspond à la mutabilité de la deuxième population.

2) On pourrait aussi avoir un système où la mutagenèse est inductible, c'est-à-dire qu'il faut un certain nombre de lésions pour obtenir un effet mutagène. Cette hypothèse rendrait compte de la brusque montée de la courbe. Pour expliquer la descente à partir du maximum, il faudrait admettre que les lésions deviennent léthales lorsque leur nombre dépasse un certain seuil, ou bien, qu'à partir d'une dose donnée, d'autres mutations sont induites et masquent le caractère de résistance à la 8-azaguanine. De tels phénomènes sont connus chez les levures (CHANET, communication personnelle).

Comme pour les mutants de coloration, l'état physiologique des spores influe sur la mutabilité en atmosphère saturée d'eau : les microconidies conservées 23 jours en absence de milieu mutant 10 à 20 fois plus que les spores de 3 jours quand elles sont exposées à des doses de 100 à 150 kR.

2.3.3.2. Spores conservées dans des atmosphères gazeuses différentes

Les taux de résistants obtenus en fonction de la dose (Figure 29) aussi bien qu'en fonction de la survie (Figure 30) diffèrent selon la composition de l'atmosphère : il semblerait que la mutabilité vers le caractère de résistance à la 8-azaguanine soit plus grande sous oxygène que sous azote. Cependant, il est curieux de constater que c'est dans l'air qu'on recueille le moins de mutants. On pourrait expliquer le fait que les spores conservées sous oxygène mutant environ 5 fois plus que dans l'air en supposant que le taux de mutants spontanés sous oxygène pur est

