

T H E S E

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

Centre d'ORSAY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par Claude BOISSON

DE LA BASIDIOSPORE AU RHIZOMORPHE, DETERMINISME DE L'AGREGATION CHEZ LE
BASIDIOMYCETE LEPTOPORUS LIGNOSUS (Kl.) Heim ex Pat.

Soutenue le 12 juin 1973 devant la Commission d'examen

Président : M. R. NOZERAN

Examineurs : M. J. CHEVAUGEON

M. J.P. LARPENT - Rapporteur

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	
A - <u>L'agrégation chez les Champignons.</u>	1
B - <u>La morphogénèse des rhizomorphes - Mise au point bibliographique.</u>	3
1 - Etude morphologique de l'édification des rhizomorphes.	3
2 - Les conditions d'apparition des rhizomorphes.	5
3 - Le déterminisme de la formation des rhizomorphes.	7
4 - Conclusions.	8
C - <u>Le choix du matériel destiné à l'étude de la formation des rhizomorphes - L'intérêt du Leptoporus lignosus (Kl.) Heim ex Pat.</u>	10
 <u>1ère PARTIE - ETUDE MORPHOLOGIQUE DU DEVELOPPEMENT DES THALLES DU LEPTOPORUS LIGNOSUS.</u>	
 I - LES FAITS MORPHOLOGIQUES - DESCRIPTION DES DIFFERENTS STADES DU DEVELOPPEMENT DES THALLES DU <u>LEPTOPORUS LIGNOSUS.</u>	13
A - <u>La morphogénèse des thalles non agrégés.</u>	14
B - <u>L'édification des structures agrégées - Morphologie et anatomie des différents stades.</u>	17
1 - Technique de culture <u>in vitro</u> du mycélium agrégé.	17
2 - Différents types de filaments présents dans les cultures faites sur un milieu permettant l'agrégation.	20
3 - Organisation des structures agrégées.	21
C - <u>Résumé et discussion.</u>	23
 II - LA MISE EN PLACE DANS LE TEMPS ET DANS L'ESPACE DES ETAPES SUCCESSIVES DU DEVELOPPEMENT.	27
A - <u>Le passage de la phase A à la phase B.</u>	27
1 - Influence des conditions internes et externes sur l'apparition des filaments B.	27
2 - Etude du délai nécessaire à l'apparition des filaments B.	29
3 - Maintien et réversibilité des caractères B.	32
4 - Conclusions.	33

B - <u>L'initiation des structures agrégées.</u>	3
1 - Le mycélium agrégé peut-il se différencier à n'importe quel stade du développement ?	3
2 - L'agrégation est-elle préparée au sein du mycélium non agrégé ?	3
3 - Formation des structures agrégées : localisation et répartition.	3
4 - Conclusions.	4
C - <u>Le développement des structures agrégées et les possibilités de réversion vers les formes non agrégées.</u>	4
1 - Croissance et ramification des palmettes.	4
2 - Maintien et perte de l'état agrégé.	4
D - <u>Conclusions.</u>	4

2ème PARTIE - ETUDE DES MECANISMES DE DEVELOPPEMENT DES THALLES.

III - NATURE ET ROLE DES CORRELATIONS AU COURS DE LA MORPHOGENESE DES THALLES NON AGREGES ET AGREGES.

A - <u>Les corrélations mycélium intramatriciel - mycélium superficiel au sein des thalles non agrégés.</u>	4
1 - Corrélations mycélium intramatriciel - mycélium superficiel au cours de la phase A.	5
2 - Différenciations internes au cours de la phase A.	5
3 - Corrélations mycélium superficiel - mycélium intramatriciel au cours de la phase B.	5
4 - Adaptation des mycéliums immergés et superficiels aux conditions de milieu.	5
5 - Conclusions.	5
B - <u>Les corrélations d'inhibition au sein du thalle agrégé.</u>	5
1 - Preuves expérimentales de l'existence de corrélations d'inhibition.	5
2 - Influence des facteurs externes sur l'intensité des corrélations d'inhibition.	5
3 - Influence des facteurs internes sur les corrélations d'inhibition.	5
4 - Conclusions.	5
C - <u>Résumé et discussions.</u>	6

IV - MANIFESTATION ET DETERMINISME DES PHENOMENES DE POLARITE.	63
A - <u>Manifestation de la polarité des différents types mycéliens.</u>	64
B - <u>Mise en place de la polarité au cours du développement.</u>	66
C - <u>Déterminisme de la polarité.</u>	66
1 - Action des facteurs internes sur la polarité.	66
2 - Déterminisme des phénomènes de polarité.	70
D - <u>Résumé et conclusions.</u>	72
V - DETERMINISME DE L'AGREGATION - ROLE DES FACTEURS INTERNES DANS L'INITIATION ET LE DEVELOPPEMENT DES PALMETTES CHEZ LE L. LIGNOSUS.	75
A - <u>Action inductrice des substances diffusibles excrétées par le thalle dans le substrat.</u>	76
1 - Mise en évidence de l'excrétion dans le substrat de substances inductrices de l'agrégation.	76
2 - Accumulation des substances excrétées dans le substrat et ses conséquences.	78
3 - Recherche des substances inductrices de l'agrégation dans les filtrats de culture.	80
B - <u>Mise en évidence, synthèse et mode d'action d'un facteur morphogène inducteur de l'agrégation.</u>	81
1 - Activité morphogène d'extraits acellulaires préparés à partir du mycélium agrégé des palmettes.	81
2 - Nature et origine des substances responsables de l'activité morphogène des extraits.	84
3 - Excrétion des substances actives à l'extérieur des structures agrégées.	87
4 - Modalités d'action des facteurs élaborés par le thalle sur l'agrégation.	88
5 - Synthèse et activité du facteur inducteur de l'agrégation au cours du développement.	94
6 - Conclusions.	96
C - <u>Action inhibitrice des substances diffusibles excrétées par le thalle dans le substrat. Etude des interactions entre palmettes.</u>	97
D - <u>Conclusions et discussions.</u>	102

DISCUSSION ET CONCLUSION

10

A - Les étapes du développement qui préparent l'agrégation -
Morphogénèse des thalles non agrégés.

10

B - Les conditions du passage à la phase agrégée.

10

1 - Les conditions internes.

10

2 - Les conditions externes.

10

C - L'initiation des structures agrégées.

10

D - Le développement des structures agrégées.

11

E - La complexité des phénomènes d'agrégation.

11

ANNEXE TECHNIQUE

12

BIBLIOGRAPHIE

12

INTRODUCTION

Le thalle des Champignons est construit à partir d'axes ramifiés qui croissent côte à côte mais ont tendance à s'écarter les uns des autres et, en conséquence, à envahir uniformément le substrat. Des corrélations s'exerçant par voie interne et par voie externe assurent un développement harmonieux de l'organisme tout entier. Dans le groupe des Septomycètes, au moins chez les espèces les plus évoluées, des organes massifs assurant la reproduction ou la propagation se différencient au sein du mycélium ; ils sont édifiés par des filaments qui se rassemblent et établissent entre eux de nombreux contacts. L'agrégation chez les Champignons correspond donc à l'établissement de rapports privilégiés entre les filaments. Nous examinerons un peu plus en détail quels organes sont mis en place à la suite du fonctionnement de ce processus et, au moins pour certains d'entre eux, quel est le mécanisme de leur morphogénèse.

A - L'AGREGATION CHEZ LES CHAMPIGNONS.

=====

Le mode de dissémination le plus couramment utilisé par les Champignons fait intervenir des spores, cellules isolées ou groupes de cellules, nées par mitose ou à la suite de méiose, qui se séparent de la plante mère et sont susceptibles de donner naissance de manière indépendante à de nouveaux individus (GAÜMANN, 1928). Chez les espèces considérées comme les plus évoluées, les spores prennent très souvent naissance dans des organes pluricellulaires, souvent massifs (corémies, carpophores, stromas), dont la formation peut suivre deux processus fondamentaux (GAÜMANN, loc. cit., BURNETT, 1968). Dans le premier, de type symplogène, ils sont formés par l'agrégation de filaments qui croissent dans la même direction ou convergent s'entremêlent, deviennent coalescents et éventuellement fusionnent. Dans le deuxième, de type méristogène, une cellule ou des cellules voisines d'un même filament se cloisonnent dans les trois directions de l'espace ; ce mode de formation se rapproche beaucoup des processus d'édification des tissus chez les végétaux et animaux supérieurs. En schématisant à l'extrême, les structures agrégées du premier type sont construites à la suite du

rassemblement de filaments nés indépendamment les uns des autres ; celles du second type résultent de la prolifération de cellules qui ne se séparent pas les unes des autres mais établissent entre elles des contacts dès leur individualisation.

Mais, les Champignons sont également capables de se propager par le simple jeu de la croissance des filaments et d'envahir progressivement des substrats constitués de débris végétaux morts (vie saprophytique) ou de végétaux vivants (vie parasitaire). En plus de cette progression à l'intérieur des tissus, qui est constamment ralentie du fait même de l'organisation de la plante, certaines espèces peuvent progresser à l'extérieur de l'hôte. Quelques-unes sont capables de croître sur des organes aériens, feuilles ou tiges : ce sont, par exemple, des Basidiomycètes du genre Rhizoctonia (R. solani Kühn) dont les filaments isolés progressent à la face inférieure des feuilles parasitées, sur les pétioles ou sur les tiges, ou du genre Marasmius qui s'étalent de la même manière que précédemment à la face inférieure des feuilles ou se propagent sur des distances beaucoup plus grandes grâce à des organes constitués de filaments agrégés du type crin ou télépode : M. equicrinis Muell., ou du type himantium : M. scandens Massee (JACQUES-FELIX, 1967). D'autres espèces sont strictement hypogées et progressent soit librement dans le sol, soit à la surface des racines, soit, enfin, entre le bois et l'écorce ; la propagation met en jeu des filaments isolés (Ophiobolus graminis Sacc.) ou, le plus souvent, agrégés au sein de structures plus ou moins hautement organisées, appelées rhizomorphes, dont la formation peut suivre l'un ou l'autre des processus symphogène ou méristogène décrits précédemment. On peut définir un rhizomorphe comme un organe issu de l'agrégation des filaments mycéliens et des rameaux qu'ils portent, de forme allongée, cylindrique ou rubannée, de structure très polarisée, assurant la propagation du Champignon à l'extérieur de l'hôte ou entre le bois et l'écorce.

Ce mode de croissance, qualifié "d'épiphytique" par GARRETT (1956), permet de surmonter les obstacles dus à l'organisation des tissus de la plante ; il a été adopté par des espèces qui, bien qu'appartenant à des groupes systématiques différents, ont évolué de la même manière pour s'adapter à des conditions écologiques particulières. La croissance "épiphytique" caractérise ainsi un groupe de parasites qui vivent dans le sol uniquement en présence d'hôtes sensibles et qui, bien que possédant souvent une reproduction sexuée, assurent leur propagation presque uniquement par voie végétative au moyen des rhizomorphes.

Nous citerons, pour être complet, un autre type d'organe assurant la propagation par voie végétative ; c'est le sclérote qui diffère du rhizomorphe par le fait que l'agrégation conduit à des organes de forme sphérique, assurant la conservation de l'espèce. Ils peuvent être construits, de même que les structures agrégées décrites précédemment, selon les processus symphogène ou méristogène (TOWNSEND et WILLETS, 1954).

Notre travail ayant porté sur une espèce édifiant des rhizomorphes, nous ferons maintenant le point des connaissances acquises sur le mode de formation de ces organes.

B - LA MORPHOGENESE DES RHIZOMORPHES - MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE.

1 - Etude morphologique de l'édification des rhizomorphes.

La morphologie des structures rhizomorphiques a été étudiée chez d'assez nombreuses espèces. Malgré leur diversité, TOWNSEND (1954) a pu les classer en quatre grandes catégories, selon leur degré d'organisation. Dans le type le plus simple, des filaments tous identiques sont simplement juxtaposés les uns aux autres dans des faisceaux présentant une structure homogène ; c'est le type réalisé chez le Merulius lacrymans (Jacq.) Fr. La structure peut devenir plus complexe par suite d'une répartition hétérogène des hyphes au sein des faisceaux (type Collybia platyphylla (Fr.) Quélet) ou de l'apparition, en certaines zones seulement de l'agrégat, de différenciations portant sur le diamètre des filaments et sur l'épaisseur des parois (type Psalliota bispore Schaeff. et Möll.). Les deux modifications précédentes se manifestent simultanément dans les rhizomorphes les mieux organisés, qui apparaissent alors comme des structures complexes formées de couches concentriques présentant des caractères anatomiques bien déterminés (type Armillariella mellea (Vahl.) Karst.).

GARRETT (1960) s'est attaché à classer les rhizomorphes en tenant compte essentiellement des processus qui dirigent leur édification.

Les rhizomorphes vrais, selon GARRETT, se forment à partir d'un organe apical semblable à un méristème ; ils ont été décrits chez l'Armillariella mellea (BREFELD, 1877 - GUILLAUMIN, 1967 - MOTTA, 1967, 1969 a et b) et chez le Sphaerostilbe repens B. et Br. (GUILLAUMIN, 1970 a et b, 1971).

La zone apicale a été bien étudiée du point de vue anatomique. Selon GUILLAUMIN (loc. cit.) la structure filamenteuse reste apparente dans la région méristématique de l'A. mellea, alors que, chez le S. repens, elle est constituée de petites cellules isodiamétriques, se divisant dans les trois directions de l'espace, et ressemble tout à fait au méristème des végétaux supérieurs.

Aux rhizomorphes vrais, GARRETT oppose les cordons mycéliens ("strands" qui sont édifiés progressivement par l'acquisition d'une structure de plus en plus organisée. Les principales espèces étudiées du point de vue morphologique sont le Boletus elegans Schum. (HOW, 1940), l'Helicobasidium purpureum (Tul.) Pat. (VALDER, 1958), le Merulius lacrymans (Jacq.) Fr. (BUTLER, 1957 et 1958), le Paxillus panuoides Fr. (FINDLAY, 1932), le Phymatotrichum omnivorum (Shear) Dugg. (ROGERS et WATKINS, 1938), le Psalliota bispora Schaeffer (MATHEW, 1961) et le Psalliota campestris Quélet (HEIN, 1930 - GARRETT, 1954).

Les cordons mycéliens sont formés au sein d'un mycélium fait de filaments libres ou d'hyphes déjà agrégées en faisceaux. Leur édification met en jeu deux processus différents. Dans le premier (type Helicobasidium sp.), des axes provenant de l'arrière s'accolent à des axes déjà existants, établissent entre eux des anastomoses et s'accrochent les uns aux autres par des ramifications en crochet (VALDER, 1958). Dans le second type, un axe ou un groupe d'axes déjà agrégés donnent naissance à des rameaux qui restent collés à ces axes et construisent autour d'eux un manchon d'hyphes de petit diamètre (type Merulius lacrymans, BUTLER, 1957 et 1958).

Les mécanismes qui conduisent à la formation des rhizomorphes vrais et des cordons mycéliens correspondent respectivement aux processus méristogène et symphogène décrits au début de cette introduction. Dans le premier cas, la structure agrégée définitive est très rapidement acquise à partir d'une zone méristématique ; dans le second, le rassemblement des filaments en faisceaux est séparé, dans le temps, des différenciations cellulaires qui se manifestent au sein de l'agrégat et conduisent à la structure de l'organe adulte.

Les espèces susceptibles de former des rhizomorphes sont également toutes capables d'édifier un thalle non agrégé. Il convient donc d'examiner maintenant dans quelles conditions apparaissent les structures agrégées ?

2 - Les conditions d'apparition des rhizomorphes.

a - Les conditions externes.

TOWNSEND (1954) et GARRETT (1960) ont écrit que certaines espèces différencient leurs rhizomorphes dans des milieux nutritifs gélosés (Armillariella mellea, Phymatotrichum omnivorum) alors que d'autres ne peuvent le faire que si la croissance s'effectue d'un milieu nutritif à un milieu non nutritif (Leptoporus lignosus, Merulius lacrymans). Nous verrons que cette distinction n'est pas justifiée car il suffit parfois de modifier légèrement la composition du substrat nutritif pour obtenir, en culture sur milieu gélosé, des structures agrégées à partir d'espèces considérées comme appartenant au deuxième groupe. Signalons toutefois que le passage d'un substrat nutritif à un substrat non nutritif correspond aux conditions naturelles de formation des rhizomorphes qui se propagent dans le sol à partir d'une masse ligneuse exploitée par du mycélium non agrégé.

La différenciation des structures rhizomorphiques est, comme tout phénomène biologique, influencée fortement par le milieu environnant. Les conditions de température, d'humidité, d'éclairement et de pH du substrat qui permettent l'agrégation sont des caractères spécifiques qu'il est inutile de décrire en détail. En général, les rhizomorphes se forment d'autant plus facilement que la température est voisine de la température optimale de croissance du mycélium non agrégé, que l'humidité est plus forte et que le pH est voisin de la neutralité ou légèrement acide (inter alia TOWNSEND, 1954 - MAC DONALD et CARTTER, 1961). La lumière a tendance à ralentir la croissance des rhizomorphes sans inhiber leur initiation (TOWNSEND, 1954).

Pour les espèces susceptibles de différencier des structures agrégées dans des milieux gélosés, la formation des rhizomorphes est conditionnée par la composition du milieu nutritif, en particulier, par les quantités de carbone et d'azote disponibles, et par leur rapport relatif (GARRETT, 1953).

b - Les conditions internes.

L'influence des conditions internes sur la différenciation des rhizomorphes est encore mal connue. Cependant, les résultats obtenus jusqu'à maintenant tendent tous à prouver que les structures agrégées ne peuvent se former qu'après l'édification d'un thalle non agrégé et seulement quand celui-ci a atteint une masse critique déterminée.

Cette dépendance vis-à-vis du mycélium non agrégé apparaît directement pour les espèces susceptibles de différencier des structures agrégées en culture sur milieu gélosé. Ainsi, des études effectuées par SNIDER (1959) sur le développement de l'Armillariella mellea, il ressort que le premier stade de la morphogenèse est uniquement mycélien et se termine par l'initiation, loin en arrière des apex en croissance, des microsclérotés, organes à partir desquels l'apex du rhizomorphe se différencie et émerge. GARRETT (1953) a montré que le nombre d'initiales apparues et le nombre de rhizomorphes en croissance active sont imposés par des corrélations d'ordre trophique.

Plus précises encore sont les conclusions de GUILLAUMIN (1970 b, 1971) au sujet du Sphaerostilbe repens. Comme précédemment, la formation des rhizomorphes est impossible tant que le mycélium n'a pas atteint une masse critique. Il se produit, ensuite, au sein du mycélium non agrégé, une différenciation interne qui se traduit, pour les cellules qui l'ont subie, par un raccourcissement du délai nécessaire à l'apparition des premières ébauches. GUILLAUMIN interprète ces phénomènes en faisant intervenir un événement qualitatif au sein du mycélium juvénile non agrégé, qui serait sous la dépendance d'une substance à seuil. Cette hypothèse, qui permet d'expliquer l'ensemble des résultats expérimentaux, n'a pas encore reçu de preuve directe.

Lorsque les rhizomorphes sont formés à partir d'une base nutritive sur un milieu non nutritif, leur différenciation n'est possible que si cette base renferme une quantité suffisante de réserves alimentaires. Jusqu'à maintenant, on a toujours expliqué cette action en faisant intervenir uniquement la quantité de réserves nutritives présentes dans l'inoculum. De ce que nous avons dit précédemment, il ressort que, en plus de ce facteur, pourraient agir la masse et l'état du mycélium non agrégé qui exploite la base nutritive et donne naissance aux rhizomorphes.

Dans le cas des rhizomorphes vrais (Armillariella mellea et Sphaerostilbe repens), il existe une exception à la règle qui subordonne l'agrégation à la présence d'une masse critique de mycélium libre. En effet, la différenciation est si forte au niveau des zones méristématiques que celles-ci peuvent poursuivre leur croissance sous forme agrégée même quand elles sont séparées du thalle-mère dont elles partent (CAMPELL, 1934).

GUILLAUMIN, 1967). Remarquons cependant que le maintien de l'état agrégé reste lié aux dimensions du fragment repiqué ou séparé du thalle-mère, ce qui laisse entrevoir, là encore, une action de masse.

3 - Le déterminisme de la formation des rhizomorphes.

Jusqu'à maintenant, la question fondamentale qui se pose à propos de la formation des rhizomorphes n'a pas été résolue. On ne sait pas encore quelles sont les modifications internes qui conduisent, à un stade bien précis du développement et dans des conditions de milieu déterminées, les filaments à s'agréger en faisceaux alors qu'auparavant ils s'allongeaient en restant apparemment indépendants les uns des autres.

Plusieurs auteurs ont pensé résoudre le problème en modifiant la composition des milieux de culture de manière à mettre en évidence des substances qui favorisent la différenciation des rhizomorphes.

WEINHOLD (1963, 1964) a montré que les rhizomorphes de l'Armillariella mellea ne se différencient pas dans un milieu synthétique contenant, en plus des sels minéraux, un sucre, un acide aminé ou un sel d'ammonium et de la thiamine. Ce résultat a été confirmé par PENTLAND (1968). L'initiation de nombreux rhizomorphes peut être obtenue en apportant au substrat des substances naturelles (extrait de malt, extrait de levure, extraits aqueux de végétaux ligneux) ou des substances pures telles que l'éthanol (WEINHOLD, loc. cit.), des acides gras (MOODY, GARRAWAY et WEINHOLD, 1968, 1970, 1972) ou des composés liés à la chaîne de synthèse du tryptophane (GARRAWAY, 1969). Dans une série d'études effectuées de 1965 à 1968, GARRAWAY et WEINHOLD ont abouti à la conclusion que ces différents facteurs agissent vraisemblablement au niveau de la synthèse lipidique.

MORQUER et ses collaborateurs (1969 a et b, 1972 a et b) ne sont pas d'accord avec cette interprétation. Les souches du Clitocybe mellea (Vahl.) Ricken qu'ils ont utilisées sont capables d'initier des rhizomorphes en l'absence d'éthanol. Pour ces auteurs, le déterminisme biochimique de la morphogenèse des rhizomorphes serait lié essentiellement à la structure stéréochimique de la source carbonée et à la nutrition azotée.

D'autres auteurs ont étudié les relations entre la différenciation des rhizomorphes et la présence d'oxygène dans le milieu ambiant chez l'A. mellea (Mme JACQUES-FELIX, 1968 - GRIFFIN, 1971) et chez le Sphaerostilbe repens (GUILLAUMIN, 1970 b, 1971). Les rhizomorphes de ces

deux espèces ne peuvent apparaître dans des milieux anoxiques mais ils ne peuvent pas non plus poursuivre leur croissance dans un environnement riche en oxygène. Les rhizomorphes qui arrivent au contact de l'air, hors du substrat nutritif, brunissent et s'arrêtent de croître chez l'A. mellea, se transforment en corémies chez le S. repens. SMITH et GRIFFIN (1971) ont donné une explication de ces résultats apparemment contradictoires. L'oxygène est effectivement nécessaire à l'initiation et à la croissance du rhizomorphe ; il est apporté aux cellules de l'apex par le canal médullaire. Si la zone apicale est en contact à l'extérieur avec un environnement riche en oxygène, un pigment brun, différent des mélanines, est formé sous l'action de la p-diphényloxydase. Ce pigment s'accumule dans les espaces intercellulaires et provoque l'arrêt de la croissance.

Ces résultats, malgré leur précision, ne permettent pas d'avancer d'hypothèse générale/^{quant} au déterminisme de l'agrégation. Il est vraisemblable que les phénomènes étudiés ne représentent qu'une partie des variations du métabolisme qui aboutissent à la différenciation ou même simplement l'accompagnent.

La seule étude qui apporte un début d'explication au rassemblement des filaments en faisceaux est celle de Mme WATKINSON (1971 a et b). Elle a montré, en effet, que la formation des cordonnets du Merulius lacrymans est déterminée par 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.

4 - Conclusions.

L'étude bibliographique que nous venons de présenter montre que si l'on connaît bien les mécanismes morphologiques qui conduisent à la formation des rhizomorphes, on connaît très peu de choses sur le déterminisme de l'agrégation des filaments. Le problème fondamental consiste à expliquer pourquoi les filaments, au lieu de s'écarter les uns des autres, restent accolés et constituent des faisceaux, soit par coalescence d'axes voisins, soit par coalescence entre un axe ou un groupe d'axes et les rameaux auxquels ils donnent naissance.

Des structures agrégées autres que les rhizomorphes sont construites selon le même processus. Les corémies sont des organes aériens dressés porteurs de conidies issus de l'agrégation des filaments. Celles du genre Doratomyces ^{Cordea} / (BRETON, 1971 a) se différencient à partir d'un seul filament qui donne naissance à deux types de rameaux : les uns, acroscopiques par rapport à la cellule-mère et ascendants s'orientent dans le sens de l'axe dont ils partent ; les autres, basiscopiques et descendants, se dirigent à l'opposé de l'axe. Ces rameaux restent accolés aux filaments dont ils partent et sont à l'origine de la formation d'un organe cylindrique, aérien et dressé, qui porte des conidies à la fin du cycle de développement.

Les études morphogénétiques de la formation des rhizomorphes, bien que peu nombreuses, mettent toutes en évidence des corrélations entre le mycélium non agrégé et les rhizomorphes qui en sont issus. Des corrélations du même type existent aussi chez le Doratomyces sp. En effet, des jeunes corémies isolées du thalle-mère sur lequel elles sont apparues, ne peuvent poursuivre leur croissance que si elles restent en contact avec un fragment de mycélium non différencié (BRETON, 1971 b).

Jusqu'à maintenant, l'influence du mycélium non agrégé a presque toujours été interprétée par des phénomènes d'ordre trophique. Chez le Corticium rolfsii (Sacc.) Curzi, les compétitions alimentaires entre centres de croissance ne suffisent pas à expliquer la morphogenèse des structures agrégées. En effet, GOUJON (1968 à 1970) puis GEIGER et GOUJON (1970) ont montré que la sclérogenèse est déterminée par une substance morphogène qui est transportée par le canal des filaments et permet d'expliquer, avec les corrélations trophiques, l'ensemble des phénomènes de développement du C. rolfsii. Cet exemple montre que des facteurs de type hormonal peuvent intervenir dans le développement des structures agrégées chez les Champignons et qu'il faut en tenir éventuellement compte dans l'interprétation des résultats expérimentaux.

Les résultats que nous venons de commenter et les problèmes généraux qu'ils soulèvent nous ont incité à étudier la formation des rhizomorphes chez les Champignons avec comme but principal la recherche du déterminisme de ce phénomène.

C - LE CHOIX DU MATERIEL DESTINE A L'ETUDE DE LA FORMATION DES RHIZOMORPHES -
L'INTERET DU LEPTOPORUS LIGNOSUS (Kl.) Heim ex Pat.

Entre les deux types de rhizomorphes décrits par GARRETT, nous avons choisi de travailler sur un Champignon construisant des rhizomorphes selon le processus symphogène. Les connaissances sur le mécanisme de formation de ces organes sont d'une part moins avancées que celles concernant l'édification des rhizomorphes vrais. D'autre part, l'agrégation des filaments est, au moins chez certaines espèces, séparée, dans le temps, des différenciations qui conduisent à l'organisation complexe de l'organe agrégé adulte ; le phénomène d'agrégation doit donc, théoriquement, être plus facile à analyser.

Notre choix s'est porté sur le Leptoporus lignosus (Kl.) Heim ex Pat. qui est un Champignon Basidiomycète Gymnocarpe de la famille des Polyporacées, répandu uniquement dans les régions tropicales humides. Il provoque une maladie de racines d'un grand nombre de plantes arbustives (Hévéa, Caféier, Cacaoyer, Palmier à huile, etc....) ; les dégâts qu'il cause sont particulièrement redoutables sur les jeunes plantations d'Hévéa et les études agronomiques qui lui ont été consacrées portent surtout sur le parasitisme vis-à-vis de cette plante.

Lors du défrichement de la forêt qui précède la mise en place de la plantation ou de l'élimination des vieux Hévéas en cas de replantation, le parasite, qui était déjà présent sur les racines de certains arbres, peut envahir de manière saprophytique les masses ligneuses souvent importantes qui restent à sa disposition et sur lesquelles il exerçait auparavant une action pathogène. Plus ou moins rapidement, des rhizomorphes vont se différencier à partir des souches infectées et se propager, soit librement dans le sol, soit le plus souvent à la surface des racines latérales ; la longueur de ces structures agrégées peut atteindre plusieurs mètres. Au cours de cette extension, si les zones en croissance rencontrent fortuitement les racines d'un hôte sensible, un jeune Hévéa par exemple, elles progressent jusqu'au collet, puis sur le pivot. Des filaments non agrégés issus des rhizomorphes pénètrent dans les racines latérales et dans le pivot ; le parasite exploite d'abord les composés cellulosiques de l'hôte, puis la

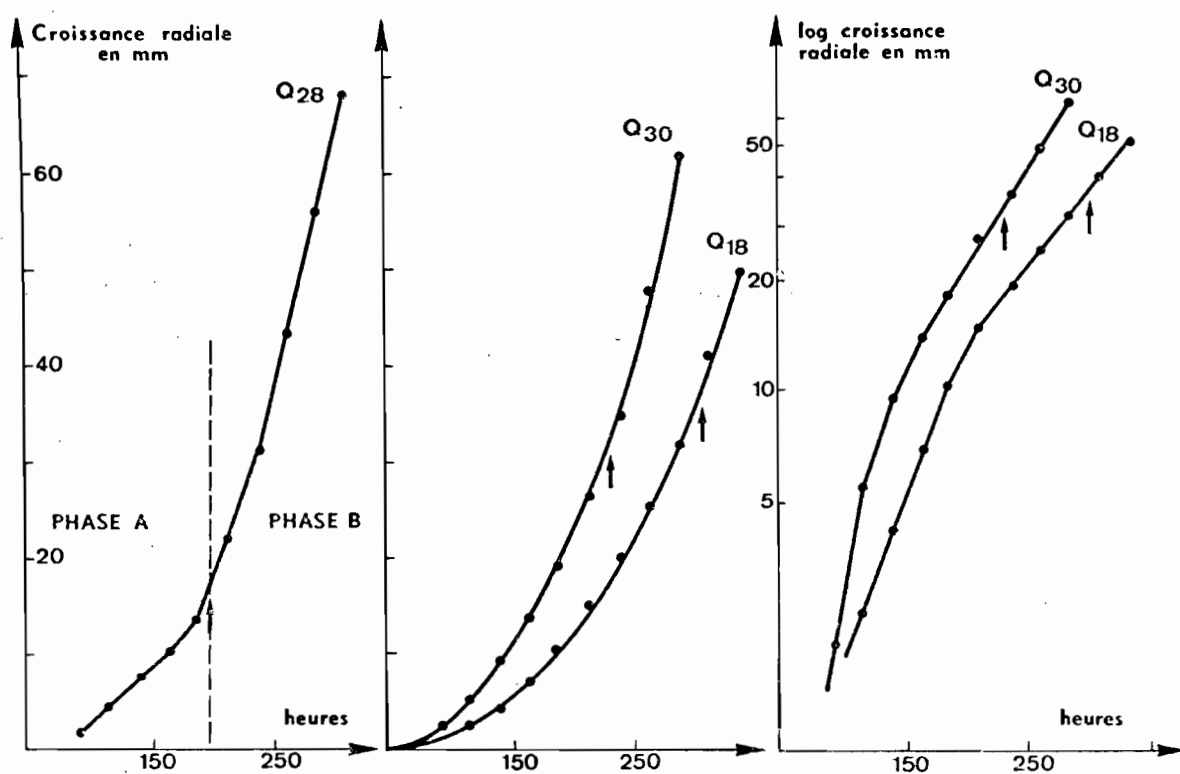


FIGURE 2

Courbes de croissance radiale des souches Q18 - Q28 et Q30

Les flèches indiquent à quel moment apparaissent les filaments B.

lignine : la pourriture qui en résulte est brune dans le front d'attaque puis blanche (d'où le nom de pourridié blanc donné à cette maladie). Si l'arbre meurt des suites de cette infection, les masses ligneuses qui restent en place constituent un nouveau foyer d'où partiront des rhizomorphes susceptibles d'atteindre à leur tour des arbres voisins.

Des carpophores en console apparaissent fréquemment sur les souches restées en place après l'abattage. La fructification est constituée à la partie supérieure d'une couche stérile formée par l'association d'hyphe à parois épaisses en un pseudoparenchyme de couleur blanche, à la partie inférieure, d'une couche fertile comportant des tubes verticaux de couleur orangée dont l'intérieur est tapissé par l'hyménium. Les basidiospores formées à la suite de la méiose naissent par quatre au sommet des basides ; elles sont de petite taille (3 à 4 μ de diamètre), incolores, à paroi non ornementée. Elles sont libérées en grand nombre surtout la nuit et au début de la journée et sont capables de germer immédiatement. Conservées sur des lames vaselinées, elles gardent leur faculté germinative pendant environ un mois.

L'infection directe des tissus vivants par les basidiospores est impossible (DE JONG, 1933 - ALTON, 1953 - PICHELL, 1956). La propagation par basidiospores peut parfois être importante (HUTCHINSON, 1960) mais elle a toujours lieu par création de nouveaux foyers qui ne deviennent dangereux qu'après l'émission de rhizomorphes. Il semble donc que, dans les conditions naturelles, les rhizomorphes jouent le rôle essentiel dans la propagation de la maladie, ce que confirment, d'ailleurs, les observations faites sur le terrain (PICHELL, 1956 - FASSI, 1964).

Les études agronomiques consacrées au parasitisme du L. lignosus sont très nombreuses. Mais on ne connaît pratiquement pas les mécanismes d'édification des thalles, en particulier, ceux qui aboutissent à la formation des rhizomorphes. Nous avons donc abordé ce problème en espérant, d'une part, fournir des données sur la biologie du parasite susceptibles d'orienter les méthodes de lutte, d'autre part, apporter une contribution plus générale à la connaissance des mécanismes de l'agrégation chez les Champignons.

Le présent mémoire est divisé en deux grandes parties. La première consistera en l'étude de l'édification des thalles depuis la basidiospore jusqu'au rhizomorphe adulte. La caractérisation des étapes morphologiques du développement nous conduira à rechercher comment les stades successifs

de la morphogenèse se mettent en place dans le temps et dans l'espace et nous amènera à caractériser, d'une part, les différenciations élémentaires affectant les filaments, d'autre part, les mécanismes de régulation du développement.

Dans la deuxième partie, nous étudierons le déterminisme des différenciations élémentaires conduisant à l'édification des structures agrégées (polarité et agrégation) et celui des corrélations assurant un développement harmonieux et intégré des thalles.

Des résultats partiels de notre étude ont déjà été publiés sous forme de courtes notes (BOISSON, 1968 a, b, c, d, 1972 - BAREYRE et BOISSON, 1969).

La grande variété des méthodes utilisées et leur mise au point progressive en fonction des problèmes à résoudre nous ont incité à décrire les techniques au fur et à mesure de leur utilisation, plutôt qu'à les regrouper artificiellement dans un chapitre matériel et techniques. Pour éviter une recherche laborieuse des méthodes utilisées à qui voudrait reproduire une expérience, nous avons, en fin de mémoire, ajouté une annexe permettant de retrouver facilement dans le texte la description détaillée des techniques.

PREMIERE PARTIE

ETUDE MORPHOLOGIQUE DU DEVELOPPEMENT DES THALLES DU LEPTOPORUS LIGNOSUS

CHAPITRE I

LES FAITS MORPHOLOGIQUES

DESCRIPTION DES DIFFERENTS STADES DU DEVELOPPEMENT DES THALLES DU LEPTOPORUS LIGNOSUS

Dans les conditions naturelles, il est possible d'observer le cycle complet du parasite : germination de la basidiospore et envahissement d'un substrat nutritif, propagation dans le sol et sur les racines par des structures agrégées, pénétration d'hôtes vivants par des filaments libres et manifestation du pouvoir pathogène, enfin, formation de carpophores et de nouvelles basidiospores. Le cycle met en jeu successivement des filaments libres et des structures agrégées. Nous nous sommes intéressés à la construction des deux types de mycélium végétatif non agrégé et agrégé en laissant de côté tout ce qui a trait à la formation des carpophores et des basidiospores. Les conditions naturelles n'offrant pas de possibilité réelle d'expérimentation, toutes nos études ont été réalisées in vitro à partir de cultures faites dans des boîtes de Pétri sur des milieux nutritifs solidifiés par de la gélose. Sauf mention spéciale, tous nos essais ont été effectués à la température optimale pour la croissance, soit 29 à 30°, à l'obscurité, dans des conditions d'humidité proches de la saturation.

