

MYCOLOGIE. — *Etude de la formation des rhizomorphes du Leptoporus lignosus (Kl.) Heim : le déterminisme de l'agrégation des filaments en palmettes* (1).  
Note (\*) de M. Claude Boisson, présentée par M. Roger Heim.

L'apparition et le maintien de l'état agrégé chez le *L. lignosus* met en jeu deux types d'informations. Les premières circulent par voie interne, sont supportées par des substances synthétisées au sein du mycélium non agrégé et sont transportées par les filaments en direction des apex des palmettes. Les secondes, qui interviennent par voie externe, sont dues à des substances diffusibles excrétées par les filaments en croissance.

Des publications récentes, il ressort que la morphogenèse des thalles non agrégés issus d'une basidiospore du *L. lignosus* se déroule en deux phases A et B caractérisées essentiellement par la nature des filaments qui assurent la croissance radiale des cultures (4), et que l'agrégation ne peut se produire qu'à partir des thalles qui ont atteint le stade B de leur développement (6). La formation des palmettes, étape préalable à celle des rhizomorphes, met en place des faisceaux de filaments qui poussent côte à côte en restant parallèles et sont le siège de différenciations affectant leur morphologie et leur vitesse d'élongation ; ces modifications permettent de les distinguer facilement des éléments libres qui peuvent se développer simultanément sur les substrats gélosés qui autorisent l'agrégation.

Dans la nature, les palmettes du *L. lignosus* se différencient toujours à partir d'une masse ligneuse envahie par le parasite sous la forme non agrégée au sein d'un substrat presque totalement dépourvu de substances nutritives. Les relations entre mycélium non agrégé et mycélium agrégé, dont l'existence paraît ici évidente, sont difficiles à étudier dans ces conditions. Nous avons donc recherché si ces relations se manifestent encore *in vitro* en utilisant des dispositifs permettant d'obtenir des structures agrégées à partir de thalles non agrégés.

Le principe de l'expérience consiste à déterminer le nombre de palmettes formées et le délai nécessaire à leur apparition à partir de thalles qui se sont développés dans l'état non agrégé pendant des temps variables (de 1 à 5 jours). Des thalles entiers de la phase B issus de la régénération de semis de grande taille (5) sont transférés sur un milieu qui permet l'agrégation (3), après s'être développés pendant 1 à 5 jours sur une membrane de cellophane déposée à la surface d'un substrat n'autorisant pas l'agrégation (2).

Quand l'âge et le diamètre des cultures transférées croissent, on constate que le délai nécessaire à la différenciation des palmettes ne varie pas mais que leur nombre moyen par thalle augmente. Ce dernier fait peut être expliqué par l'accroissement, avec la taille de la culture, de la quantité de filaments susceptibles de s'agréger dans la marge en croissance. Cependant, le nombre de palmettes formées par unité de longueur augmente également dans les mêmes conditions. Il faut donc admettre que la quantité et l'état des cellules de la phase B situées en arrière de la marge interviennent dans le nombre de structures agrégées régénérées. Autrement dit, il existe des corrélations entre les cellules de la culture non agrégée et les palmettes qu'elles différencient après le transfert sur un milieu permettant l'agrégation.



O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° 22838

Cpte : B

Ces corrélations peuvent théoriquement s'exercer par voie interne ou par l'intermédiaire du milieu externe. Lorsque les relations entre la palmette et le thalle non agrégé sont interrompues par une incision pratiquée sur le parcours des filaments à une distance variant de 0,5 à 2,5 cm en arrière du front de croissance, on observe, quelle que soit la taille des palmettes ainsi isolées, une dissociation des filaments dans le front de croissance. Cette dernière expérience tend à prouver que l'information contenue dans les cellules du mycélium de la phase B circule en direction des palmettes par le canal des filaments.

Cette information peut, entre autres hypothèses, être supportée par des substances synthétisées au sein des filaments B. Nous avons testé leur présence en recherchant si des extraits de cultures qui se développent dans la phase B exercent une action morphogène sur les filaments B. Le mycélium est récolté dans des thalles qui croissent dans l'état B sur une membrane de cellophane déposée à la surface d'un milieu malté. Il est mis en suspension dans un tampon tris-HCl de pH 7,4, broyé en présence de billes de verre, et centrifugé à 20 000 g pendant 20 mn ; le surnageant est ramené à pH 7,4 puis stérilisé à froid sur un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,45  $\mu$ . Les tests sont faits dans des cultures semblables à celles utilisées précédemment pour la récolte du mycélium de type B ; l'extrait est déposé sous la membrane de cellophane dans une perforation pratiquée au sein du milieu malté et gélosé à 1 ou 2 mm en avant du front de croissance.