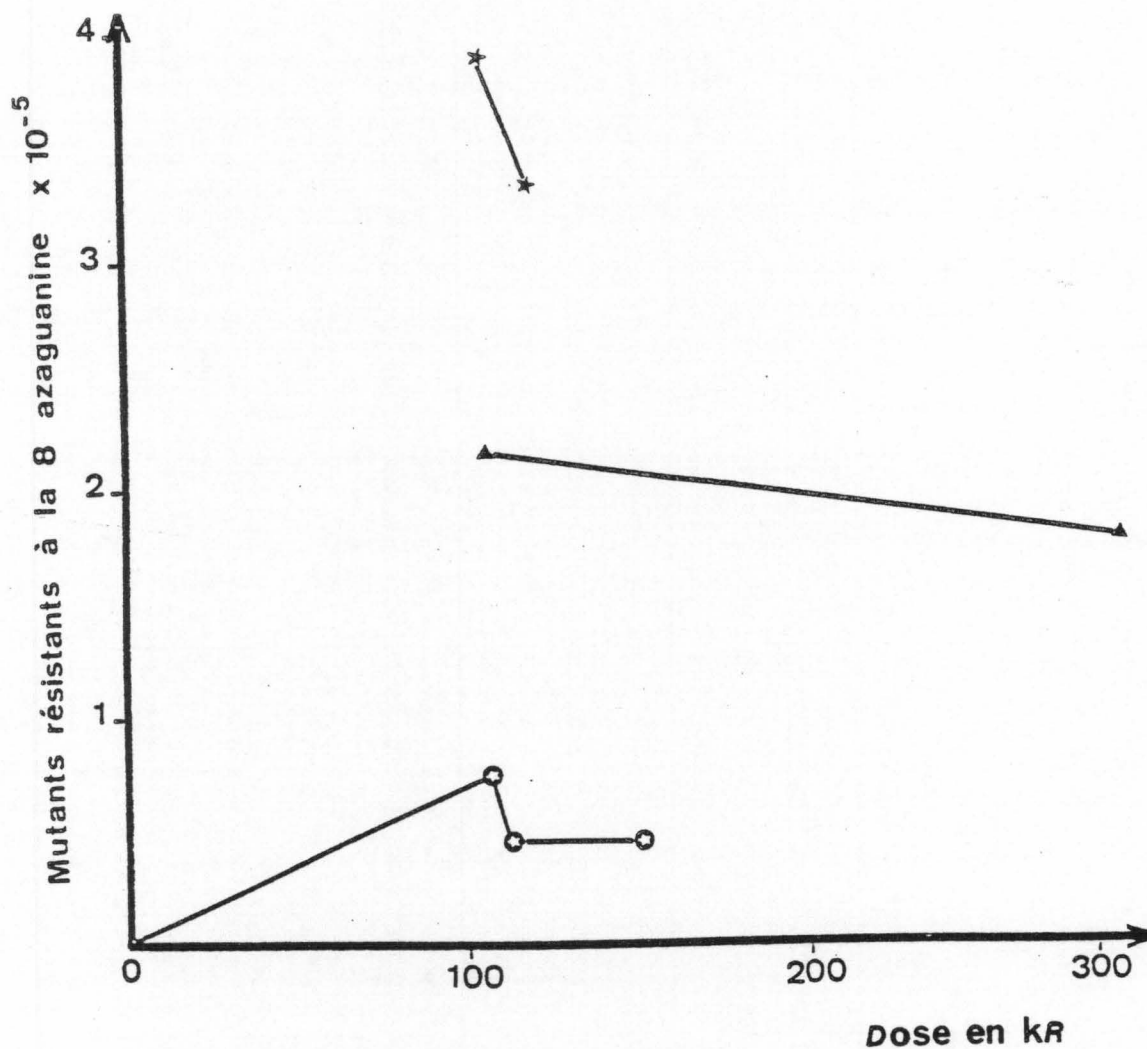


Fig. 29 - Taux de mutants résistants à 8-azaguanine en fonction de la dose d'exposition aux rayons γ . Les spores ont séjourné dans des atmosphères de composition différente :

- spores conservées 3 jours dans l'air ambiant (—●—) ;
- spores conservées 5 jours dans l'air contenant 100% d'oxygène (—★—) ;
- spores conservées 6 jours dans l'air contenant 100% d'azote (—▲—).