Le développement des thalles a été observé en partant de la basidiospore, qui, en tant que produit de la méiose, peut être considérée comme le point zéro de la morphogénèse. De nombreuses souches issues d'une basidiospore unique ont été utilisées ; elles ont été désignées par un signe associant une lettre et un nombre, la lettre caractérisant le carpophore où elles ont été récoltées, le nombre correspondant aux basidiospores prélevées isolément

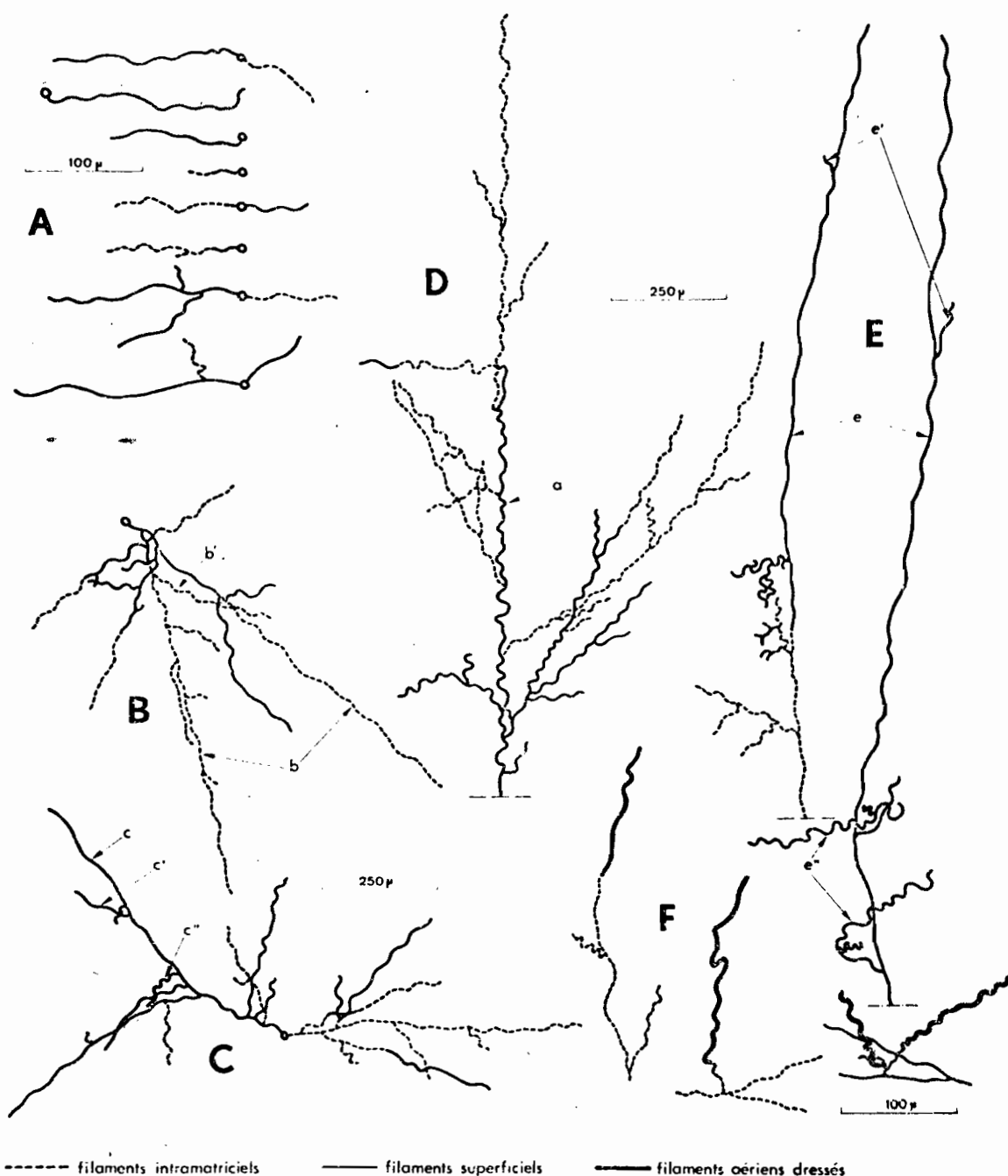


PLANCHE I

Les premières étapes du développement des thalles non agrégés du Leptoporus lignosus

- A - germination des basidiospores.
- B et C - thalles de 45 heures montrant le système d'axes et de rameaux qui assurent l'envahissement du substrat.
- D - axe sinueux, rampant puis intramatriciel, porteur d'hyphes en vrilles.
- E - axes rampants, rectilignes et porteurs d'hyphes en vrilles.
- F - apparition des filaments aériens à partir des filaments intramatriciels ou rampants.

Voir dans le texte les explications concernant les lettres minuscules.

sur une même fructification. Les souches DI et H4 ont servi de support à la plupart de nos recherches en raison de la netteté avec laquelle apparaissent les caractères morphologiques permettant de repérer les différentes phases du développement.

La basidiospore possède un seul noyau issu de la méiose ; les phénomènes de développement ont donc été étudiés à partir d'un matériel génétiquement pur. Nous avons vérifié que les résultats obtenus sont également valables pour un isolat (le n° 3204 de notre collection) provenant d'un pivot d'Hévéa malade, isolat qui s'est révélé très pathogène au cours de nombreux essais d'inoculations expérimentales.

Lorsqu'on ensemence une basidiospore sur un milieu malté et gélosé à 2%, le développement des cultures a toujours lieu sous forme non agrégée. Nous étudierons donc en premier lieu la morphogénèse des thalles construits à partir de filaments libres.

A - LA MORPHOGENESE DES THALLES NON AGREGES.

La basidiospore germe en émettant un ou deux filaments qui, en règle générale, progressent à la surface du substrat (pl. I,A). L'envahissement du milieu met en jeu des éléments mycéliens superficiels et intramatriciels dont la position par rapport au substrat n'est pas irrémédiablement fixée ; certains filaments peuvent, en effet, progresser successivement en surface, puis en profondeur.

Les éléments superficiels sont constitués par quelques axes rampants à parcours très sinueux (pl. ID,a) et par de nombreux axes rectilignes (pl. IC,c et IE,e). Ces derniers portent deux types de rameaux : les uns, rectilignes, naissent en faisant avec l'axe un angle voisin de 45° (pl. IC,c' et IE,e') ; les autres ont un parcours très sinueux, paraissent enroulés sur eux mêmes et font avec l'axe un angle qui peut varier de 0 à 180° (pl. IC,c" et IE,e").

Les éléments intramatriciels assurent rapidement l'envahissement en profondeur du substrat. Ils sont constitués par un système d'axes et de rameaux à parcours rectilignes ; l'angle de ramification est toujours assez ouvert, voisin de 45° dans la plupart des cas (pl. IB,b').

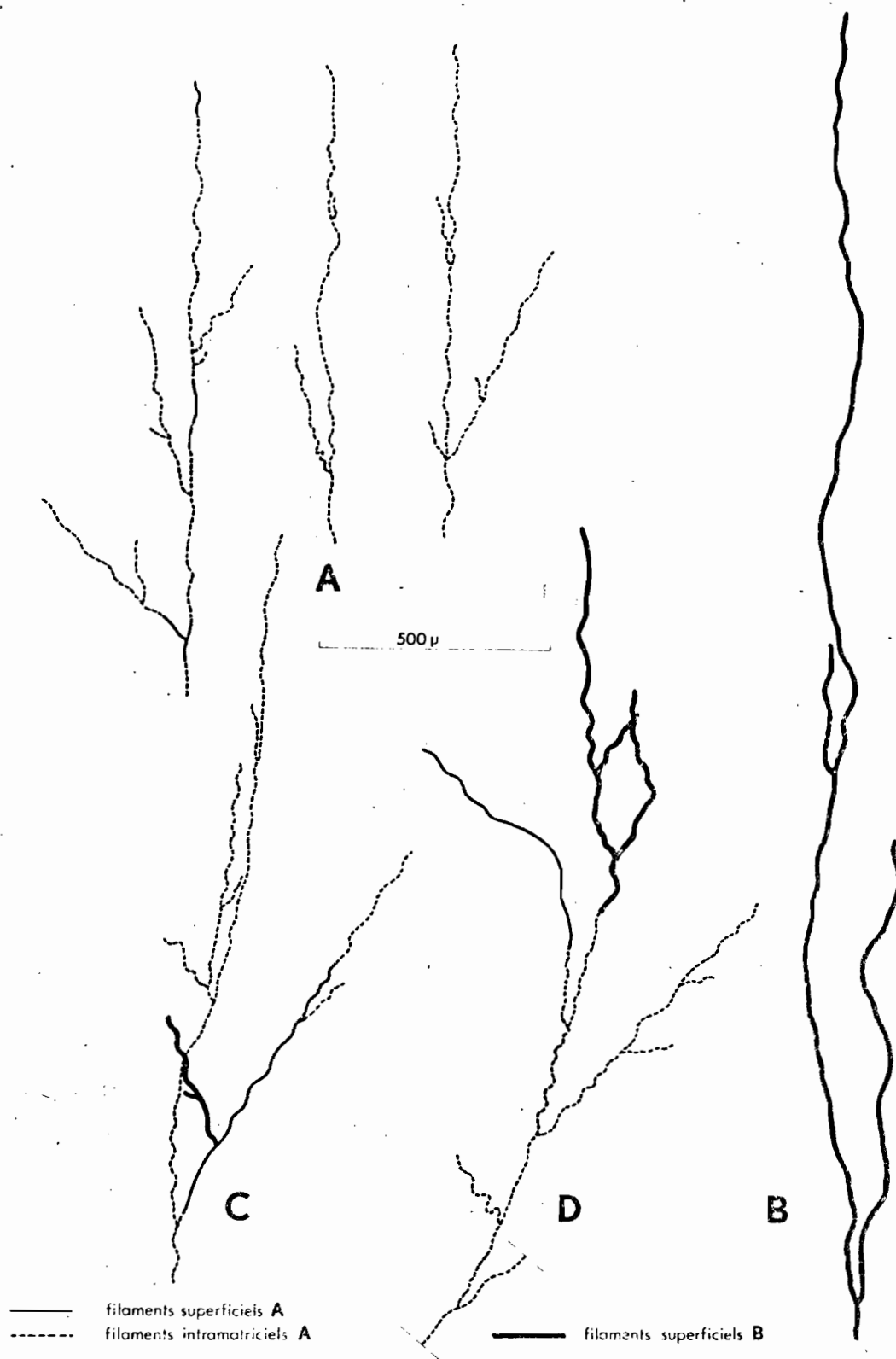


PLANCHE II

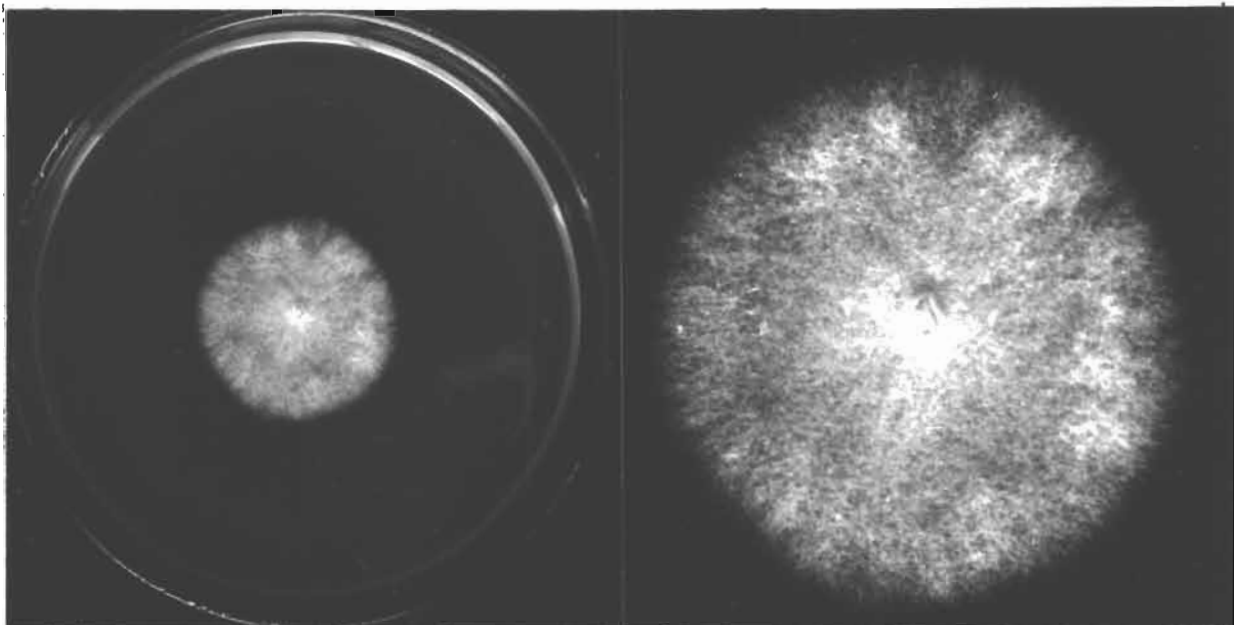
Aspect morphologique des filaments caractéristiques des deux phases de développement du mycélium non agrégé

A - filaments A.

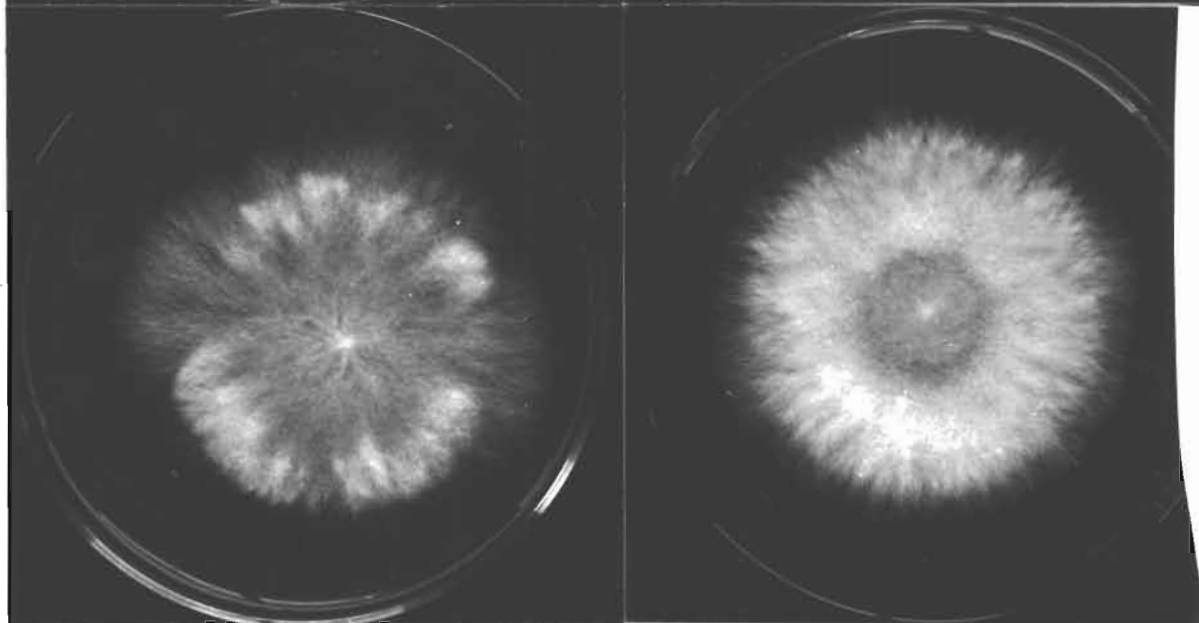
B - filaments B.

C et D - naissance d'un filament B au niveau d'un filament rampant (C) ou d'un filament intramatriciel (D).

A



C



PLANCIE III

Aspect morphologique des thalles non agrégés issus d'une basidiospore

A et B - thalles dans la phase A ($\varnothing$ voisin de 35 mm): cultures duveteuses, forme circulaire, marge en croissance diffuse. Cultures âgées de 8 jours.

C et D - thalles au moment du passage de la phase A à la phase B. Le passage peut s'effectuer en certains points seulement du thalle (C) ou simultanément sur toute la marge (D). Remarquer l'aspect duveteux du mycélium de la phase A, l'aspect rayonnant de celui de la phase B. Cultures âgées de 10 jours.

Trois à cinq jours après l'ensemencement de la basidiospore, des rameaux aériens dressés commencent à apparaître aussi bien à partir des filaments intramatriciels que des éléments rampants (pl. IF).

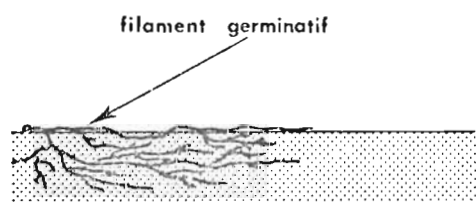
A l'issue de cette période d'établissement du thalle dans le substrat, la culture issue de la basidiospore est de forme circulaire. Les filaments immergés s'allongeant, en règle générale, plus rapidement que les filaments rampants, ils assurent bientôt à eux seuls la croissance du thalle et sont seuls visibles dans la marge. Ils apparaissent sous forme d'axes rectilignes qui émergent parfois en surface sur de très courts trajets (pl. II A). Ils donnent naissance à des rameaux eux mêmes immergés et rectilignes, l'angle de ramification étant voisin de 45° . Loin en arrière, à 2 ou 3 mm des apex, ils différencient également des rameaux aériens dressés qui donnent aux thalles un aspect duveteux (pl. III A et B).

5 à 10 jours après la mise en culture, la marge du thalle prend une forme irrégulière ; elle est bientôt envahie par un mycélium d'aspect rayonnant (pl. III C et D). Ces changements correspondent à l'apparition, en plus des éléments précédents qui poursuivent leur croissance, de très nombreux filaments rampants qui naissent dans l'arrière front en certains points seulement ou simultanément sur toute la marge (pl. III C et D). Ils s'allongent plus rapidement que les filaments immergés et cette propriété leur permet d'envahir très vite le pourtour du thalle tout entier.

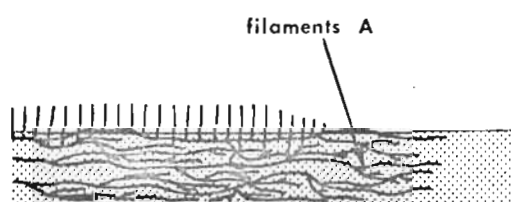
Observés au microscope, ces nouveaux éléments mycéliens apparaissent sous forme d'axes à parcours légèrement sinueux. Ils sont peu ramifiés et les rameaux rampants qu'ils portent naissent selon un angle aigu souvent très fermé (pl. II B). Loin en arrière des apex, ils détachent des rameaux immergés et des rameaux aériens dressés.

L'examen des cultures juste avant la manifestation visible des changements morphologiques montre que ces nouveaux constituants du thalle sont édifiés à partir de rameaux issus des éléments rampants ou intramatriciels de la première phase de croissance (pl. II C et D). Cette caractéristique est à l'origine de leur apparition en arrière de la marge des cultures.

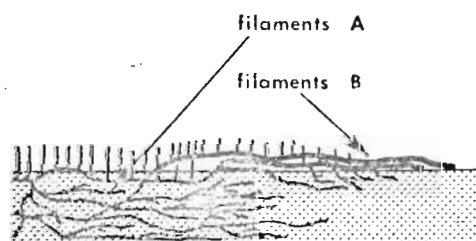
Le développement d'un thalle à partir d'une basidiospore du L. lignosus passe donc par deux phases repérables par la nature des filaments qui assurent l'extension radiale de la culture et qui prédominent au cours de



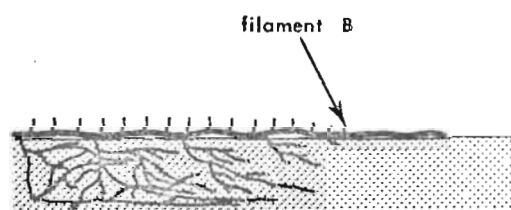
DEBUT DE LA PHASE A



PHASE A



DEBUT DE LA PHASE B



PHASE B

FIGURE I

Représentation schématique des diverses étapes du développement du L. limosum

TABLEAU I

Caractères biométriques et vitesse de croissance radiale des filaments A et B des souches D1,
H4 et 3204 sur milieu malté

	D1		H4		3204	
	A	B	A	B	A	B
diamètre moyen en μ	$2,6 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,2$
diamètres extrêmes en μ	1,8 à 4,0	2,6 à 5,5	2,2 à 3,3	2,7 à 4,4	2,0 à 2,5	2,7 à 4,4
distance moyenne entre le 1er rameau et l'apex en μ	495 ± 46	512 ± 72	300 ± 26	452 ± 64	617 ± 66	964 ± 32
distances extrêmes entre le 1er rameau et l'apex en μ	273 à 893	340 à 700	216 à 470	226 à 714	320 à 1230	440 à 1560
distance moyenne entre le 1er et le 2ème rameau en μ	470 ± 70	723 ± 86	419 ± 27	732 ± 39	634 ± 48	1226 ± 92
distances extrêmes entre le 1er et le 2ème rameau en μ	282 à 620	440 à 1040	310 à 545	564 à 902	310 à 990	800 à 1900
croissance radiale en mm/24 h	5,3	10,7	5,3	10,7	6,7	13,6

chacune de ces deux étapes (fig. 1). Durant la première, appelée phase A, ce sont des filaments intramatriciels, les filaments A, qui sont responsables de l'accroissement de diamètre des cultures. Les filaments superficiels, appelés filaments B, à élancement plus rapide, assurent la croissance radiale des thalles au cours de la phase B.

Nous avons recherché par des observations plus précises quelles sont les différences morphologiques et physiologiques qui existent entre ces deux types mycéliens.

Les mesures du diamètre des filaments et de la distance entre les rameaux ont été effectuées sur des filaments A et B pour les souches DI, H4 et 3204. L'examen du tableau I montre que le diamètre des filaments A est plus petit que celui des filaments B, de 30% environ en ce qui concerne la valeur moyenne. Sur les filaments B, la ramification démarre plus loin de l'apex que sur les filaments A. Mais une différence encore plus nette ressort de la comparaison entre la distance moyenne qui sépare les deux premiers rameaux : elle est presque le double pour les filaments B de la souche 3204, supérieure de la moitié pour ceux des souches DI et H4. Il faut remarquer cependant que les variations individuelles de toutes ces mesures sont très importantes et que les différences ne sont valables qu'au niveau des moyennes. Par exemple, la distance moyenne entre les deux premiers rameaux est, en ce qui concerne la souche DI, de 470 μ pour les filaments A et de 723 μ pour les filaments B. Les mesures extrêmes sont, respectivement, 282 et 620, 440 et 1040 pour les mêmes éléments. Ceci montre que les caractères biométriques ne sont pas suffisants pour permettre l'identification d'un filament au type A ou B, d'autant plus qu'ils peuvent varier en fonction des conditions de culture. En définitive, il n'y a pas de différence d'ordre qualitatif bien tranchée entre les éléments mycéliens caractéristiques des deux phases du développement mais leur repérage reste tout de même facile sur un milieu gélosé, ne serait-ce que par leur position par rapport au substrat.

Les filaments A et B s'allongent à des vitesses différentes. Cette caractéristique a été étudiée à partir d'une série de thalles d'origine monosporee, les basidiospores étant prélevées sur un même carpophore. Les examens sont faits tous les jours sur deux diamètres perpendiculaires tracés préalablement sur le fond de la boîte de Pétri ; ils consistent à repérer la position de l'apex et la nature des filaments en croissance sur chacun

des quatre rayons choisis. Ces mesures permettent de tracer la courbe de croissance radiale moyenne des diverses souches en fonction du temps. Dans quelques cas, ces courbes présentent deux phases de croissance linéaire successives correspondant respectivement aux phases A et B (fig. 2 : courbe de la souche Q28). La plupart du temps, la séparation entre les deux stades est beaucoup moins nette (fig. 2 : courbes des souches Q18 et Q30 construites en coordonnées linéaires), en partie parce que le passage à la phase B n'est pas simultané sur toute la marge du thalle, en partie également parce que la vitesse de croissance des filaments A et B varie au cours du développement. Lorsqu'on construit les mêmes courbes en coordonnées semi-logarithmique (fig. 2) elles mettent en évidence deux phases de croissance exponentielle traduites par deux droites de pentes différentes, le changement de pente se produisant au cours de la phase A. Cette dernière caractéristique est l'indice d'une modification de fonctionnement du filament A qui se manifeste, avant le passage à la phase B, par une accélération de la croissance. Autrement dit, il existe, au sein du mycélium de type A, une période de différenciation physiologique qui précède la différenciation morphologique.

Dans des conditions que nous préciserons plus loin, et qui permettent de maintenir indéfiniment un thalle dans la phase A ou dans la phase B, il a été possible de mesurer la vitesse d'élongation des deux types de filaments pour les isolats qui ont été utilisés dans la suite de ce travail. Ces mesures, portées dans le tableau I, montrent que les filaments B s'allongent deux fois plus rapidement que les filaments A.

B - L'EDIFICATION DES STRUCTURES AGREGÉES - MORPHOLOGIE ET ANATOMIE DES DIFFÉRENTS STADES.

Lorsque les cultures sont réalisées dans les conditions précédentes sur du milieu à l'extrait de malt, le développement peut se poursuivre indéfiniment à partir de filaments libres dans la phase B. Dans certaines conditions que nous décrirons maintenant, il a été possible d'obtenir in vitro une morphogénèse semblable à celle observée au cours du cycle naturel du parasite.

1 - Technique de culture in vitro du mycélium agrégé.

Nous avons dans un premier temps utilisé des techniques qui se rapprochent beaucoup des conditions naturelles.

Des bûchettes de bois d'Hévéc, stériles, de 8 cm³ de volume environ, sont ensemencées avec du mycélium du L. lignosus. Lorsque les filaments ont envahi la totalité du substrat, au bout d'une quinzaine de jours, les bûchettes portant le Champignon sont déposées sur du sable que l'on arrose régulièrement pour le maintenir constamment humide. Ces expériences ont été faites en boîtes de Pétri de 18 ou 20 cm de diamètre (1 bûchette ensemencée) ou dans des grandes boîtes de 1 m de long sur 0,20 m de large, les bûchettes au nombre de 10, étant ensemencées à l'une des extrémités. Cette dernière technique permet d'obtenir des rhizomorphes dont la structure est tout à fait semblable à celle des mêmes organes récoltés dans la nature.

Cependant, on ne connaît pas de manière précise les constituants chimiques du substrat. Nous avons donc remplacé la bûchette d'Hévéc par des disques de milieu nutritif de 35 mm de diamètre, envahis par le parasite. La présence de sable n'étant pas favorable à l'observation morphologique des thalles en croissance, ces disques ont simplement été déposés sur le fond d'une boîte de Pétri ne contenant aucun substrat. Si l'humidité est maintenue constamment saturante, le mycélium agrégé peut se développer à partir du disque de milieu sur le verre au fond de la boîte mais la morphogénèse ne se poursuit pas jusqu'à son terme ultime, le rhizomorphe.

Ces techniques, proches des conditions naturelles, offrent cependant des possibilités expérimentales limitées. Nous avons donc essayé de reproduire le cycle complet du parasite en culture sur milieu gélosé, ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été réalisé jusqu'à maintenant.

Depuis RIGGENBACH (1957, 1960), on sait que le L. lignosus ne peut croître sur un milieu synthétique que s'il contient une source d'azote organique et de la thiamine. Ce résultat a été vérifié pour les souches isolées en Côte d'Ivoire (BOISSON, 1965). Le milieu synthétique utilisé pour la culture du mycélium non agrégé a la composition suivante :

NO ₃ Na	2 g
PO ₄ H ₂ K	0,8 g
PO ₄ HK ₂	0,2 g
SO ₄ H ₂ g, 7H ₂ O	0,5 g
ClK	0,5 g
SO ₄ Fe, 7H ₂ O	0,01 g
Glucose	20 g
Asparagine	1 g
Thiamine	0,5 mg
Gélose	20 g
Eau	qsp 1000 ml

L'apport, dans les proportions indiquées de phosphates de potassium sous forme monopotassique et bipotassique permet d'avoir un pH initial toujours voisin de 6,0. La morphogénèse des thalles se déroule de la même manière que sur le milieu à l'extrait de malt.

Les thalles peuvent se développer sous forme agrégée dans le substrat précédent à condition d'abaisser son pH jusqu'à la valeur 4,0 ou de lui ajouter du nitrate d'ammonium. Si ces deux modifications sont apportées en même temps, des structures agrégées jeunes typiques apparaissent en petit nombre. L'apport d'asparagine à des doses allant de 1 à 5 g/l permet d'obtenir un nombre de plus en plus grand d'organes agrégés. Dans quelques cas, la différenciation a pu atteindre le stade rhizomorphe.

En définitive, nous disposons de trois milieux synthétiques (MS1, MS2 et MS3) dont les formules sont les suivantes :

MS1	-	NO ₃ Na	2 g
		SO ₄ Mg, 7H ₂ O	0,5 g
		ClK	0,5 g
		SO ₄ Fe, 7H ₂ O	0,01 g
		NO ₃ NH ₄	2 g
		Glucose	20 g
		Thiamine	0,5 mg
		Gélose	20 g
		Eau	qsp 1000 ml

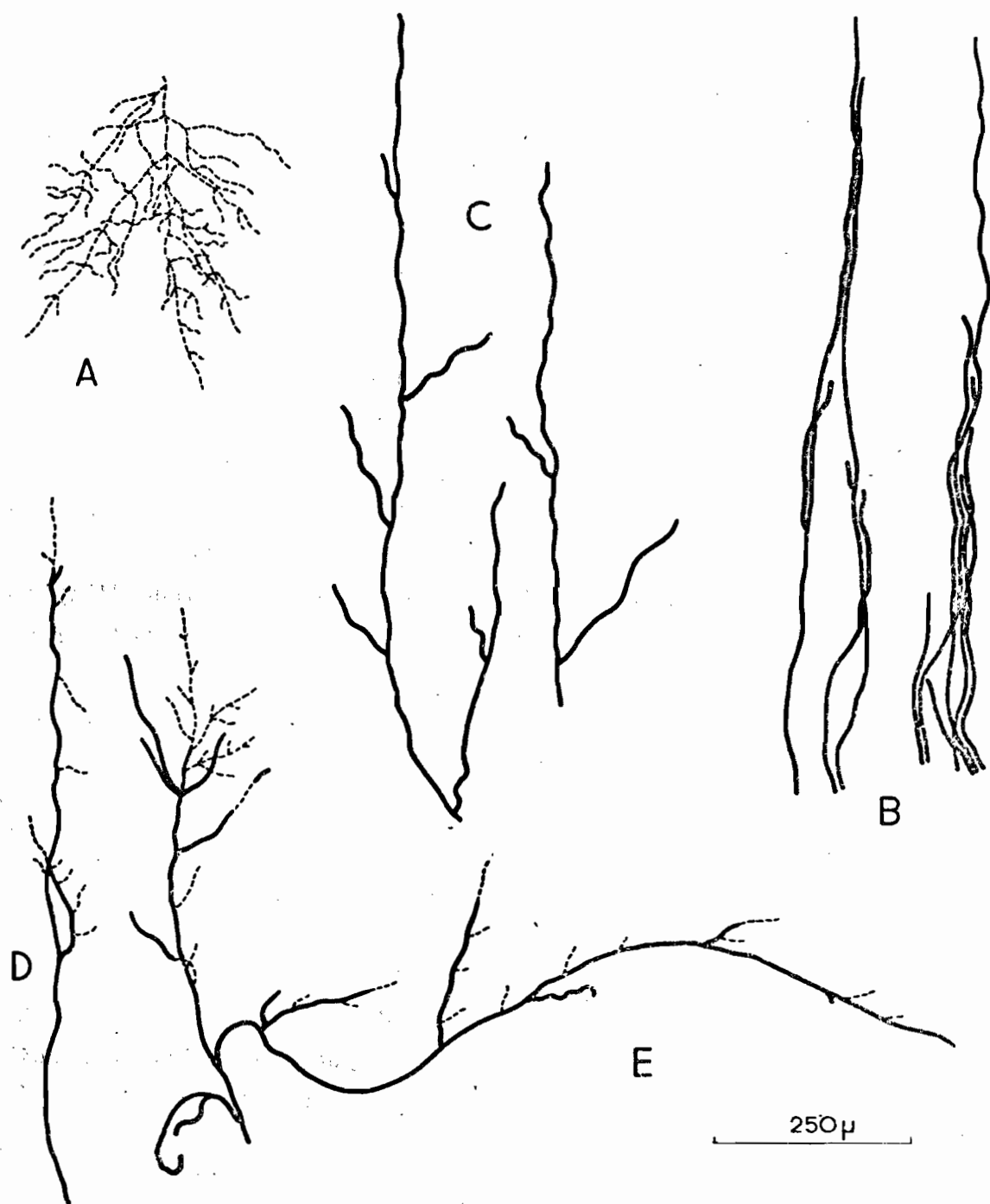
Avant de répartir en boîtes de Pétri, on ajoute, à 60°, 40 ml/l du mélange PO₄H₃ - PO₄H₂Na 0,1M de pH 2,0, ce qui donne un pH final de 4,0. On peut faire varier ce pH de 3,5 à 4,5 en ajoutant des quantités de mélange phosphate variant de 60 à 30 ml/l respectivement. On peut également apporter de l'asparagine aux doses de 1 ou 2 g/l pour obtenir un développement plus important de mycélium agrégé.

MS2 - Ce substrat a la même composition que le précédent mais ne contient pas de nitrate d'ammonium. Il faut obligatoirement lui apporter de l'asparagine.

MS3 - Ce milieu n'est pas acidifié et a un pH voisin de 6,0 ; il a la composition suivante :

NO ₃ Na	2 g
PO ₄ HK ₂	0,8 g
PO ₄ H ₂ K	0,2 g
SO ₄ Mg, 7H ₂ O	0,5 g
ClK	0,5 g
SO ₄ Fe, 7H ₂ O	0,01 g
NO ₃ NH ₄	2 g
Glucose	20 g
Thiamine	0,5 mg
Gélose	20 g
Eau	qsp 1000 ml

Sur ces milieux qui permettent l'obtention in vitro de structures agrégées, on constate que les filaments libres ont une croissance très faible. Cette action est d'autant plus nette que le milieu qui permet le développement du mycélium agrégé contient plus de NO₃NH₄ ou est plus acide et que la quantité de filaments repiqués est plus faible ;



PLANCIE IV

Les différents types de filaments observés dans une culture
faite sur un milieu qui permet l'agrégation

- A - filament intramatriciel non agrégé
- B - filaments superficiels agrégés
- C - filaments superficiels non agrégés
- D et E - passage du type superficiel non agrégé au type intramatriciel

elle peut aller jusqu'à l'inhibition totale de la croissance. En conséquence il est presque toujours nécessaire d'ensemencer les milieux gélosés autorisant l'agrégation avec des boutures de grande taille qui, nous le verrons plus loin, régénèrent directement des filaments B ; nous avons utilisé fréquemment des thalles entiers de la phase B.

2 - Différents types de filaments présents dans les cultures faites sur un milieu permettant l'agrégation.

Lorsqu'un thalle de la phase B est transféré, sans léser la marge en croissance, sur un milieu MS1 de pH 4,0, contenant 1 g/l d'asparagine, les filaments B s'arrêtent très vite de croître. Il arrive fréquemment que les apex éclatent et laissent échapper une petite sphère de protoplasme à l'extrémité des hyphes.

Des massifs de mycélium aérien dressé constitué d'hyphes très ramifiées sont édifiés dans la zone apicale ou subapicale du thalle non agrégé. Les structures agrégées sont initiées à partir de ces massifs ; elles apparaissent sous forme de faisceaux de filaments rampants étroitement serrés les uns contre les autres, peu ramifiés et dont les rameaux restent presque toujours accolés à l'axe (pl. IV B). Les hyphes agrégées s'allongent à une vitesse moyenne de 4,2 mm par jour pour la souche H4.

L'initiation des structures agrégées n'a pas lieu uniformément sur toute la marge de la culture. A côté des faisceaux de filaments agrégés, des éléments mycéliens libres peuvent se développer. Lorsqu'ils sont intramatriels, ils s'allongent très lentement (0,5 mm par jour pour H4) et se ramifient intensément en prenant un aspect de "balai de sorcière" (pl. IV A). Lorsqu'ils sont superficiels, ils croissent plus rapidement (1,8 mm par jour pour H4), se ramifient moins fréquemment, selon un angle de ramification toujours assez ouvert, voisin de 30 à 45° (pl. IV C). Ces derniers filaments peuvent, après un certain parcours en surface, plonger dans le milieu et prendre progressivement l'aspect des filaments intramatriels libres (pl. IV D et E) ou, après régénération de mycélium aérien dressé, être à l'origine de nouveaux faisceaux. Les hyphes superficielles non agrégées doivent donc être considérées comme un stade transitoire. Comme, par ailleurs, l'allongement des filaments intramatriels cesse très vite, il devient évident que seuls les filaments agrégés sont susceptibles de croître indéfiniment sur les milieux autorisant l'agrégation.

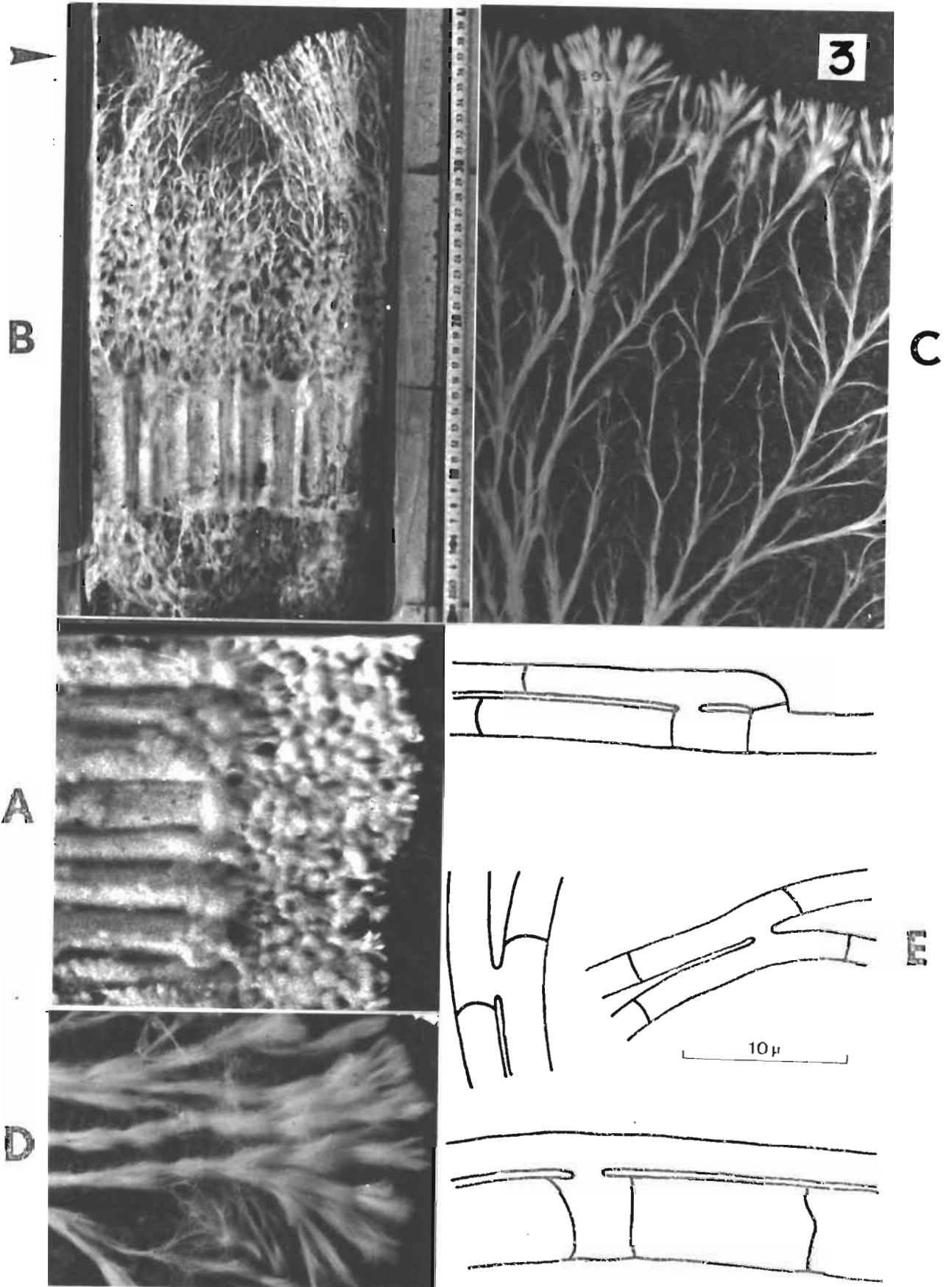


PLANCHE V

Les caractéristiques morphologiques des structures agrégées au stade palme

A - plaque mycélienne assurant un envahissement homogène du substrat.

