

Chimie et génétique des microorganismes¹

Par le Prof. FERNAND CHODAT

Université Genève, Institut de Botanique générale

Dans les nombreuses industries fondées sur l'emploi des microorganismes, le chimiste est-il vraiment maître de ses instruments végétaux, en a-t-il tiré tout ce qu'il peut en attendre? Certes non! Les aléas des processus fermentaires viennent de ce que l'opérateur ne manie plus des substances, mais des êtres vivants. Or, qui dit vie, dit aussi souplesse : plasticité de l'appareil végétatif, variations dues à l'appareil reproducteur. Une sécurité, illusoire, serait de disposer d'organismes aux propriétés enzymatiques constantes. La sagesse est d'accepter la nature et d'étudier avec les biologistes, les pouvoirs fermentaires nouveaux qu'engendrent les variations.

Ces dernières sont de deux sortes : spontanées ou expérimentales. Spontanées quand l'évènement inducteur de la modification a passé inaperçu; expérimentales, lorsque l'accident a été délibérément provoqué. Ce dernier type est naturellement mieux connu. Sa puissance modificatrice n'est toutefois pas toujours supérieure à celle des causes naturelles : l'énergie ionisante des rayons ultraviolets d'un beau jour d'été suffit parfaitement pour faire muter divers organismes.

Le changement survenu modifie les formes et le fonctionnement de l'être atteint (voir fig. 1, mutation de *Phoma*). Les modifications morphologiques, les premières que l'on a étudiées, résultent des effets successifs et parfois conjugués d'une ou de plusieurs variations biochimiques. Limitons notre examen à ces dernières.

Considérons les fluctuations du pouvoir de synthèse d'un acide aminé, observables chez une moisissure devenue célèbre en peu de temps, et appartenant au groupe des champignons Ascomycètes-Pyrénomycètes : le genre *Neurospora*. Diverses de ces espèces contaminent les boulangeries et les fabriques de sucre de canne. La fig. 2 résume les étapes du cycle vital de ce champignon : réduit à son état imparfait, c.-à-d. dépourvu de reproduction sexuée, on le nomme *Monilia crassa*. Cet organisme se multiplie par bourgeonnement. Dès qu'un filament touche un filament de sexe opposé, les deux cellules en contact fusionnent et cumulent deux noyaux à l'intérieur d'un seul article. Ce dernier prolifère en maintenant l'état dicaryon. La fusion des deux noyaux s'opère au moment où le mycelium a formé

une pelote appelée propérithèce. Cette fécondation proprement dite sera le point de départ d'appareils nouveaux, les ascues et les ascospores. Parvenu à ce degré de maturité, le procarpe porte le nom de péri-