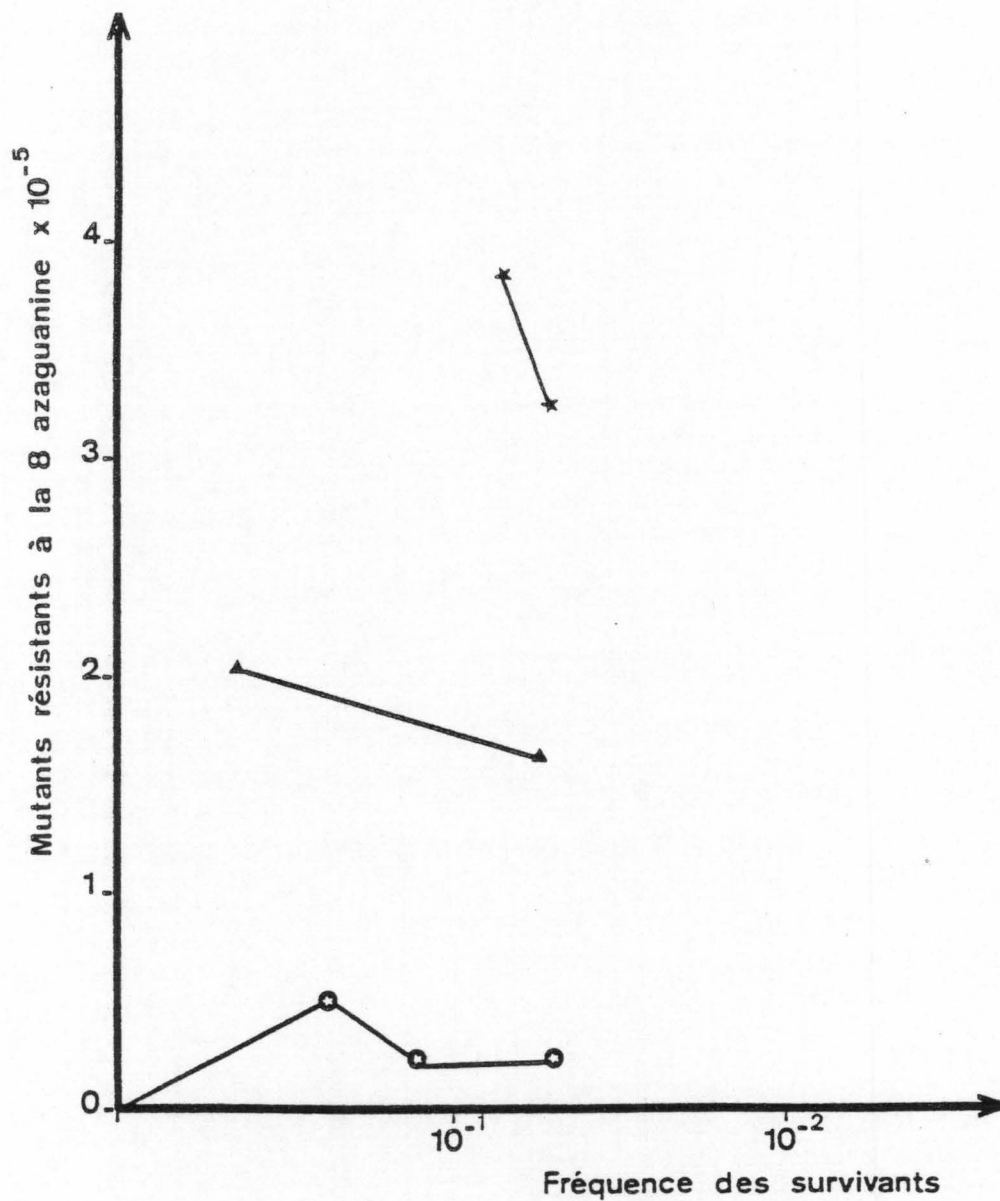


Fig. 30 - Taux de mutants résistants à la 8-azaguanine en fonction de la fréquence de survivants. Les spores ont séjourné dans des atmosphères de composition différente :

- spores conservées 3 jours dans l'air ambiant (-●) ;
- spores conservées 5 jours dans l'air contenant 100% d'oxygène (-★) ;
- spores conservées 6 jours dans l'air contenant 100% d'azote (-▲).

notablement plus important que dans l'air. C'est pourquoi il aurait été intéressant de déterminer ce taux "spontané", puisqu'on sait, que l'oxygène peut être mutagène.

CONCLUSION

Nous avons étudié l'influence de la composition en O_2 , N_2 et H_2O de l'atmosphère sur la mortalité et la mutabilité engendrées par les rayons γ chez les microconidies uninucléées haploïdes de *Nectria haematococca*. Notre but était d'abord de déterminer si ces facteurs de l'environnement entraînaient des effets sur la létalité des spores du champignon comparables à ceux obtenus avec des graines placées dans les mêmes conditions de traitement. Ensuite nous nous proposons de préciser les facteurs de l'environnement permettant d'obtenir chez *Nectria haematococca* les taux de mutants les plus élevés possibles. Une similitude des réponses léthales des graines et des microconidies nous autorisait à considérer *Nectria haematococca* comme un modèle convenable pour les plantes. Cela nous permettrait de définir pour celles-ci des conditions favorables à la mutagenèse, en nous basant sur les résultats acquis en étudiant la mutabilité du champignon.

Notre travail établit que :

1° - Pour ces deux types de rayonnement employés γ et UV, les courbes de survie ont la même allure. Celles-ci ont été interprétées en disant qu'une conidie était tuée lorsque plusieurs cibles étaient touchées par plusieurs coups.

2° - Différents facteurs modifient la sensibilité des spores vis-à-vis de l'effet léthal des rayons γ . L'état physiologique (âge, facteurs nutritionnels) est un de ceux-ci : les spores prises sur des thalles de 30 jours sont plus sensibles que les spores de 3 jours, c'est-à-dire que pour obtenir un même pourcentage de survivants, il faut exposer les spores âgées à une dose de rayonnement plus faible que les spores jeunes. Les causes de cette plus grande sensibilité des microconidies âgées sont inconnues. Un autre facteur est la présence d'oxygène. Son effet est celui que l'on connaissait grâce aux travaux réalisés avec d'autres organismes, à savoir qu'il augmente nettement la radiosensibilité dès lors qu'il est présent, même en quantité relativement faible dans l'atmosphère (KIEFFER, 1979). La teneur dans l'air est suffisante pour que l'effet léthal des rayons γ soit maximum puisque l'enrichissement de l'atmosphère en oxygène n'entraîne pas d'augmentation de la mortalité par rapport à l'air lorsque les doses d'exposition sont supérieures à 100 kR. Un troisième facteur pris en compte est l'eau. Son influence sur la létalité des microconidies, induite par les rayons γ est également conforme à ce qui a été décrit pour de nombreux organismes. Nous n'avons pas pu tracer la courbe de sorption des microconidies de *Nectria haematococca*, mais celle qui a été obtenue avec des spores de *Penicillium caseicolum* a la même