B - plaque mycélienne et à la partie supérieure (flèche) faisceau de forme cylindrique, non ramifié.

D - faisceaux ramifiés.

E - anastomoses entre filaments agrégés en arrière de la zone apicale d'une palmette.

En définitive, les filaments agrégés diffèrent des filaments libres par leur vitesse de croissance et par des caractères morphologiques dont le plus constant est la ramification selon un angle nul.

Les structures agrégées du L. lignosus sont initiées à partir des faisceaux de filaments que nous venons de décrire ; leur développement se déroule en trois stades, la palmette, le cordonnet et le rhizomorphe, que nous décrirons maintenant.

3 - Organisation des structures agrégées.

Les organes agrégés du L. lignosus sont édifiés en deux temps. Un premier système d'hyphes agrégées est mis en place par la palmette, structure qui, à elle seule, est responsable de la croissance en longueur des organes agrégés. La néoformation de filaments autour des faisceaux, support de la croissance en épaisseur, et l'intervention de différenciation au niveau de quelques filaments seulement, assurent le passage aux stades cordonnnet et rhizomorphe. Ces dernières transformations se produisent toujours loin en arrière de la zone apicale des palmettes et n'affectent jamais l'ensemble des faisceaux mis en place par les palmettes. Dans les conditions naturelles, les hyphes qui ne participent pas à l'édification des structures agrégées sont très rapidement lysées et seuls restent visibles des organes cylindriques ou plus ou moins aplatis, de couleur blanche puis brun-orangé, qui sont les rhizomorphes.

a - La palmette.

Le terme de palmette a été donné, par les agronomes habitués à observer le L. lignosus dans la nature, aux structures agrégées présentes à la surface des racines, dans la zone d'extension du parasite, parce qu'elles apparaissent sous forme de faisceaux de filaments presque toujours étalés en éventail dans la marge en croissance.

Les conditions variées utilisées pour la culture du mycélium agrégé ont montré que la croissance peut, en réalité, être assurée par des formations d'aspects très divers. Nous avons observé toutes les variations possibles depuis la plaque mycélienne constituée de faisceaux très nombreux, juxtaposés les uns aux autres, présentant un front de croissance homogène et assurant un envahissement régulier du substrat (pl. V A), jusqu'aux organes bien isolés les uns des autres, allongés, en forme de ruban, qui assurent qu'un

TABLEAU II

Caractéristiques biométriques des filaments agrégés au cours des différents stades de développement des rhizomorphes (moyenne de 100 mesures)

	Nature des filaments et lieu de prélèvement	Diamètre moyen en μ	Longueur moyenne des articles en μ
Palmette	Filaments du front de croissance	$2,4 \pm 0,1$	238 ± 14
	Filaments de la base de la palmette	$3,7 \pm 0,1$	45 ± 2
Cordonnet	Filaments du centre du cordonnet	$4,9 \pm 0,1$	37 ± 3
	Filaments de la périphérie	$2,8 \pm 0,1$	84 ± 6
Rhizomorphe	Filaments de gros diamètre dans la zone médullaire	$12,0 \pm 1,1$	(1)
	Filaments de petit diamètre dans la zone corticale	$2,9 \pm 0,1$	75 ± 5

- (1) Ces mesures n'ont pas pu être effectuées car les articles sont très longs et il est difficile d'observer un article entier sur les coupes transversales. En revanche, on peut suivre ces filaments sur 400 à 500 μ sans trouver de cloison.

flèche

envahissement très inégal du substrat (pl. V B/). Dans la majorité des cas, c'est une forme intermédiaire qui assure la croissance ; elle est représentée par des organes rubannés, plus ou moins ramifiés, étalés ou non en éventail dans la zone apicale (pl. V C et D).

Par extension, ces diverses formations ont reçu le nom de palmette puisqu'elles sont toutes construites par des filaments agrégés présentant les caractéristiques décrites précédemment. La palmette doit alors être définie comme un organe constitué d'un ou de plusieurs faisceaux édifiés à la suite du rassemblement de filaments tous semblables, portant un petit nombre de rameaux qui restent accolés à l'axe dont ils partent.

Au fur et à mesure que les cellules de la palmette vieillissent, elles subissent des transformations morphologiques. Les filaments observés à la base des palmettes sont plus gros et à articles plus courts que ceux présents dans la marge en croissance (tabl. II) ; ils renferment un cytoplasme dispersé et granuleux alors que les cellules de la zone apicale contiennent un cytoplasme dense et homogène, se colorant très fortement au bleu coton. Nous avons recherché la présence d'anastomoses entre les filaments agrégés de la palmette. Nous n'en avons jamais observées dans la marge en croissance ; en arrière, nous en avons quelquefois repérées sur des coupes longitudinales (pl. V E) mais elles sont très rares.

Dans certaines conditions, les palmettes perdent leur structure agrégée. Les filaments des faisceaux continuent à croître en s'écartant les uns des autres. La nature non agrégée du mycélium ainsi régénéré est facile à déterminer en se basant sur la croissance plus faible et sur les caractéristiques différentes de la ramification des filaments libres.

b - Le cordonnet.

Les cordonnets apparaissent en arrière du front de croissance des palmettes. Ce sont des organes de couleur blanc laiteux, cylindriques à rubannés, dont la largeur peut être supérieure à 1 mm. Ce stade morphologique est caractérisé par la néoformation, autour des faisceaux d'hyphes de gros diamètre édifiés par la palmette, d'un grand nombre de filaments étroitement serrés les uns contre les autres, de petit diamètre, à articles longs et à parois fortement épaissies. Leurs mensurations figurent au tableau II. On peut leur attribuer un rôle dans la rigidité et la protection des filaments du centre vis-à-vis des agents externes.

1 mm

250 μ

B

A

20 μ

E

C

20 μ

D

20 μ

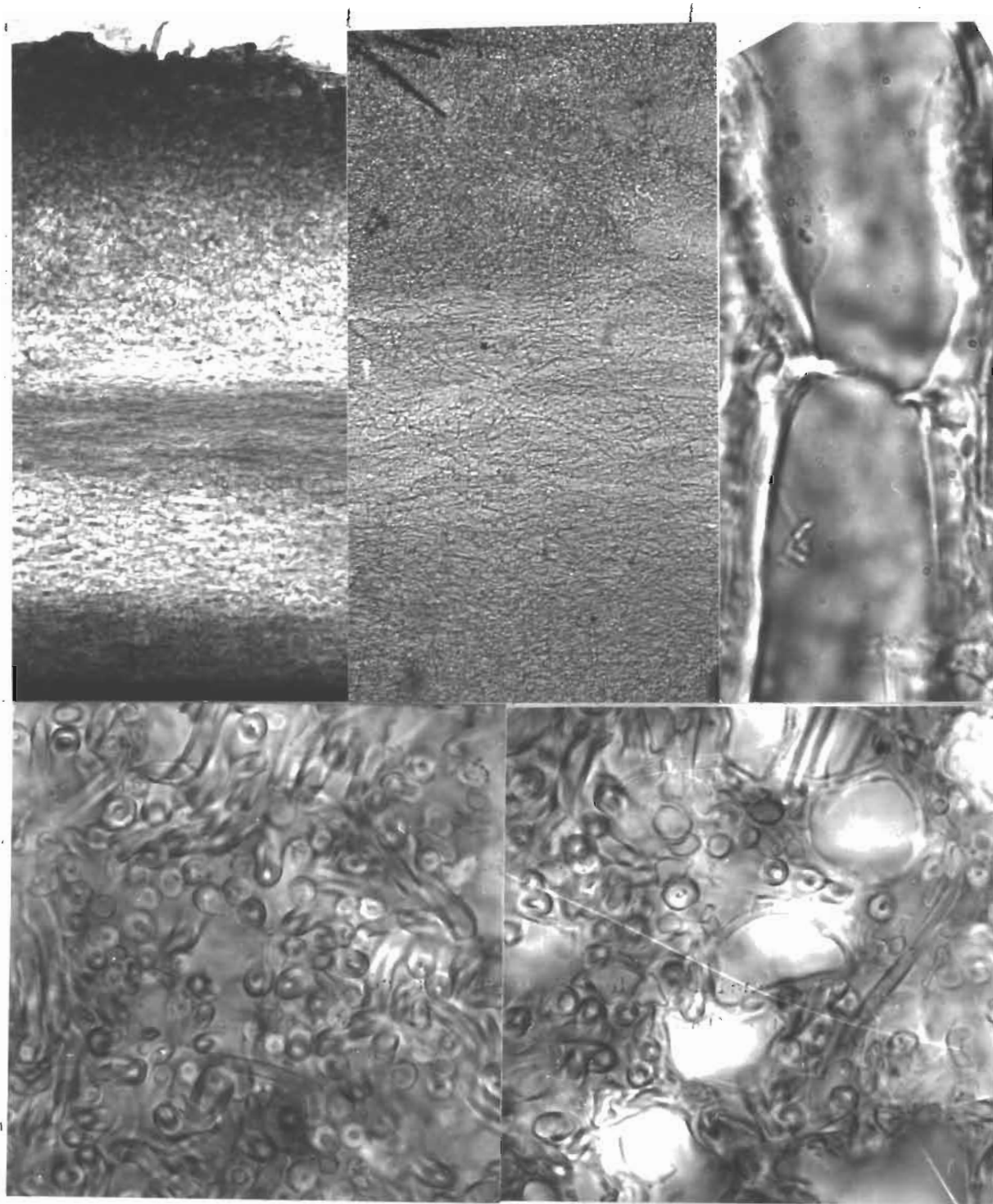


PLANCHE VI

Etude anatomique du rhizomorphe adulte

- A et B - coupes montrant les différentes zones constitutives du rhizomorphe.
C - détail de la zone moyenne.
D - détail de la zone médullaire.
E - cloisonnement imparfait d'un filament de gros diamètre de la zone médullaire.

c - Le rhizomorphe.

Le rhizomorphe est édifié à partir du cordonnet. Il se présente sous forme d'un organe cylindrique, ou plus ou moins aplati en ruban, dont la largeur peut atteindre 4 à 5 mm ; d'abord blanc, il se teinte légèrement de brun lorsqu'il est âgé. Son étude anatomique permet de distinguer trois couches différentes repérables par le diamètre, l'orientation et la densité des filaments (pl. VI A et B).

La zone centrale, appelée médulla, comprend trois types de filaments orientés en général dans le sens axial (pl. VI A, B et D) : des filaments de très gros diamètre (jusqu'à 18 microns pour la souche 3204), à parois épaisses pouvant atteindre 2 microns (tabl. II) ; des hyphes de petit diamètre, à parois épaisses (tabl. II) ; un petit nombre de filaments de diamètre intermédiaire entre les précédents, à parois minces. Les filaments de gros diamètre sont très peu cloisonnés et les cloisons sont imparfaites et presque toujours percées d'une large perforation au centre (pl. VI E) ; la structure anatomique de ces éléments les rend particulièrement aptes au transport le long du rhizomorphe. Dans la zone moyenne (pl. VI C), les gros filaments à parois épaisses sont absents ; les deux autres types d'hyphes existent mais leur croissance peut être orientée radialement ; tous ces filaments constituent une association assez lâche. La zone corticale a la même constitution que la couche moyenne mais avec une structure beaucoup plus serrée.

La différenciation des structures agrégées du L. lignosus marquée par la succession des étapes palmette, cordonnet et rhizomorphe correspond en définitive à un accroissement du nombre des filaments participant à la formation de chaque organe et à un degré d'organisation supérieur. La palmette a une structure homogène et est constituée d'un seul type de filament. Le cordonnet comprend deux couches formées par deux types différents de filaments. Le rhizomorphe est constitué de trois couches distinctes repérables par la disposition et la proportion relative des trois types de filaments qui participent à leur édification.

C - RÉSUMÉ ET DISCUSSION.

L'étude morphologique des thalles du L. lignosus que nous venons de réaliser a permis de décrire les étapes successives du développement marquées par les phases A et B pour le mycélium non agrégé, par les stades palmettes, cordonnet et rhizomorphe pour le mycélium agrégé. Dans les conditions expérimentales utilisées jusqu'à maintenant, les structures agrégées ont été obtenues à partir du mycélium de la phase B. Compte tenu de cette restriction dont nous reparlerons dans la suite de ce mémoire, nous

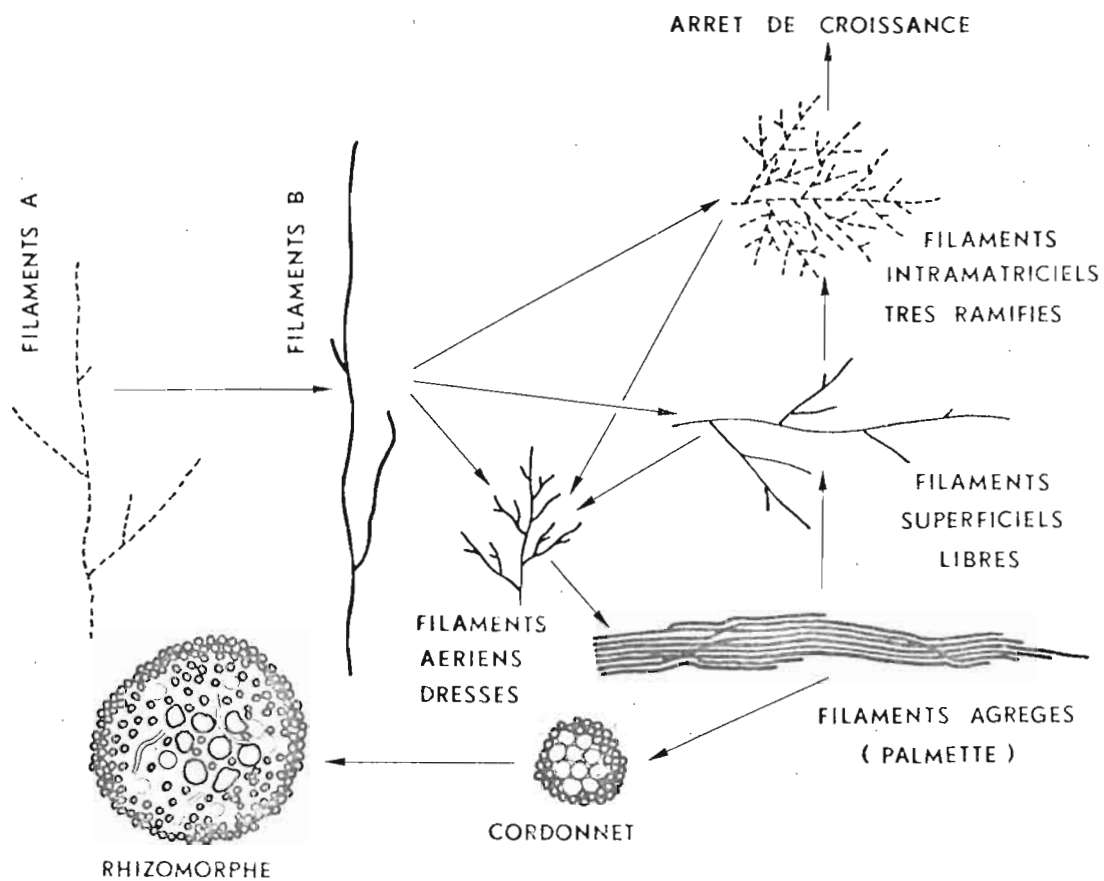


FIGURE 3

Les différents types filamenteux qui participent à l'édification des thalles
du L. lignosus

pouvons schématiser la morphogénèse des thalles (fig. 3), de la basidiospore au rhizomorphe, en figurant les différents types filamenteux qui apparaissent successivement et caractérisent les principaux stades du développement.

Le premier appareil végétatif construit à partir de la basidiospore est constitué en majorité de filaments intramatriciels (filaments A) qui assurent l'extension radiale de la culture et dont la ramification donne naissance en arrière de la marge au système aérien dressé. Puis, il apparaît un nouveau type de filaments (filaments B) qui, du fait de leur élongation plus rapide, envahissent bientôt la marge et assurent alors à eux seuls l'extension radiale du thalle. Leur ramification donne naissance en arrière au mycélium aérien dressé et au mycélium intramatriciel.

Placés dans des conditions qui permettent l'agrégation, les filaments B peuvent conduire à trois types de filaments : après formation d'un massif de mycélium aérien dressé, aux filaments agrégés ; à des filaments superficiels isolés ; à des filaments intramatriciels libres. Les éléments superficiels libres n'ont qu'une existence transitoire : ils évoluent toujours plus ou moins rapidement vers les types intramatriciels ou agrégés. Les filaments immergés peuvent parfois évoluer vers le type superficiel non agrégé puis vers le type agrégé ; le plus couramment, ils cessent de croître. Une fois l'agrégation enclenchée, seuls les éléments agrégés sont capables de croître et de se perpétuer indéfiniment.

Les structures agrégées se construisent selon un ordre rigoureux dans le sens d'une complexité croissante. La palmette, premier organe agrégé apparu, assure seule la croissance en longueur. Les différenciations ultérieures qui se traduisent par la formation des cordonnets et des rhizomorphes, organes cylindriques ou rubannés capables de croître en épaisseur, ont lieu à l'intérieur du mycélium agrégé construit par la palmette.

La morphogénèse des Basidiomycètes a été souvent décrite et les différents auteurs (résumé des travaux par GAÜMANN, 1928 ; BUTLER, 1966 et TABER, 1966) reconnaissent trois types de mycélium. Le mycélium "primaire" édifié à partir de la basidiospore assure l'envahissement du milieu, grâce, en particulier, à un angle de ramification très ouvert et à une dominance pratiquement nulle des axes sur leurs rameaux. Alors que, typiquement, il correspond à la phase monocaryotique, le mycélium "secondaire" est dicaryotique et possède des anses d'anastomose ; la préséance des axes sur les rameaux est souvent très marquée. Enfin, le mycélium tertiaire, constitué de filaments souvent très différenciés, est responsable de l'édification

des carpophores ou d'organes végétatifs massifs tels que sclérotés ou rhizomorphes. La distinction entre ces trois types mycéliens, les deux premiers en particulier, n'est pas toujours facile ; GAÜMANN (1928) signale que dans beaucoup d'espèces, il n'existe pas de différence fondamentale dans la morphologie des mycéliums primaire et secondaire.

La morphogénèse des thalles du L. lignosus peut être replacée facilement dans ce cadre général du développement des Basidiomycètes et il est tentant de faire correspondre la phase A au mycélium primaire, la phase B au mycélium secondaire, et la phase agrégée au mycélium tertiaire. Cette relation est appuyée par des correspondances entre certains caractères morphologiques ou physiologiques : le système de ramification et les préséances axes-rameaux semblent identiques chez mycélium primaire et filaments A, mycélium secondaire et filaments B. TABER (1966) considère que le mycélium primaire est en contact direct avec le substrat où il puise sa nourriture alors que le mycélium secondaire se nourrit par l'intermédiaire du précédent et n'est pas en contact direct avec le substrat ; ceci est, au moins en partie, réalisé dans les mycéliums de type A et B. GAÜMANN (1928) signale qu'il existe parfois des différences physiologiques telles que le mycélium primaire reste rampant ou intramatriciel alors que le mycélium secondaire se développe au contact de l'air, au dessus du premier ; c'est là également un caractère qui s'applique partiellement aux types mycéliens A et B.

Il est cependant difficile d'aller au-delà de cette comparaison. L'étude cytologique a montré que la basidiospore est uninucléée. On peut trouver très rapidement dans le filament germinatif des articles contenant deux noyaux qui sont toujours séparés par une distance courte et constante (autour de 8 microns) ; dans les cultures plus âgées, les articles sont en général binucléés mais n'ont parfois qu'un seul ou trois noyaux (BOISSON, 1965). Des résultats antérieurs semblent indiquer, par ailleurs, que le L. lignosus est homothallique (BOISSON, loc. cit.). Il est par suite tentant de considérer les paires de noyaux observés dans les filaments comme des dicaryons. Aucun autre critère, l'absence d'anses d'anastomoses en particulier, ne permet d'en être certain. Remarquons cependant que si les hypothèses précédentes correspondent à la réalité, cela signifie que la dicaryotisation se fait très tôt, parfois dès les premiers stades de germination de la basidiospore. Il est donc peu vraisemblable qu'il y ait correspondance entre les phases A et monocaryotique d'une part, les phases B et dicaryotique d'autre part.

GARRET (1944) puis TOWNSEND (1954) rangeaient les "cordons mycéliens" du L. lignosus dans le groupe des organes agrégés à structure homogène. L'appartenance de la palmette à cette catégorie est évidente. Mais, le rhizomorphe a une structure complexe, tout à fait identique à celle décrite

à propos du Merulius lacrymans (FALCK, 1909) et du Psalliota campestris (HEIN, 1930). Il appartient donc au groupe dont l'organisation est la plus évoluée, décrit par TOWNSEND (loc. cit.).

La morphogénèse des organes agrégés du L. lignosus permet de les ranger dans la catégorie des cordons mycéliens ou strands (GARRET, 1960), caractérisés par leur formation en deux étapes, la première assurant la croissance en longueur des rhizomorphes, la seconde leur croissance en épaisseur. Il reste une inconnue en ce qui concerne l'initiation des palmettes. Elle a lieu au sein de massifs très denses de mycélium aérien dressé, ce qui rend quasi impossible les observations morphologiques. Par suite, nous ne savons pas si les faisceaux de filaments agrégés sont édifiés par le rassemblement d'un grand nombre d'axes nés indépendamment les uns des autres, ou par un axe ou un petit nombre d'axes et leurs rameaux.

Les structures agrégées n'assurent, en général, qu'un envahissement très inégal du substrat. L'orientation très stricte de la croissance, qui est à l'origine de ce phénomène, est due, non seulement au rassemblement des filaments en faisceaux, mais, également, au caractère de la ramification des filaments agrégés : les rameaux restent accolés aux axes. Cette particularité n'est pas propre au L. lignosus mais concerne, en réalité, toutes les structures agrégées du type rhizomorphe ou corémie. Son choix en tant que critère de l'agrégation pour les espèces édifiant des organes de ce type nous paraît donc tout à fait légitime. En retour, cela signifie que rechercher les mécanismes de l'agrégation revient, en partie, à rechercher le déterminisme de ce caractère.

A la suite de l'étude morphologique que nous venons d'effectuer, nous aborderons le problème de la mise en place, dans le temps et dans l'espace, des différenciations élémentaires responsables de l'apparition successive des diverses phases morphologiques. L'étude expérimentale de la formation des structures agrégées a été limitée au stade palmette. L'agrégation se manifeste alors par un groupement en faisceaux des filaments, accompagné de modifications morphologiques simples portant sur la croissance et la ramification ; elle ne met en jeu qu'un seul type d'hyphes alors que plus tard apparaissent de nouveaux types de filaments et des différenciations plus nombreuses au niveau cellulaire. C'est donc au stade palmette que l'agrégation paraît la plus accessible à l'expérimentation.

CHAPITRE II

LA MISE EN PLACE DANS LE TEMPS ET DANS L'ESPACE DES ETAPES SUCCESSIVES DU DEVELOPPEMENT

Après la description des faits morphologiques qui marquent le développement des thalles du L. lignosus, il est nécessaire de déterminer comment et dans quelles conditions les différents stades se succèdent les uns aux autres. Cette étude devrait conduire à une connaissance plus précise des phénomènes de différenciation intervenant successivement au cours du développement. Elle a été divisée en trois parties :

- A - Le passage de la phase A à la phase B.
- B - L'initiation des structures agrégées.
- C - Le développement des structures agrégées.

A - LE PASSAGE DE LA PHASE A A LA PHASE B.

Des observations effectuées jusqu'à maintenant, il ressort que la succession des deux phases A et B s'effectue toujours dans le même sens, que la première phase n'est jamais omise et qu'elle a toujours une durée finie. Est-ce que ces caractéristiques du développement restent valables quelles que soient les souches utilisées et les conditions de culture ? Autrement dit, des facteurs d'ordre interne ou externe sont-ils susceptibles de les modifier ?

1 - Influence des conditions internes et externes sur l'apparition des filaments B.

a - Les conditions internes.

L'examen du développement de nombreux thalles issus chacun d'une basidiospore unique montre que, dans la majorité des cas, la morphogénèse se déroule toujours de la même manière et qu'elle est conforme aux faits précédemment décrits. L'aspect des cultures peut varier en fonction de

l'abondance du mycélium aérien ou de la densité des filaments dans la marge en croissance mais la succession des étapes du développement reste fondamentalement la même : le premier appareil végétatif formé est toujours de type A ; l'apparition des filaments B ne se fait qu'après un délai apparemment variable selon les souches. Autrement dit, la durée de la première phase de croissance est dépendante des facteurs génétiques ; elle peut être relativement courte mais n'est jamais nulle.

En revanche, il est possible de trouver des thalles qui croissent indéfiniment dans la phase A. Ils peuvent dans de rares cas être issus de basidiospores récoltées dans la nature. Ils sont beaucoup plus fréquents quand les basidiospores sont traitées, avant germination, par un agent mutagène, l'acide nitreux. Certaines souches, D1 par exemple, donnent naissance, après des repiquages répétés, à des lignées cellulaires qui ont perdu l'aptitude à différencier des filaments B.

Nous aurions pu envisager l'utilisation de mutants pour étudier le déterminisme de la morphogénèse. Cette voie de recherche n'a pas été retenue car, en dehors du fait que les caractéristiques du développement sont certainement contrôlées par un grand nombre de gènes (délai d'apparition des filaments B en particulier), le cycle sexuel du parasite est inconnu et il est difficile d'obtenir des fructifications dans des conditions contrôlées.

b - Les conditions externes.

De nombreux facteurs de l'environnement sont susceptibles d'intervenir dans le développement des thalles du L. lignosus. L'examen systématique de leurs effets ne présente qu'un intérêt secondaire pour notre étude. Dans ce mémoire, nous nous contenterons de signaler quelques conditions qui interdisent le passage de la première à la deuxième phase du développement.

Dans le milieu synthétique utilisé pour la culture du mycélium non agrégé (p. 18) le thalle ne peut se développer dans l'état B en l'absence d'une source d'azote organique et de thiamine, ou en présence de quantités trop faibles de substances du premier type.

Des facteurs de l'environnement tels que la température et l'humidité peuvent également intervenir. Le passage de la phase A à la phase B n'est plus possible lorsque la température s'abaisse en dessous de 20° ou lorsque l'humidité relative s'éloigne de la saturation et prend une valeur voisine de 60%.

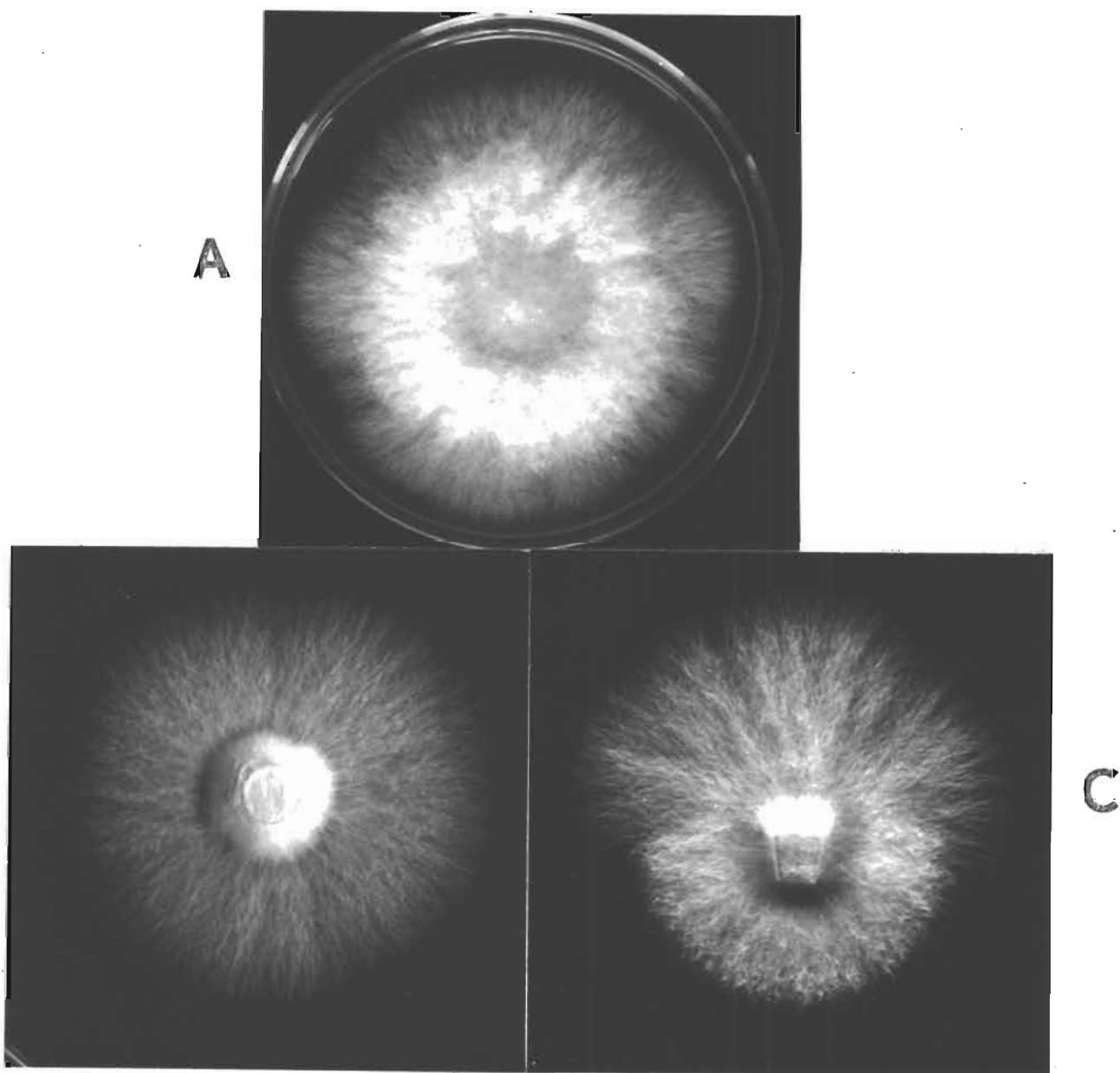


PLANCHE VII

Différents types de thalles obtenus à partir de boutures prélevées dans une culture de la phase A

- A - thalle dont le développement a lieu d'abord dans la phase A puis dans la phase B.
- B - thalle qui se développe directement dans la phase B.
- C - culture mixte, dans la phase B du côté apical de la bouture, dans la phase A du côté basal.

Ces clichés ont été réalisés avec des cultures de la souche D1.
Voir texte pour les caractéristiques des boutures dans les différents cas.

Nous n'avons pas cherché à connaître la signification de ces différents résultats. Ils sont simplement une illustration du fait que le déroulement normal de la morphogénèse des thalles du L. lignosus n'est possible que dans un environnement dont les caractéristiques ne peuvent varier au-delà de certaines limites.

En conclusion, il est possible de modifier le développement des thalles en agissant sur des facteurs internes ou externes. Dans les conditions expérimentales, l'apparition des filaments B est inéluctable mais elle se produit toujours après un délai durant lequel le thalle se développe dans la phase A.

2 - Etude du délai nécessaire à l'apparition des filaments B.

L'existence d'un délai peut indiquer que certaines différenciations internes sont soumises à ce délai, ou bien qu'il existe une modification progressive des propriétés des cellules, jusqu'à ce que la différenciation morphologique puisse se manifester. Il convient donc d'étudier en premier lieu les conditions de mise en place de ce délai.

a - Evènements intervenant au cours de la mise en place du délai nécessaire à l'apparition des filaments B.

Nous avons déjà signalé que la différenciation morphologique marquée par le passage de la phase A à la phase B est vraisemblablement précédée par des différenciations physiologiques qui se produisent au sein du mycélium de la phase A, et qui se traduisent par un allongement plus rapide des filaments A. Les évènements qui interviennent dans ce phénomène et qui jouent, de toute évidence, un rôle dans l'apparition des filaments B, peuvent être étudiés expérimentalement en déterminant les potentialités de boutures prélevées dans un thalle de la phase A. La nature des filaments régénérés doit théoriquement permettre de savoir si les cellules emportées par le semi ont reçu des informations préparant la différenciation morphologique.

Des boutures de 0,4 mm et de 5 mm de côté sont prélevées dans le front de croissance sans léser les apex ou à 1 cm en arrière de ce front, dans des cultures-mères de la phase A d'âge croissant. Les thalles régénérés sur milieu à l'extrait de malt sont observés tous les jours ; on peut déterminer de cette manière la nature des filaments qui assurent l'extension du thalle.

Souche	Taille de la bouture	Lieu de prélèvement	Age de la culture-mère en jours					
			4	5	6	7	8	9
D ₁	0,4mm de côté	quelconque						
								
	5mm de côté	dans le front de croissance						
		en arrière du front						
3204	0,4mm de côté	quelconque						
								
	5mm de côté	dans le front de croissance						
		en arrière du front						



culture fille dans la phase A (pl. VII A).



culture fille dans un état mixte, B sur la face apicale de la bouture, A sur les faces latérales et basales (pl. VII C).



culture fille dans la phase B (pl. VII D).

cases vides: le repiquage n'a pu être effectué par suite de la petite taille de la culture mère.

FIGURE 4

Caractéristiques des thalles régénérés à partir de boutures prélevées du mycélium de la phase A

Les résultats des essais effectués avec les souches D1 et 3204 sont résumés par la figure 4 ; du fait de leur similitude, nous n'examinerons en détail que ceux concernant la souche D1.

Les boutures de petite taille régénèrent constamment un thalle fils dans la phase A. Le développement de la culture est alors tout à fait semblable à celui du thalle issu de la basidiospore ; à 30°, le mycélium de type B apparaît 6 à 12 jours après l'ensemencement (pl. VII A). La nature des thalles issus de boutures de grande taille dépend du lieu de prélèvement et de l'âge de la culture mère. La régénération se fait dans la phase A lorsque des boutures massives sont prélevées dans le front de croissance sur des thalles âgés de moins de 6 jours et, en arrière du front, sur des thalles âgés de moins de 8 jours. En revanche, une bouture de grande taille, faite de cellules prélevées à 1 cm en arrière du front de croissance régénère d'emblée un mycélium de type B si elle provient d'une culture mère repiquée depuis 8 jours ou plus (pl. VII B). Les mêmes boutures prises dans le front de croissance en respectant l'intégrité des apex, sur une culture mère âgée de plus de 5 jours, régénèrent un individu mixte constitué d'emblée de filaments B du côté apical et de filaments A du côté basal (pl. VII C) ; ces cultures traduisent l'existence d'une polarité de régénération liée au sens et à l'orientation de la croissance dans le thalle mère.

En conclusion, les filaments A régénèrent toujours des filaments semblables à eux mêmes quand ils sont repiqués à partir de semis de petite taille. En revanche, les résultats concernant les thalles issus de boutures de grande taille montrent que des cellules associées en un mycélium de type morphologique A peuvent régénérer d'emblée des filaments B. Autrement dit, les cellules subissent, au cours de la première phase de croissance, une différenciation telle que, bouturées en masse, elles sont capables de régénérer directement des filaments B. Cela signifie qu'une ou plusieurs différenciations physiologiques précèdent l'expression morphologique du changement de phase.

b - Caractéristiques du délai nécessaire à l'apparition des filaments B.

La plupart du temps, les filaments B n'apparaissent pas simultanément sur toute la marge du thalle. La période correspondant à leur mise en place dure plus ou moins longtemps, mais elle est toujours limitée. Pour pouvoir comparer entre eux des thalles issus de basidiospores

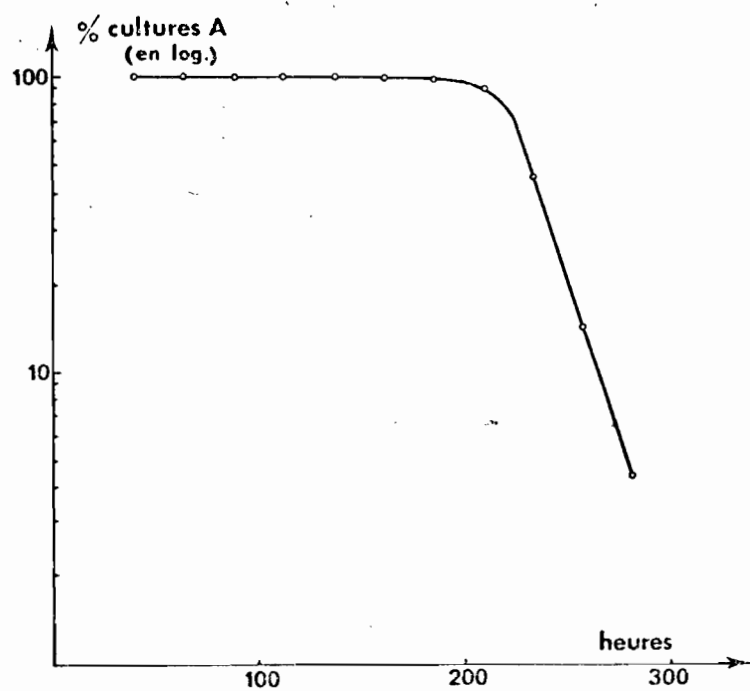


FIGURE 5

Répartition, en fonction du temps, du délai moyen nécessaire à l'apparition des filaments B dans des thalles issus chacun d'une basidiospore appartenant à une population provenant d'un même carpophore.

différentes ou de boutures mycéliennes, nous avons défini un délai moyen basé sur des mesures faites dans des conditions déterminées.

Les cultures sont réalisées sur du milieu malté, à partir de semis déposés au centre de la boîte de Pétri. Les observations sont faites sur deux diamètres perpendiculaires repérés au préalable sur le fond de la boîte. Toutes les 24 heures, on note la position du front de croissance sur chacun des quatre rayons et la nature A ou B des filaments qui assurent l'extension du thalle. Dès que les filaments B sont apparus et qu'ils arrivent au niveau des filaments A dans la marge, on considère que la culture se développe dans la phase B sur le rayon considéré. Les quatre mesures effectuées permettent de calculer pour chaque thalle le délai moyen nécessaire à l'apparition des filaments B.