La croissance des filaments B est fortement ralentie au-dessus de l'extrait et il apparaît, au niveau de la marge, un mycélium aérien dressé abondant. Les filaments rampants qui se développent 24 à 48 h après la mise en place du test sont groupés en faisceaux et présentent les caractères morphologiques des hyphes agrégées. Ces modifications ne se produisent pas lorsque, dans la perforation, on dépose le tampon d'extraction ou du milieu malté liquide. L'agrégation se manifeste donc en présence d'extrait, dans des conditions où elle ne le fait pas spontanément.

*En définitive*, les corrélations qui s'exercent entre le thalle non agrégé et les palmettes auxquelles ils donnent naissance sont, au moins en partie, dépendantes de la synthèse, au sein des filaments libres de la phase B, de substances qui sont transportées par les filaments en direction des apex en croissance. Ces facteurs jouent un rôle dans l'apparition et le maintien de l'état agrégé.

Les faits exposés jusqu'à maintenant sont tous en faveur de l'interprétation selon laquelle l'agrégation est sous la dépendance de facteurs chimiques qui circulent par voie interne. D'autres expériences montrent cependant que ces informations n'interviennent pas seules.

Lorsque, en effet, un thalle agrégé cultivé sur une membrane de cellophane est transféré, dans sa totalité, du milieu autorisant l'agrégation, sur lequel il s'est développé<sup>(3)</sup>, sur un milieu neuf de même composition, on observe une dissociation momentanée des palmettes dans la zone en croissance, ainsi qu'un ralentissement de l'élongation. Compte tenu du fait que les filaments ne traversent pas la membrane de cellophane, la seule manière d'interpréter ces expériences est d'admettre que des modifications induites par le thalle en croissance dans le milieu sous-jacent sont en partie nécessaires au maintien de l'état agrégé.

Cette hypothèse peut encore être éprouvée en recherchant si l'apparition et le maintien de l'état agrégé sont possibles quand le milieu est constamment renouvelé sous un thalle en croissance.

Le dispositif expérimental utilisé est le suivant. Des rectangles de papier filtre sont placés sur un support incliné et imbibés en permanence par une solution nutritive permettant l'agrégation <sup>(3)</sup> ; cette solution s'écoule goutte à goutte avec un débit de 250 à 350 ml/24 h. Des boutures sont déposées sur ce papier filtre. Elles sont toutes prélevées, sans léser la zone en croissance, dans des cultures réalisées sur une membrane de cellophane et sont constituées par des palmettes de 1,5 à 2 cm de longueur ou par des fragments de thalle non agrégé de la phase B mesurant 1,5 × 2 cm. Le découpage des boutures est fait de manière à laisser en avant du front de croissance une surface de cellophane libre à peu près équivalente à celle de la bouture. Le développement des thalles s'effectue donc sur cette membrane, au contact d'un substrat qui se renouvelle constamment par diffusion dans le papier filtre sous-jacent. La même disposition est adoptée pour les témoins mais le papier filtre est imbibé, à sa partie inférieure, par trempage dans une petite quantité de solution nutritive ; dans ce cas, il n'y a donc plus circulation du substrat sous les cultures.

Cette expérience, répétée plusieurs fois, a toujours donné les mêmes résultats. Dans le témoin, le mycélium agrégé se différencie à partir des boutures faites de filaments libres, ou poursuit sa croissance à partir des palmettes. En revanche, l'apparition des structures agrégées ou la poursuite de leur élongation sont stoppées quand le milieu nutritif s'écoule continuellement sous les cultures. Les caractères microscopiques des filaments régénérés dans les deux conditions confirment les résultats de l'observation directe.

Dans les conditions de nos expériences, il est maintenant bien prouvé que le thalle en croissance altère le substrat sous-jacent en l'amenant dans un état tel que l'agrégation peut apparaître puis se maintenir. Cette altération peut, en théorie, provenir de l'appauvrissement du milieu par suite de l'absorption d'éléments par les filaments en croissance ou de l'excrétion de substances diffusibles par ces mêmes filaments.