allure que les courbes publiées pour des spores bactériennes, des cellules de levure ou des graines d'*Hibiscus*. Pour des humidités relatives atmosphériques comprises entre 33 et 55%, la teneur en eau des organismes étudiés reste constante, représentant environ 5 à 25% du poids sec selon le matériel considéré ; cette eau serait de l'eau d'imbibition, d'après GUILBOT (1960). Ensuite, la teneur en eau des cellules augmente rapidement, en même temps que l'humidité relative de l'atmosphère s'élève : dans ces conditions d'humidité, les cellules renferment de l'eau libre en plus de l'eau liée et de l'eau d'imbibition. Il n'a malheureusement pas été possible d'étudier l'influence de l'eau de constitution, les conditions expérimentales calquées sur les méthodes de traitement des graines entraînant la létalité des microspores aux faibles teneurs en eau. Nos expériences ont montré que la radiorésistance des spores conditionnées à 33 et 55% d'humidité relative de l'air est supérieure à celle des spores conservées à 75 et 100% d'humidité relative. Il est même vraisemblable que la radiorésistance passe par un maximum pour 55%. Cette variation avec un maximum au début de la zone des teneurs en eau libre est semblable à ce qui a été observé pour les graines d'orge (CONGER et al., 1966) et de tomate (SILVY, 1968). Par contre, il n'est pas possible de dire si on a également un maximum dans la zone de l'eau d'imbibition comme pour l'*Hibiscus* (MAHAMA, 1980 ; MAHAMA et SILVY, 1982) car les teneurs en eau étudiées dans cette zone ne sont pas assez nombreuses.

En ce qui concerne l'effet mutagène des rayonnements, on constate que pour les 3 catégories de mutants étudiés (mutants de coloration, stérilité et résistance à la 8-azaguanine), l'exposition aux rayons γ augmente d'un facteur 100 à 1000 le taux de mutants spontanés. Cette augmentation est de la même importance que celle que l'on a observé avec les rayons UV pour une même survie (5%).

La mutabilité varie avec les conditions d'environnement, selon le type de mutant recherché. Des variations de la mutabilité selon le gène considéré et l'environnement ont été observées aussi chez *Saccharomyces cerevisiae* (HAYNES et ECKARDT, 1980 ; MORTIMER et al., 1965). Dans l'air saturé en vapeur d'eau, pour une dose d'irradiation γ de 130 à 200 kR, les taux de mutants rouges et de résistants à la 8-azaguanine de *Nectria haematococca* sont nettement supérieurs à ceux obtenus en atmosphère d'humidités relatives plus faibles. Il semble donc qu'en atmosphère saturante, la radiosensibilité des spores et leur aptitude à muter vers certains caractères varient dans le même sens : plus la dose de rayonnement est élevée, plus la létalité et la mutabilité sont importantes. Les produits de la radiolyse de l'eau auraient donc la même efficacité pour favoriser les deux processus. En revanche, ce sont les spores déshydratées qui mutent le plus

fréquemment vers la stérilité ; ceci suggère que les événements mutagènes qui entraînent la stérilité seraient différents de ceux qui conduisent à la pigmentation rouge ou à la résistance à la 8-azaguanine.

Avec des doses de rayonnement de l'ordre de 100 KR, les trois caractères mutants étudiés apparaissent plus fréquemment quand les spores ont été conservées sous oxygène que sous azote. Cependant, si on rapporte les taux de mutants à la fréquence des survivants, la différence entre oxygène et azote disparaît : les taux de mutants obtenus dans les deux conditions sont comparables ; la différence était due au fait que la létalité est notablement plus grande sous oxygène. Il s'ensuit qu'en présence d'oxygène, la quantité de lésions est plus importante, mais ces lésions ne sont pas plus mutagènes qu'en son absence.