Cette étude a été réalisée à partir d'une population de basidiospores isolées sur un seul carpophore (souches Q1 à Q48 de notre nomenclature). Les différences entre souches portent à la fois sur la vitesse de croissance et sur le délai nécessaire à l'apparition des filaments B. Il est théoriquement possible que ces deux caractéristiques soient liées entre elles ; on peut concevoir, par exemple, que le délai précédant l'apparition des filaments B soit long pour les souches à développement lent et réciproquement. Cette hypothèse a été soumise au test graphique des coins de TUCKEY (exposé de la méthode dans QUENCUILLE, 1964). Ce test montre qu'il n'y a pas de corrélation significative entre les deux caractères précédents au seuil 5%. Autrement dit, il existe des souches à croissance lente qui se développent dans la phase B après un délai de courte durée et réciproquement.

L'étude de la répartition des délais moyens d'apparition des filaments B dans la population a été réalisée en construisant la courbe donnant en fonction du temps, le pourcentage, exprimé en logarithmes, de cultures qui sont encore dans la phase A (fig. 5). Cette courbe présente un palier, puis, après une courte période d'inflexion, une droite de pente donnée. La distribution n'est pas significativement différente d'une distribution normale au seuil de 5%. Ceci traduit le fait que les délais moyens nécessaires à l'apparition des filaments B sont distribués au hasard, et que, par conséquent, la population est homogène en ce qui concerne ce caractère.

Lorsque les thalles correspondant à la population de basidiospores précédemment étudiée sont repiqués avec une bouture mycélienne faite de l'article apical d'un filament B, les délais moyens nécessaires à

l'apparition des filaments B dans ces thalles-fils sont semblables, pour une même souche, à ceux mesurés précédemment dans les thalles-mères issus de la basidiospore. Ces résultats indiquent que le délai moyen précédant la différenciation des filaments B est constant pour chacune des souches.

Cette conclusion a été testée à nouveau pour les souches D1, H4 et 3204. Nous savons que des boutures de petite taille prélevées dans une culture de la phase A, se développent successivement dans les phases A puis B, comme les thalles issus d'une basidiospore. On mesure alors le délai moyen nécessaire à l'apparition des filaments B dans des cultures-filles réalisées à partir d'une série de 50 petites boutures (0,4 mm de côté) prélevées dans un même thalle de la phase A. La faible dispersion des chiffres obtenus montre que toutes les boutures sont équivalentes, donc que l'on peut valablement utiliser ce mode de semis pour réaliser des cultures jumelles. D'autre part, si l'on répète ces expériences et que l'on calcule à chaque fois la moyenne des chiffres obtenus pour l'ensemble des thalles, on s'aperçoit que le délai moyen est constant pour une souche déterminée : il est de 5 jours pour la souche 3204, de 7 jours pour les souches D1 et H4.

De l'étude précédente, il ressort que le délai moyen nécessaire à l'apparition des filaments B, autrement dit, la durée moyenne de la phase A, est une caractéristique importante de la morphogénèse des thalles non agrégés. Ce délai varie au hasard parmi les souches issues d'une population de basidiospores récoltées sur un même carpophore mais reste constant pour chacune d'elles.

3 - Maintien et réversibilité des caractères B.

Lorsqu'une culture sur milieu malté a atteint le stade B de son développement, le thalle peut, théoriquement, poursuivre indéfiniment sa croissance sous cette forme. Dans les conditions naturelles, cette différenciation est perdue dans les basidiospores qui régénèrent obligatoirement un mycélium de type A. Est-ce là la seule voie possible de retour vers la forme A ou bien peut-on provoquer artificiellement une telle réversion ?

Souche	Taille de la bouture	Lieu de prélèvement	Age de la culture-mère en jours							
			2	3	4	5	6	7	8	9
D ₁	0,4 mm de côté	quelconque								
	5 mm de côté	dans le front de croissance								
		en arrière du front								
3204	0,4 mm de côté	quelconque								
	5 mm de côté	dans le front de croissance								
		en arrière du front								



culture fille dans la phase A.



culture fille dans un état mixte, B sur la face apicale de la bouture A sur les faces latérale et basale.



culture fille dans la phase E.

cases vides : le repiquage n'a pu être effectué par suite de la petite taille de la culture-mère.

FIGURE 6

Caractéristiques des thalles régénérés à partir de boutures prélevées dans le mycélium de la phase B

Pour le L. lignosus qui ne possède pas de reproduction asexuée, le seul moyen d'aborder ce problème du point de vue expérimental consiste à étudier la transmission des caractères B au cours du bouturage par fragments de mycélium. Les modalités de cette transmission sont susceptibles de varier avec la taille des boutures, le lieu de prélèvement et l'âge de la culture mère. Afin de tenir compte de ces trois facteurs, des boutures de 0,4 mm et de 5 mm de côté ont été prélevées dans le front de croissance ou à 1 cm en arrière de ce front, dans des cultures-mères de la phase B d'âge croissant. On examine, 48 heures après le semis, la nature des filaments régénérés.

Les résultats obtenus à partir des thalles des souches D1 et 3204 sont schématisés dans la figure 6.

Les boutures de petite taille régénèrent des cultures dont la morphologie est caractéristique de la phase A, quel que soit l'âge de la culture-mère dont elles proviennent. Les cellules appartenant aux filaments B emportés par le semis sont donc incapables de transmettre leurs caractères B aux files de cellules qu'elles régénèrent.

En revanche, les boutures de grande taille régénèrent directement des thalles de type B si elles sont constituées de cellules situées en arrière du front de croissance sur un thalle de la phase B mis en culture depuis 5 jours ou plus. Les mêmes boutures, découpées dans le front de croissance, quel que soit l'âge de la culture-mère dans les limites de l'expérience, ou à 1 cm en arrière de ce front sur une culture-mère âgée de moins de 5 jours, régénèrent des individus mixtes identiques à ceux décrits précédemment : de type B du côté apical, ils sont de type A du côté basal ; ils traduisent l'existence d'une polarité de régénération.

La transmission des caractères des filaments B n'est donc assurée que si le bouturage est fait à partir d'une masse mycélienne importante. On assiste à un retour vers la phase A quand les boutures sont suffisamment petites ; la morphogénèse se déroule alors de la même manière que pour les thalles issus d'une basidiospore.

4 - Conclusions.

L'étude chronologique du développement apporte des informations supplémentaires aux faits purement descriptifs.

L'examen de nombreuses cultures montre que le mycélium construit à partir de la basidiospore est toujours de type A. La phase B du développement n'est atteinte qu'à la suite d'un délai moyen qui est constant pour une souche déterminée, mais, en général, différent entre souches.

Au cours de la phase A, il se produit une ou plusieurs différenciations qui ne se manifestent pas immédiatement dans la morphologie des thalles mais permettent aux cellules de régénérer directement du mycélium de type B lorsqu'elles sont bouturées en masse.

Dans nos conditions expérimentales, le passage à la phase B est inéluctable et le maintien de cet état est assuré indéfiniment si la propagation est effectuée avec des boutures de grande taille. En revanche, le mycélium se développe de nouveau dans l'état A si le bouturage est effectué à partir de semis suffisamment petits. Ces résultats sont conformes à une idée très générale selon laquelle l'état différencié n'est transmis par bouturage que si la masse de cellules différenciées repiquées est suffisamment grande.

Remarquons que les modalités de transmission des caractères mycéliens au cours du bouturage peuvent être utilisées de manière pratique pour obtenir à volonté des thalles qui se développent successivement dans les phases A puis B, ou qui régénèrent directement des filaments B. Cette possibilité a été constamment exploitée dans la suite de notre travail.

B - L'INITIATION DES STRUCTURES AGREGÉES.

Dans les conditions naturelles, le L. lignosus passe du stade non agrégé au stade agrégé quand il se développe dans le sol sous forme de palmette puis de rhizomorphe à partir d'une masse ligneuse exploitée de manière saprophytique. En culture in vitro, le passage a lieu dans le même sens quand le thalle est transporté du milieu malté sur un substrat autorisant l'agrégation. Les observations effectuées sur le développement du mycélium non agrégé permettent de poser deux questions relatives à ce passage. Les structures agrégées peuvent-elles naître à partir de n'importe quel stade du développement ? La masse, la nature et l'âge du mycélium non agrégé jouent-ils un rôle dans la morphogénèse des structures agrégées auxquelles il donne naissance ?

1 - Le mycélium agrégé peut-il se différencier à n'importe quel stade du développement ?

Puisqu'il existe deux étapes du développement au sein du mycélium non agrégé, on peut se demander non seulement si les phases non agrégées peuvent être omises, mais, plus précisément, si les structures agrégées peuvent apparaître directement à partir du mycélium de la phase A.

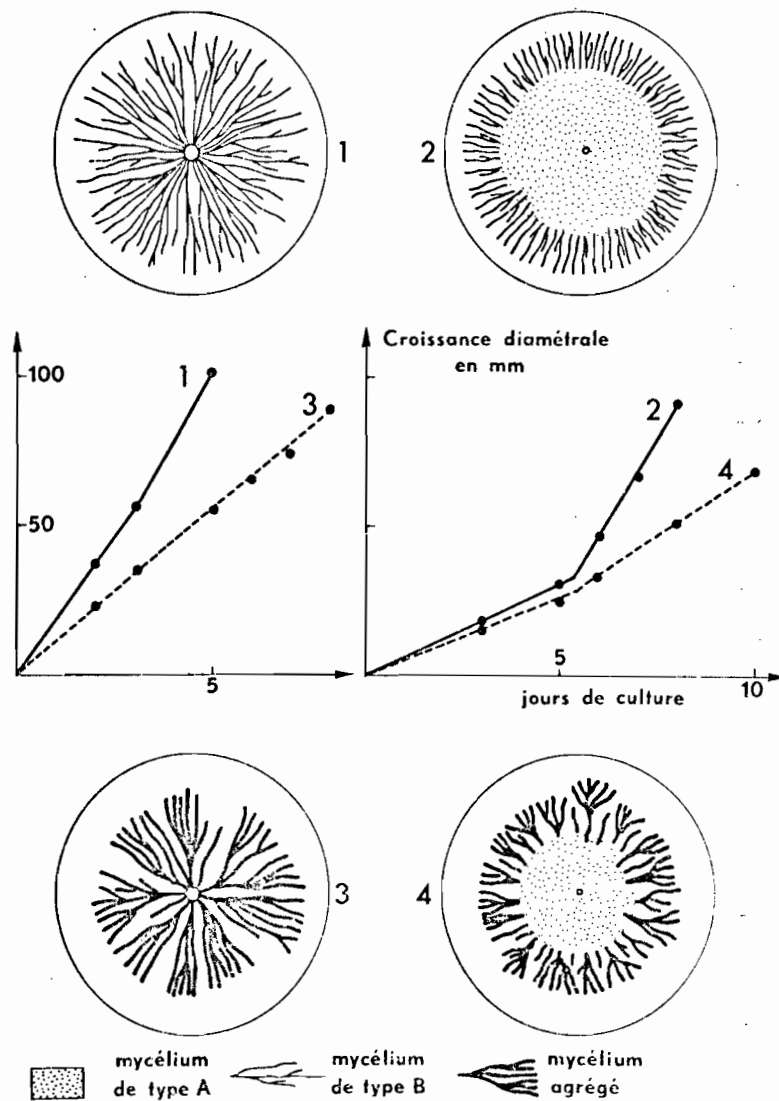


FIGURE 7

Aspect morphologique et croissance radiale de thalles issus de boutures de tailles différentes, obtenus sur deux milieux dont l'un permet l'agrégation.

1. Bouture de grande taille sur milieu malté ; 2. Bouture de petite taille sur milieu malté ; 3. Bouture de grande taille sur milieu MS1 ; 4. Bouture de petite taille sur milieu MS1.

Les études précédentes montrent qu'il est techniquement facile d'obtenir des thalles dont le développement se poursuit indéfiniment dans la phase A ou dans la phase B ou des thalles qui passent, comme ceux provenant de basidiospores, successivement par les stades A puis B, soit en utilisant des boutures, soit en utilisant des lignées mutantes. Ces thalles ont été cultivés simultanément sur des milieux conduisant selon les cas à la formation de filaments libres ou de structures agrégées. Ces techniques ont permis d'analyser in vitro les relations entre les éléments agrégés et non agrégés de l'appareil végétatif.

Certaines souches du L. lignosus ne conduisent jamais à des structures agrégées ou le font rarement et, dans ce cas, toujours au bout de délais très longs, même lorsqu'elles sont placées dans des conditions convenables pour les autres souches (cultures sur bûchettes d'Hévéea déposées sur du sable humide). Or, nous constatons par ailleurs que ces mêmes souches sont incapables d'édifier un mycélium de type B à partir du mycélium de type A premier formé.

Lorsque des boutures de 35 mm de diamètre sont prélevées avec la gélose sous-jacente et déposées sur des lames de verre, les thalles sont fait d'abord de filaments rayonnants lâchement agrégés en palmettes, puis de cordonnets, si toutefois l'humidité de l'air environnant reste proche de la saturation. Lorsque cette condition n'est pas réalisée, le mycélium prend un aspect duveteux et demeure indéfiniment non agrégé. Les caractéristiques morphologiques et biométriques de leurs hyphes rapprochent ces deux catégories de thalles respectivement des formes non agrégées B et A. Or, rappelons que, sur les substrats gélosés, le passage de la phase A à la phase B n'est possible que si l'air ambiant est saturé en eau. Cet effet de l'humidité tend à indiquer, comme les différences entre souches signalées plus haut, que les conditions nécessaires pour le passage de la phase A à la phase B sont également nécessaires pour l'agrégation.

La relation entre les diverses formes adoptées par l'appareil végétatif apparaît plus clairement encore si on compare la morphologie des mycéliums des phases A et B cultivés sur des milieux autorisant ou non l'agrégation. On réalise des cultures jumelles à l'aide de couples de semis identiques déposés l'un sur un substrat permettant l'agrégation (milieu MS1 à pH 4,2 contenant 1 g/l d'asparagine), l'autre sur un milieu malté où les caractères A ou B s'affirment clairement. On constate alors pour chaque

couple de semis de grande taille que l'un régénère un mycélium d'emblée de type B tandis que l'autre s'agrège immédiatement (fig. 7). En revanche, il faut attendre un délai pour obtenir l'agrégation des filaments lorsque les cultures proviennent de petites boutures (fig. 7) ; l'étude des courbes de croissance radiale et l'examen morphologique des cultures montrent que ce délai correspond à celui qui est nécessaire à la formation des filaments B. Les changements de pente observés simultanément dans les courbes de croissance 2 et 4 (fig. 7) correspondent en effet au début de l'apparition des filaments B dans les cultures sur milieu malté (courbe 2), à l'initiation des palmettes sur le milieu autorisant l'agrégation (courbe 4).

Ces différentes expériences mettent en évidence l'incapacité du mycélium de la phase A à s'agrèger.

Autrement dit, dans un thalle obtenu à partir d'une basidiospore, l'agrégation ne peut avoir lieu qu'à la suite d'une première différenciation apparue au sein du mycélium non agrégé. Mais il n'est pas nécessaire que cette différenciation soit exprimée morphologiquement. En effet, les thalles issus de boutures de petite taille cultivés sur un milieu autorisant l'agrégation se développent sous forme agrégée, directement à partir du thalle de la phase A, dès que celui-ci a atteint potentiellement l'état B.

2 - L'agrégation est-elle préparée au sein du mycélium non agrégé ?

Les conclusions précédentes peuvent être exprimées sous une autre forme. La formation des palmettes a toujours lieu à partir de mycélium non agrégé, soit sous forme A quand les boutures sont de petite taille, soit sous forme B quand elles sont de grande taille. Il existe, de toute évidence, des relations entre mycélium libre et mycélium agrégé. On peut alors se demander si la nature, la masse et l'âge des cellules constituant le thalle non agrégé jouent un rôle dans la morphogénèse des structures agrégées qu'il régénère.

L'étude de ce phénomène a été réalisée à partir de thalles dont la première partie du développement s'effectue sur une membrane de cellophane déposée à la surface d'un milieu malté. Toutes les 24 heures, une partie des cultures est transférée sur un milieu permettant l'agrégation (milieu MS1 sans asparagine à pH voisin de 4,2), avec la cellophane sous-jacente, celle-ci

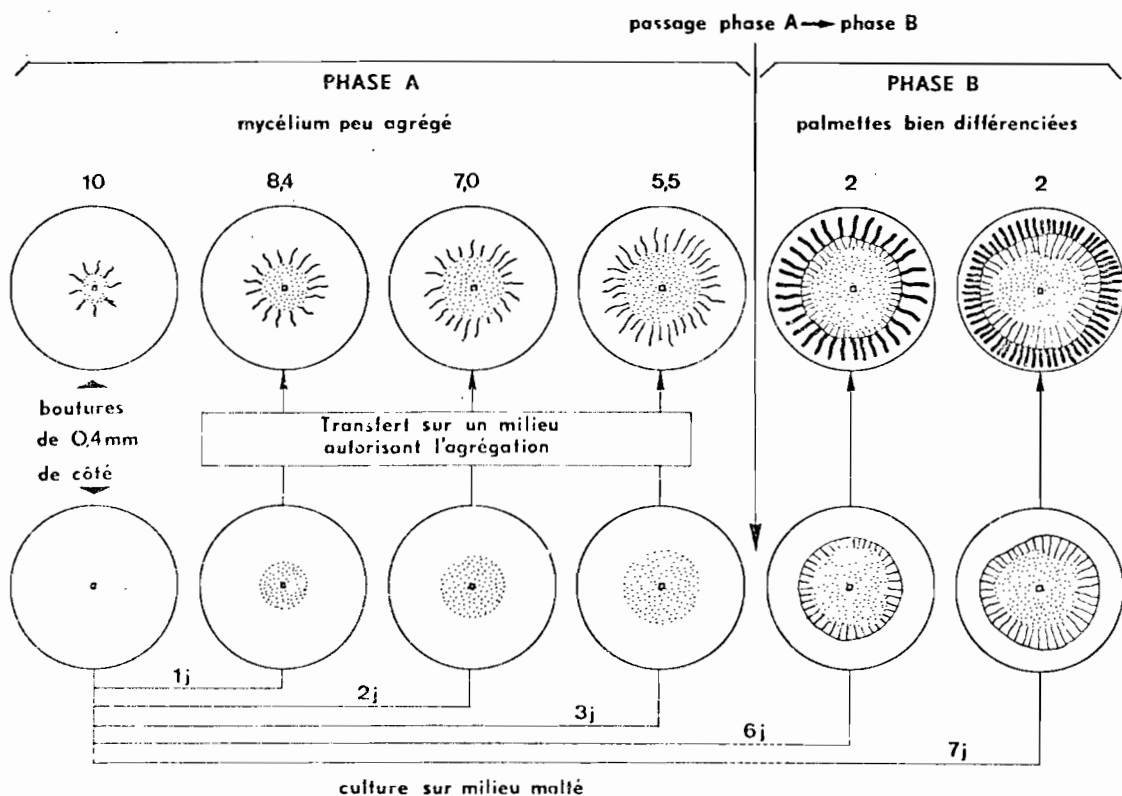


FIGURE 8

Schéma des expériences permettant d'étudier l'influence de la nature et de l'âge du mycélium non agrégé sur la formation des structures agrégées.

Les chiffres figurés au-dessus des cultures transférées représentent le délai, en jours, nécessaire à l'apparition des structures agrégées après le transfert sur milieu MS1.

étant découpée à 1 ou 2 mm en avant du front de croissance (fig. 8). Des boutures semblables à celles donnant naissance aux cultures-mères sont également repiquées directement sur le milieu MS1. On observe le nombre de palmettes formées et le délai nécessaire à leur apparition à partir de thalles des phases A et B qui se sont développés sous forme non agrégée pendant 0, 1, 2, 3, n jours.

a - Cas des thalles qui se développent successivement dans les phases A puis B.

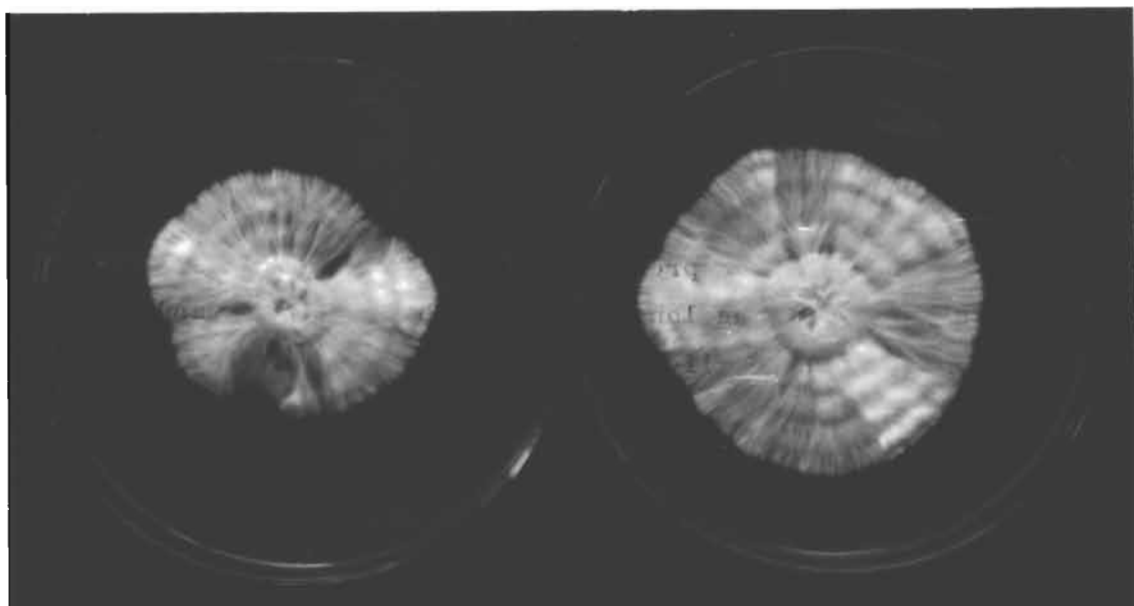
Les thalles se développent à partir de petites boutures de la souche H4 (0,4 mm de côté), d'abord dans la phase A puis, après un délai moyen de 6 à 7 jours, dans la phase B. Les caractéristiques des thalles agrégés obtenus par transfert de cultures non agrégées d'âges variés sur milieu MS1 permettent de tirer les conclusions suivantes.

Parmi les semis ensemencés directement sur le milieu MS1 beaucoup ne régénèrent pas. En revanche, si la régénération a eu lieu sur le milieu malté, même durant un temps assez court, la croissance sur le milieu MS1 se poursuit plus facilement.

Pour les thalles âgés de 4 à 5 jours au moment du transfert, le temps nécessaire à l'initiation des palmettes, mesuré à partir du transfert (fig. 8) diminue régulièrement quand l'âge de la culture augmente. L'agrégation ne pouvant se produire que lorsque le thalle a atteint le stade B, le délai précédant la mise en place du mycélium agrégé doit tenir compte du délai nécessaire au thalle pour atteindre l'état B. A partir du moment où le mycélium est potentiellement capable de se différencier sous la forme agrégée, il faut un délai de 3 à 4 jours pour que des palmettes soient initiées. D'autre part, à partir des thalles les plus jeunes, les palmettes sont toujours assez mal individualisées et le mycélium peu agrégé (pl. VIII A).

En revanche, dans les thalles plus âgés (5 jours ou plus au moment du transfert), les palmettes apparaissent au bout d'un délai plus court (2 jours en moyenne) et sont bien différenciées (pl. VIII B). En outre, ce délai ne varie plus quel que soit l'âge du thalle, dans les limites de l'expérience. Ces changements dans les conditions d'apparition des structures agrégées correspondent dans le temps au stade de différenciation des filaments B.

A



B

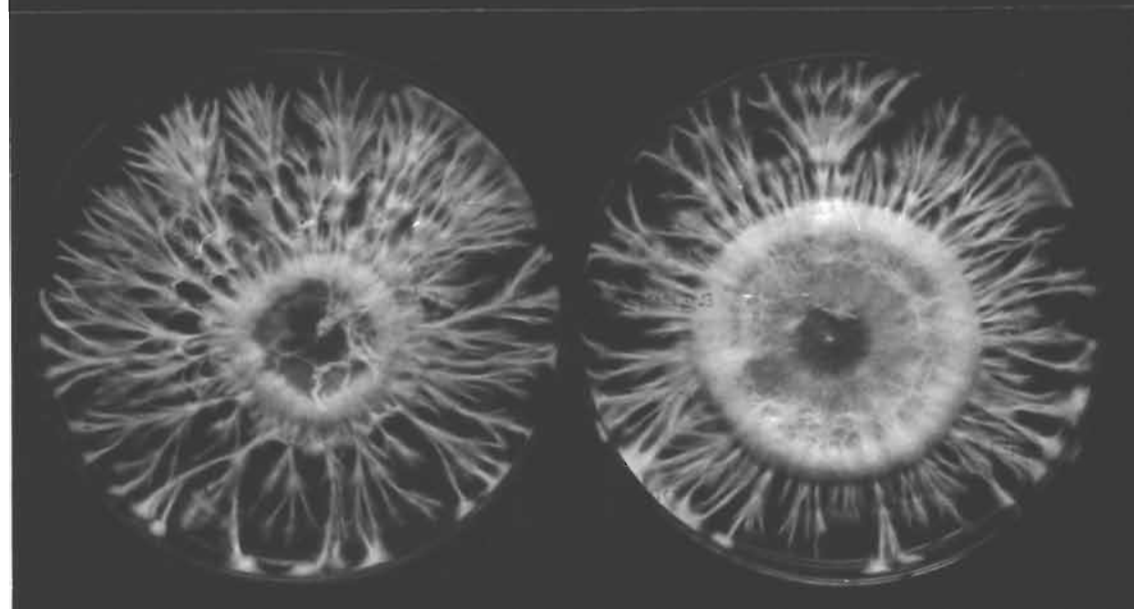


PLANCHE VIII

Influence de la nature, de l'âge et de la masse du mycélium non agrégé à partir duquel sont formées les structures agrégées

- A - palmettes peu agrégées, formées à partir d'un thalle de la phase A transféré sur milieu MS1 à l'âge de 2 ou 3 jours (cliché pris 12 j et 11 j après le transfert).
- B - palmettes bien différenciées régénérées à partir d'un thalle issu de petites boutures transféré sur milieu MS1 à l'âge de 5 ou 6 jours (cliché pris 9 j et 8 j après le transfert).

Le nombre de palmettes formées par thalle augmente avec l'âge de celui-ci. Rapporté à la circonférence du thalle, il augmente également, ce qui veut dire que les palmettes sont de plus en plus rapprochées les unes des autres. Rapporté à la surface du thalle, il diminue.

b - Cas des thalles qui se développent directement dans la phase B.

De même que précédemment, l'initiation des structures agrégées demande un délai plus long et échoue fréquemment quand le semis est déposé directement sur le milieu MS1.

Quand la bouture a régénéré sur le milieu malté, ne serait-ce que 24 heures, les palmettes apparaissent beaucoup plus rapidement et le délai nécessaire à leur différenciation ne varie pratiquement pas quand l'âge du thalle transféré croît (2 à 3 jours). Le nombre de palmettes augmente régulièrement quand l'âge et le diamètre du thalle non agrégé augmentent également. Rapporté à l'unité de surface, ce nombre de palmettes reste constant pour les cultures âgées de moins de 4 jours et diminue par la suite.

Les expériences précédentes montrent tout d'abord que des boutures placées directement dans des conditions permettant l'agrégation régénèrent rarement du mycélium agrégé, même si elles sont de grande taille. Cela signifie que la régénération de nouveaux filaments à partir du semis est difficile sur un substrat qui n'est pas favorable à la croissance du mycélium libre.

L'initiation des palmettes est plus facile quand des thalles entiers sont transférés sur un substrat autorisant l'agrégation. Les palmettes se forment plus rapidement et en plus grande abondance lorsqu'elles se différencient à partir d'une masse importante de cellules appartenant à la phase non agrégée et lorsque ces cellules sont dans l'état B. Non seulement le mycélium de la première phase est incapable de s'agréger, mais, comparé à celui de la phase B, il n'apporte que très peu d'informations aux filaments régénérés sur un milieu qui autorise l'agrégation : les structures agrégées auxquelles ils donnent naissance sont peu différenciées (pl. VIII) et apparaissent après des délais très longs. Dans les mêmes conditions, un thalle non agrégé fait de filaments B est capable de régénérer rapidement un grand nombre de palmettes bien différenciées ; cette action n'est pas due seulement à l'accroissement, avec celui du diamètre du thalle, du nombre de filaments du front de croissance susceptibles de s'agréger mais également à

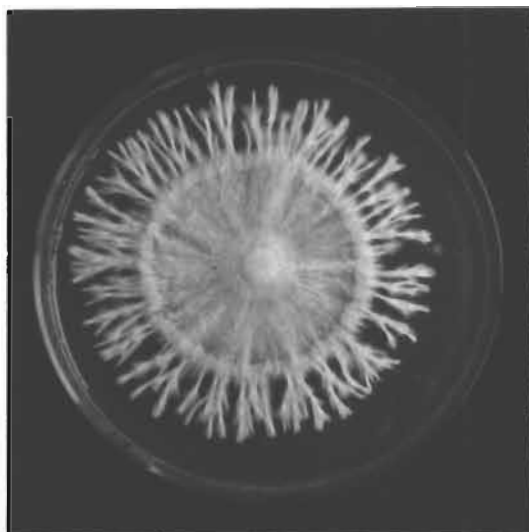
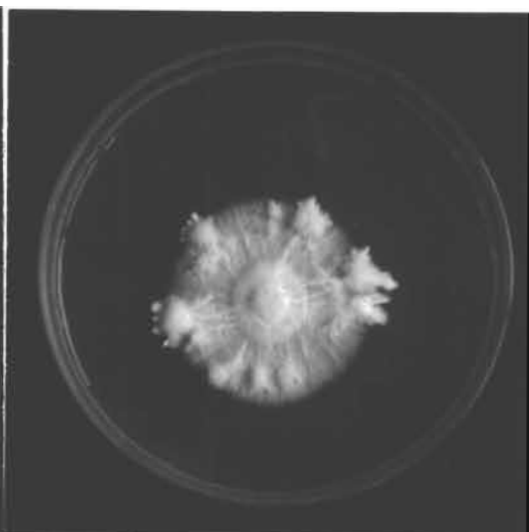
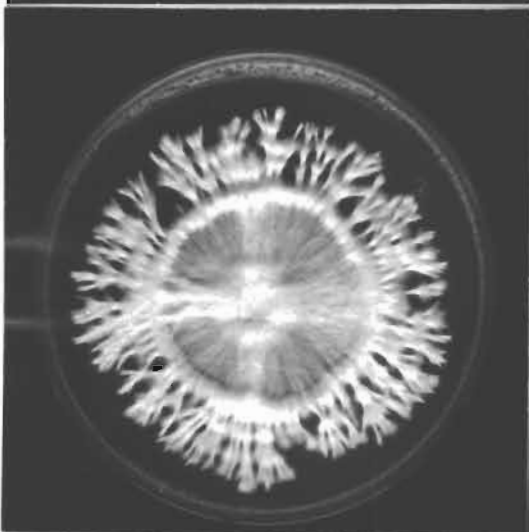
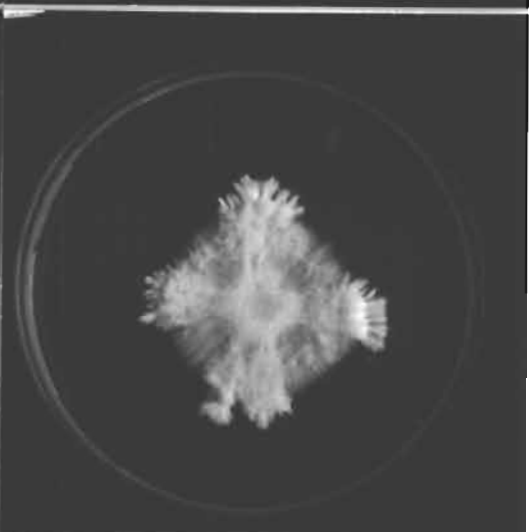
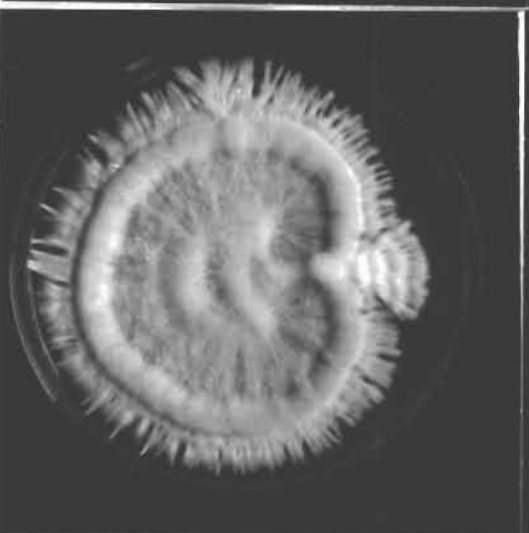
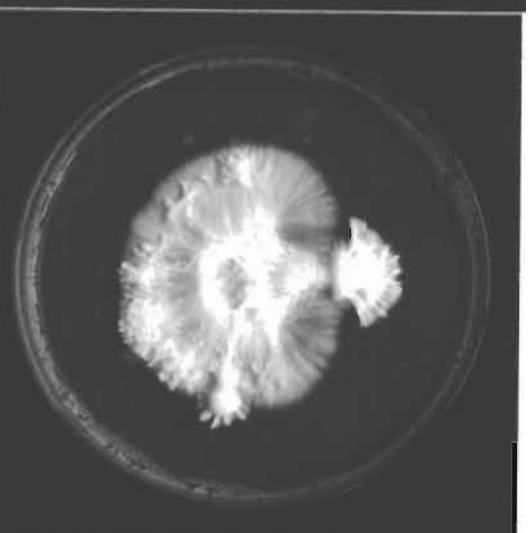
A**B****C****D****E****F**

PLANCHE IX

Les variations de la localisation des palmettes à la périphérie d'un thal non agrégé

A et B - thalle non agrégé issu de boutures circulaires.

C et D - thalle non agrégé issu de boutures carrées.

E et F - thalle obtenu à partir de boutures en forme de croissant.

A, C et E - milieu MS1 de pH 4,4

B, D et F - milieu MS1 de pH 3,3

Toutes les cultures sont âgées de 1j (1j après le transfert sur le milieu

l'accroissement du nombre de cellules constituant le thalle. En effet, le nombre de palmettes initiées par un thalle de la phase B est proportionnel à sa surface, au moins pour les cultures âgées de moins de 4 jours.

En conclusion, il apparaît que, non seulement les filaments B sont les seuls capables de conduire à la phase agrégée, mais qu'ils sont le siège d'une différenciation interne qui prépare l'agrégation.

3 - Formation des structures agrégées : localisation et répartition.

La comparaison in vitro des cultures de mycélium non agrégé et agrégé montre que, dans le premier cas, le milieu est entièrement envahi et de manière uniforme alors que dans le second, le substrat n'est pas occupé sur toute sa surface ; il reste toujours du milieu libre entre les palmettes et entre leurs rameaux. Cette localisation des structures agrégées pose donc un problème géométrique de répartition dans l'espace.

Nous l'avons abordé expérimentalement en transférant des thalles non agrégés de la phase B sur des substrats autorisant l'agrégation. Des boutures circulaires de 8 mm de diamètre de la souche H4 sont ensemencées sur des membranes de cellophane déposées à la surface d'un milieu malté. Les thalles fils se développent dans la phase B. A l'âge de 3 jours, ils sont transférés avec la cellophane sous-jacente sur des substrats MS1 à pH 3,8 et 4,3, contenant tous deux 1 g/l d'asparagine.

Sur le substrat le moins acide, les palmettes apparaissent dans un délai de 3 jours à partir d'une couronne continue de mycélium aérien dressé qui s'est différenciée dans la zone apicale après le transfert (pl. IX A) ; elles semblent réparties de manière uniforme à la périphérie du thalle non agrégé. Sur le substrat MS1 le plus acide, le transfert du thalle est suivi d'un arrêt apparemment total de la croissance. Les filaments B plongent dans le milieu et donnent naissance à des filaments intramatriciels intensément ramifiés à elongation très lente. Dans la plupart des cas, il apparaît plus ou moins rapidement à la surface du thalle non agrégé et en arrière de la marge, des plages d'étendue variable recouvertes de mycélium aérien dressé (pl. IX B). Ces zones peuvent envahir les régions voisines et parfois même la totalité du thalle non agrégé ; elles restent plus souvent localisées et bien individualisées. En général, elles donnent naissance à un groupe de palmettes très rapprochées les unes des autres. Comme il ne se forme jamais

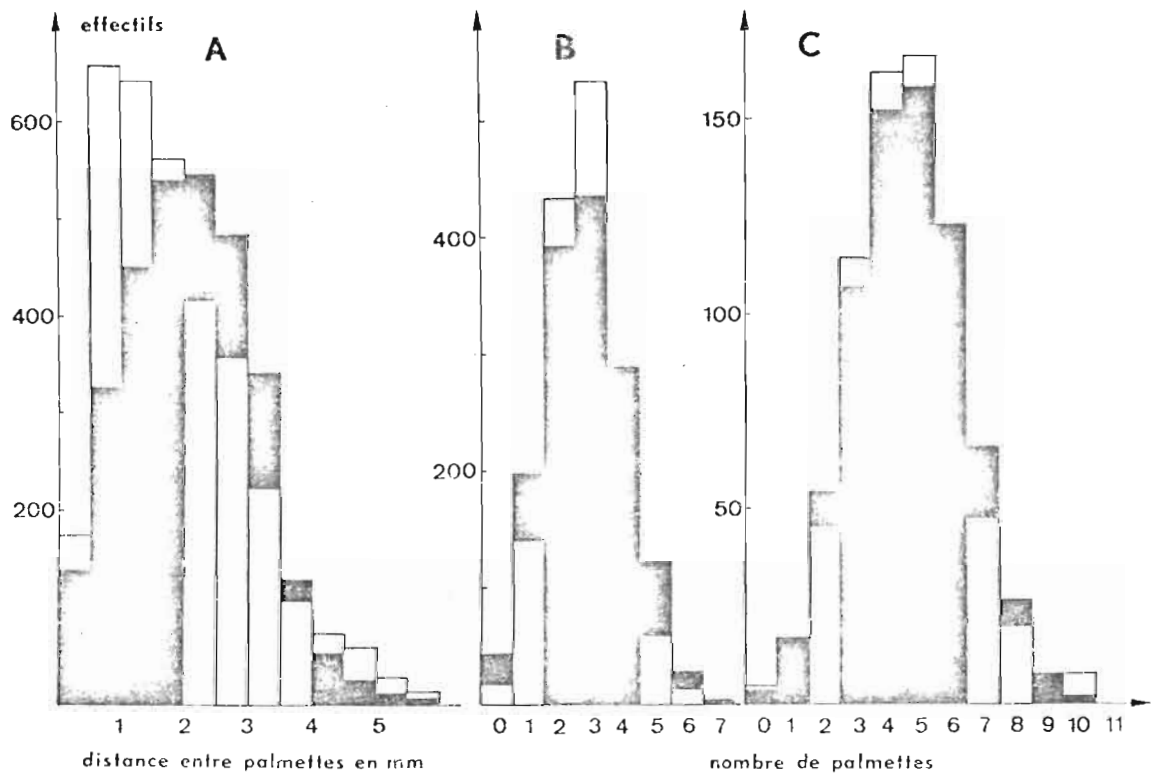


FIGURE 9

Etude de la répartition des structures agrégées à la périphérie d'un thal non agrégé

A - courbes de distribution des distances entre palmettes.