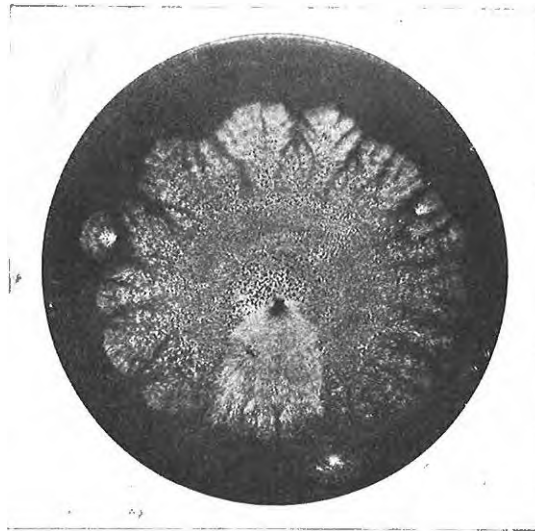


Fig. 1. — Mutation de *Phoma*

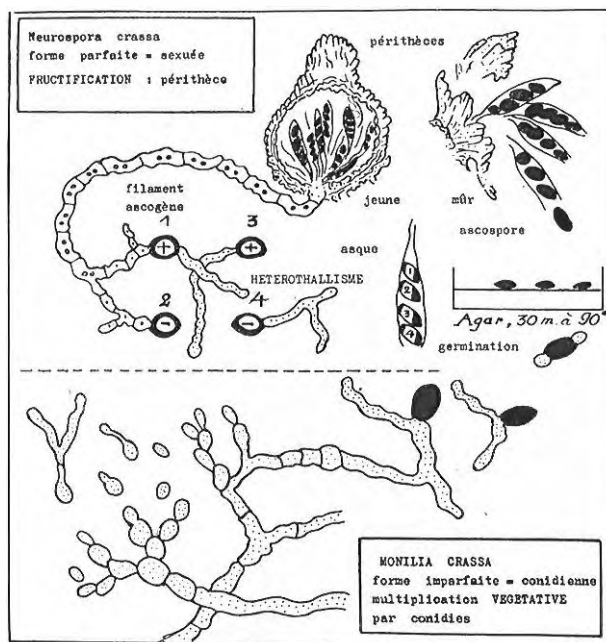


Fig. 2. — Cycle vital du *Neurospora crassa*
Champignon Ascomycète-Pyrénomycète

¹ Résumé d'une conférence présentée le 28 février 1948 à l'Association professionnelle suisse des Chimistes par le Prof. FERNAND CHODAT.

thèse, conceptacle qui s'ouvrira finalement pour laisser s'échapper les ascospores, issues elles-mêmes des ascques. La forme parfaite du champignon qui se reproduit par conjugaison porte le nom de *Neurospora crassa*. La germination des ascospores se fait difficilement au laboratoire; il faut parfois chauffer à 90°, pendant 30 minutes pour amorcer la germination. La sexualité complète de *Neurospora* permet d'obtenir au moment de la ségrégation des caractères, qui se fait dans l'asque, des gamétophytes génétiquement purs. Les mâles et les femelles de ces derniers copulent et donnent naissance à un génotype nouveau, si les gémiteurs proviennent par chance d'une souche mutée. Ainsi apparaît une race nouvelle, pure et constante.

On déclanche² la mutation expérimentale de diverses manières: rayons X, radiations ultraviolettes, gaz de moutarde, etc. Quand ces agents atteignent les ascospores, un petit nombre d'entre elles subissent un ébranlement nucléaire. Il faut donc éprouver des milliers de cellules avant de tomber sur celle qui est mutée. La fig. 3 résume les étapes d'un traitement infligé aux spores d'un *Neurospora*. La cellule supposée mutée par les U. V., est mise au contact d'un propéritèce normal et de sexe opposé. L'hybride formé par conjugaison, développe des ascques. A leur maturité s'en échappent des ascospores, les unes normales, les autres mutées. Une micromanipulation permet le triage et le transfert des quatre ou huit spores contenues dans une asque. Chaque cellule est alors cultivée, individuellement, sur un milieu synthétique aussi riche que possible. En plus des sels minéraux, des phosphates, du sucre, l'azote est offert sous la forme d'une gamme complète d'acides aminés. Diverses vitamines sont encore jointes à cette solution nutritive. Sur ce milieu-hôpital, l'organisme n'est appelé à aucun effort. Un filament normal y prospère à merveille; un filament muté, qui aurait perdu la faculté de synthétiser un acide aminé ou une vitamine, se développe aussi sur ce milieu, puisqu'il y trouve toute préparée, la molécule qu'il ne peut plus construire. Pour déceler, parmi ces cultures, celles qui sont déficientes, on les transporte chacune à part sur un milieu suffisant pour la croissance d'un *Neurospora* normal. Sa composition est simple: mineralia, phosphate, sel d'ammonium, sucre et une vitamine: la biotine. Si la croissance a lieu, cela signifie que la cellule est restée saine, qu'elle a échappé aux effets de la ionisation. Si la culture échoue, cela veut dire que le *Neurospora* a muté, qu'il a perdu un pouvoir de synthèse,

² La plupart de ces découvertes sensationnelles sont dues à une équipe de savants américains: BEADLE, TATUM, LINDEGREEN, SPIEGELMAN et à leurs innombrables collaborateurs. A ces noms il faudrait ajouter celui du génétiste danois WINGE. On trouvera dans un Symposium publié en 1946 par les laboratoires biologiques de Cold Spring Harbor L. I., New-York, une série d'articles consacrés à ce sujet.