L'état physiologique du matériel traité peut intervenir également pour favoriser ou limiter l'efficacité mutagène du rayonnement pour un caractère donné : les microconidies irradiées sur des cultures de 3 jours mutent plus difficilement pour donner naissance à des thalles rouges ou résistants à la 8-azaguanine que les spores de 23 jours séparées du milieu nutritif depuis 20 jours ; mais les taux de mutants sont semblables dans les deux cas si on considère le caractère de stérilité.

On a remarqué aussi que les formes des courbes représentant les taux de mutants en fonction de la dose de rayons γ ou de la fréquence de survivants sont différentes selon le caractère auquel on s'adresse. Ainsi, en atmosphère saturée en vapeur d'eau, les taux de mutants de coloration ou de stérilité augmentent avec les doses de rayonnement croissantes ou les fréquences de survivants décroissantes. En revanche, la variation du taux de résistants à la 8-azaguanine, en fonction de la dose comme de la survie, passe par un maximum. Dans ce cas, les conditions qui déterminent une forte mortalité ne sont pas les plus favorables pour recueillir un grand nombre de résistants. Par conséquent, selon le type de mutants que l'on veut obtenir, il faudra utiliser des doses de rayonnement très différentes pour avoir quelques chances de recueillir les mutants souhaités. Il n'est donc pas possible de définir un protocole unique permettant d'améliorer la mutabilité d'un organisme ; pour chaque type de mutations recherchées, il sera au contraire nécessaire de déterminer les conditions les plus favorables.

Afin de préciser les résultats énoncés précédemment, il serait nécessaire :

- d'évaluer le taux de mutation spontané pour chacune des conditions de conservation. En effet l'environnement lui-même peut induire l'apparition de certaines mutations et le fait de ne pas avoir de renseignement à ce sujet nous a gêné dans l'interprétation des résultats ;

- de disposer d'une technique permettant l'obtention de spores déshydratées dont la teneur en eau correspondrait à de l'eau liée selon GUILBOT. Avec la méthode des solutions de sel en milieux aqueux lorsque l'humidité relative de l'enceinte de conservation est inférieure à 33% les spores ne sont plus viables. Une étude bibliographique nous a montré que TALLENTIRE et POWERS (1963) ont réussi à déshydrater totalement des spores de *Bacillus megaterium* puis à les réhydrater progressivement tout en conservant leur viabilité. Cette méthode ayant été également utilisée avec succès par WILSON et POWERS (1970) sur des conidies d'*Aspergillus nidulans*, nous envisageons de la tester sur les spores de *Nectria haematococca*. Si elle se révèle satisfaisante, nous pourrions montrer si la radiosensibilité des conidies dans le domaine des très faibles humidités relatives est du même type que celle observée sur les graines et les spores bactériennes qui sont de plus en plus radiosensibles quand l'humidité relative de l'air diminue de 15% à 0%.

Nous essayerons de déterminer si la mutabilité est du même type que celle observée dans l'autre zone de forte radiosensibilité correspondant à des humidités relatives comprises entre 55% et 100% ou bien s'il n'y a pas de corrélation entre létalité et mutabilité. En effet, le type de dommages provoqués par les rayonnements dans un environnement plus ou moins sec étant différents, il est vraisemblable que les taux de mutants obtenus varient suivant l'état de l'eau dans la cellule et suivant les gènes considérés.

Les nouvelles perspectives pourront être conduites à l'aide des 3 types de mutants déjà utilisés dans le présent travail. Nous pourrions y ajouter l'étude d'un autre type de mutants : les révertants d'un marqueur d'auxotrophie. La mise au point du matériel se prêtant le mieux à ce type d'investigations ayant été assez longue, nous n'avons pu l'exploiter dans le temps qui nous était imparti. Toutefois, le matériel est finalement prêt et il serait intéressant d'étudier l'influence de l'environnement sur un gène particulier. Ce système monogénique présente l'avantage d'éviter les interactions qui peuvent se produire entre gènes dans les systèmes polygéniques que nous avons étudiés précédemment.