B - secteurs de $2\pi/16$ portant 0, 1, 2, 7 palmettes.

C - secteurs de $2\pi/8$ portant 0, 1, 2, 11 palmettes.

En noir, effectifs théoriques ; en blanc, effectifs observés.

de structures agrégées en dehors de ces zones de mycélium aérien dressé denses, celles-ci peuvent être considérées comme les centres de formation des palmettes. Le groupement des structures agrégées formées à partir de massifs discontinus apparaît de manière évidente. Est-ce que des phénomènes semblable interviennent lorsque les palmettes se forment à partir d'un anneau de mycélium aérien dressé apparemment continu ?

Pour le savoir, nous avons étudié la répartition des palmettes à la périphérie du thalle en mesurant les distances qui séparent deux palmettes voisines et en construisant la courbe de distribution des distances entre palmettes (fig. 9 A). La comparaison statistique avec la courbe théorique (loi normale) montre que les palmettes ne sont pas distribuées au hasard à la périphérie du thalle ; le nombre de palmettes très proches les unes des autres est beaucoup plus grand que celui qui correspondrait à une répartition au hasard. Cet excès est compensé par un déficit des palmettes situées à une distance moyenne l'une de l'autre. Il apparaît enfin un excès pour les palmettes séparées par de grandes distances.

Dans une étude du même type, les résultats ont été interprétés en comptant le nombre de palmettes régénérées dans des secteurs de $2\pi/16$ ou de $2\pi/8$ d'angle au sommet. Pour chaque secteur, on calcule les fréquences de ceux portant 0, 1, 2, n palmettes et on en construit la courbe de distribution (fig. 9 B et C). En comparant statistiquement ces deux distributions observées avec les effectifs théoriques donnés par la loi binomiale, on arrive à la conclusion que la répartition des structures agrégées se fait au hasard pour les secteurs de $2\pi/8$. Pour ceux de $2\pi/16$, la distribution observée est significativement différente de la loi théorique. La figure 9 B montre que ces différences proviennent essentiellement d'un excès des secteurs contenant un nombre moyen de palmettes (de 2 à 4). Ces résultats sont conformes au fait que les palmettes ne naissent pas au hasard à la périphérie d'un thalle non agrégé ; elles ont tendance à être groupées par 2 ou 3 et ces groupes sont eux-mêmes distribués au hasard.

Cette analyse montre en définitive que la notion de centres de formation des palmettes doit être conservée même quand les structures agrégées sont formées à partir d'une couronne continue de mycélium aérien dressé. Celle-ci est formée de centres de formation très rapprochés les uns des autres situés tous dans la zone sub-apicale et donnant naissance en moyenne à 2 à 3 palmettes très proches les unes des autres.

Deux hypothèses peuvent rendre compte de la localisation des centres formateurs des palmettes : ou bien ils correspondent à des groupes de cellules qui seules sont capables de donner naissance à du mycélium agrégé, ou bien toutes les cellules d'un thalle possèdent cette potentialité mais, en raison des corrélations qui s'exercent entre elles, seules certaines l'expriment. La comparaison de la localisation des centres de formation des palmettes en fonction du pH du substrat (pl. IX A et B) est favorable à cette dernière hypothèse.

Des résultats plus précis ont été obtenus quand les expériences précédentes sont réalisées avec des thalles de la phase B issus de boutures carrées ou en forme de croissant découpées dans des cultures sur cellophane. Après transfert sur le milieu MS1 de pH 3,8, les palmettes qui se développent à partir des thalles issus de boutures carrées, sont toujours localisées dans les zones situées en face des quatre côtés du semis, conduisant à une disposition en croix très caractéristique (pl. IX D). Lorsque la culture non agrégée provient d'une bouture en forme de croissant, il apparaît, dans les mêmes conditions de substrat, un groupe de palmettes en général très épaisses, sur la partie du thalle correspondant à la face concave de la bouture, à peu près sur l'axe de symétrie de celle-ci (pl. IX F).

Ces derniers résultats montrent que des facteurs internes interviennent dans la localisation des centres de formation. Leur action n'est cependant pas totalement indépendante de celles des facteurs du milieu. Si, en effet, les transferts sont réalisés sur le substrat MS1 de pH 4,3, les palmettes apparaissent en n'importe quel point de la périphérie du thalle, en plus des zones privilégiées décrites précédemment (pl. IC, C et E). En général, les palmettes qui partent de ces régions sont plus serrées, plus nombreuses et apparaissent un peu plus rapidement que celles qui se différencient ailleurs sur la marge de la culture.

L'ensemble des expériences précédentes tend à prouver que la localisation des centres de formation des palmettes n'est pas la traduction d'une différenciation, au sein du thalle non agrégé, de groupes de cellules seules capables de donner naissance aux palmettes. Elle résulte, au contraire, de corrélations qui se manifestent ou s'établissent après le transfert entre les filaments présents à la périphérie du thalle.

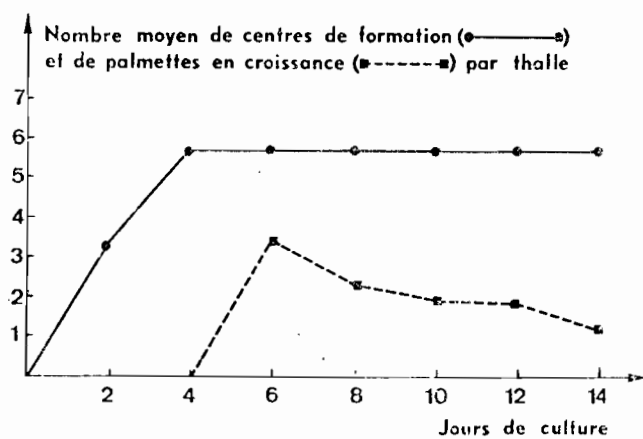


FIGURE 10

Mécanismes de régulation intervenant au niveau des centres de formation de palmettes et des palmettes en croissance dans des thalles agrégés de la souche M4

4 - Conclusions.

L'étude du passage de la phase non agrégée à la phase agrégée conduit aux conclusions suivantes :

a - L'initiation des palmettes n'est possible que lorsque le thalle non agrégé a atteint, potentiellement, le stade B de son développement. Mais il n'est pas nécessaire que l'état B soit exprimé morphologiquement.

b - Le mycélium de la phase B est le siège de différenciations internes qui préparent l'agrégation.

c - Les palmettes apparaissent groupées par 2 ou 3, à partir de centres de formation qui sont répartis au hasard à la périphérie d'un thalle non agrégé de la phase B régénéré à partir d'une bouture de forme circulaire. Cette répartition au hasard peut être perturbée quand le mycélium non agrégé est issu de boutures dont la forme (carrée ou en croissant) introduit une hétérogénéité dans la régénération des filaments B.

C - LE DEVELOPPEMENT DES STRUCTURES AGREGÉES ET LES POSSIBILITES DE REVERSION VERS LES FORMES NON AGREGÉES.

Une fois initiées, les palmettes vont croître et se ramifier à la surface des substrats. Dans certaines conditions, elles peuvent perdre leur état agrégé. Nous étudierons donc le développement des structures agrégées et les possibilités de réversion vers les formes libres.

1 - Croissance et ramification des palmettes.

Les caractéristiques du développement des structures agrégées ont été étudiées dans des conditions telles que le petit nombre de palmettes régénérées permet de suivre facilement leur croissance et leur ramification.

Des boutures de 7 mm de côté faites de filaments B de la souche H4 sont ensemencées sur un substrat MS2 contenant 20 g/l de glucose et 0,01 g/l d'asparagine. Les centres de formation des palmettes apparaissent sous forme de touffes de mycélium aérien dressé qu'il est facile de repérer sur le fond de la boîte de Pétri. On suit de la même manière les palmettes en croissance active en fonction du temps. Les résultats, portés dans les courbes de la figure 10, montrent que les centres de formation apparaissent uniquement durant les quatre premiers jours de culture. Un certain nombre seulement parmi eux donnent naissance à des palmettes qui poursuivent leur croissance ou cessent de croître lorsque la culture vieillit.

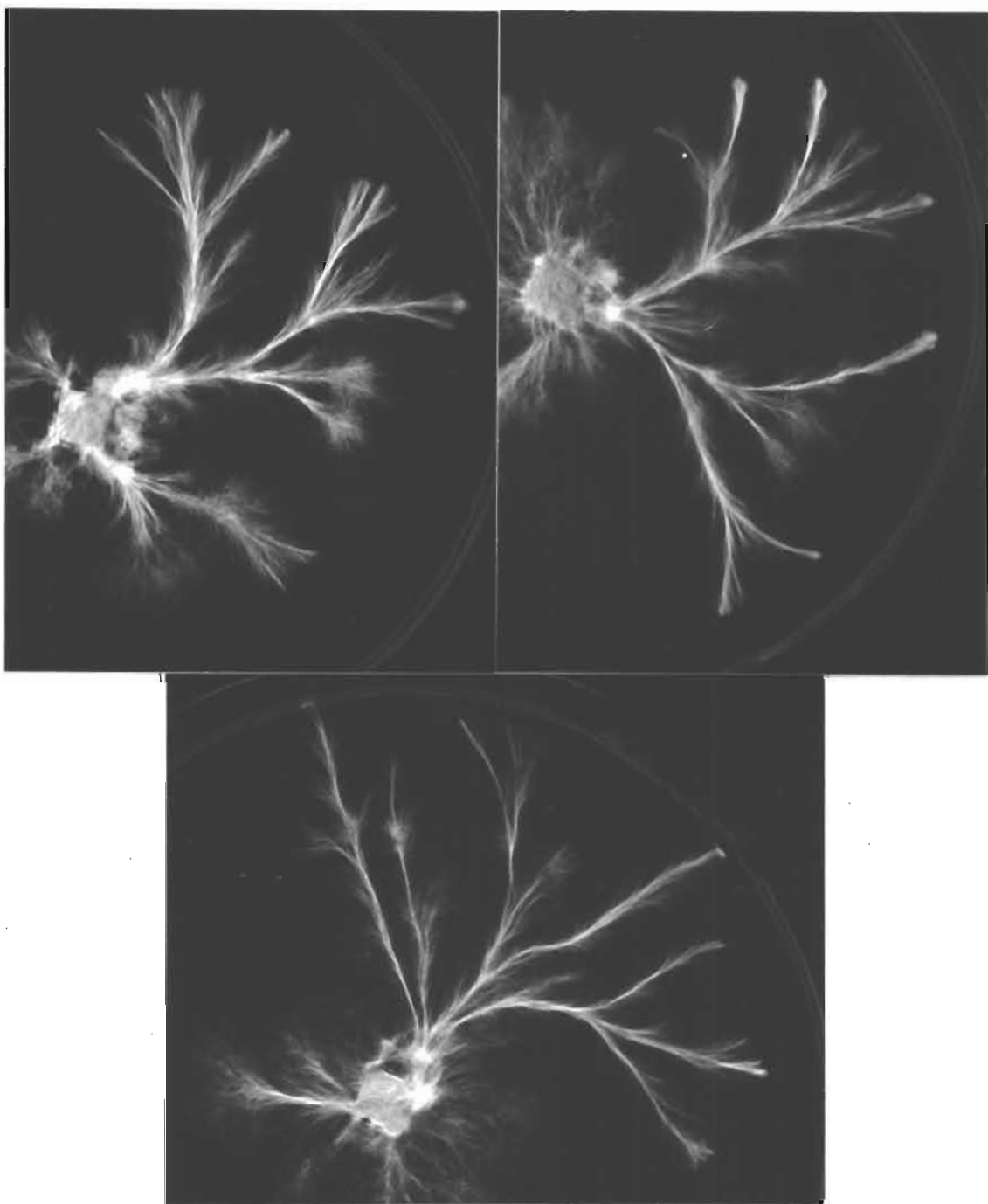


PLANCHE X

La croissance et la ramification des palmettes

De ces observations, il ressort que le développement du thalle agrégé est soumis à des phénomènes de régulation qui interviennent en limitant le nombre de centres de formation, le nombre de ceux qui sont actifs et le nombre de palmettes qui poursuivent leur croissance.

La ramification de la palmette est le résultat de la séparation dans la zone apicale de faisceaux de filaments qui poursuivent leur croissance sous forme agrégée en se séparant les uns des autres. Tous les rameaux ainsi formés ne poursuivent pas leur croissance ; certains se développent sous forme non agrégée d'abord en surface puis en profondeur dans le substrat ; ils cessent très vite de croître (pl. X). Il existe donc, là encore, un mécanisme de régulation limitant le nombre de rameaux qui poursuivent leur développement.

Une étude précise de la croissance et de la ramification des palmettes a été faite dans des cultures où ces organes, du fait de leur petit nombre et de la grande étendue de substrat dont ils disposent, peuvent se développer longtemps sans se gêner mutuellement ni être ralentis par les bords du récipient de culture. Des boutures de 1 cm de côté faites de mycélium B de la souche H4 sont ensemencées dans des fioles de Roux de 1 l contenant 100 ml d'un milieu MS2 complété avec 0,1 g/l d'asparagine.

On mesure tous les jours la croissance des palmettes et le nombre de rameaux actifs qu'elles portent. Les courbes donnant les variations de ces deux caractéristiques en fonction du temps peuvent être construites pour chaque palmette. La planche XI reproduit les résultats les plus typiques obtenus parmi les 55 palmettes observées.

Dans tous les cas, la croissance est linéaire ; sa vitesse est de l'ordre de 5 mm par jour.

Quand la palmette n'est pas gênée dans son extension, le nombre de rameaux en croissance varie selon une courbe exponentielle ; ceci confirme les faits d'observation directe sur le mode de ramification. En effet, chaque rameau peut se diviser après une certaine élongation en n rameaux fils et le nombre total de rameaux suit ainsi une progression géométrique qui se traduit graphiquement par une exponentielle. Ceci n'est valable, bien entendu, que lorsque tous les rameaux poursuivent leur croissance, ce qui est souvent réalisé dans les jeunes palmettes (pl. XI, A et B) ; mais, plus ou moins rapidement selon les thalles, des rameaux cessent de s'allonger alors que

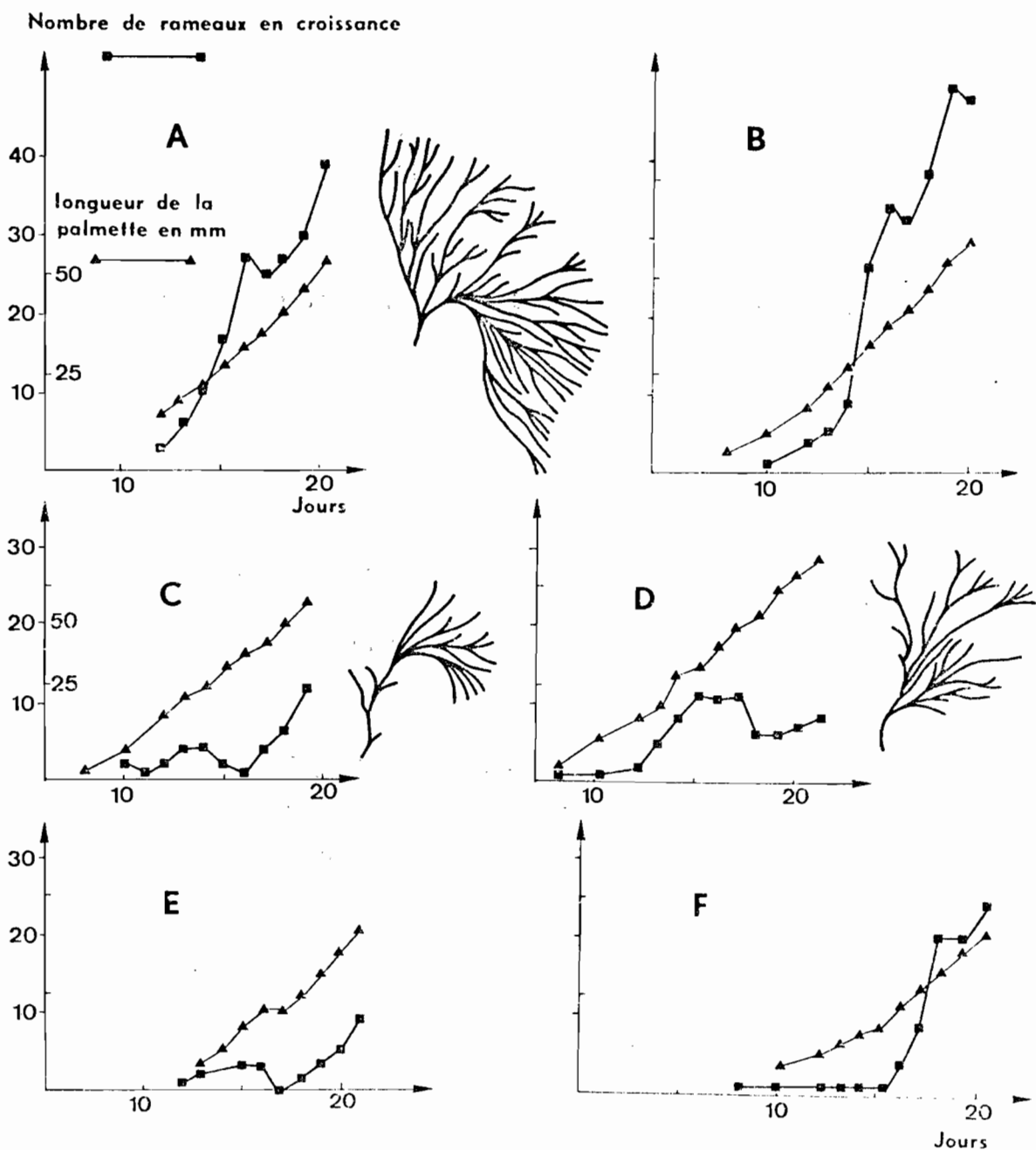


PLANCHE XI

Croissance et ramification des palmettes de la souche H4

d'autres poursuivent leur croissance et se ramifient de nouveau. La fréquence relative des deux phénomènes se traduit sur les courbes donnant le nombre de rameaux en fonction du temps par une diminution de la pente, par l'apparition d'un palier, ou même par un décrochement avec diminution du nombre de rameaux en croissance (pl. XI A et B). La ramification peut ensuite reprendre comme au début du développement et être à nouveau stoppée (pl. XI E). Ces phénomènes interviennent parfois très tôt ; les premiers rameaux formés s'arrêtent de croître (pl. XI C et D). Dans d'autres cas, tous les rameaux sont inhibés en même temps (pl. XI E) ; plus tard, un ou deux d'entre eux peuvent reprendre leur croissance et se ramifier à nouveau. Enfin, il n'est pas rare de trouver des palmettes qui s'allongent très longtemps sans se ramifier (pl. XI F).

La variation du nombre de palmettes et de rameaux qui poursuivent leur croissance par rapport à ceux qui sont inhibés rend compte de l'aspect morphologique des structures agrégées jeunes observées aussi bien dans les cultures sur milieu gélosé que sur du sable, ou dans des conditions naturelles : palmettes plus ou moins étalées en éventail, rameaux très isolés les uns des autres ou au contraire coalescents, reprise de croissance par un petit nombre d'éléments agrégés.

En définitive, l'ensemble des palmettes d'un thalle agrégé ainsi que les rameaux qu'elles portent ne se développent pas indépendamment les uns des autres. Il existe des mécanismes de régulation qui interviennent au cours du développement et limitent l'extension et la ramification des structures agrégées. Signalons au passage que des expériences ont permis de montrer que des mécanismes de régulation interviennent dans la suite du développement, lors de la formation des cordonnets et des rhizomorphes dans le mycélium agrégé laissé en place par la palmette (BOISSON, à paraître).

2 - Maintien et perte de l'état agrégé.

Dans les conditions naturelles, nous savons que l'envahissement de substrats ligneux morts ou la pénétration de tissus vivants sont réalisés par des filaments libres qui apparaissent à partir des structures agrégées assurant la propagation du parasite ; il existe donc des possibilités de dédifférenciation.

Ce problème peut être abordé in vitro de deux manières différentes. Les structures agrégées typiques n'ont été obtenues jusqu'à présent que sur des substrats particuliers ; il est par suite logique de se demander ce qui va se passer si l'on oblige des palmettes obtenues sur un milieu permettant l'agrégation, à se développer sur un milieu non favorable comme le milieu malté. Une deuxième possibilité consiste à déterminer dans quelles conditions la différenciation est stable sur des milieux autorisant l'agrégation.

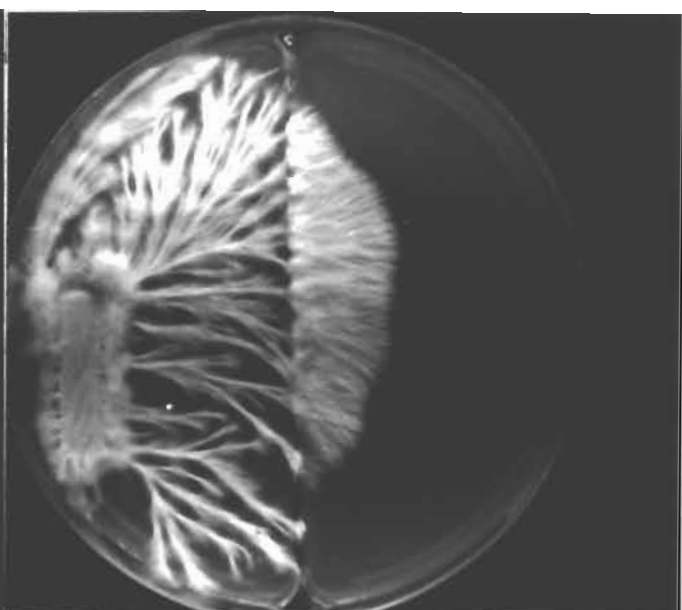
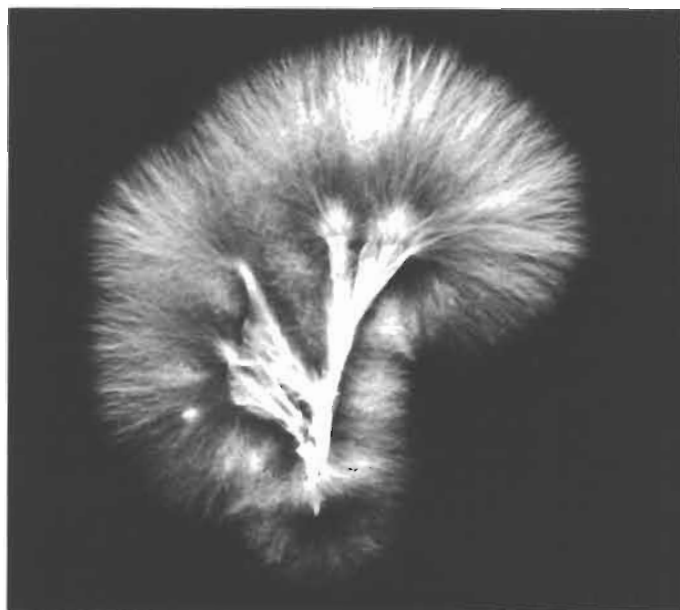
Le transfert de palmettes de différentes tailles sur milieu malté est toujours suivi de la perte de l'état agrégé. Si la bouture est de petite taille, le thalle se développe successivement dans les phases A puis B ; lorsqu'elle est de taille importante (palmettes de 1 à 2 cm de longueur), elle régénère un thalle mixte fait de filaments B du côté apical, de filaments A à partir de la base et des côtés latéraux (pl. XII A). Cette hétérogénéité dans la régénération traduit une polarité identique à celle décrite précédemment pour le mycélium non agrégé de type B.

Pour vérifier que les résultats précédents ne constituent pas seulement un effet du bouturage, nous avons utilisé une autre technique consistant à obliger le Champignon à se développer d'abord sous forme agrégée puis à passer sur un substrat ne permettant pas l'agrégation. A cette fin, des boutures de 5 x 30 mm, découpées dans des cultures sur cellophane de la souche H4, sont ensemencées de manière excentrée dans des boîtes de Pétri à deux compartiments contenant, le premier du milieu MS1, le deuxième du milieu malté (pl. XII B) ; les explantats sont déposés sur le premier substrat. Ils régénèrent des palmettes qui perdent l'état agrégé dès qu'elles atteignent le milieu malté (pl. XII B).

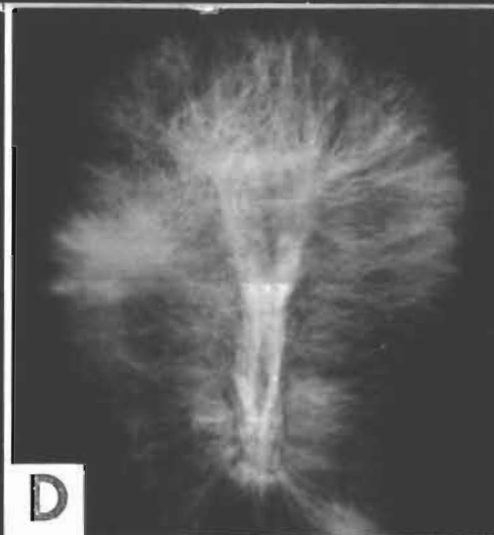
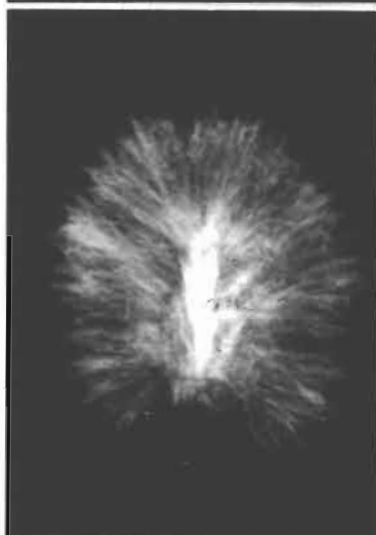
Ces expériences montrent que le maintien de l'état agrégé est fortement dépendant de la qualité du substrat ; en particulier, le passage sur du milieu malté conduit toujours à un retour à la forme non agrégée.

L'étude du maintien de l'état agrégé sur un milieu autorisant l'agrégation a été réalisée à partir de cultures de la souche H4, obtenues sur des membranes de cellophane déposées à la surface du milieu MS1, âgées de 9 jours. Le bouturage est effectué avec des palmettes de 5, 10, 15, 20 et 25 mm de longueur, prélevées avec la cellophane sous-jacente sans léser la zone apicale. Des témoins ont été réalisés sur les cultures-mères en

A



C



D



F

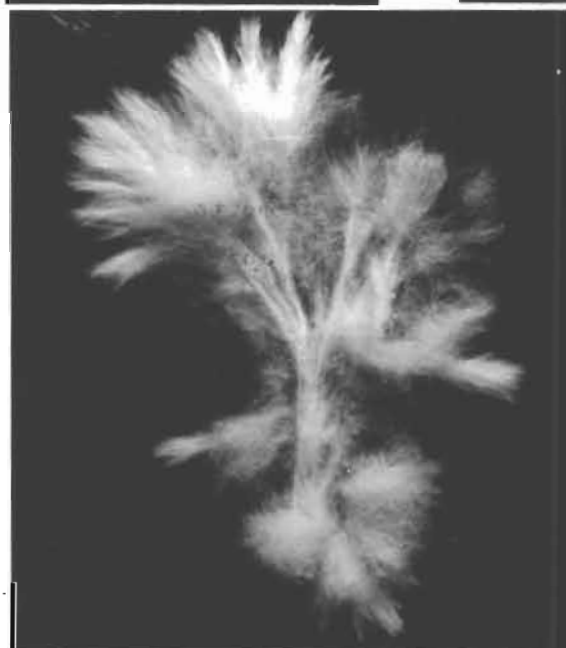


PLANCHE XII

Perte et maintien de l'agrégation de la souche H4 dans différentes conditions

- A - ensemencement d'une palmette sur milieu malté.
- B - passage d'un milieu permettant l'agrégation (HS1) sur milieu malté.
- C à G - Repiquage de palmettes de 5 mm (C), 10 mm (D), 15 mm (E), 20 mm (F) et 25 mm (G) sur milieu HS1. Âge des cultures : 3 jours.

isolant des palmettes de même taille, du thalle qui leur a donné naissance, par une simple incision au scalpel ou par enlèvement d'un petit bloc du substrat gélosé en arrière de la structure traitée.

La séparation d'une palmette du thalle-mère qui lui a donné naissance est toujours suivie de la perte de l'état agrégé dans la zone apicale, quelle que soit la taille du fragment isolé. Les dimensions de ce fragment interviennent, en revanche, dans la localisation et la rapidité d'apparition des structures agrégées néoformées. Celles-ci apparaissent après des délais d'autant plus longs que la taille des fragments repiqués est plus petite. Les palmettes néoformées apparaissent en n'importe quel point de la marge des thalles issus des boutures de 5, 10 et parfois 15 mm (pl. XII C, D et E). Dans ce dernier cas, elles se forment quelquefois préférentiellement du côté apical de la bouture et sont parfois en relation continue avec les structures agrégées repiquées. Ces deux caractéristiques se retrouvent constamment dans les cultures issues des boutures les plus grandes (20 et 25 mm, pl. XII F et G). La localisation des palmettes néoformées peut être encore plus rigoureuse, aucune régénération n'ayant lieu sur la base et les bords latéraux de l'explantat. Dans les cas les plus typiques (pl. XII G), les palmettes néoformées sont en relation directe avec les rameaux de la structure agrégée repiquée et il ne s'en forme pas ailleurs. La perte momentanée de l'état agrégé observée lors du repiquage des palmettes peut dépendre de la masse de cellules emportées par la bouture ; il est possible que la taille maximale des palmettes utilisées dans les expériences précédentes soit encore en dessous de la masse minimale permettant le maintien de l'état agrégé. Pour tester cette hypothèse, des thalles entiers, cultivés sur une membrane de cellophane, ont été transférés sur un substrat neuf permettant l'agrégation. Dans ces conditions, le mycélium régénéré dans la zone apicale et, plus rarement, sur les bords des palmettes, est fait de filaments superficiels libres. Cependant, la croissance sous forme agrégée reprend, dans la zone apicale uniquement, après un délai d'environ 48 heures.

La perte de l'état agrégé qui suit le bouturage de palmettes sur un milieu autorisant l'agrégation dépend donc de deux causes indépendantes intervenant simultanément : premièrement, la séparation de la palmette du thalle-mère ; deuxièmement, le transfert d'un substrat altéré à un substrat neuf.

L'étude expérimentale du maintien de l'état agrégé conduit aux conclusions suivantes :

a - Le substrat et les conditions de culture jouent un rôle primordial dans le maintien de l'état agrégé. Certains substrats autorisent l'agrégation d'autres non. L'état agrégé n'est jamais initié ni maintenu sur les seconds.

b - L'état agrégé est perdu quand les palmettes sont séparées du thalle mère qui leur a donné naissance, et quand celui-ci est transféré en entier sur un substrat neuf autorisant l'agrégation. Cela signifie d'une part que des informations nécessaires au maintien de l'état agrégé circulent par le canal des filaments, d'autre part que le substrat est altéré sous l'action des thalles en croissance et que ces altérations jouent un rôle dans l'agrégation.

c - Le bouturage de palmettes sur un milieu qui autorise l'agrégation est, conformément aux conclusions précédentes, toujours suivi de la régénération de mycélium non agrégé. Le retour à l'état agrégé dépend en revanche de la masse de mycélium repiqué.

D - CONCLUSIONS.

Aux informations purement morphologiques, la présente étude des thalles du L. lignosus en cultures in vitro, à partir de la basidiospore ou par bouturage, apporte des informations d'un caractère nouveau sur le développement de cette espèce.

Elle montre que les mécanismes de croissance et de développement sont analogues à ceux connus chez d'autres organismes appartenant aux Règnes animal ou végétal. L'expérimentation indique en effet que les cellules ou les groupes de cellules subissent des changements de forme (différenciation morphologique) qui apparaissent dans un ordre déterminé au cours du développement et qui sont l'expression de changements internes (différenciation biochimique) qui ne sont pas directement perceptibles. L'expérimentation montre aussi que ces cellules n'agissent pas comme des unités indépendantes ; elles sont susceptibles de recevoir ou d'envoyer des informations aux cellules voisines. Enfin, tous ces phénomènes sont sous la dépendance plus ou moins forte du milieu. Ces différentes caractéristiques du développement du L. lignosus sont retracées schématiquement dans la figure 11 que nous commenterons maintenant.

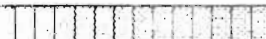
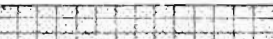
	PHASE A	PHASE B	PHASE AGREGEE STADE PALMETTE
différenciation et dédiﬀérenciation morphologiques			
différenciation physiologique			
caractéristiques nouvelles mises en place		POLARITE 	AGREGATION 
mécanismes de régulation	durée de la phase A		palmettes et rameaux en croissance active

FIGURE 11

Représentation schématique des différenciations élémentaires et des mécanismes de régulation intervenant successivement au cours du développement des thalles du L. lignosus

Le développement des thalles du L. lignosus à partir de la basidiospore passe par trois étapes principales qui se succèdent toujours dans le même ordre : phase A, phase B et phase agrégée. Ces différents stades sont repérés facilement par des changements de morphologie correspondant à l'apparition de nouveaux types de filaments. Des différenciations internes précèdent et préparent ces changements de forme. Au cours de la phase non agrégée, certaines des caractéristiques de la phase B sont mises en place dans le mycélium de la phase A. L'étude des conditions d'apparition des palmettes à partir du mycélium non agrégé montre à l'évidence que l'agrégation est déjà préparée au sein du mycélium de la phase B.

Des potentialités nouvelles, telles que la polarité et l'agrégation, se manifestent successivement au cours du développement. La polarité mise en évidence chez le L. lignosus apparaît à la suite du bouturage ; elle se traduit, sur milieu malté, par la nature du mycélium régénéré sur le front et à la base des boutures. Cette propriété est exprimée aussi bien par les filaments B que par les structures agrégées.

L'agrégation se manifeste d'abord par un rassemblement des filaments en faisceaux et des modifications morphologiques portant sur la ramification. Les études réalisées sur le maintien et la perte de l'état agrégé donnent des renseignements intéressants susceptibles d'orienter les travaux sur le déterminisme de l'agrégation. Nous savons, en effet, que les informations nécessaires au maintien de l'état agrégé circulent à la fois par voie interne et par voie externe.

Les phénomènes de développement du L. lignosus sont tous influencés par les facteurs externes. Le déroulement normal de la morphogénèse n'est possible que dans un environnement dont les caractéristiques ne varient pas au-delà de certaines limites. Ces facteurs externes jouent un rôle très important dans le passage de la phase non agrégé à la phase agrégée. On sait depuis longtemps que l'initiation des palmettes ne peut avoir lieu que dans des conditions particulières de milieu ; la présente étude montre que les mêmes conditions sont nécessaires au maintien de l'état agrégé.

La première partie de notre travail a porté sur les faits morphologiques du développement et sur leur mise en place dans le temps et dans l'espace. Les conclusions auxquelles elle aboutit permettent d'étudier les mécanismes de développement des thalles. Nous examinerons successivement les phénomènes de corrélation actifs au sein des thalles et les phénomènes de polarité. Nous rechercherons enfin quel est le déterminisme de l'agrégation.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DES MECANISMES DE DEVELOPPEMENT DES THALLES

CHAPITRE III

NATURE ET ROLE DES CORRELATIONS AU COURS DE LA MORPHOGENESE DES THALLES NON AGREGES ET AGREGES

L'étude de la morphogénèse de l'appareil végétatif du L. lignosus et de la mise en place au cours du temps des différenciations élémentaires qui jalonnent le développement montre qu'un thalle se comporte comme un individu au sein duquel les différentes parties sont interdépendantes. Cette interdépendance se manifeste plus particulièrement à deux stades du développement, tout d'abord à l'occasion du passage de la phase A à la phase B, ensuite, lors de la production et de la ramification des palmettes.

A - LES CORRELATIONS MYCELIUM INTRAMATRICIEL - MYCELIUM SUPERFICIEL AU SEIN ===== DES THALLES NON AGREGES. =====

Les résultats de l'étude morphologique du développement du mycélium non agrégé permettent de caractériser le passage de la phase A à la phase B par l'inversion des relations existant entre le mycélium intramatriciel et le mycélium superficiel au cours de chacune des phases. Pendant la phase A, la croissance en longueur est assurée par les filaments intramatriciels A et le mycélium aérien naît de leur ramification. Pendant la phase B, ce sont au contraire les filaments superficiels B qui sont responsables de l'extension du thalle et le mycélium intramatriciel est issu de leur ramification. Il est possible que le changement de phase correspondant à cette inversion soit sous la dépendance de corrélations existant entre les systèmes intramatriciel et superficiel du thalle ; c'est ce que nous chercherons à mettre en évidence dans un premier temps.

1 - Corrélations mycélium intramatriciel - mycélium superficiel au cours de la phase A.

Pour étudier expérimentalement ces corrélations, il suffit de comparer la morphogénèse de thalles témoins où les deux systèmes mycéliens peuvent se développer simultanément et la morphogénèse de thalles où la croissance de l'un ou l'autre système est supprimée.