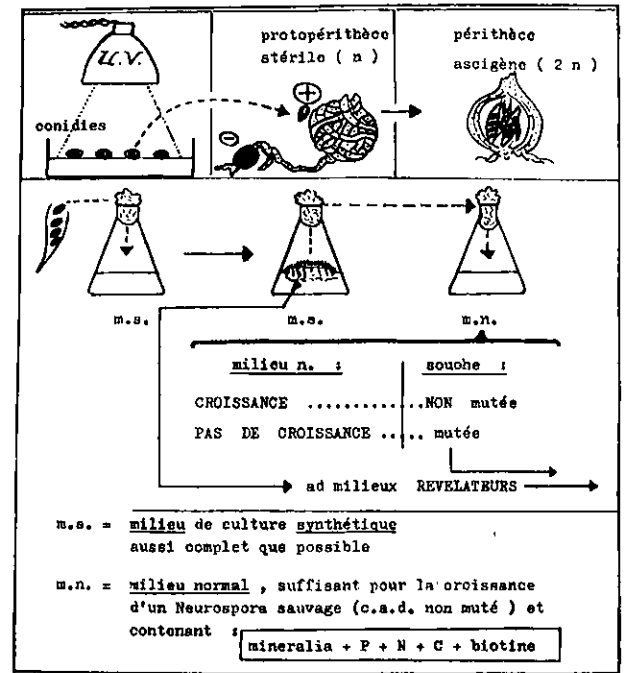


Fig. 3. — Traitement d'un *Neurospora*

non compensé par la composition de ce milieu pauvre. Pour connaître la nature exacte du déficit, on cultive alors la souche mutée (et conservée sur le milieu-hôpital), sur une gamme de milieux révélateurs. Le tableau I décrit cette expérience. On supprime systématiquement au milieu-hôpital, l'un ou l'autre des acides aminés qui entrent dans sa composition. Huit solutions nutritives sont ainsi préparées; sur chacune d'elles on inocule le mutant. Au cas où il y a échec de croissance, par exemple sur la solution 3, cela signifie que le germe muté a perdu la faculté de synthétiser la leucine, acide aminé indispensable à sa croissance et manquant à la solution 3. Je nomme ce mutilé: mutant apo-leucine pour traduire l'expression anglaise: *leuciless*.

Tableau I. — *Neurospora* et acides aminés

Culture d'une même souche traitée, sur milieu synthétique aussi complet que possible et systématiquement appauvri, révélateur du déficit biochimique du mutant présumé

Témoin -- souche sauvage croissant partout (de 0 à 8)
S = solution nutritive de base: mineralia + P + C + vitamines

Milieu	0	1	2	3	5	6	7	8	4
S	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine	+	—	+	+	+	+	+	+	+
Proline	+	+	—	+	+	+	+	+	+
Leucine	+	+	+	—	+	+	+	+	+
Isoleucine	+	+	+	+	—	+	+	+	+
Tryptophane	+	+	+	+	+	—	+	+	+
Indol	+	+	+	+	+	+	—	+	+
Lysine	+	+	+	+	+	+	+	—	+
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	—
etc.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance	+	+	+	—	+	+	+	+	+

* Ne synthétisant plus la leucine, le mutant ne croit pas sur un milieu dépourvu de cet acide aminé.