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDER P., CONNORS T.A. and MARBAIX G., 1971 - Drugs which enter nucleic acids.
In "Fondamentals of biochemical pharmacology" - Pergamon Press.
- ALPER T. and HOWARD-FLANDERS P., 1956 - Role of oxygen in modifying the radiosensitivity of *E. coli* B.
Nature, 178 : 978-979.
- BABAI-AHARY A., DABOUSSI-BAREYRE M.J. and PARISOT D., 1982 - Isolation and genetic analysis of self-sterility and perithecial pigmentation mutants in a homothallic isolate of *Nectria haematococca*.
Can. J. Bot., 60 : 79-84.
- BACQ Z.M. and ALEXANDER P., 1966 - Fundamentals of radiobiology.
2 nd edn. Pergamon press, London.
- BARRAN L.R., 1980 - Effect of heat freeze-thawing and dessication on the survival of *Fusarium sulphureum* spores.
Trans. Br. Mycol. Soc., 75 (3) : 425-427.
- BELLAMY W.D. and LAWTON E.J., 1955 - Studies on factors affecting the sensitivity of bacteria to high velocity electrons.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 59 : 595-603.
- BERGER G., AGNEL J.P. et SAINT-LEBE L., 1977 - Etude de la partie soluble des radiodextrines formées par l'irradiation gamma de l'amidon de maïs.
Die Stärke 29 : 40-47.
- BOOTH C., 1975 - The present status of *Fusarium* taxonomy.
Annual Review of Phytopathology, 13 : 83-93.
- BREWBAKER J.L., ESPIRITU L. and MAJUMDER S.K., 1965 - Comparative effects of X-rays and U.V. irradiation on pollen germination and growth.
Radiat. Bot., 5 : 493-500.
- BROCK R.D. and FRANKLIN I.R., 1966 - The effect of desiccation, storage and radiation intensity on mutation rate in tomato pollen.
Radiat. Bot., 6 : 171-179.

- CALDECOTT R.S., 1961 - Seedling height, oxygen availability, storage and temperature :
Their relation to radiation induced genetic and seedling injury in barley.
Effects of ionizing radiations on seeds (Proc. Conf. Karlsruhe, 1960), IAEA,
Vienna, 3-24.
- CALDECOTT R.S. and NORTH D.T., 1961 - Factors modifying the radiosensitivity of
seeds and the theoretical significance of the acute irradiation of successive
generations.
Symposium on mutation and plant breeding (Ithaca, 1960). Natl. Acad. Sci.
Pub., 891 : 365-404.
- CHOU T.W., SINGH B., SALUNKHE D.K. and CAMPBELL W.F., 1970 - Effects of gamma
radiation on *Penicillium expansum* L.
I. Some factors influencing the sensitivity of the fungus.
Radiat. Bot., 10 : 511-516.
- CONGER B.V., NILAN R.A., KONZAK C.F. and METTER S., 1966 - The influence of seed
water content on the oxygen effect in irradiated barley seeds.
Radiat. Bot., 6 : 129-144.
- CONGER B.V., HILEMAN J.R., NILAN R.A. and KONZAK C.F., 1971 - The influence of
temperature on radiation-induced oxygen-dependent and independent damage in
barley seeds.
Radiat. Res., 46 : 601-612.
- CONGER B.V., KONZAK C.F. and NILAN R.A., 1977 - Radiation sensitivity and modifying
factors.
In "Manual on mutation breeding" - 2 nd edn. IAEA, Vienna, 40-43.
- DABOUSSI-BAREYRE M.J., 1979 - Contrôle génétique de deux états différenciés chez
l'Ascomycète *Nectria haematococca*.
Thèse Doctorat d'Etat, Faculté des Sciences Orsay.
- DODD N.J.F. and EBERT M., 1970 - Effects of ionizing radiation on dried spores of
Osmunda regalis. II - Modification of survival and its correlation with free
radical changes.
Int. J. Radiat. Biol., 18 : 463-473.