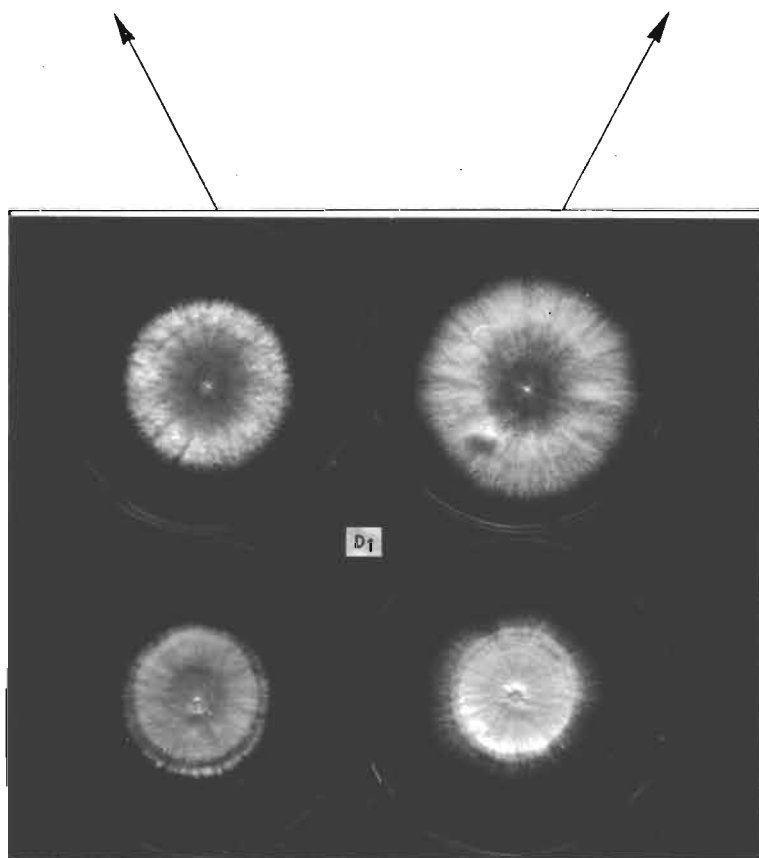
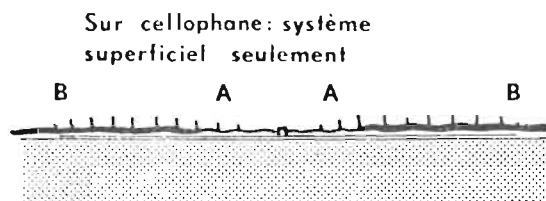
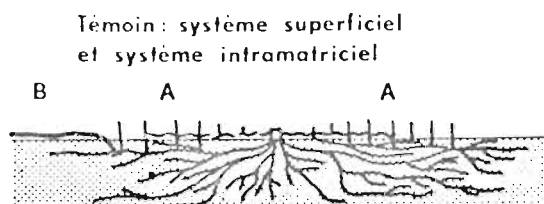
Pour empêcher le développement du système intramatriciel, il suffit de déposer les semis sur une membrane de cellulose telle que les pores soient de diamètre inférieur à ceux des filaments (membrane de cellophane, filtres Millipore avec des pores de $0,22\ \mu$ ou $0,45\ \mu$ de diamètre) ; les témoins sont constitués par des cultures faites directement sur le milieu gélosé ou sur des membranes dont les pores sont de diamètre suffisant pour laisser passer les hyphes (filtres Millipore avec des pores de $8\ \mu$ de diamètre). Inversement, pour empêcher la croissance du système superficiel, il suffit d'ensemencer les boutures sous une membrane de cellophane ; seuls les filaments intramatriciels peuvent se développer dans ces conditions.

Ces expériences ont été réalisées à partir de boutures de petite taille prélevées dans des cultures des souches D1 et 3204, sur milieu malté.

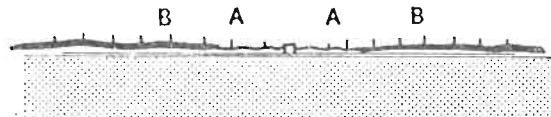
Les thalles/^{témoins} se développent successivement dans les phases A puis B, la durée moyenne de la phase A étant de 7 jours pour la souche D1 et de 5 jours pour la souche 3204. Les cultures témoins ensemencées sur filtre Millipore avec des pores de $8\ \mu$ de diamètre évoluent de manière identique, mais la croissance est légèrement ralentie.

Quand les thalles sont faits uniquement de mycélium superficiel, leur croissance diamétrale est plus forte que celle des témoins (pl. XIII), ceci étant dû à une apparition plus rapide des filaments B. La durée de la phase A est, par rapport au témoin, plus courte de deux à trois jours en moyenne.

Quand les boutures sont ensemencées sous une membrane de cellophane, les dimensions du thalle intramatriciel régénéré augmentent jusqu'à devenir supérieures à celles de la membrane de cellophane ; à partir de cet instant, le mycélium aérien peut à nouveau se développer (fig. 12). Les filaments B n'apparaissent que 24 à 48 heures après la différenciation du système aérien dressé, alors qu'ils sont déjà présents dans des cultures témoins



Témoin: sur filtre avec pores de 8μ :
systèmes superficiel et intramatriciel



Sur filtre avec des pores de $0,45\mu$:
système superficiel seulement

PLANCHE XIII

Influence des corrélations mycélium superficiel-mycélium intramatriciel sur
la morphogénèse des thalles non agrégés du L. lignosus



Témoin: systèmes superficiel
et intramatriciel



Sous cellophane: système intramatriciel
seulement au début du développement



FIGURE 12

Schéma du développement des thalles lorsque la croissance du mycélium
superficiel est interdite

d'âge identique. Les thalles intramatriciels restent donc dans l'état A aussi longtemps que le développement des éléments aériens est interdit, même lorsque, chronologiquement, ils devraient se différencier dans l'état B.

L'ensemble des expériences précédentes montre à l'évidence qu'il existe des corrélations entre les mycéliums immergé et superficiel d'un thalle de la phase A. Si l'on empêche le développement du mycélium intramatriciel, on réduit très fortement le délai nécessaire à l'apparition des filaments B. En revanche, si le thalle ne peut croître que par des filaments immergés, on allonge indéfiniment, dans les limites de l'expérience, la durée de la phase A. Dans les conditions normales où les deux systèmes coexistent, ces corrélations sont responsables de la morphogénèse en contrôlant le passage de la première à la deuxième phase du développement. Le délai nécessaire à l'apparition des filaments B peut en effet être modifié si on supprime les interactions entre les deux types de mycélium.

2 - Différenciations internes au cours de la phase A.

Nous avons montré dans le chapitre II (p. 30) que la différenciation vers l'état B est préparée au sein du mycélium de type A. En effet, des cellules appartenant morphologiquement à la première phase du développement sont susceptibles, lorsqu'elles sont bouturées en masse, de régénérer directement des filaments B.

La différenciation interne ainsi mise en évidence peut, théoriquement, être induite par une altération du substrat sous l'influence du mycélium intramatriciel. La durée réduite de la phase A quand on empêche le développement du mycélium intramatriciel est incompatible avec cette hypothèse.

Nous avons cherché à savoir si cette différenciation se produit, au cours de la phase A, dans les hyphes superficielles ou dans les hyphes intramatricielles. Pour cela, des boutures faites de filaments A ayant subi cette différenciation, donc capables de régénérer directement des filaments B, sont découpées en trois semis emportant séparément le mycélium superficiel, le mycélium intramatriciel profond et le mycélium intramatriciel de la zone moyenne (pl. XIV). Seuls les premiers régénèrent d'emblée des filaments B ; les seconds donnent des thalles-fils qui se développent dans la phase A ; les boutures prélevées à un niveau moins profond régénèrent des thalles qui sont dans la phase B ou des individus mixtes composés pour

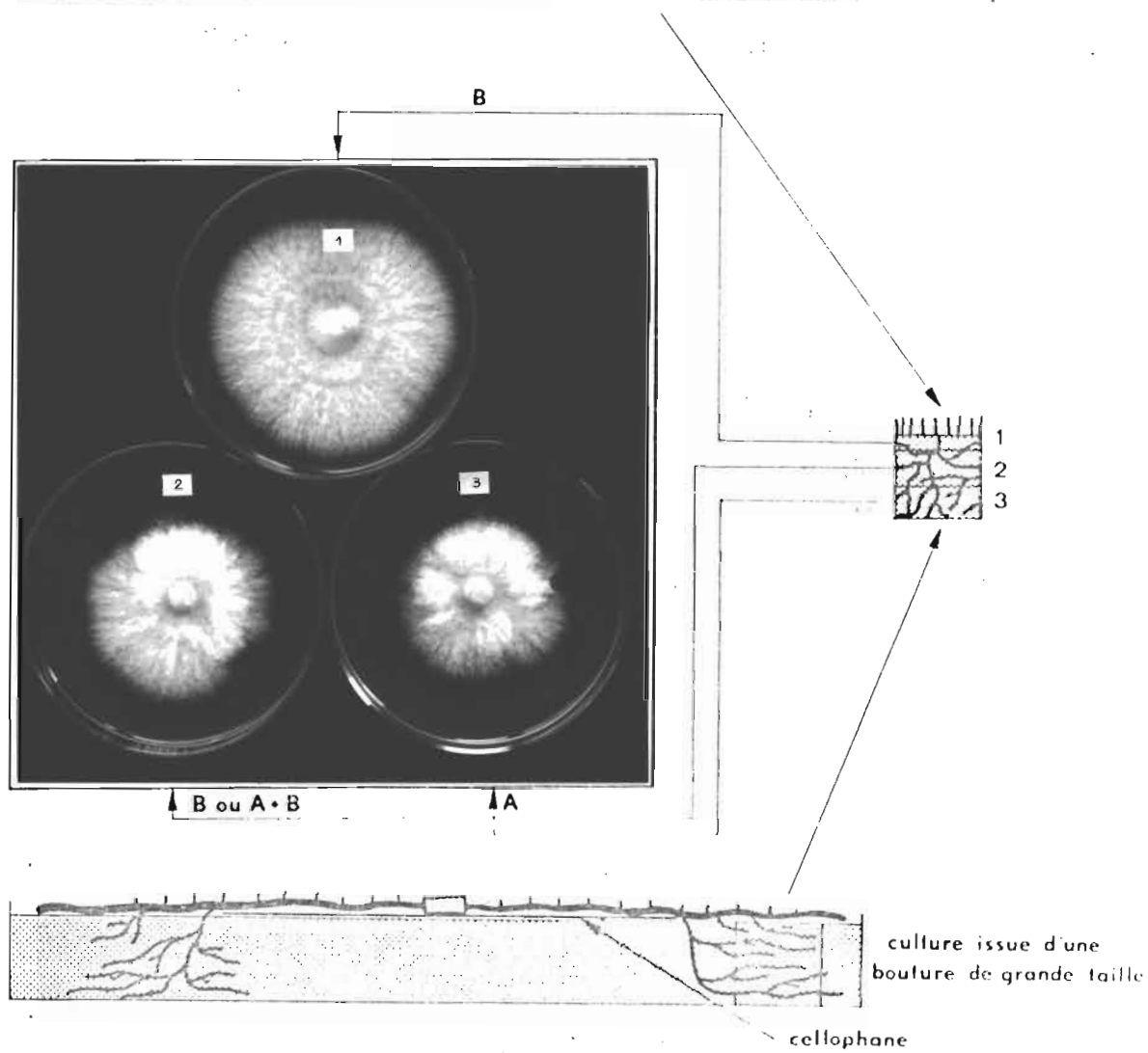
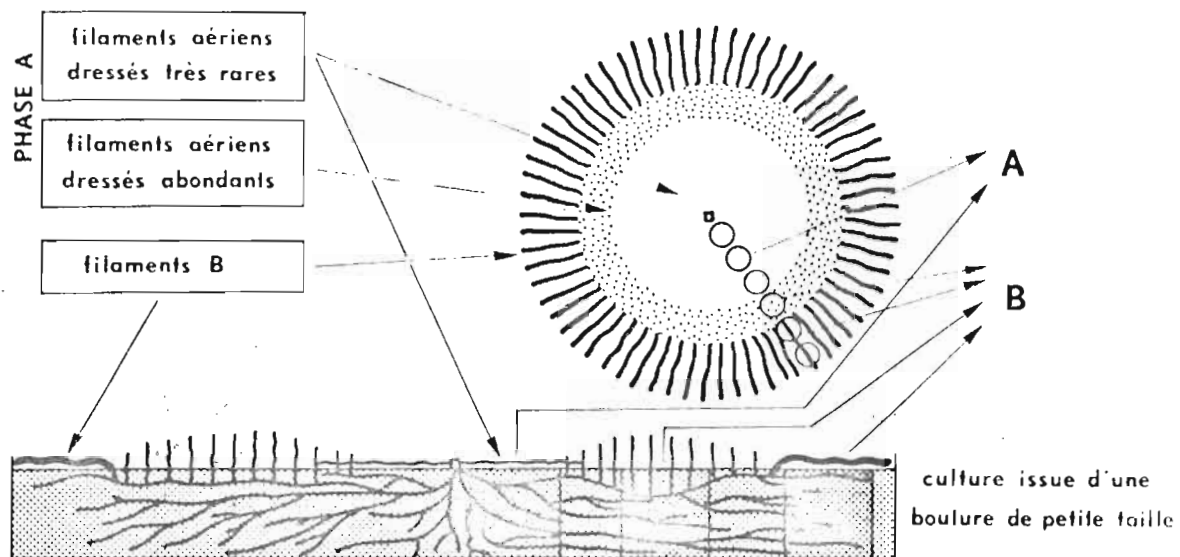


PLANCHE XIV

Potentialités de régénération des filaments immergés et superficiels dans
les thalles non agrégés des phases A et B

partie de mycélium de type B et pour partie de mycélium de type A (pl. XIV). L'examen du mycélium intramatriciel montre que ces résultats ne peuvent être attribués à une densité plus faible des filaments dans les couches profondes qu'en surface. L'utilisation de boutures de 2 cm de côté confirme ces faits ; les semis de 4 cm² prélevés en profondeur dans le mycélium intramatriciel régénèrent presque toujours les thalles-fils dans la phase A. En définitive, c'est bien la qualité du mycélium bouturé qui détermine la nature du mycélium régénéré.

Les résultats de cette expérience sont conformes à ceux exposés précédemment (fig. 4, p. 30). En effet, les boutures de grande taille prélevées en arrière du front de croissance dans des thalles de la phase A régénèrent d'emblée des filaments B quand elles proviennent de cultures âgées de 5 jours au moins, déjà recouvertes d'un mycélium aérien dressé abondant.

Ils sont encore confirmés par l'expérience suivante. Dans un thalle obtenu à partir d'un semis de petite taille, âgé de 9 jours, sur lequel les filaments B viennent d'apparaître, on prélève des boutures de 8 mm de diamètre à différents niveaux entre le centre de la culture et sa marge (pl. XIV). Les thalles-fils sont dans la phase A quand les boutures proviennent de la partie centrale du thalle, dans une zone où il y a très peu de filaments aériens dressés ; ils sont dans la phase B quand les explantats sont prélevés plus à l'extérieur dans un mycélium de type morphologique A recouvert d'un épais tapis de mycélium aérien dressé, ou dans du mycélium de la phase B.

Le rôle du mycélium aérien dressé des thalles de la phase A dans la différenciation des filaments B peut enfin être démontré directement. Lorsque le mycélium aérien qui se développe en arrière du front de croissance sur des cultures de la phase A est éliminé jour après jour, on retarde indéfiniment l'apparition des filaments B.

La présente étude nous permet de déterminer l'origine de la transformation qui, au sein du mycélium de type A, prépare la différenciation morphologique des filaments B. Elle est d'ordre interne et se produit au sein du mycélium aérien dressé né, par ramification, des filaments A.

3 - Les corrélations mycélium superficiel - mycélium intramatriciel au cours de la phase B.

Nous avons, jusqu'à maintenant, étudié les corrélations entre systèmes immergés et superficiels au cours de la première phase du développement et montré que les filaments aériens dressés qui se différencient durant le stade A ont en définitive un fonctionnement de type B : leurs potentialités de régénération par bouturage sont identiques à celles des filaments B dans les mêmes conditions. On peut se poser des questions du même type pour les systèmes mycéliens aériens et intramatriciels qui coexistent encore au cours de la phase B. Est-ce que des corrélations existent entre ces deux types de filaments ? Quel est le mode de fonctionnement des éléments immergés nés de la ramification des hyphes superficielles B ?

La comparaison de cultures de la phase B édifiées uniquement à partir de mycélium superficiel ou à partir des systèmes mycéliens superficiel et intramatriciel montre que, comme précédemment, il existe des corrélations entre les éléments immergés et superficiels du thalle. Mais elles s'exercent uniquement sur la croissance radiale des cultures qui est significativement plus forte quand seul le mycélium superficiel peut se développer.

Pour déterminer le mode de fonctionnement des filaments appartenant morphologiquement à la phase B, nous avons utilisé des boutures faites de mycélium superficiel ou de mycélium intramatriciel profond. Afin d'être sûr que le système immergé dérive de la ramification des filaments B et non de la poursuite de la croissance des éléments intramatriciels de la bouture, les cultures-mères sont réalisées sur une membrane de cellophane de 6 cm de diamètre dans des boîtes de Pétri de grande taille ($\varnothing$ 16 cm), contenant du milieu malté sur une épaisseur de 1 cm (pl. XIV). Les prélèvements sont effectués à différents âges dans la portion du thalle qui s'est développée au-delà de la membrane de cellophane. Les boutures emportant du mycélium superficiel régénèrent d'emblée un mycélium de type B, alors que celles constituées de mycélium intramatriciel profond donnent un thalle-fils qui se développe dans la phase A. Les rameaux intramatriciels issus des filaments superficiels B se comportent donc comme des filaments A. Leur croissance à l'intérieur du substrat semble entraîner leur dédifférenciation.

Ce résultat a été confirmé en obligeant des filaments B nés de boutures de grande taille à croître à l'intérieur du substrat : il suffit pour cela d'ensemencer un tel explantat sous une membrane de cellophane. Lorsque les filaments intramatriciels se développent au-delà de cette membrane, de nouveau sur le substrat libre, la morphologie du thalle reste caractéristique de la phase A pendant 24 à 48 heures.

Les expériences précédentes permettent de tirer les conclusions suivantes :

a - des corrélations entre les systèmes immergé et superficiel s'exercent au sein des thalles de la phase B mais elles n'agissent que sur leur croissance radiale, pas sur leur morphologie ;

b - les éléments immergés issus de la ramification des filaments B se comportent comme des filaments A au cours de la régénération.

4 - Adaptation des mycéliums immergés et superficiels aux conditions de milieu.

Les expériences précédentes montrent que, quelle que soit la phase de développement, les potentialités de régénération des filaments immergés et des filaments aériens dépendent uniquement de leur position par rapport au substrat. A côté des stades A et B que l'on distingue par des caractères morphologiques, on peut donc définir deux états I et S qui correspondent respectivement aux deux modes de fonctionnement des filaments intramatriciels et superficiels. Au début de la phase A, tout le mycélium est dans l'état I ; il fonctionne ensuite pour partie dans l'état I (système intramatriciel) et pour partie dans l'état S (système superficiel). Les filaments superficiels B et leurs rameaux aériens dressés sont dans l'état S ; celui-ci est rapidement perdu dans les rameaux intramatriciels qui adoptent les caractéristiques du fonctionnement I.

Certaines des expériences précédentes montrent que le maintien des thalles dans les conditions favorables à l'un des deux états est suivi par l'acquisition rapide et le maintien indéfini du mode de fonctionnement correspondant. Ainsi, nous avons vu que la durée de la phase A peut être considérablement allongée quand on empêche le développement du mycélium superficiel. La réversion vers le type A du mycélium de la phase B qui se développe à l'intérieur du substrat conduit à une conclusion identique.

En revanche, la durée de la phase A est notablement raccourcie quand le mycélium superficiel peut seul se développer. Tous ces faits tendent à prouver /^{que} les états I et S correspondent à une adaptation à des conditions particulières dont on peut soupçonner qu'elles sont en relation avec l'aération du milieu.

Un début de confirmation de cette hypothèse a été obtenue ; en effet, des thalles qui devraient normalement se développer dans la phase B sont incapables de le faire si la culture est réalisée dans une enceinte close, en présence d'un mélange gazeux comportant 1% d'oxygène et 99% d'azote. Cela prouve que dans un milieu pauvre en oxygène, seul le mycélium de type A est capable de croître.

5 - Conclusions.

L'étude que nous venons de réaliser permet de se faire une idée assez précise du déterminisme du passage de la phase A à la phase B.

Les filaments A de la première phase de croissance se développent au sein du substrat dans un milieu partiellement privé d'oxygène ; leur fonctionnement physiologique est du type I (intramatriciel). Ils donnent naissance, par ramification, à des filaments aériens dressés qui vivent au contact direct de l'air et ont un fonctionnement de type S (superficiel). Entre ces deux systèmes de physiologies différentes s'exercent des corrélations qui, dans les conditions normales du développement, sont responsables du délai qui précède le passage à la phase B. Celui-ci est marqué par une différenciation morphologique et correspond à l'établissement d'une prédominance de l'état S sur l'état I ; il est préparé par l'apparition du mode de fonctionnement S dans le mycélium aérien dressé de la première phase de croissance.

Le comportement du L. lignosus en culture in vitro est à rapprocher de son comportement dans les conditions naturelles. Cet organisme dispose, en définitive, de deux systèmes mycéliens pour assurer son développement. L'un d'eux semble adapté à la vie à l'abri de l'air, dans une ambiance très pauvre en oxygène alors que l'autre, au contraire, ne peut se développer qu'au contact direct de l'atmosphère. L'existence de ces deux systèmes mycéliens représente un avantage certain du point de vue évolutif, car elle permet à cette espèce de coloniser un plus grand nombre de substrats et d'adapter son comportement en fonction de l'environnement. Les filaments A

sont susceptibles de pénétrer profondément dans les masses ligneuses qu'ils exploitent et c'est vraisemblablement par leur intermédiaire que s'exerce le pouvoir pathogène du parasite. Le rôle des filaments B est d'assurer le passage d'un substrat à un autre (de l'intérieur de la masse ligneuse à l'extérieur) ainsi que de permettre le passage de la structure libre à la structure agrégée, donc le passage de la phase d'exploitation d'un substrat à la phase de propagation vers un autre substrat.

B - LES CORRELATIONS D'INHIBITION AU SEIN DU THALLE AGREGÉ.

L'étude de la morphogénèse des thalles agrégés a montré que le nombre de palmettes et de rameaux en croissance est imposé par des mécanismes de régulation intervenant au niveau du thalle tout entier. Les faisceaux de filaments agrégés inhibés donnent naissance, dans la zone apicale, à des hyphes libres, d'abord superficielles puis intramatriciels, qui cessent bientôt de s'allonger. Nous rechercherons maintenant quel est le déterminisme de ces corrélations.

1 - Preuves expérimentales de l'existence de corrélations d'inhibition.

Une première régulation intervient pour limiter le nombre de centres actifs de formation des structures agrégées. La nature des corrélations mises en jeu a été étudiée expérimentalement par l'examen du comportement des thalles après ablation chirurgicale des centres en activité.

Les expériences ont été réalisées à partir de thalles agrégés de la souche H4 âgés de 6 à 9 jours, issus de boutures de 1 cm de côté déposées sur un milieu MS1 de pH 4,0, contenant 1 g/l d'asparagine. Quand les centres de formation sont supprimés avec le milieu sous-jacent, de nouveaux centres actifs sont formés dans des zones qui n'en portaient pas auparavant, à condition que celles-ci n'aient pas atteint le stade où la marge est constituée uniquement de filaments intramatriciels. Lorsque les ablations ne portent pas sur l'ensemble des centres de formation en activité, les palmettes qui restent sur le thalle poursuivent leur croissance et, la plupart du temps, il n'en apparaît pas de nouveau.

Un second contrôle est exercé sur le nombre de ramifications actives que porte une palmette. Des expériences identiques aux précédentes ont été réalisées à partir des mêmes cultures âgées de 8 à 10 jours. On repère sur des palmettes bien développées des rameaux qui cessent de croître.

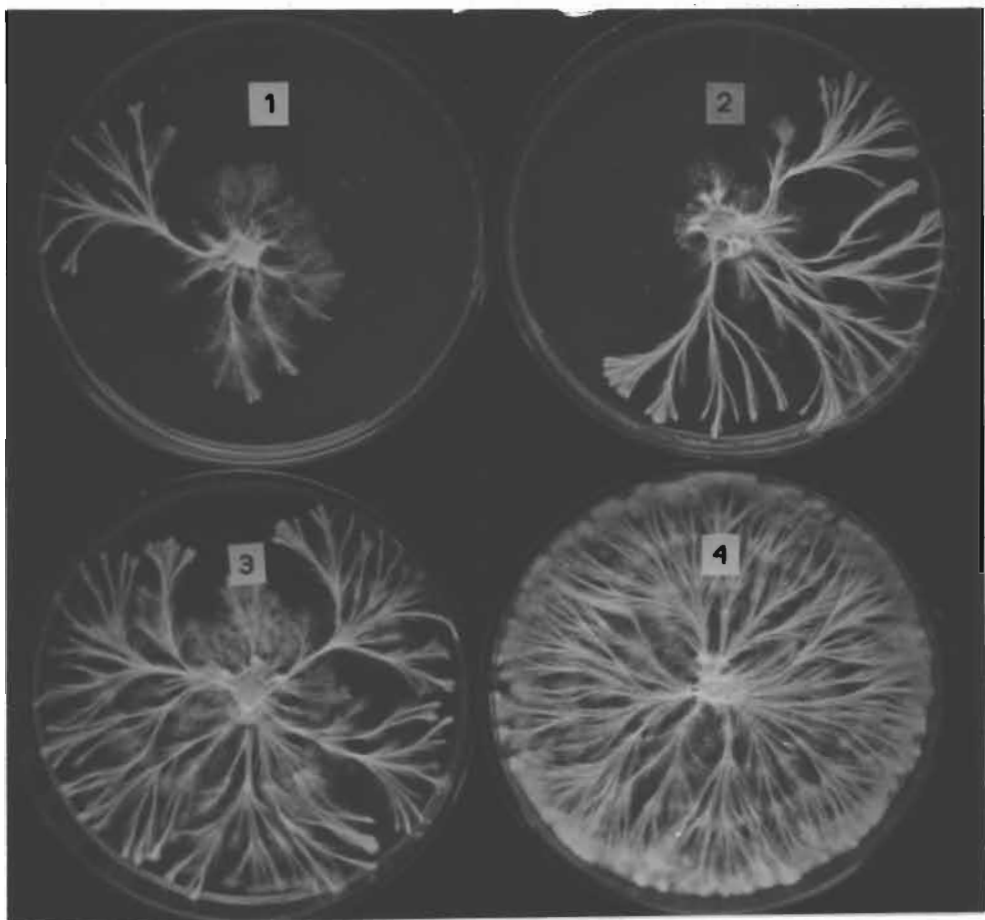


PLANCHE XV

Influence de la concentration du milieu en asparagine sur la morphologie
 thalles agrégés

- 1 : 0,01 g/l d'asparagine
- 2 : 0,1 g/l d'asparagine
- 3 : 0,3 g/l d'asparagine
- 4 : 1 g/l d'asparagine

Quelques-unes de ces structures sont conservées comme témoins ; dans les autres on supprime tous les rameaux en croissance active ainsi que toutes les autres palmettes du thalle. La régénération est très lente au niveau des lésions ; en revanche, il apparaît sur les rameaux précédemment inhibés un mycélium aérien dense qui initie de nouvelles structures agrégées. Cette régénération se produit quelquefois sur les palmettes conservées comme témoins, mais elle est beaucoup plus rare.

Les expériences précédentes montrent que les divers centres de croissance d'un thalle agrégé ne se comportent pas comme des unités indépendantes mais sont le siège de corrélations qui se traduisent par l'inhibition de certains d'entre eux. Ces zones inhibées peuvent donner naissance à de nouvelles structures agrégées si on supprime les centres de croissance actifs. Les mécanismes de régulation interorganiques sont donc bien des corrélations d'inhibition analogues à celles décrites aussi bien chez les Champignons (LARPENT, 1966) que chez les Phanérogames (CHAMPAGNAT, 1969).

2 - Influence des facteurs externes sur l'intensité des corrélations d'inhibition.

Les conditions externes jouent un rôle important dans l'aspect morphologique des palmettes. En agissant sur les facteurs de l'environnement ou sur la composition des milieux de culture, on peut faire varier, presque à volonté, les caractéristiques de la palmette. Les résultats détaillés de cette étude seront publiés ultérieurement. Parmi les facteurs précédents, certains semblent intervenir plus spécifiquement sur l'intensité des phénomènes de corrélation ; c'est le cas de la quantité d'azote organique disponible dans le substrat. A titre d'exemple, nous étudierons ses effets en utilisant l'asparagine comme source d'azote.

Dans une première série d'essais, nous avons observé les variations du pourcentage d'inhibition des initiales de palmettes en fonction de la richesse du substrat en asparagine. Des boutures de 7 mm de côté de la souche H4, prélevées dans des cultures sur cellophane âgées de 8 jours sont repiquées sur des milieux MS₂ de pH 4,0, contenant 0,05, 0,3 et 0,8 g/l d'asparagine. Les mesures du nombre d'ébauches régénérées et du nombre de palmettes en croissance active 11 jours après le repiquage permettent de

calculer le pourcentage de palmettes inhibées dans les différents milieux. Ces deux caractéristiques des thalles agrégés augmentent en même temps que la dose d'asparagine croît (tabl. III). La première varie plus fortement que la seconde ; il en résulte que le pourcentage d'ébauches inhibées diminue quand la richesse du substrat en asparagine augmente.

Nous avons étudié de la même manière la croissance et la ramification des palmettes. Le milieu de base, identique au précédent, est complété par les quantités suivantes d'asparagine : 0,01, 0,1, 0,3 et 1 g/l. Les variations morphologiques observées sur ces différents substrats (pl. XV) portent sur le nombre de palmettes par thalle mais également sur le nombre de rameaux actifs par palmettes. Les structures agrégées obtenues sur le milieu contenant 0,3 g/l d'asparagine portent deux fois plus de rameaux actifs que celles qui se développent sur le substrat qui en contient seulement 0,01 g/l (tabl. IV). Comme la vitesse de croissance des palmettes varie peu, cela correspond effectivement à une ramification plus intense.

Des expériences précédentes, il ressort que l'asparagine a une influence très marquée sur les corrélations d'inhibition. Plus le milieu contient d'asparagine et plus les pourcentages d'inhibition sont faibles. Des facteurs trophiques interviennent donc dans les phénomènes de corrélations observés.

3 - Influence des facteurs internes sur les corrélations d'inhibition.

Le rôle des apex en croissance dans les corrélations d'inhibition peut s'exercer de multiples façons. On invoque classiquement, parmi d'autres mécanismes possible le drainage, à leur profit et aux dépens des autres, de substances en provenance de la partie centrale des thalles ou bien l'action de substances synthétisées dans la zone apicale, vers l'arrière, sur les zones inhibées. Un choix est possible entre ces deux hypothèses. En effet, si, dans les deux cas, les sites d'action sont toujours les apex, les lieux de synthèse et le sens des transports sont différents. Les effets de l'interruption de ces transports à divers niveaux doivent alors permettre d'invalider l'une des interprétations possibles.

Deux séries d'expériences ont été réalisées, l'une avec des thalles qui régénèrent peu de palmettes à partir de centres de formation discontinus localisés en arrière de la marge, l'autre avec des thalles portant de nombreuses palmettes formées à partir d'une couronne continue de mycélium

aérien dressé. Les structures agrégées se développent à partir de thalles de type B de la souche H4 obtenus sur milieu malté et cellophane que l'on transfère, après trois jours de culture, sur un substrat MS₁ à pH 3,5. Les traitements sont effectués une semaine après le transfert ; la lecture des résultats est faite 6 jours plus tard.

Dans le premier cas (fig. 13 A), on sépare les palmettes des centres de formation soit par une simple incision au scalpel, soit en enlevant avec la cellophane sous-jacente toute la zone portant du mycélium aérien dressé. Dans les cultures témoins, 18% seulement des palmettes formées initialement sont inhibées alors que dans les cultures traitées, l'inhibition affecte respectivement 86 et 78% des structures agrégées formées.

Dans la deuxième série d'expériences, on procède, à des ablations plus ou moins importantes de mycélium non agrégé dans la partie centrale de la culture (fig. 13 B). Dans les thalles témoins, le pourcentage d'inhibition des palmettes est de 43% ; ce pourcentage augmente en même temps que la masse de mycélium libre enlevée en arrière des palmettes jusqu'à atteindre 84% lorsque tout le mycélium non agrégé est supprimé.

Dans aucun de ces deux cas, on ne peut attribuer les corrélations à l'intervention de substances inhibitrices synthétisées par les apex ; en effet, les ablations des zones situées en arrière devraient être sans influence sur les corrélations. En revanche, les résultats s'interprètent très bien en admettant que les corrélations résultent de la concurrence qui se manifeste entre les différentes zones en croissance pour des substances synthétisées en arrière et transportées dans les filaments.

4 - Conclusions.

Au cours du développement d'un thalle agrégé, tout se passe en définitive comme si le thalle lui-même, par l'intermédiaire des interactions intervenant entre les structures agrégées qu'il porte, était capable de s'adapter à une situation donnée dans laquelle entrent en jeu des facteurs internes (masse et nature du mycélium non agrégé d'où partent les palmettes) et des facteurs externes, en particulier, la composition du milieu en substances nutritives. Cette adaptation se traduit par la quantité de mycélium agrégé régénéré (action à la fois sur le nombre de palmettes et sur le nombre de rameaux par palmette).

Les facteurs internes qui interviennent dans ces corrélations sont de toute évidence véhiculés par les hyphes puisque lorsqu'on interrompt la continuité entre le thalle non agrégé et les palmettes, les filaments de la marge en croissance se dissocient ; ce transport se fait sous l'influence des apex qui exercent une compétition à leur profit. Si l'on supprime les apex des palmettes en croissance, cette compétition est suspendue et les zones précédemment inhibées donnent naissance à de nouvelles palmettes.

C - RESUME ET DISCUSSIONS.

Les mécanismes de régulation qui se manifestent au cours du développement des thalles du L. lignosus interviennent dans les deux phases non agrégées et agrégées de la morphogénèse.

Au cours des stades non agrégés, les interactions s'exercent entre les systèmes mycéliens superficiel et immergé. Elles sont responsables du délai nécessaire à l'apparition des filaments B dans une culture de la phase A, donc de la durée de cette phase. Elles interviennent encore dans les thalles de la phase B et agissent sur la vitesse d'élongation des filaments superficiels B. Ces corrélations correspondent à des interactions entre deux systèmes mycéliens I (intramatriciel) et S (superficiel) dont les activités physiologiques semblent différentes ; l'installation de la prédominance du système S caractéristique de la deuxième phase du développement est préparée au sein du mycélium aérien dressé issu de la ramification des filaments intramatriciels A.

Une deuxième série de corrélations intervient dans les thalles agrégés entre les divers centres de croissance. Elles sont responsables du nombre et de la localisation des centres de formation des palmettes, du nombre de centres actifs et enfin du nombre de rameaux actifs portés par les palmettes. Elles n'exercent qu'une action très faible sur la vitesse d'élongation des structures agrégées. Ces phénomènes ont pour origine la concurrence qui s'établit entre les centres de croissance pour des facteurs provenant de l'arrière ; ils se traduisent au niveau des zones inhibées par la perte de l'état agrégé et par l'arrêt de la croissance.

La mise en évidence des interactions qui s'exercent entre les différentes parties d'un thalle est un fait relativement récent alors que les corrélations intervenant au cours du développement des plantes sont

connues et étudiées depuis beaucoup plus longtemps (revue de ces phénomènes par CHAMPAGNAT, 1969 ; PHILIPS, 1969 ; WARDLAW, 1968 ; WAREING et PHILIPS, 1970).

Les corrélations décrites chez les Champignons peuvent s'exercer de manières très diverses. LARPENT (1966) a mis en évidence un phénomène de dominance apicale chez le Phialophora atra v. Beyma, caractérisé "par une vitesse de croissance de l'axe principal supérieure à celle de tous les rameaux latéraux et par l'accélération ou la reprise de croissance d'une ou plusieurs ramifications après ablation du sommet principal". Il a montré que chez d'autres espèces, le mycélium est le siège de corrélations plus originales portant sur la proportion de ramifications en croissance (Rhizoctonia solani Kühn et Neurospora crassa Shear et Dodge) ou sur la distance entre deux rameaux successifs (Saprolegnia monoïca Pringsheim et Achlya bisexualis Coker).

Des compétitions peuvent intervenir entre les apex des axes et d'autres centres de croissance, par exemple les ébauches de sclérotés du Corticium rolfsii (Sacc.) Curzi (GOUJON, 1967 a et b). En perturbant ces corrélations, on peut provoquer expérimentalement la formation de sclérotés au cours d'une phase du développement durant laquelle les ébauches n'apparaissent pas spontanément. On a décrit également des corrélations entre les régions âgées des filaments et leurs extrémités jeunes (CHEVAUGEON, 1959 ; CHEVAUGEON et NGUYEN VAN, 1969) : le facteur déterminant la zonation d'un mutant "vague" de l'Ascobolus immersus Fr. et du Podospora anserina Rehm siège dans les parties âgées de la culture et se propage par voie interne du centre vers la périphérie du thalle. Si on enlève chaque jour le centre du thalle en ne laissant en place que la marge en croissance, la culture reste non zonée.

Des corrélations sont susceptibles d'intervenir entre le mycélium végétatif et des organes différenciés. Ainsi la néoformation d'ébauches latérales sur les sporangiospores du Laccor prainii n'est importante que si les relations avec le mycélium végétatif sont maintenues (GAUDET DUPONT G., 1970). Les ébauches de sclérotés du Corticium rolfsii (HENIS et CHET, 1968), de même que les corémies du genre Doratomyces Corda (BRETON, 1971 b) ne poursuivent leur croissance et leur développement que lorsqu'elles restent en relation avec le mycélium végétatif environnant. Les relations entre mycélium libre et structures agrégées de type rhizomorphique que nous avons décrites dans l'introduction de ce mémoire sont du même type que les précédentes.

On connaît enfin des interactions qui s'exercent au cours de la croissance des carpophores massifs de certains Basidiomycètes ; BORRISS (1934) a montré que le développement des fructifications du Coprinus lagopus Fr. est stoppé si les lamelles sont excisées suffisamment tôt. Des substances de type hormonal seraient susceptibles d'intervenir ; ROBBINS et HERVEY (1959) pensent que au moins trois substances de croissance différentes jouent un rôle dans la formation des carpophores du Poria ambigua. Des chercheurs japonais (HAGIMOTO et KONISHI, 1959-1960 ; URAYAMA, 1956) ont montré que la courbure du stipe de l'Agaricus bisporus (Lange) Imbach et de l'A. campestris L. ex Fr. qui suit l'ablation des lames sur un côté seulement du chapeau serait due à l'influence de substances hormonales, synthétisées dans les lamelles, sur l'élongation du stipe.