Les publications américaines qui relatent ces expériences mentionnent dans leurs protocoles des flacons portant le numéro 85 837. Il évoque la quantité fabuleuse de triages et de cultures impliqués dans une seule de ces analyses! L'expérience révèle parfois que la race a perdu à la fois deux ou trois propriétés de synthèse.

Ces mutilations portent encore sur le pouvoir de synthèse des vitamines. La souche sauvage construit toutes celles dont elle a besoin, sauf la biotine, à partir des substances simples du milieu pauvre.

Le tableau 2 résume la série des opérations faites pour déceler le déficit du mutant.

Des études analogues, faites sur le microbe *Escherichia coli*, révèlent l'existence d'une pléiade de races dérivées de la souche normale; chacune d'elles est caractérisée par la perte du pouvoir de synthèse d'un acide aminé ou d'une vitamine. Toutes ces formes mutilées, obtenues au laboratoire ont une grande signification pour le bactériologiste: il comprend mieux le polymorphisme physiologique de certains microbes, connus sous un nom linnéen, mais en fait constitués par une constellation de races physiologiques nées au cours de cette longue aventure qu'est la propagation d'une espèce.

Nous ne connaissons pas encore, bien qu'on la soupçonne, la reproduction sexuée des microbes. Il est difficile en conséquence de s'imaginer les processus de cette pulvérisation de l'espèce sauvage et biochimiquement complète.

Le chimiste-analyste peut tirer un premier parti de ces races impotentes: soient un mutant devenu incapable de synthétiser la lysine et le milieu-hôpital dépourvu de lysine; ajoutons des doses croissantes de cet acide aminé à des parts égales de ce milieu. La croissance du mutant sur ces diverses solutions nutritives sera proportionnée à la quantité de lysine ajoutée; le poids sec de l'organisme définira la

Tableau 2. — *Penicillium et vitamines*

Culture d'une même souche traitée, sur milieu synthétique aussi complet que possible et systématiquement appauvri, révélateur du déficit biochimique du mutant présumé

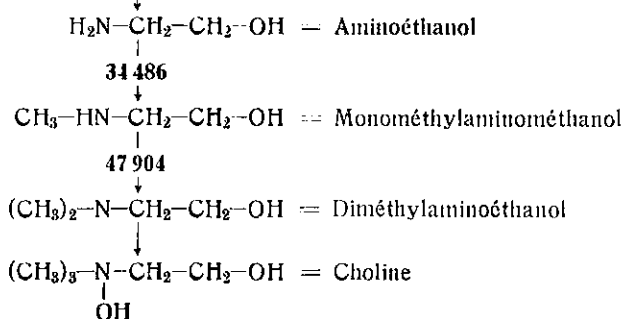
Témoin = souche sauvage croissant partout (de 0 à 7)

S = solution nutritive de base: mineralia+P+C+acides aminés

Milieux	0	1	2	3	4	5	6	7
S	+	+	+	+	+	+	+	+
Aneurine	+	—	+	+	+	+	+	+
Pyridoxine	+	+	—	+	+	+	+	+
Niacine	+	+	+	—	+	+	+	+
Biotine	+	+	+	+	—	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	—	+	+
A. p-amino benzoïque .	+	+	+	+	+	+	—	+
A. nucléique (levure) .	+	+	+	+	+	+	+	—
etc.	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance	+	+	+	—*	+	+	+	+

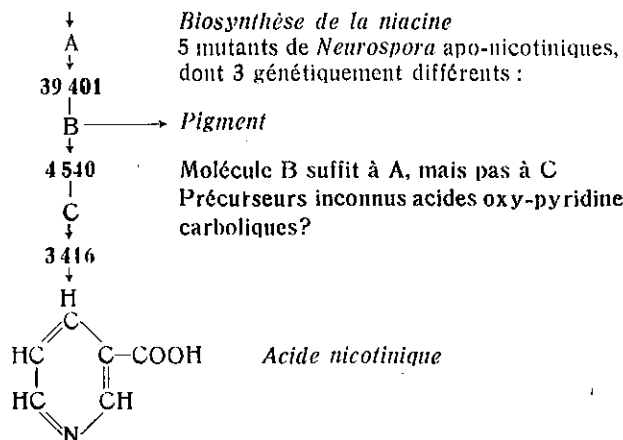
* Ne synthétisant plus la niacine (amide de l'acide nicotinique), le mutant ne croît pas sur un milieu dépourvu de cette vitamine.