- DODD N.J.F. and EBERT M., 1973 - A correlation of ESR and radiobiological observations of the temperature and oxygen effect in *Osmunda regalis* spores after irradiation with fast electrons.
Radiat. Bot., 13 : 87-96.
- ECKARDT F., 1980 - Quantitative measures of mutagenicity and mutability based on mutant yield data.
Mutat. Res., 74 : 439-458.
- ECKARDT F. and HAYNES R.H., 1977 - Kinetics of mutation induction by ultraviolet light in excision-deficient yeast.
Genetics 85 : 225-247.
- FRIDOVICH I., 1978 - Les superoxydes ou les dangers de la vie aérobie.
La Recherche, 92 : 743-749.
- GEORGOPOULOS S.G., 1962 - Genetic control of tolerance to TCNB and PCNB in *Hypomyces solani* f. sp. *cucurbitae*.
Nature, 194 : 148-149.
- GILET R., 1970 - Etude au moyen des courbes de survie, de la restauration cellulaire après irradiation chez les Chlorelles.
Thèse Doctorat d'Etat, Faculté des Sciences Grenoble.
- GLADSTONE J.S. and HUNTER A.W.S., 1959 - Effects of seed moisture content and post irradiation storage on the growth and survival of X₁ tomato plants.
Can. J. Genet. Cyt., 1 : 339-346.
- GLADSTONES J.S. and FRANCIS C.M., 1965 - Studies on the use of mutagenic agents in plant breeding. II - The effects of dose and seed moisture content on mutation production in *Lupinus angustifolius* by X. rays.
Aust. J. Agric. Res., 16 : 301-310.
- GOLBLITH S.A., REY L. and ROTHMAY R., 1975 - In "Freeze drying and advanced food technology".
Academic Press Inc. (London).
- GUILBOT A. and LINDENBERG A.B., 1960 - Eau non solvante et eau de sorption de la cellule de Levure.
Biochim. Biophys. Acta, 39 : 389-397.

HANLIN R., 1971 - Morphology of *Nectria haematococca*.

Amer. J. Bot., 58 (1) : 105-116.

HAYNES R.H. and ECKARDT F., 1979 - Analysis of dose response patterns in mutation research.

Can. J. Genet. Cytol., 21 : 277.

HAYNES H. and KUNZ B., 1980 - In "The molecular biology of the yeast *saccharomyces*". Cold Spring Harbor Lab. Publication.

HOWARD A., CERCEK L., EBERT M. and HAIGH M.V., 1966 - 3nd Int. Congress Rad. Res., Cortina, Italy. Abstract n° 441.

KAPPAS A. and GEORGOPOULOS S.G., 1970 - Genetic analysis of dodine resistance in *Nectria haematococca* (Syn. *Hypomyces solani*).
Genetics, 66 : 617-622.

KATAMAYA T. and NAGAMATSU T., 1966 - Radiosensitivity in plants. I - Relation between the water content and of some crops seeds and their sensitivity to different doses of X-rays and gamma-rays.
Japan J. Breeding, 16 : 5-10.

KIEFFER J., 1975 - Theoretical aspects and implication of the oxygen effect.
In "Radiat. Res. - Biomedical, Chemical and Physical Perspectives (Nygaard O.F., Adler H.I., and Sinclair W.K., Eds), 1025-1039.
Academic Press, New York.

KIEFFER J. and HUBERT B., 1979 - The oxygen effect in the killing of diploid yeast by photon irradiation of different energies.
Radiat. Res., 77 : 472-478.

KLINGMÜLLER W., 1962 - Influence of graded moisture content on survival and back mutation rate of X-rayed *Neurospora crassa* conidia.
Proc. 2nd Intern. Congr. Radiation Res., Harrogate, England, 1962.

LAVILLE E., 1971 - Etude des mécanismes de deux variations contagieuses chez le *Nectria haematococca* (Berk. et Br.) Wr.
Thèse Doctorat d'Etat, Faculté des Sciences d'Orsay.

MAHAMA A., 1980 - Etude de l'action des rayonnements gamma du Cobalt 60 sur les semences de deux espèces d'*Hibiscus* textiles.-Influence de la teneur en eau des semences sur leur radiosensibilité.

- Effets mutagènes observables
sur deux générations successives.

Thèse Doctorat d'Ingénieur, Faculté des Sciences de Montpellier.

MAHAMA A. et SILVY A., 1982 - Influence de la teneur en eau sur la radiosensibilité des semences d'*Hibiscus cannabinus* L. - I. Rôle des différents états de l'eau. Environ. Exp. Bot., 22 (n° 2) : 233-242.

MALLA D.S., DIEHL J.F. and SALUNKHE D.K., 1967 - *In vitro* susceptibility of strains of *Penicillium viridicatum* and *Aspergillus flavus* to β -irradiation. Experimentia, 23 : 492-495.