Des corrélations très diverses sont donc susceptibles de s'exercer au sein des thalles construits par les Champignons. Les interactions entre les parties immergées et superficielles d'un mycélium végétatif constituent un nouveau type de corrélations. Le L. lignosus offre le premier exemple étudié d'interactions de cette nature et le premier exemple de contrôle, chez les Champignons, d'un phénomène de différenciation par la modification de ces interactions.

Les corrélations entre les centres de croissance du thalle agrégé ressemblent beaucoup à celles décrites chez le Corticium rolfsii et, dans une certaine mesure, aux phénomènes de dominance apicale si l'on admet que les interactions s'exercent non pas au niveau des apex des filaments comme chez le Phialophora atra mais au niveau des groupes d'apex représentés par les points de croissance des structures agrégées.

CHAPITRE IV

MANIFESTATION ET DETERMINISME DES PHENOMENES DE POLARITE

Dans les conditions naturelles, le cycle de développement du L. lignosus met en jeu deux phénomènes principaux : l'envahissement de substrats nutritifs par des filaments libres et la propagation par les structures agrégées. Lorsqu'un substrat est envahi, le parasite l'exploite dans sa totalité ; les filaments ont la possibilité de croître uniformément dans toutes les directions de l'espace. D'un point de vue théorique, on peut considérer que la propagation loin en avant du foyer d'infection constitué par un substrat envahi de la manière précédente, sera d'autant plus efficace qu'elle s'effectuera plus longtemps dans une seule direction. En effet, elle aboutira à un épuisement moins rapide des réserves nutritives du substrat que si la croissance des filaments se poursuit dans toutes les directions. Or, c'est précisément ce qui se réalise avec les structures agrégées qui assurent la progression en avant par un faisceau de filaments croissant dans une seule direction, l'envahissement latéral à partir de ces faisceaux étant lui-même limité au nombre de rameaux actifs portés par la palmette. La manifestation d'une propriété dans une seule direction de l'espace, ici la croissance, correspond à la définition même de la polarité. L'examen du L. lignosus dans les conditions naturelles permet donc de conclure que seul le mycélium agrégé est polarisé.

Les résultats de l'étude morphologique des cultures réalisées in vitro à partir d'une basidiospore confirment les conclusions précédentes et apportent un début d'explication de ce phénomène. Toute structure filamenteuse est polarisée du fait de l'orientation de la croissance. La morphologie des filaments qui participent à l'édification des thalles du L. lignosus montre que l'orientation de leur croissance est de plus en plus stricte au fur et à mesure qu'ils évoluent vers l'état agrégé. La réduction de la vitesse d'émission des rameaux et de l'angle de ramification observée quand on passe du filament A au filament B puis aux filaments agrégés est conforme à cette constatation. Ces caractéristiques conduisent à un envahissement uniforme du substrat aussi bien en profondeur qu'en surface par les

filaments non agrégés et à un envahissement très inégal des milieux gélosés par les organes rubannés que sont les premières structures agrégées.

La morphologie des thalles obtenus à partir de boutures faites de chacun des trois types mycéliens considérés précédemment fait apparaître une polarité de régénération et donne de plus une technique expérimentale permettant de l'analyser. En effet, les boutures de grande taille prélevées dans une culture jeune de la phase A régénèrent sur milieu malté de manière uniforme sur leurs différentes faces ; lorsque des boutures identiques sont prélevées de la même façon dans des cultures de la phase B ou dans du mycélium agrégé, elles régénèrent d'emblée des filaments B du côté apical, des filaments A puis B après un délai variable, du côté basal des boutures. La croissance beaucoup plus lente des filaments A par rapport aux filaments B suggère ainsi un moyen simple de chiffrer l'intensité de la polarité : il suffit de calculer le rapport entre les croissances radiales mesurées du côté apical et du côté basal de la bouture. Plus ce rapport est élevé et plus la polarité est intense ; la valeur 1 indique l'absence de polarité.

Les mêmes boutures repiquées sur un milieu permettant l'agrégation manifestent leur polarité par le nombre de palmettes apparues sur les différentes faces de la bouture et par le délai nécessaire à leur apparition.

Des essais préliminaires ayant montré que la polarité de régénération se traduit de manière analogue sur les deux types de substrat, la majorité de nos expériences ont été réalisées sur le milieu malté d'un emploi plus facile. Grâce à cette technique, nous avons pu étudier avec précision la manifestation de la polarité chez les différents types mycéliens du L. lignosus, et sa mise en place au cours du développement, puis aborder le problème du déterminisme de ces phénomènes.

A - MANIFESTATION DE LA POLARITE DES DIFFERENTS TYPES MYCELIENS.

La technique précédente a été appliquée aux différents types mycéliens du L. lignosus afin d'avoir une preuve expérimentale de la présence ou de l'absence de ces phénomènes et de déterminer les conditions de leur manifestation et de leur maintien.

Pour éliminer une action éventuelle du milieu sous-jacent, toutes les cultures-mères ont été réalisées sur une membrane de cellophane. Selon le substrat choisi et la taille de la bouture repiquée, on obtient à

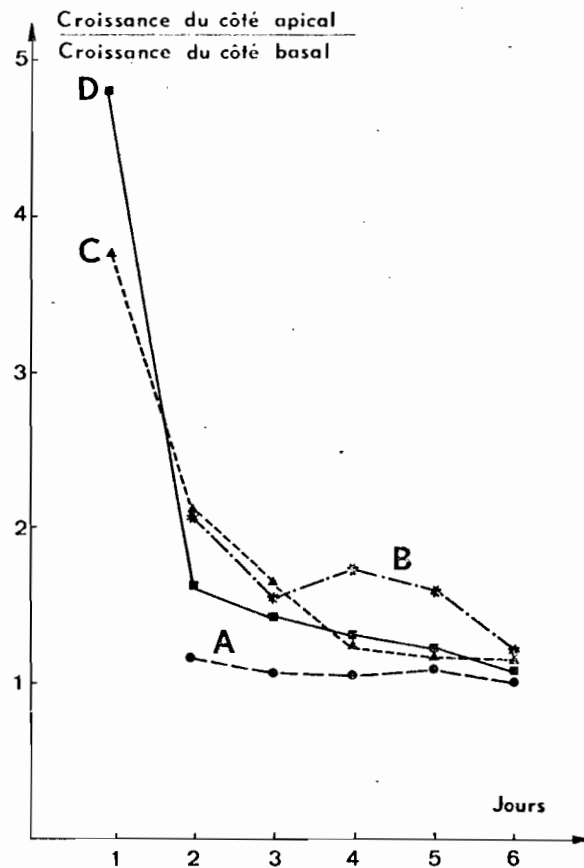


FIGURE 14

Les manifestations de la polarité sur milieu malté au cours de la régénération de boutures de différents types

- A : mycélium de type A - bouture 7 x 7 mm.
- B : mycélium de type B - bouture 7 x 7 mm.
- C : mycélium de type B - bouture 15 x 15 mm.
- D : mycélium agrégé - palmette de 1,5 cm de longueur.

volonté des thalles qui se développent dans la phase A ou dans la phase B, ou des structures agrégées. Les boutures sont prélevées dans la marge en respectant les apex en croissance. Leur taille a été choisie à la suite d'essais préliminaires ; par suite des caractéristiques du développement (taille réduite des jeunes thalles de la phase A en particulier) et de la morphologie très différentes des structures libres et agrégées, il n'est pas possible de choisir des boutures de taille uniforme. Les explantats faits de filaments A mesurent 7 mm de côté ; ceux qui emportent des filaments B ont la même taille ou des dimensions supérieures (15 x 15 mm) ; enfin, les boutures de mycélium agrégé sont constituées par des palmettes de 2,5 cm de longueur. L'existence de boutures de deux tailles différentes pour les prélèvements faits dans les thalles de la phase B permet de comparer les résultats obtenus aussi bien avec le mycélium de type A qu'avec les structures agrégées, ces dernières emportant une quantité de mycélium à peu près équivalente à celle des boutures de 15 mm de côté faites de filaments B.

Des courbes de la fig. 14, il ressort que les boutures prélevées dans un thalle de la phase A régénèrent de façon uniforme sur toutes leurs faces (courbe A) ; le rapport entre la croissance du côté apical et basal des semis reste toujours voisin de 1, ce qui traduit l'absence totale de polarité.

En revanche, ce phénomène est très intense, dès le début de la régénération, pour les boutures faites de filaments B et pour les structures agrégées (courbes C et D) ; son intensité diminue rapidement et devient très faible dans les thalles âgés de 4 à 6 jours. La polarité des jeunes thalles est plus marquée quand ils proviennent de structures agrégées mais elle disparaît un peu plus rapidement. Les filaments B régénèrent de manière polarisée même quand la bouture est de taille réduite (courbe B), égale à celle des semis faits de filaments A. Malgré les variations de taille des boutures, la comparaison entre la polarité de chaque type de filament reste donc tout à fait valable.

La polarité des filaments B et des structures agrégées se manifeste également quand les boutures régénèrent sur un milieu autorisant l'agréga-
tion. Des boutures de grande taille prélevées dans le front de croissance d'une culture de la souche H4 qui se développe dans la phase B, ne régénèrent pratiquement pas sur les bords latéraux et basal du semis ; en revanche, de nombreuses palmettes apparaissent rapidement sur la face

apicale de la bouture, là où les apex en croissance n'ont pas été lésés. On observe les mêmes réactions quand des palmettes de grande taille sont repiquées sur un milieu permettant l'agrégation.

En conclusion, il ressort que la polarité de régénération se manifeste de manière à peu près identique à partir des filaments B et des structures agrégées. L'acquisition de cette polarité n'est donc pas propre à la palmette. Comme les filaments A ne la possèdent pas, il est certain que la différenciation qui fait apparaître cette propriété se produit entre la phase A et la phase B. C'est ce que nous essaierons de déterminer maintenant.

B - MISE EN PLACE DE LA POLARITE AU COURS DU DEVELOPPEMENT.

L'étude réalisée au deuxième chapitre sur les conditions de mise en place du délai nécessaire à l'apparition des filaments B a fait ressortir que des boutures prélevées dans le front de croissance de cultures de la phase A peuvent régénérer de manière polarisée et donner naissance à des individus mixtes de type B du côté apical, de type A sur les faces basale et latérales. La polarité de régénération peut donc se manifester à partir de boutures prélevées dans un thalle qui n'a pas encore atteint le stade B de son développement. Des mesures précises, basées sur la technique d'estimation de la polarité ont permis de confirmer les faits précédents.

La polarité est donc mise en place en même temps que la différenciation physiologique, liée à l'apparition du mycélium aérien dressé, qui précède la naissance des filaments B.

C - DETERMINISME DE LA POLARITE.

Après avoir étudié les caractéristiques de la manifestation et du maintien de la polarité des filaments B et des structures agrégées, il nous faut maintenant rechercher quel est son déterminisme. Ce travail peut être abordé en étudiant l'action des facteurs internes sur ce phénomène.

1 - Action des facteurs internes sur la polarité.

Les essais de bouturage à partir de thalles de la phase B (Ch. II) ont montré que la régénération de cultures asymétriques n'a lieu que lorsque les boutures sont prélevées dans les zones apicales ou sub-apicales. Les apex des filaments semblent donc intervenir dans les phénomènes de polarité

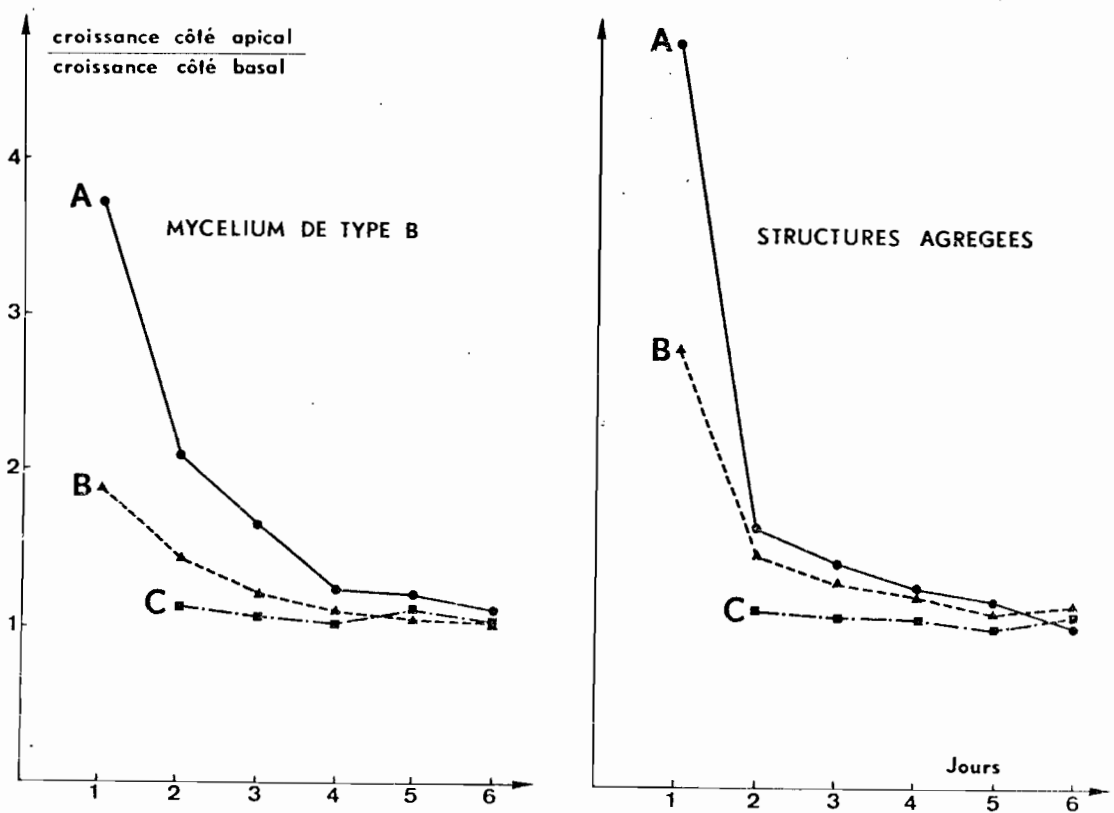


FIGURE 15

Etude de l'influence des apex dans la polarité des filaments B et des structures agrégées

A : boutures prélevées sans léser les apex.

B : boutures prélevées à quelques millimètres en arrière du front de croissance.

C : boutures prélevées loin en arrière du front de croissance.

Les caractéristiques exactes des boutures sont mentionnées dans le texte

a - Rôle des apex.

L'influence des apex a été déterminée en comparant la polarité de boutures prélevées dans la marge en croissance avec celle de boutures prélevées en arrière de la marge.

Les explantats de mycélium non agrégé sont découpés dans des thalles âgés de 5 jours, dans le front de croissance ou à 0,5 cm en arrière, ou dans des cultures âgées de 12 jours ayant envahi la boîte de Pétri depuis 6 jours environ. Les boutures de mycélium agrégé sont constituées par des palmettes de 2,5 cm de longueur avec leur zone apicale ou après ablation de celle-ci sur 2 à 3 mm, ou par des fragments de palmettes de 2 cm de long prélevées à 2 ou 3 cm en arrière de la marge ; ces deux séries d'explantats sont découpées dans des cultures-mères âgées respectivement de 9 à 12 jours. La polarité de régénération est estimée sur milieu malté par la technique habituelle.

Les courbes A et B de la figure 15 montrent que les boutures prises juste en arrière de la marge en croissance régénèrent encore de manière polarisée. Cependant, l'intensité du phénomène et son maintien au cours du temps sont considérablement réduits par rapport à ceux mesurés à partir de boutures emportant les apex des filaments. La polarisation disparaît complètement quand les explantats sont prélevés encore plus loin en arrière de la marge en croissance (fig. 15 - courbe C) ; la régénération étant plus lente dans ce dernier cas, les premières mesures de croissance n'ont pu être effectuées que 48 heures après le repiquage.

Des résultats identiques ont été obtenus lorsque les boutures sont ensemencées sur un milieu autorisant l'agrégation. Cependant, l'examen du mode de régénération de semis faits de mycélium non agrégé apporte des informations supplémentaires.

Les expériences ont été réalisées avec des boutures rectangulaires mesurant 5 x 30 mm, la longueur étant orientée selon la direction de la croissance. La forme de la bouture, différente de celle utilisée précédemment, permet de repérer avec plus de précision la position des palmettes sur les différentes faces de l'explantat ; on compte le nombre de palmettes apparues dans des zones correspondant au tiers apical ou proximal, au tiers

Age de la culture mère	Lieu de prélèvement	Nombre de palmettes régénérées			Rapport apical/basal (Nbre de palmettes)	Croissance apicale/basale
		côté apical	côté basal	côtés latéraux		
5 j	dans la marge	7,6	0,2	0	38,0	très gr
6 j	à 0,5 cm en arrière de la marge	3,4	1,7	1,7	2,0	1,46
10 j	à 3,5 cm du semis initial	8,7	7,3	0,3	1,19	1,13
12 j	à 3,5 cm du semis initial	7,3	7,8	1,0	0,94	0,98
16 j	à 3,5 cm du semis initial	9,7	9,0	2,0	1,08	0,98

Les chiffres représentent la moyenne des mesures effectuées sur 20 thalles de chaque série.

TABLEAU V

Etude de la polarité du mycélium de la phase B manifestée au cours de la régénération de structures agrégées

médian et au tiers basal des boutures. On mesure également le délai nécessaire à l'apparition des structures agrégées et leur croissance radiale.

La polarité des boutures prélevées dans la marge se manifeste par la localisation très stricte des palmettes dans la zone apicale (tabl. V). Elle s'atténue quand les boutures sont prélevées à 0,5 cm en arrière du front de croissance mais apparaît encore assez nettement dans l'élongation des structures agrégées. Elle disparaît complètement quand les prélèvements sont faits de plus en plus loin en arrière de la marge, dans des cultures d'âge croissant. L'utilisation de milieux autorisant l'agrégation permet, en outre, de mettre en évidence des phénomènes de polarité qui persistent beaucoup plus longtemps que sur milieu malté et sur lesquels les apex n'exercent plus aucune influence. En effet, la régénération reste assez rare sur les faces latérales des boutures, même quand ces dernières sont prélevées dans du mycélium très âgé. La polarité qui se manifeste dans ces conditions est liée à l'orientation des filaments dans le semis.

Les deux types de polarité apparaissent très nettement quand des structures agrégées de grande taille sont repiquées sur un substrat permettant l'agrégation. Nous avons vu précédemment (ch. II, p. 46) que, dans les cas les plus typiques, après un arrêt momentané de la croissance, les rameaux de la palmette poursuivent seuls leur élongation et qu'il ne se forme pas de nouvelles structures agrégées sur les faces basale et latérale de la bouture. Ces résultats tendent à prouver que les structures agrégées sont le siège d'une polarité plus intense que les filaments libres.

L'ensemble des expériences précédentes met en évidence le rôle joué par les apex dans la polarité. Mais la présence des apex ne suffit pas, dans certaines conditions, à maintenir la manifestation de ce phénomène. En effet lorsque les boutures sont de taille suffisamment petites, elles régénèrent des thalles non polarisés de la phase A. La masse de mycélium emportée par le semis intervient donc dans les phénomènes de polarité.

b - Influence de la quantité de mycélium emportée par la bouture.

Nous avons utilisé, pour cette étude, des boutures découpées dans le front de croissance de cultures de type B, la taille minimale correspondant aux éléments les plus petits qu'il est techniquement possible de prélever.

Le repiquage de filaments B isolés, portant de 1 à 4 rameaux, ne modifie généralement pas leur croissance ; dans quelques cas seulement, on observe la régénération d'un nouvel apex dans la zone sub-apicale. Mais, rapidement, le filament et les différents rameaux pénètrent dans le substrat et se développent dans la phase A. Cette réversion ne se produit pas si on bouture en masse des filaments beaucoup plus longs. Ceci est démontré facilement à partir de semis, prélevés dans la marge de cultures de type B, dont la largeur est constante (2,5 mm) et la longueur croissante (2,5 à 12,5 mm). On peut dire schématiquement qu'ils emportent toujours le même nombre de filaments ; seule leur longueur est variable. Or, ces boutures ne donnent lieu à la manifestation et au maintien des phénomènes de polarité que lorsqu'elles sont suffisamment longues.

Les boutures de différentes tailles faites de mycélium agrégé se comportent de la même manière que les précédentes. Les plus petites sont constituées par des rameaux de palmettes, faits de filaments très agrégés, coupés à 0,5 cm en arrière de la zone apicale ; elles régénèrent des thalles très nettement polarisés comportant des filaments B du côté apical et des filaments A du côté basal. Mais, plus ou moins rapidement, les filaments B plongent dans le milieu et le thalle tout entier se développe dans la phase A. Quand les boutures sont de plus grande taille (1 cm), elles donnent naissance à des cultures polarisées semblables à celles provenant de palmettes de 2,5 cm de long.

La polarité peut donc se manifester à partir de fragments de filaments comportant un tout petit nombre de cellules. Cela démontre de manière évidente que ce phénomène est une propriété des files de cellules constituant le filament et que la polarité de régénération traduit la polarité des filaments eux-mêmes. Mais, les expériences précédentes prouvent également que la polarité est en relation avec la stabilité des caractères mycéliens B ; ce phénomène ne persiste, en effet, que si la bouture est de taille suffisante.

c - Conclusions.

L'étude de l'influence de quelques facteurs internes sur la polarité permet de tirer trois conclusions essentielles :

- Le phénomène semble plus intense sur les structures agrégées que sur les filaments B libres ; cela apparaît aussi bien dans la régénération qui suit immédiatement le repiquage que dans les résultats obtenus par l'ensemencement de boutures de différentes tailles.

- La comparaison des résultats obtenus sur le milieu malté qui ne permet pas l'agrégation et sur un substrat qui l'autorise semble indiquer que polarité et agrégation pourraient, au moins en partie, dépendre d'un même déterminisme.

- Enfin, les phénomènes de polarité dépendent étroitement de la présence d'apex fonctionnels d'une part, de la masse mycélienne située en arrière de ceux-ci d'autre part. On est ainsi tenté de les expliquer par le drainage sous l'influence des apex en croissance et dans leur direction, de substances synthétisées en arrière de la marge par les cellules plus âgées. C'est avec cette hypothèse de travail que nous avons abordé l'étude du déterminisme de la polarité.

2 - Déterminisme des phénomènes de polarité.

L'hypothèse énoncée ci-dessus suppose que trois facteurs différents entrent en jeu pour aboutir à la manifestation de la polarité : la synthèse de substances dans les cellules situées en arrière de la marge, le transport de ces substances par les filaments, et le drainage en direction des apex en croissance.

Le rôle des apex, que nous avons démontré précédemment, peut théoriquement s'exercer de deux manières, soit par drainage de substances en provenance de l'arrière, soit par émission d'inhibiteurs qui migrent vers l'arrière et empêchent la régénération des filaments E. Le choix entre ces deux hypothèses peut être fait à partir d'expériences dans lesquelles on fait varier, dans les boutures, le rapport relatif entre le nombre d'apex en croissance et la masse de mycélium située en arrière. Si les apex exercent leur action par l'intermédiaire d'un inhibiteur, plus ce rapport sera faible, et moins la polarité sera intense ; en effet, l'inhibiteur sera dilué dans une plus grande masse de mycélium. C'est l'inverse qui devrait se produire dans la deuxième hypothèse. Or, nous avons vu dans l'expérience mettant en jeu des boutures de 2,5 mm de largeur et de longueur croissante (2,5 à 12,5 mm) que la polarité ne se manifeste que lorsque la bouture est suffisamment longue. Il faut donc admettre que les apex exercent leur action par drainage de substances provenant de l'arrière des thalles.

Cela est encore plus évident quand on considère la polarité manifestée au cours de la régénération de structures agrégées. Nous avons vu précédemment que les phénomènes de corrélation entre centres en croissance d'un thalle agrégé s'expliquent par une compétition pour des substances provenant

de l'arrière du thalle. On comprend mal pourquoi l'inhibition de la formation des palmettes dans la zone basale d'une bouture polarisée serait due à un autre type de phénomène.

Le drainage en direction des apex peut théoriquement porter sur des substances synthétisées dans le mycélium âgé ou sur des substances absorbées dans le milieu et transportées sans modification vers les zones en croissance. Dans le premier cas, le phénomène doit être indépendant du substrat, au moins au début de la régénération ; dans le second, au contraire, la valeur nutritive du substrat devrait intervenir. Des expériences effectuées avec des boutures identiques ensemencées sur de l'eau gélosée (20 g/l) et sur des milieux gélosés contenant 1 g/l et 20 g/l d'extrait de malt montrent que la composition nutritive du substrat est sans action. Il est donc vraisemblable que le drainage s'effectue sur des substances synthétisées au sein du mycélium, en arrière de la zone en croissance.

Les relations entre les transports par les filaments et les phénomènes de polarité ont été étudiés de deux manières.

On ne connaît pas la nature chimique des substances qui agissent dans les phénomènes de polarité. Il est donc difficile de démontrer qu'elles sont transportées par les filaments. Néanmoins, on peut montrer que le transport de substances nutritives est possible dans les hyphes du L. lignosus. L'utilisation d'un dispositif expérimental identique à celui utilisé par SCHUTTE (1956) et LARPENT (1966) qui oblige le Champignon à se développer sur deux milieux juxtaposés dont l'un est déficient en une substance nutritive, a permis de montrer que les transports de substances azotées sont possibles dans les deux sens.

On sait par ailleurs qu'il existe des inhibiteurs des mouvements cellulaires à l'intérieur des hyphes ; GOUJON (1965) a montré que le PCMB (acide para-chloro-mercuri-benzoïque) exerce une telle action sur le Trachysphaera fructigena Tab. et Bunt. En supposant que cette substance agisse de la même manière sur le L. lignosus, on a alors un moyen simple d'interdire les transports par les filaments. L'introduction de PCMB dans un milieu malté à la concentration finale de 10^{-3} M a permis d'empêcher la manifestation de la polarité chez des boutures possédant cette propriété.

24 heures après le bouturage, les filaments B de la zone apicale semblent avoir perdu individuellement toute polarité de croissance : leur parcours est en effet très sinueux, souvent avec des retours en arrière. La croissance n'est cependant pas totalement stoppée car, 48 heures après l'ensemencement, elle a repris sur les quatre faces de la bouture et met en jeu à la fois des filaments A et B dont la répartition ne traduit plus aucune polarisation de la bouture ; l'absence de polarité est confirmée dans la suite du développement par la forme des thalles.

On peut donc attribuer la polarisation des filaments B et des structures agrégées à l'influence des apex par l'intermédiaire du drainage vers les extrémités en croissance de substances synthétisées en arrière. Si, en effet, on interdit les transports par les filaments, on n'observe plus aucune polarité de régénération.

D - RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

La polarité est sans doute la différenciation la plus rapidement mise en place au cours de l'édification des organismes vivants et sa perte au cours de la reproduction sexuée n'est en général que de très courte durée.

Cependant, son intensité peut être très variable. Chez les Champignons, la structure filamenteuse et la localisation de la croissance à l'apex des hyphes constitue un cas typique de polarité de structure et de fonction. Mais, selon l'intensité avec laquelle se manifeste cette propriété, le mycélium construit à partir de ces éléments peut ou non refléter dans sa structure la polarité des filaments qui le constituent. Les phénomènes que nous venons d'étudier chez le L. lignosus constituent une illustration particulièrement frappante de cette situation.

Nous avons vu, en effet, que les différents types mycéliens qui participent successivement à l'édification des thalles issus d'une basidiospore sont de plus en plus nettement polarisés. L'intensité croissante de cette propriété se traduit aussi bien dans la morphologie des filaments que dans le mycélium qu'ils construisent. Elle apparaît également de manière très nette au cours du bouturage. La polarité des hyphes est une propriété acquise par les filaments B ; elle persiste, en se renforçant, lorsque ces filaments subissent de nouvelles différenciations, en particulier, lorsqu'ils s'agrègent.

Les résultats d'expérience tendant à supprimer l'action des apex et à interrompre le transport de substances par les filaments sont en faveur de l'interprétation de ces phénomènes par un mécanisme mettant en jeu le drainage en direction des apex et, sous leur influence, de substances provenant de l'arrière.

Les relations entre les phénomènes de polarité et le développement des êtres vivants ont déjà donné lieu à de nombreuses études. Parmi les écrits les plus récents, consacrés aux organismes végétaux, citons les mises au point générales de BLOCH (1965), BONNER (1952), CHAMPAGNAT (1969), SINNOT (1960), WARDLAW (1968), WAREING et PHILIPS (1970) et WETTSTEIN (1965).

Chez les Champignons, la structure filamenteuse et la localisation de la croissance à l'apex des hyphes constitue un cas typique de polarité de structure et de fonction.

La polarité de structure apparaît dans la morphologie du filament mais également dans la répartition des constituants du cytoplasme. Les études faites par ZALOKAR (1965) sur les cellules apicales du Neurospora sp. montrent que la zone située tout à fait à l'apex est remplie d'un cytoplasme qui contient de longues mitochondries filamenteuses mais pas de noyau. Ce cytoplasme est plus riche en protéine, RNA et phosphatase alcaline que la partie moyenne de la cellule mais ne contient pas de réserves ; le glycogène disparaît, en effet, près de l'extrémité des hyphes. Enfin, la partie distale est très pauvre en cytoplasme mais contient en revanche, de nombreuses vacuoles. La répartition des différents organites à l'intérieur des hyphes ainsi que celle de plusieurs enzymes explique la polarité de fonction du filament : la partie apicale est spécialisée dans la synthèse de nouvelles parois cellulaires alors que la partie moyenne semble assurer la plupart des autres activités de croissance ; le cytoplasme a tendance à migrer de l'arrière vers l'avant. Les travaux de ZALOKAR mettent bien évidence l'importance des apex et le rôle des échanges entre les différentes parties de la cellule, par l'intermédiaire des transports, dans les phénomènes de polarité du filament.

La polarité de structure et de fonction des hyphes se traduit fréquemment au cours de la régénération ; c'est le cas des filaments jeunes du Rhizoctonia solani (LARPENT, 1962) et des sporangiophores du Mucor Prainii (DUPONT et JULIEN, 1969 ; GAUDET-DUPONT, 1971) et, dans une certaine mesure, des filaments B isolés du L. lignosus. La polarité de régénération peut aussi

se manifester à partir d'organes agrégés. Nous venons de le montrer avec les palmettes du L. lignosus ; les corémies du genre Doratomyces (BRETON, 1971 b) et les rhizomorphes de l'Armillariella mellea (GUILLAUMIN, 1967) possèdent également cette propriété.

Les phénomènes décrits par ZALOKAR (loc. cit.) au niveau du filament permettent d'expliquer la polarité de régénération décrite à propos du L. lignosus. Il est probable que des différences dans l'intensité des phénomènes de transport ou dans la nature des substances transportées sont à l'origine d'une part, de l'absence de polarité de régénération chez les filaments A, d'autre part, de la polarité plus marquée chez les filaments agrégés que chez les filaments B.

Le maintien de la polarité dépend, chez le L. lignosus, de la masse de cellules situées en arrière des apex. Des phénomènes du même ordre ont été observés chez l'A. mellea (GUILLAUMIN, 1967) et chez des Algues, en particulier le Draparnaldia mutabilis (Roth.) Bary (LARPENT, 1968). Chez notre organisme, cette dépendance provient du fait que la polarité met en jeu des substances synthétisées par le thalle en arrière de la marge en croissance.

Les mécanismes de transport doivent être particulièrement actifs dans les filaments agrégés du L. lignosus puisque les palmettes sont capables de se développer sur des milieux totalement dépourvus de substances nutritives. Les résultats d'expériences, actuellement en cours, avec des éléments marqués sont en accord avec cette constatation. La mise en place de la polarité dès le stade B du développement doit donc être considérée comme faisant partie des différenciations qui, au sein du mycélium libre, préparent l'agrégation. L'étude du déterminisme de l'agrégation que nous entreprenons maintenant, va nous montrer que ce n'est pas la seule.

CHAPITRE V

DETERMINISME DE L'AGREGATION - ROLE DES FACTEURS INTERNES DANS L'INITIATION ET LE DEVELOPPEMENT DES PALMETTES CHEZ LE L. LIGNOSUS

Les études morphologiques décrites dans le premier chapitre de ce mémoire ont montré que les filaments du L. lignosus peuvent, ou bien croître côte à côte et envahir uniformément le substrat, ou bien constituer des faisceaux et assurer une occupation très inégale du milieu environnant par des organes agrégés appelés palmettes. Ces formations assurent l'élongation des structures agrégées et constituent les initiums de rhizomorphes. La palmette étant le premier organe agrégé apparu au cours du développement, c'est à son niveau que nous étudierons le déterminisme de l'agrégation.

Jusqu'à maintenant, nous avons mis en évidence le rôle régulateur des mécanismes de corrélations qui s'exercent d'une part, entre le mycélium d'un thalle non agrégé et les palmettes qu'il différencie et, d'autre part, au sein de la palmette elle-même. Nous avons comparé les polarités de structure et de régénération entre le mycélium construit à partir de filaments libres et les organes agrégés et montré qu'elles s'accroissent chez ces derniers. Il reste à aborder le mécanisme de l'agrégation, c'est-à-dire à déterminer la nature des informations nécessaires à l'initiation et au maintien de l'état agrégé.

Certains résultats obtenus précédemment permettent d'orienter nos recherches. Rappelons, en effet, que le maintien de l'agrégation au niveau de la marge en croissance n'est pas assuré, d'une part (Ch. II p. 46) quand on transporte un thalle agrégé du substrat permettant l'agrégation sur lequel il s'est développé sur un substrat neuf de même composition, d'autre part, (Ch. II p. 46) quand on interdit les transferts entre un thalle non agrégé et les palmettes qu'il régénère. Ces résultats sont favorables à l'intervention d'informations circulant à la fois par voie externe et par voie interne. Nous étudierons successivement la nature de ces informations et leurs effets non seulement sur le maintien de l'état agrégé mais également sur son initiation.

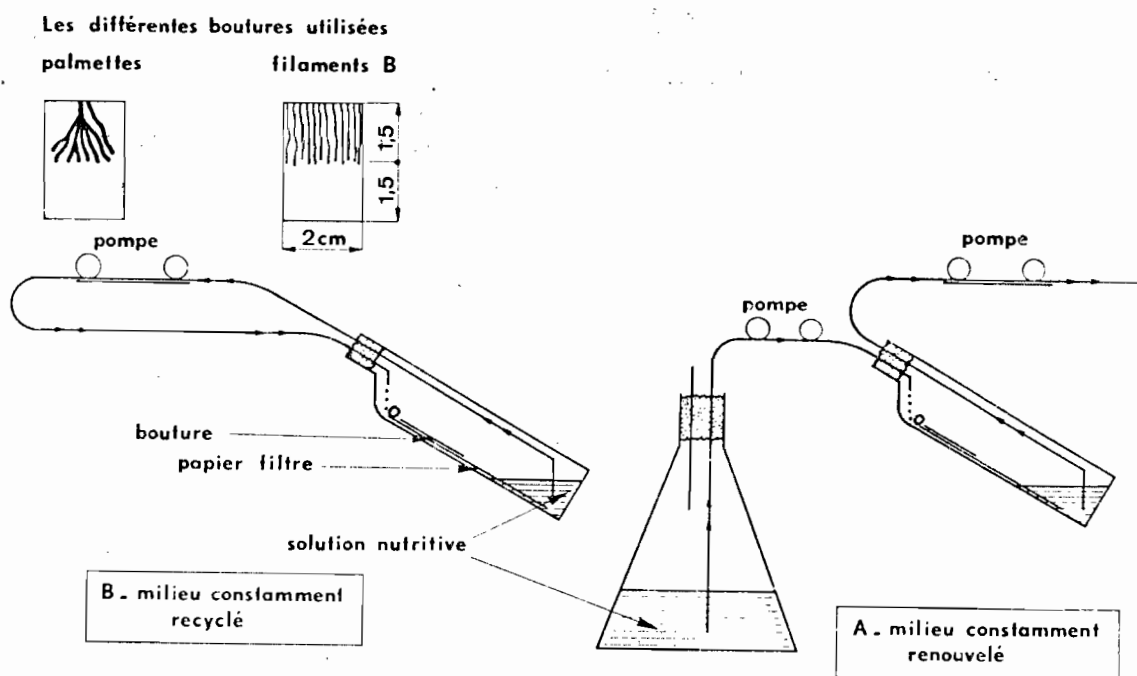


FIGURE 16

Techniques expérimentales utilisées pour réaliser des cultures sous un écoulement continu de substrat nutritif

A - ACTION INDUCTRICE DES SUBSTANCES DIFFUSIBLES EXCRETEES PAR LE THALLE DANS LE
===== SUBSTRAT. =====

Les expériences que nous venons de rappeler tendent à prouver que le milieu de culture est altéré par les palmettes en croissance et que ces altérations jouent un rôle dans l'agrégation puisque l'état agrégé ne se maintient pas à la suite du transfert du thalle sur un substrat neuf de même composition. La nature et le mode d'action des informations qui transitent par l'intermédiaire du milieu ont été étudiés en utilisant des conditions expérimentales telles que les altérations du substrat sous l'influence du thalle en croissance soient interdites ou modifiées.

1 - Mise en évidence de l'excrétion dans le substrat de substances inductrices de l'agrégation.

Dans une première série d'expériences, nous avons renouvelé constamment le milieu de culture au contact des thalles en croissance.

Le dispositif expérimental utilisé est le suivant (fig. 16 A). Des rectangles de papier filtre placés sur un support incliné (fond d'une boîte de Roux) sont imbibés en permanence par une solution nutritive permettant l'agrégation. Cette solution s'écoule goutte à goutte avec un débit de 330 ml/24 heures et est éliminée après son passage sous la culture. Le substrat MS₁ de pH 4,5 utilisé dans ces expériences contient 20 g/l de glucose et 2 g/l d'asparagine. Des boutures faites de filaments libres ou de mycélium agrégé sont déposées sur le papier filtre. Les premières sont découpées dans le front de croissance de thalles de la phase B obtenus sur une membrane de cellophane, leurs dimensions étant de 1,5 x 2 cm. Le découpage des boutures est fait de manière telle qu'il reste en avant du front de croissance une surface de cellophane libre à peu près équivalente à celle de la bouture (fig. 16). Les semis de mycélium agrégé sont constitués par des palmettes de 1,5 x 2 cm de long découpées de la même manière que précédemment (fig. 16). Le développement des thalles s'effectue donc sur une membrane de cellophane au contact d'un substrat qui circule en permanence par diffusion dans le papier filtre sous-jacent et qui est constamment renouvelé. Des témoins sont réalisés avec le même dispositif mais le papier filtre est imbibé par la solution nutritive déposée au fond du récipient de culture.