Biosynthèse de la choline par le *Neurospora*



Biosynthèse de la niacine

5 mutants de *Neurospora* apo-nicotiniques, dont 3 génétiquement différents :



teneur en lysine de la solution! Inoculons alors ce même mutant sur un milieu contenant un protide de constitution mal connue: le poids de la récolte indique la quantité de cet acide aminé dans la substance inconnue. La difficulté des analyses d'acides aminés, souligne l'importance de cette méthode fine, mais délicate.

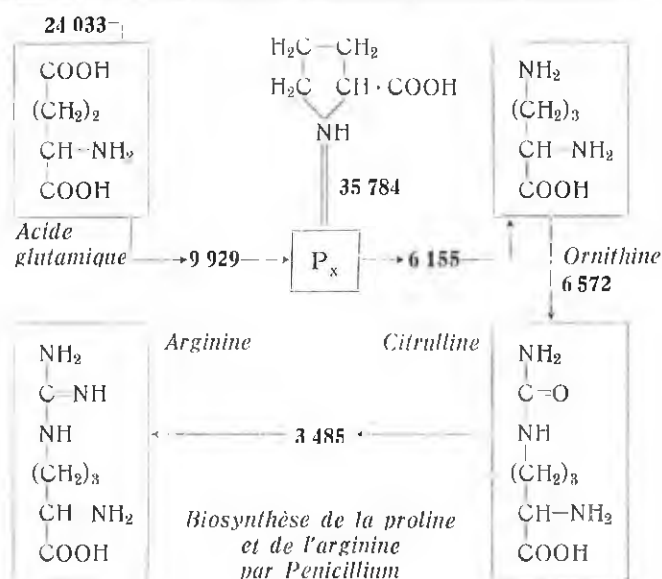
Le biochimiste tire un second parti, plus important celui-là, de cet étrange matériel biologique. Grâce à lui les mystérieuses étapes de la biosynthèse sont mises en lumière. Voici le principe de ces expériences: tous les mutants issus d'une même souche et caractérisés par la même perte de pouvoir de synthèse, ne sont pas équivalents. Des vérifications d'ordre génétique montrent que les gènes altérés occupent diverses positions dans l'appareil chromosomique du champignon. Ces localisations se déterminent avec une étonnante précision, grâce à l'étude des associations de caractères, manifestées dans la postérité de croisements délibérément effectués. Disons en bref que des accidents caryologiques différents s'expriment par une conséquence commune, soit l'impossibilité de synthétiser une substance particulière. Chaque chimiste sait par ailleurs, qu'une molécule est le produit d'une chaîne de réactions intéressant une série de précurseurs. Supposons que la molécule finale (acide aminé ou vitamine) soit le fruit de cinq réactions affectant cinq précurseurs;

peu importe que j'altère ou détruise le gène correspondant à la réaction 2, qui modifie le précurseur 2, ou que j'atteigne le gène correspondant à la réaction 4; le résultat est le même : le courant est interrompu, la molécule finale ne se constitue plus! Un tel blocage s'accompagne de l'accumulation du précurseur antérieur à la réaction atteinte. L'accumulation fait défaut lorsque l'organisme «dévie le convoi sur une ligne de dégagement» et synthétise une molécule inattendue, souvent un pigment! Les sept mutants génétiquement différents, dont aucun ne peut synthétiser l'asparagine, suggèrent que sept réactions successives sont au minimum nécessaires à la biosynthèse de cette molécule. Ces admirables recherches ont permis de préciser le déficit propre à chacun des mutants apo-asparagine et de retracer la suite des opérations impliquées dans la biosynthèse de cet acide aminé. Si, par exemple dans le cas de l'arginine, la carence concerne la quatrième réaction, le mutant ne croîtra sur le milieu-hôpital qu'à la condition d'y trouver de l'arginine toute faite. Si c'est la seconde réaction qui est bloquée, le mutant amputé de cet appareil enzymatique poussera encore sur un milieu-hôpital contenant de la citrulline, dont il fera de l'arginine!