MILTENBURGER H. and BAUER H., 1961 - Inaktivering von *Neurospora* konidium durch Röntgenstrahlen unter uerschiedenen Bedingungen. Strahlentherapie, 116 : 57 - 69.

MORTIMER R., BRUSTAD T. and CORMACK D.V., 1965 - Influence of linear energy transfer and oxygen tension on the effectiveness of ionizing radiations for induction of mutations and lethality in *Saccharomyces cerevisiae*. Radiat. Res., 26 : 465-482.

MUCCHIELLI A., 1975 - Evaluation toxicologique des produits formés au cours de l'irradiation gamma (^{60}Co) de l'amidon. Influence sur la croissance et le métabolisme bactérien. Thèse Doctorat d'Etat, Faculté des Sciences de Lille.

MUCCHIELLI A. and SAINT LEBE L., 1975 - Physiological behavior of *Escherichia coli* in the presence of extracts of irradiated starch. European J. Appl. Microbiol., 1 : 337-342.

MUNSON R.J. and GOODHEAD D.H., 1977 - The relation between induced mutation frequency and cell survival - a theoretical approach and an examination of data for eukaryotes. Mutat. Res., 42 : 145-160.

- NILAN R.A., KONZAK C.F., HARLE J.R. and HEINER R.E., 1962 - Interrelation of oxygen, water and temperature in the production of radiation induced effects in plants. *Strahlentherapie (Suppl.)*, 51 : 171-182.
- PARISOT D., MAUGIN M. and GERLINGER C., 1982 - Genetic and epigenic factors involved in the excretion of naphthoquinone pigments into the culture medium by *Nectria haematococca*. *Journal of General Microbiology*, 126 : 443-457.
- POWERS E.L., LYMAN J.T. and TOBIAS C.A., 1968 - Some effects of accelerated charged particles on bacterial spores. *Int. J. Radiat. Biol.*, 14 : 313-330.
- POWERS E.L. and TALLENTIRE A., 1968 - The roles of water in the cellular effects of ionizing radiations. In "Actions chimiques et biologiques des radiations". Masson et Cie Editeurs. Paris.
- SILVY A., 1968 - Contribution à l'étude de l'effet d'une irradiation gamma à faible dose sur les graines et tubercules avant plantation. *Rapport C.E.A. - R - 3509*.
- SOMMER N.F., CREASY M.T., ROMANI R.J. and MAXIE E.C., 1964 - An oxygen dependent post radiation of *Rhizopus stolonifer* sporangiophores. *Radiat. Res.*, 22 : 21-28.
- SOZZI D. and GESSLER C., 1980 - Fungicide (MBC) resistant mutants of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* and *Botrytis cinerea* : pathogenicity and fitness. *Phytopathologische Zeitschrift*, 97 : 19-24.
- SPARRMAN B., EHRENBERG L. and EHRENBERG A., 1959 - *Acta Chem. Scand.*, 13 : 199.
- STAPLETON G.E. and HOLLAENDE A., 1952 - Mechanism of lethal and mutagenic action of ionizing radiation on *Aspergillus terreus*. II - Use of modifying agents and conditions. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 39, Suppl. 1 : 101-115.
- THANASSOULOPOULOS C.C., GIANNOPOLIS C.N. and KITSOS G.T., 1971 - Evaluation of sensitiveness and development of resistance of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* to benomyl. *Phytopathologische Zeitschrift*, 70 : 114-120.

VAN ETTEH H.D. and KOLMARK G., 1976 - Modifying the growth habit of filamentous fungus *Fusarium solani* to facilitate replica plating procedures.
Can. J. Bot., 55 : 848-851.

WALDHAM D.G. and HALVORSON H.O., 1954 - Applied Microbiology 2 : 333.

WILSON D. and POWERS E.L., 1970 - X-ray sensitivity and modifying effects of water in conidia of *Aspergillus nidulans*.
Radiat. Res., 43 : 698-710.

WITKIN E.M., 1966 - Radiation induced mutations and their repair.
Science, 152 : 1345-1352.

WOOD T.H. and RANDOLPH S., 1961 - Dependence of X-ray sensitivity of yeast on cellular water content.
Radiat. Res., 14 : 518.