Le premier mode d'action semble peu vraisemblable du fait que les palmettes peuvent parfaitement se développer sur un milieu totalement dépourvu de substances nutritives, du sable humide, de l'eau distillée ou des lames de verre par exemple. Cette hypothèse est définitivement éliminée par les résultats de l'expérience suivante.

Des bûchettes de bois d'Hévée, dont le volume est voisin de 8 cm<sup>3</sup>, sont inoculées en boîtes de Roux avec le parasite. Lorsqu'elles sont entièrement envahies par le mycélium, après un délai d'une quinzaine de jours, elles sont placées dans des conditions identiques à celles utilisées précédemment dans les expériences de lavage continu mais la solution nutritive est remplacée par de l'eau distillée. Chez le témoin, l'agrégation se manifeste par la formation de palmettes à partir du mycélium de la bûchette. Lorsque le substrat sous-jacent est lavé continuellement par un courant d'eau, la différenciation des palmettes est impossible. Le Champignon ne pouvant rien puiser dans le milieu extérieur, la seule façon d'interpréter ces expériences est d'admettre que les informations nécessaires à l'agrégation qui parviennent aux filaments par l'inter-

médiaire du milieu externe sont supportées par des substances diffusibles excrétées par le thalle en croissance.

Des résultats exposés dans cette Note, il ressort que le déterminisme de l'agrégation des filaments du *L. lignosus* est sous la dépendance d'informations dont certaines circulent par voie interne alors que d'autres interviennent par l'intermédiaire du substrat sous-jacent.

Les mécanismes de la différenciation des structures agrégées de type rhizomorphe sont encore mal connus. Plusieurs auteurs [(<sup>8</sup>), (<sup>9</sup>)] ont signalé que le thalle non agrégé doit avoir atteint une certaine masse avant que les rhizomorphes soient initiés ; cette action a souvent été interprétée par une accumulation de facteurs nutritifs (<sup>8</sup>). Récemment (<sup>7</sup>), la formation des cordonnets du *Merulius lacrymans* a été attribuée à l'excrétion de substances nutritives par les hyphes conductrices, substances qui jouent un rôle attractif vis-à-vis des rameaux qu'elles émettent et les incitent à rester étroitement accolés aux faisceaux de filaments conducteurs dont ils partent. A notre connaissance, c'est la première fois que l'on fait intervenir l'action simultanée d'informations supportées par des substances, transitant par voie externe et par voie interne, dans l'agrégation d'hyphes mycéliennes à partir desquelles vont se différencier des rhizomorphes.

(\*) Séance du 20 mars 1972.

(1) Ce travail a été réalisé en liaison avec le Laboratoire de Morphologie Expérimentale de la Faculté des Sciences d'Orsay, associé au CNRS.

(2) Milieu malté et gélosé à 2 %.

(3) NaNO<sub>3</sub> : 2 g ; MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O : 0,5 g ; KCl : 0,5 g ; FeSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O : 0,01 g ; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> : 2 g ; glucose : 20 g ; asparagine : 1 g ; thiamine : 0,5 mg ; agar-agar : 20 g ; eau : qsp 1 000 ml. Le pH de ce milieu est abaissé aux environs de 4,0 en ajoutant après stérilisation 40 ml/l d'un mélange 0,1 M H<sub>2</sub>NaPO<sub>4</sub>-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> de pH 2,0.

(4) C. BOISSON, *Comptes rendus*, 266, Série D, 1968, p. 1112-1115.

(5) C. BOISSON, *Comptes rendus*, 267, Série D, 1968, p. 1435-1438.

(6) C. BOISSON, *Comptes rendus*, 267, Série D, 1968, p. 1578-1581.

(7) S. DAY, in : S. D. GARRETT, *Pathogenic Root-Infecting Fungi*, Cambridge University Press, 1970, p. 97-98.

(8) S. D. GARRETT, *Ann. Bot. Lond.*, 17, 1953, p. 63-79.

(9) J. J. GUILLAUMIN, *Cahiers ORSTOM*, série Biol., 13, 1970, p. 41-66.

Laboratoire de Phytopathologie du Centre ORSTOM d'Adiopodoumé,  
B. P. n° 20, Abidjan, Côte-d'Ivoire.