Ces considérations comportent un axiome : chaque réaction biochimique est conditionnée par l'existence d'un unique gène. Peut-être ferait-on mieux de dire

Tableau 3. — Croissance de souches de *Neurospora*

No.	Apo-arginine sur				
	Arginine	Citrulline	Ornithine	Proline	Acide glutamique
3 485	+	—	+	—	—
6 572	+	+	±	—	—
6 155	+	+	+	—	—
9 929	+	+	+	+	—
24 033	+	+	+	+	±



que pour le passage d'un précurseur à l'autre, opération qui comporte le plus souvent plusieurs réactions, il y en a au moins une qui est spécifique, commandée par le gène reconnu déficient, alors que les autres, réactions auxiliaires, dépendent de gènes épargnés par le traitement et présidant à des actes chimiques plus généraux.

Varié, ce n'est pas toujours perdre un caractère; il peut y avoir gain. Les méthodes pour mesurer ces modifications enrichissantes ne sont pas plus compliquées que les précédentes. Ce qu'il est malaisé d'établir, c'est s'il y a gain réel ou récupération d'une faculté antérieurement perdue. La seconde de ces hypothèses donne un crédit nouveau à la théorie de BLANC sur la cosmolyse : le monde serait peuplé d'espèces végétales et animales aux possibilités moindres que celles de leurs ancêtres. Le capital génétique aurait la tendance, le temps aidant à s'éparpiller! Les mutations marquées par un gain ne seraient alors que des «reversions» comme disent les anglosaxons. Deux conditions semblent jouer un rôle décisif pour l'apparition d'une propriété nouvelle : le milieu et l'état génétique de l'être observé. Les fermentations dites adaptatives sont celles où l'on assiste au développement d'un enzyme précédemment absent chez un organisme que l'on irrite avec une nourriture nouvelle, un sucre par exemple. Toute fois, la formation d'un enzyme nouveau ne paraît pas nécessairement liée à la présence du substrat fermentescible. La prudence avec laquelle il nous faut parler de ces phénomènes s'explique par le fait que nous connaissons mal l'état génétique des organismes qui en sont le siège. On sait depuis quelques années, qu'à l'état haploïde les levures acquièrent et perpétuent des propriétés enzymatiques nouvelles. La conjugaison ou reproduction sexuée a souvent pour effet d'effacer ces tendances et de ramener par amphimixie la race à son statut originel. L'effort que les biologistes ont à faire maintenant est précisément d'établir dans ces manifestations de gain de caractère la part de la sensibilité (irritation par un sucre nouveau) et celle de l'état génétique qui révèle ou annule des phénomènes plus fréquents et généraux que nous ne l'imaginons. Enfin, deux temps correspondent à l'acte de mutation positive : le choc qui déclenche, puis la période où le caractère s'amplifie jusqu'au point d'être perceptible. Quelle est la voie de cette amplification? L'idée classique l'identifie à la multiplication des noyaux cellulaires. Certains sayants ont cependant suggéré l'idée que l'amplification pourrait s'établir directement par voie protoplasmique. Nous sommes en pleine recherche dans ce domaine. Je pense cependant que les premiers éléments positifs que j'ai présentés sont de nature à expliquer le courant marqué de la génétique vers la biochimie et le profit tiré de l'union des méthodes de deux disciplines, la chimie et la biologie.