Les résultats de ces expériences sont parfaitement constants. Quand la bouture emporte des filaments libres de la phase B, des palmettes se différencient dans la condition témoin. Lorsque le substrat est renouvelé en permanence, il apparaît, en général, un massif de mycélium aérien dressé dans la zone subapicale de la bouture mais ce centre de formation ne différencie jamais de palmettes. Deux types de réactions peuvent se produire au contact du milieu. Certains filaments rampants s'arrêtent de croître par suite de l'éclatement des apex et du rejet du protoplasme sur la membrane de cellophane. D'autres continuent à s'allonger à une vitesse d'environ 0,5 mm par jour ; ils ne sont plus agrégés et se ramifient fréquemment, les rameaux faisant avec l'axe qui leur a donné naissance un angle voisin de 45°. Ces réactions morphologiques correspondent à celles que présentent les filaments B lorsqu'ils arrivent au contact d'un substrat autorisant l'agrégation et qu'ils n'évoluent pas vers la forme agrégée (p. 20).

Les résultats sont identiques lorsque les boutures sont constituées par des palmettes de 1,5 à 2 cm de long. La régénération donne naissance dans la marge à des filaments non agrégés rampants ou dressés, puis à des structures agrégées en continuité avec celles de la bouture, dans la condition témoin. En revanche, lorsque la solution nutritive est renouvelée en permanence, la croissance des palmettes est définitivement arrêtée ; seuls les filaments libres intensément ramifiés continuent à s'allonger.

En conclusion, dans nos conditions expérimentales, l'agrégation ne peut ni apparaître, ni se maintenir si la solution nutritive autorisant l'agrégation est constamment renouvelée au contact de la bouture. On en déduit que le milieu sous-jacent est transformé par les filaments en croissance. Cette action peut théoriquement s'exercer de deux manières : ou bien les filaments prélèvent des substances dans le substrat ou bien, au contraire, ils excrètent des facteurs chimiques dans le substrat.

Le choix entre ces deux hypothèses peut être fait en réalisant des expériences de lavage semblables aux précédentes mais avec de l'eau à la place d'une solution nutritive. Quand des bûchettes de bois d'Hévéa envahies par le L. lignosus sont ensemencées dans les mêmes conditions que précédemment sur une membrane de papier filtre imbibée d'eau, elles différencient des palmettes si l'eau reste stagnante au fond du récipient de culture alors qu'elles ne le font jamais si l'eau est renouvelée en

permanence sous la bûchette. Ces résultats permettent d'éliminer à coup sûr la première hypothèse énoncée précédemment et impliquent que l'altération du substrat conduisant les thalles à croître sous forme agrégée est due à l'excrétion dans le substrat de substances diffusibles synthétisées par les filaments en croissance. Ces substances jouent un rôle inducteur dans l'agrégation puisque, lorsqu'elles sont éliminées, les palmettes ne peuvent ni apparaître, ni maintenir leur structure agrégée.

2 - Accumulation des substances excrétées dans le substrat et ses conséquences.

Nous venons de voir que les substances inductrices de l'agrégation sont excrétées par les filaments en croissance. Que se passe-t-il lorsque les conditions expérimentales sont telles que ces substances peuvent, au moins théoriquement, s'accumuler dans le substrat ?

Avec le dispositif utilisé précédemment, cet objectif sera atteint si la solution nutritive, après avoir diffusé dans le papier filtre sous le thalle en croissance, est reprise à nouveau pour le lavage (fig. 16 B). Nous avons ainsi recyclé 100 ml de milieu MS₁ de pH 4,5 contenant 2 g/l d'asparagine. Dans ces conditions, les palmettes apparaissent en grand nombre 48 heures après la mise en culture. Ce résultat tend à prouver que les substances actives s'accumulent dans le substrat et que cette accumulation permet la différenciation des palmettes, même lorsque la solution nutritive s'écoule continuellement sous le thalle en croissance.

Ces conclusions ont été confirmées et précisées en faisant varier les conditions de l'accumulation, donc la quantité de substances actives présente dans le substrat.

La technique utilisée consiste à recycler des volumes de solution nutritive de plus en plus grands, de 40 ml à 5 litres dans nos expériences. Dans ces conditions, les structures agrégées apparaissent d'autant moins rapidement que le volume de substrat est plus grand. Au-dessus de 1 l (2 l et 5 l), il ne se forme jamais de palmettes typiques ; les initiales apparues se développent très lentement, au moins pendant la durée limitée de nos essais. Ces résultats montrent que les substances excrétées par les filaments n'induisent l'agrégation qu'à partir d'une concentration seuil qui est atteinte d'autant plus rapidement que le volume de solution nutritive recyclé est plus petit. Lorsque celui-ci devient très grand, autrement dit quand les conditions expérimentales sont très proches de celles d'un renouvellement continu du substrat, l'agrégation ne se manifeste plus.

	Nombre et croissance des structures agrégées (1)				
Asparagine g/l	0,1	0,5	1	2	5
Solutions nutritives constamment renouvelées	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
Solutions nutritives constamment recyclées - 40 ML	48 27,0	47 21,0	45 20,5	42 31,5	45 23,
Solutions nutritives constamment recyclées - 100 ML	23 20,5	28 21,0	35 22,0	49 23,5	48 23,

(1) chiffre supérieur = nombre de faisceaux en croissance active
cinq jours après l'ensemencement.

chiffre inférieur = croissance radiale moyenne des palmettes en
cinq jours (en mm).

TABLEAU VI

Influence de l'écoulement continu d'une solution nutritive permettant
l'agrégation sous un thalle en croissance dans la formation des
structures agrégées

On peut espérer modifier les caractéristiques des thalles agrégés régénérés au cours des expériences de recyclage continu en utilisant le fait que les corrélations au sein des thalles agrégés sont d'autant plus intenses que le milieu nutritif contient moins d'asparagine.

Les essais précédents ont donc été repris avec des substrats MS₁ de pH 4,5 contenant de 0,1 à 5 g/l d'asparagine. Pour chaque condition, le recyclage est effectué avec 40 et 100 ml de substrat. Dans le témoin, les milieux ci-dessus sont constamment renouvelés. On mesure, cinq jours après l'ensemencement, le nombre de palmettes formées sur chaque bouture et leur longueur (tabl. VI). Cette dernière mesure donne une idée de la rapidité d'apparition des palmettes car quelles que soient les conditions de substrat, elles s'allongent à des vitesses équivalentes.

L'influence de la quantité d'asparagine apparaît seulement quand le volume de solution nutritive recyclée est de 100 ml (dernière ligne du tableau VI). On constate en effet que le nombre moyen de palmettes différenciées par bouture est d'autant plus grand que le substrat contient plus d'asparagine, au moins jusqu'à la dose de 2 g/l (2 g/l et 5 g/l dans nos essais). Ces résultats sont parfaitement conformes à ceux trouvés précédemment (Ch. III p.58).

Lorsqu'un volume plus petit de substrat est utilisé, les thalles agrégés formés ont des caractéristiques semblables, quelle que soit la quantité d'asparagine contenue dans la solution nutritive (avant-dernière ligne du tableau VI).

La comparaison des caractéristiques des thalles agrégés formés dans les milieux contenant peu d'asparagine (0,1 à 1 g/l) en fonction de la quantité de substrat recyclé confirme les résultats précédents : les palmettes apparaissent en effet plus rapidement et en plus grand nombre quand le volume de solution nutritive est plus petit. Cependant, en présence de milieux riches en asparagine (2 et 5 g/l), ces différences n'apparaissent plus. Pour interpréter ces derniers résultats, il faut admettre que les substances excrétées par les filaments atteignent le seuil d'activité d'autant plus vite que le volume de substrat recyclé est plus petit et qu'il contient plus d'asparagine. Il faut admettre également que passée une certaine concentration, l'accumulation de nouvelles quantités de substances est inefficace puisqu'elle ne se traduit plus dans la morphologie du thalle.

3 - Recherche des substances inductrices de l'agrégation dans des filtrats de culture.

Il est maintenant bien démontré que les substances inductrices de l'agrégation s'accumulent dans le substrat. Il est, par suite logique de chercher à les identifier dans des filtrats de culture.

Le test mis au point pour détecter l'action morphogène des filtrats sera décrit en détail plus loin sous le nom de "test sur lame". Il consiste à observer la morphologie des thalles régénérés à partir de boutures faites de filaments B en présence de filtrats de culture ou de milieu neuf ramenés à un même pH (4 à 5 dans nos expériences).

Lorsqu'on teste de cette manière les filtrats recueillis à la fin des expériences de lavage continu par recyclage, on n'observe aucune différence entre les thalles régénérés dans les deux conditions : il apparaît un petit nombre de palmettes après un délai relativement long, de l'ordre de 3 à 4 jours.

L'absence d'action morphogène peut théoriquement provenir d'une concentration trop faible des substances actives. En effet, dans les conditions du recyclage, la quantité de facteurs diffusibles présents au niveau des palmettes en croissance est la somme de celle résultant de la concentration dans le substrat et de celle due à l'excrétion qui, au moins localement, doit être relativement importante. Il n'est pas convenable d'utiliser des filtrats concentrés car les effets de la forte concentration en facteurs nutritifs, glucose en particulier, risquent de masquer l'action morphogène propre aux substances diffusibles (BOISSON, à paraître).

La difficulté précédente peut être levée en faisant les cultures dans des conditions qui permettent d'obtenir de grandes quantités de mycélium agrégé à partir d'un faible volume de solution nutritive, donc l'accumulation d'une grande quantité de substances actives dans un faible volume de substrat. Il suffit pour cela d'absorber la solution nutritive sur un substrat inerte, la perlite expansée dans nos essais. Le milieu usé (filtrat) est récupéré après deux semaines de culture par filtration sous vide dans un entonnoir de Büchner.

Des tests sont réalisés dans les mêmes conditions que précédemment. En présence de milieu neuf, les palmettes sont peu nombreuses et se différencient après un délai de 3 à 4 jours. En présence du filtrat, les structures agrégées sont déjà très abondantes 2 jours après l'ensemencement.

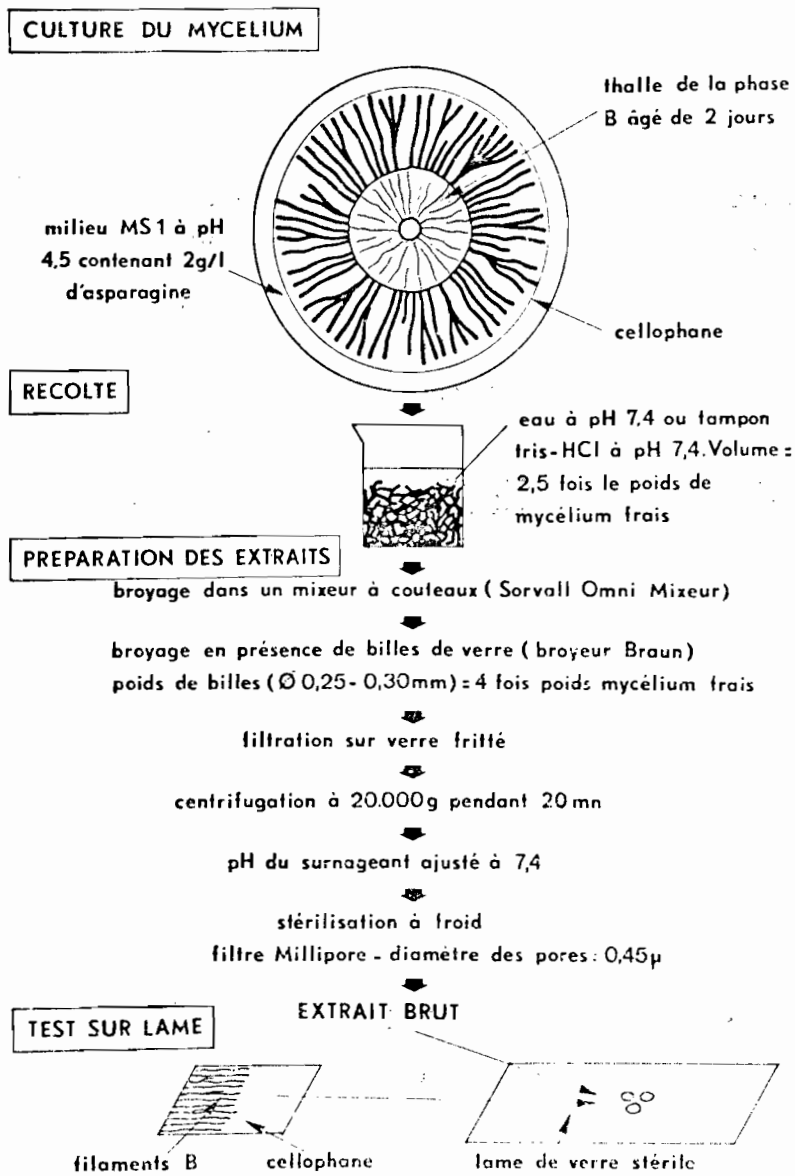


FIGURE 17

Préparation des extraits mycéliens et technique du test sur lame

Les palmettes apparaissent donc plus rapidement et en plus grand nombre sur le filtrat, ce qui tend à prouver qu'il contient des substances favorables à la formation des palmettes. Il ne nous est pas possible d'être plus précis dans nos conclusions car de très nombreuses substances sont libérées par le thalle dans le substrat et certaines d'entre elles pourraient intervenir indirectement sur l'agrégation.

De l'ensemble des expériences présentées jusqu'à maintenant, il ressort que l'agrégation est induite par des substances diffusibles excrétées par le thalle en croissance dans le substrat sous-jacent. Ces substances étant élaborées par le thalle, il est logique de penser qu'elles sont également présentes à l'intérieur des filaments, donc de chercher à démontrer leur présence.

B - MISE EN EVIDENCE, SYNTHÈSE ET MODE D'ACTION D'UN FACTEUR MORPHOGENE INDUCTEUR
=====

DE L'AGREGATION.
=====

La présence de facteurs inducteurs de l'agrégation que nous soupçonnons au sein des hyphes des palmettes peut être testée en recherchant si des extraits acellulaires préparés à partir de mycélium agrégé exercent une action morphogène sur l'agrégation.

1 - Activité morphogène d'extraits acellulaires préparés à partir du mycélium agrégé des palmettes.

a - Préparation des extraits (fig. 17).

Dans tous ces essais, le mycélium agrégé a été obtenu sur un milieu MS₁ de pH 4,5 contenant 2 g/l d'asparagine. Le substrat recouvert d'une membrane de cellophane est ensemencé par transfert d'un thalle entier de la phase B, âgé de 2 jours. Cette technique permet d'obtenir rapidement des quantités importantes de mycélium agrégé (environ 0,2 g en poids frais par boîte de Pétri après une semaine de culture).

La méthode d'extraction, mise au point à la suite d'une série d'essais préliminaires, est la suivante (fig. 17). Les filaments sont mis en suspension dans un volume équivalent à 2,5 fois le poids de mycélium frais de tampon tris-HCl 0,05M de pH 7,4 ou d'eau distillée ramenée à pH 7,4 avec quelques gouttes de tris-hydroxy-méthylméthane. Ils sont d'abord dilacérés dans un mixeur à couteaux (SURVAIL Omni-mixeur) puis broyés

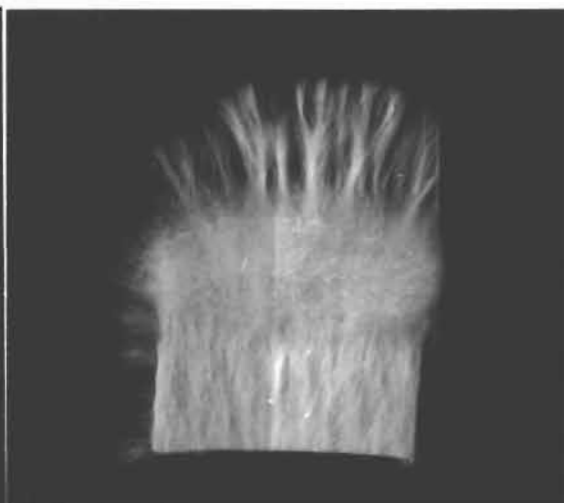
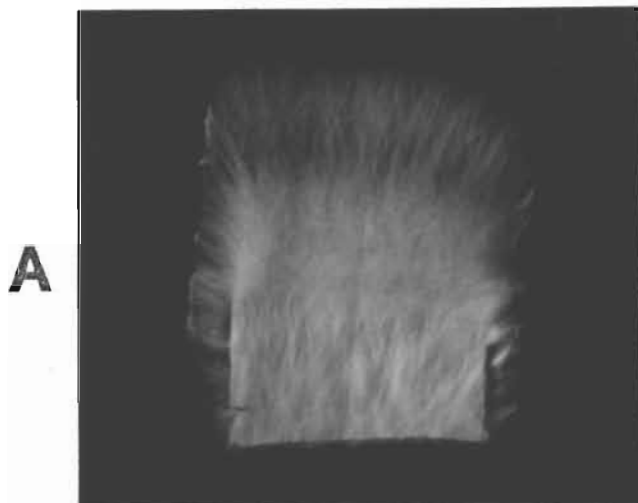


PLANCHE XVI

Les effets morphogènes d'extraits acellulaires préparés à partir de mycélium agrégé

A et C : Témoin

B et D : Extrait de mycélium agrégé

pendant 3 minutes en présence de billes de verre de 0,25 à 0,30 mm de diamètre (Homogénéiseur BRAUN) ajoutées à la suspension mycélienne à raison de quatre fois le poids de mycélium frais. Les billes sont séparées du broyat par filtration sous vide à travers une plaque de verre fritté. Ce filtrat, ramené à pH 7,4 avec le même tampon que précédemment, est alors centrifugé à 20.000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est enfin stérilisé à froid par passage sur un filtre dont les pores mesurent 0,45 μ de diamètre. Nous appellerons extrait brut la liqueur obtenue à la suite des traitements précédents. La présence d'antibiotiques (penicilline 10^6 U.I./l et streptomycine 1 g/l) ne modifiant pas la sensibilité des tests, ces substances ont été fréquemment ajoutées aux extraits afin d'éviter les proliférations bactériennes.

b - Test d'activité.

A la suite d'une série d'essais préliminaires, nous avons mis au point une technique simple et rapide, dite du "test sur lame", qui consomme seulement de faibles quantités d'extrait.

Des boutures de 2 cm de large sur 1,5 cm de long sont prélevées dans la marge d'une culture de la phase B âgée de 3 à 6 jours, obtenue sur une membrane de cellophane. Celle-ci est découpée à 1,5 cm en avant du front de croissance (fig. 17) de sorte que, après transfert, la croissance puisse se poursuivre sans interruption sur cette membrane. Ces boutures sont ensemencées sur deux à trois gouttes d'extrait déposées sur une lame de verre stérile. Un témoin est réalisé dans les mêmes conditions avec du tampon tris-HCl de pH 7,4 ou de l'eau à pH 7,4.

c - Activité morphogène des extraits de mycélium agrégé.

Un examen pratiqué 24 heures après la mise en place du test montre que la croissance radiale des cultures sur extrait est plus faible que celle du témoin ; la régénération donne naissance à un mycélium aérien dressé plus abondant sur les extraits que sur le tampon et il n'y a pratiquement pas de filaments rampants. Deux jours après le semis, les différences apparaissent avec plus de netteté : les boutures placées sur le tampon édifient un tapis mycélien assez clairsemé et uniforme fait de filaments juxtaposés (pl. XVI A et C), présentant un front de croissance régulier. Le mycélium régénéré en présence d'extrait est constitué par des faisceaux de filaments étroitement serrés les uns contre les autres dans la zone apicale, ayant l'aspect de palmettes de structure lâche (pl. XVI B).

	âge du thalle	1 j.	2 j.	3 j.	4 j.
Croissance radiale en mm	tampon	7,9	15,0	22,4	29,
	extrait	3,8	10,6	18,9	27,
Allongement journalier en mm	tampon	7,9	7,1	7,4	7,
	extrait	3,8	6,8	8,3	8,

TABLEAU VII

Influence d'un extrait de mycélium agrégé sur la croissance des filaments de la souche H4

	Groupement des filaments	% de filaments isolés ou groupés				
		isolé	2	3	4	> 4
Témoins	1ère mesure	50,0	21,0	18,5	9,2	1,
	2ème mesure	51,5	27,3	15,2	1,5	4,
Traités	extrait 1	26,9	16,7	12,0	12,0	32,
	extrait 2	15,3	20,1	9,7	8,1	46,
	extrait 3	23,9	12,8	14,6	10,3	38,

TABLEAU VIII

Estimation de l'agrégation des filaments dans le front de croissance de cultures témoins ou traitées avec des extraits de mycélium agrégé (âge : 2 j.)

Il présente un front de croissance irrégulier et recouvre le substrat de manière très hétérogène. Les filaments groupés en faisceaux ont par ailleurs les caractères microscopiques des hyphes agrégées (pl. XVI D). En particulier, les rameaux qu'ils portent ont tendance à rester collés contre l'axe qui leur a donné naissance.

L'action morphogène des extraits apparaît donc très clairement au cours des tests sur lame puisque, en leur présence, la régénération conduit à la formation de structures agrégées. Plusieurs des modifications apportées au développement des thalles par les extraits sont susceptibles d'être estimées de manière quantitative.

Ainsi, la croissance a été mesurée à des intervalles de 24 heures à partir de 20 thalles repiqués sur le tampon d'extraction et sur des extraits de mycélium agrégé (tabl. VII). La croissance radiale des thalles traités est d'abord plus faible que celle des témoins. Cette période correspond à l'apparition signalée précédemment d'une zone dense de mycélium aérien dressé analogue aux centres de formation des palmettes. Les filaments obtenus en présence d'extrait ont ensuite une vitesse de croissance égale puis légèrement supérieure à celle des témoins.

De même, la formation des faisceaux a été estimée au microscope par la proportion de filaments isolés ou groupés dans le front de croissance. Cette mesure est faite en examinant l'extrémité des filaments jusqu'à 1 mm en arrière des apex, de manière à savoir si, pour ce parcours limité, ils sont isolés ou accolés à 1, 2, 3 ou plus de trois filaments voisins. Cette évaluation de l'agrégation reste très imprécise mais il est difficile, compte tenu de la morphologie des cultures dans le front de croissance, de trouver des critères plus précis. Les résultats consignés dans le tableau VIII montrent à l'évidence que les extraits conduisent à un regroupement des filaments. La proportion de filaments isolés, ou groupés par plus de 4, fait ressortir des différences d'autant plus valables que, dans les cultures traitées, les groupes de filaments agrégés sont souvent très épais, beaucoup plus épais en tout cas que ceux observés sur les cultures témoins.

Les extraits agissent aussi sur l'angle de ramification des filaments : les rameaux ont tendance à rester collés contre l'axe qui leur a donné naissance. Les mesures de l'angle de ramification dans le front de croissance d'un thalle sont difficiles à faire par suite de l'intrication des filaments et de la longueur souvent très importante de l'article apical ; il est donc impossible d'estimer l'activité d'un extrait par des mesures de ce type.

Toutes ces mesures confirment les effets des extraits observés macroscopiquement. Leurs difficultés, en particulier celles liées à l'estimation du groupement des filaments, font que ces critères n'ont pas été retenus par la suite dans l'interprétation des tests car ils ne donnent pas de précisions plus grandes que celles obtenues par l'examen macroscopique et microscopique de la marge en croissance.

Les essais précédents montrent que les extraits de mycélium agrégé exercent une action inductrice sur la formation des palmettes quand ils sont apportés par voie externe à un thalle de la phase B. Il est tentant d'interpréter ces résultats en attribuant le rôle morphogène à des substances identiques à celles qui sont actives par voie externe. Cette assimilation est cependant trop hâtive car bien d'autres facteurs peuvent intervenir. Il est logique, en revanche, de chercher si les caractéristiques des substances actives dans l'extrait sont les mêmes que celles des substances diffusibles inductrices de l'agrégation. Cela revient à montrer que les premières sont, comme les secondes, des substances élaborées par le thalle, qu'elles sont excrétées par les filaments dans le substrat et qu'elles sont du type substance "à seuil". C'est dans cette direction que nous allons maintenant orienter notre étude.

2 - Nature et origine des substances responsables de l'activité morphogène des extraits.

Il est assez facile d'avoir des indications sur la nature chimique des substances qui sont à l'origine de l'action morphogène des extraits. En effet, certaines méthodes simples permettent de dénaturer ou d'éliminer des produits de constitution chimique déterminée alors que d'autres sont insensibles à ces traitements. Les résultats des tests sur lame avec les extraits ainsi traités doivent permettre de savoir à quel groupe de substances appartiennent les facteurs actifs.

a - Essai de purification des extraits.

Trois traitements différents ont été utilisés : la thermo-inactivation ; la dialyse et l'adsorption sur charbon actif.

Thermo-inactivation :

Les extraits sont plongés dans de l'eau bouillante pendant des temps variant de 10 à 30 mn ou sont stérilisés pendant 15 mn à 110°. Après une centrifugation destinée à éliminer les produits précipités, le surnageant

est utilisé pour réaliser des tests sur lame et on constate que l'action agrégative persiste ; elle semble légèrement plus forte après trempage de l'extrait pendant 10, 20 ou 30 mn dans l'eau bouillante ; elle est un peu moins nette après la stérilisation.

Dialyse :

Deux millilitres d'extrait sont dialysés pendant 24 heures contre deux fois deux litres de la solution d'extraction (tris-HCl de pH 7,4 ou eau à pH 7,4), sous agitation constante et à une température de 2°C environ. L'extrait dialysé n'exerce plus aucun effet morphogène au cours des tests sur lame.

Les substances qui ont traversé la membrane à dialyse peuvent être soit les substances actives elles mêmes, soit un ou des cofacteurs indispensables à la manifestation des effets morphogènes. Pour choisir entre ces deux hypothèses, nous avons déposé dans le boyau de cellulose 2 ml de la solution d'extraction et dialysé pendant 15 heures contre 100 ml d'un extrait actif. Le dialysat et l'extrait ont des effets semblables sur l'agrégation. Ce sont donc les substances actives elles-mêmes qui sont dialysables. On en conclut que ce sont des molécules de petite taille. Comme, par ailleurs, elles sont thermostables, il est vraisemblable qu'elles ne sont pas de nature protéique.

Adsorption sur charbon actif :

Le charbon utilisé au cours des traitements (DARCO, grade 60, Atlas Chemical Industries) est extrait au reflux pendant deux heures avec une solution 2N d'acide chlorhydrique puis lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralité. Il est séché et conservé au sec dans un flacon coloré.

2,5 g de charbon activé sont ajoutés à 100 ml d'un extrait de mycélium agrégé ; le mélange est agité pendant une demi-heure puis centrifugé. Le charbon est repris par 100 ml d'une solution aqueuse de pyridine à 10% et maintenu sous agitation constante pendant 10 minutes, puis séparé par centrifugation. Ces opérations sont répétées trois fois. Les 300 ml de la solution de pyridine sont alors évaporés à sec, sous vide, à 40° ; l'extrait sec est remis en solution dans 20 ml de tampon tris-HCl de pH 7,4 ou d'eau à pH 7,4. Après centrifugation pour éliminer les particules de charbon encore en suspension, on obtient un éluat très limpide, de couleur jaune, de pH 7,0.

Des tests sur lame sont alors effectués en présence de la solution d'extraction, de l'extrait brut, de l'extrait traité au charbon actif et de l'éluat pyridine. On constate que les cultures ne s'agrègent pas ni sur le liquide d'extraction, ni sur l'extrait traité au charbon alors qu'elles donnent des faisceaux bien agrégés sur l'extrait pur et sur l'éluat pyridine. Les substances responsables de l'effet morphogène des extraits peuvent donc être adsorbées sur le charbon actif puis éluées par une solution aqueuse de pyridine à 10%. Ces propriétés impliquent qu'elles comportent un cycle dans leur formule chimique (PUJARNISCLE, communication personnelle).

Les essais de purification tentés jusqu'à maintenant permettent donc de conclure que les substances actives sont des petites molécules thermostables, comportant un ou plusieurs cycles dans leur formule chimique.

b - Origine des substances actives au sein des extraits.

Les conclusions précédentes sur la nature des substances actives ont des conséquences extrêmement importantes en ce qui concerne leur origine. En effet, si les facteurs chimiques du substrat ont des caractéristiques identiques à celles des substances actives en matière de taille des molécules et de stabilité à la chaleur, seule la thiamine possède un cycle dans sa formule. Comme nous l'avons montré précédemment, cette vitamine est nécessaire au développement végétatif du L. lignosus mais sa présence dans le substrat n'est pas suffisante pour induire l'agrégation. Il y a donc de grandes chances pour que les substances actives au sein des extraits ne soient pas des substances absorbées par le thalle dans le substrat mais des substances élaborées par les filaments.

Cette proposition est confirmée par la persistance de l'action des extraits quand ils sont mélangés avec les solutions nutritives utilisées habituellement dans nos milieux de culture. Les extraits induisent encore la régénération de mycélium agrégé en présence de milieu malté. En mélange avec le milieu MS₁ qui permet à lui seul l'agrégation, l'action des extraits reste perceptible par l'apparition plus rapide d'un plus grand nombre de palmettes.

On pouvait également penser que l'action morphogène des extraits provenait de l'absorption, dans le substrat MS₁, de substances à réaction acide. Cette hypothèse doit être écartée puisque le pH des extraits est toujours ramené au voisinage de la neutralité (7,4). Des tests effectués à différents pH montrent par ailleurs que l'activité est seulement légèrement renforcée à pH acide (4,0 à 5,0) et qu'elle ne disparaît totalement qu'à partir du pH 8,0.

Les résultats précédents tendent donc à prouver que les substances actives au sein des extraits sont élaborées par le thalle. Nous chercherons maintenant à déterminer si elles sont excrétées dans le substrat.

3 - Excrétion des substances actives à l'extérieur des structures agrégées.

L'une des techniques susceptibles de montrer que les substances actives sur l'agrégation sont présentes à l'extérieur des filaments consiste à les extraire par des techniques qui respectent l'intégrité des cellules de la palmette.

Il suffit pour cela de mettre des palmettes en suspension dans un mélange tampon ou dans de l'eau à pH 7,4 puis de tester l'action morphogène du filtrat récupéré après élimination du mycélium. Le temps de contact peut être assez court, de l'ordre d'une demi-heure ; la suspension est alors constamment agitée. Ce traitement risque, par suite des nombreuses cassures provoquées sur les filaments, d'aboutir à la libération d'une partie du contenu cellulaire. Cet inconvénient a été éliminé en allongeant le temps de contact (jusqu'à 10 heures) et en supprimant l'agitation.

Dans tous ces essais, on utilise 2,5 ml d'eau ou de tampon tris-HCl à pH 7,4 pour laver 1 g de palmettes. Le rapport poids de mycélium frais/volume de tampon est donc identique à celui employé lors de la fabrication des extraits et permet, par conséquent, des comparaisons directes entre les deux types de préparations. Le pH des solutions de lavage est en général acide, variant de 5 à 6 ; les tests ont été effectués après ajustement des pH à 7,5.

La solution dans laquelle ont baigné les palmettes provoque la régénération de mycélium agrégé au cours des tests sur lame. L'activité morphogène ainsi mise en évidence est cependant moins nette que celle des extraits de mycélium agrégé. Les substances actives de la solution de lavage peuvent être, comme celles des extraits, adsorbées sur charbon actif puis éluées par une solution aqueuse de pyridine à 10%. Il est donc probable que les deux types de facteurs sont sinon identiques, du moins très proches l'un de l'autre par leur constitution chimique.

Les expériences précédentes montrent que les substances élaborées au sein des thalles, actives sur l'agrégation, sont présentes à l'extérieur des filaments. Il est donc vraisemblable que ces facteurs sont excrétés dans le substrat car s'ils étaient fixés sur les parois sans diffuser dans le milieu, des traitements aussi simples n'aboutiraient pas à leur mise en solution.

En définitive, l'action morphogène des extraits acellulaires de mycélium agrégé est supportée par des substances synthétisées par le thalle et excrétées dans le substrat. On est tenté de parler dès maintenant de substances morphogènes actives sur l'agrégation. Cette dénomination, bien que très mal définie et employée avec différents sens dans la littérature, implique, à notre avis, une action directe des substances actives sur l'agrégation. Il nous paraît donc indispensable d'avoir des renseignements précis sur les modalités d'action des facteurs mis en évidence, avant de leur attribuer le rôle de substances morphogènes inductrices de l'agrégation.

4 - Modalités d'action des facteurs élaborés par le thalle sur l'agrégation.

Dans les conditions habituelles d'extraction et mises à part les variations toujours possibles entre deux séries de cultures effectuées dans des conditions identiques, la quantité de substances actives présentes dans les extraits de mycélium agrégé de la souche H4 doit être relativement constante. Par la technique d'extraction exposée précédemment, on obtient en effet un volume d'extrait à peu près équivalent à celui du liquide ajouté au moment du broyage, soit, environ, 2,5 fois, en volume, le poids de mycélium frais. De plus, cet extrait contient des quantités d'azote organique (dosage par la méthode de LOWRY) qui varient peu, de 5 à 7 mg NP/ml. Il nous a paru intéressant d'étudier, dans un premier temps, l'influence de la concentration des extraits sur les effets morphogènes qu'ils induisent.

a - Influence de la concentration des extraits sur la réaction morphogène.

Pour faire varier la quantité de substances actives apportées au thalle au cours des tests sur lame, il est facile de diluer ou de concentrer des extraits bruts. Des essais préliminaires ayant montré que le tampon tris-HCl est inhibiteur pour la croissance des filaments B à partir de 0,5 M, les expériences ont toujours été effectuées avec des extraits préparés en présence d'eau distillée dont le pH est ramené à 7,4 par quelques gouttes seulement de tris-hydroxy-méthyl-méthane.

Les extraits sont évaporés sous vide à 40°C jusqu'à un volume égal au dixième du volume de départ. A partir de cette concentration 10, on obtient, par dilution, les concentrations 5, 3, 2 et 1, la dernière d'entre elles correspondant à nouveau à celle de l'extrait brut. Des dilutions

successives au $1/2$ sont faites à partir de l'extrait brut avec de l'eau à pH 7,4, jusqu'au $1/32$ ($1/2 - 1/4 - 1/8 - 1/16$ et $1/32$).

Les extraits dilués et concentrés sont utilisés pour faire des tests sur lame avec la souche H4, dans les conditions habituelles. Dilué au $1/32$, l'extrait est sans effet : la croissance et la morphologie du mycélium régénéré sont alors identiques à celles des boutures ensemencées sur de l'eau à pH 7,4. Les filaments sont légèrement agrégés à partir de la dilution $1/16$; au-dessus de cette dilution, on constate que les hyphes régénérées apparaissent de moins en moins rapidement et forment des structures agrégées de plus en plus épaisses quand la concentration croît. Concentrés 5 fois et 10 fois, les extraits exercent une action inhibitrice très forte sur la croissance, allant parfois jusqu'à son arrêt total.

Les extraits de mycélium agrégé ne provoquent donc l'agrégation que dans des limites déterminées de concentration. Si l'on essaie de rapporter cette action à la quantité de substances actives dans l'extrait, il apparaît que ces facteurs ne sont efficaces qu'au-dessus d'un seuil déterminé. Le fait qu'ils exercent, dans certaines limites, une action de type quantitatif sur la morphologie des structures agrégées régénérées, permet de donner une estimation approximative de l'activité comparée de liqueurs d'origine différente ; il suffit de repérer à quelle concentration les structures agrégées apparues dans les tests sur lame ont une morphologie semblable.

Très concentrés, les extraits inhibent la croissance des filaments B. Il n'est pas certain que cette inhibition soit le fait d'une concentration trop forte en substances actives sur l'agrégation car de nombreux autres facteurs chimiques sont également concentrés en même temps. La pression osmotique est très forte et peut expliquer à elle seule l'inhibition (BOISSON, à paraître). Il faut cependant signaler que des extraits purifiés successivement par thermo-inactivation, adsorption sur charbon actif et élution à la pyridine ont le même effet inhibiteur que les extraits bruts dont ils proviennent, et, ceci, pour des concentrations théoriquement identiques en facteur actif. De nombreuses substances ayant été éliminées lors de la purification, la persistance de l'effet inhibiteur est favorable au fait qu'il serait supporté par les substances actives sur l'agrégation.

Dans tous les essais effectués jusqu'à maintenant, les extraits ont été préparés à partir du mycélium agrégé de la souche H4 et testés sur cette même souche. Il est logique de se demander si d'autres isolats sont sensibles au facteur actif sur l'agrégation et s'ils sont eux-mêmes producteurs de ces substances.

b - Variabilité de la réaction morphogène en fonction de la souche.

La variabilité de la réaction morphogène dépend à la fois de la production des substances actives par une souche donnée et de sa sensibilité vis-à-vis de ces substances. On peut donc l'étudier en utilisant des souches qui s'agrègent peu ou pas du tout pour fabriquer des extraits que l'on testera sur des souches qui s'agrègent bien et réciproquement. La souche H4 a été choisie pour les études expérimentales sur l'agrégation car la formation des palmettes en culture est particulièrement typique. Les isolats D1, H105 et 3204 différencient des structures agrégées largement étalées en éventail dans la marge en croissance et qui prennent rarement, surtout chez D1, l'aspect de palmettes ramifiées constituées par des faisceaux bien isolés les uns des autres.

Des extraits ont été préparés à partir du mycélium des quatre isolats précédents, obtenu dans des conditions de milieu qui permettent l'agrégation (milieu MS₁ à pH 4,5 contenant 2 g/l d'asparagine). Afin de déceler d'éventuelles différences quantitatives entre les souches, les extraits bruts ont été concentrés et dilués selon la technique décrite précédemment (p. 88). Nous avons ainsi utilisé des extraits concentrés 10 fois puis ramenés aux concentrations 5, 3, 2 et 1 par dilution, des extraits bruts, et des extraits bruts dilués au 1/2, au 1/5 et au 1/10. Les effets morphogènes des quatre types d'extraits ainsi obtenus ont été étudiés grâce à des tests sur lame réalisés avec des boutures faites de filaments B appartenant aux quatre souches H4, D1, H105 et 3204.

Si l'on examine tout d'abord l'action des extraits de différentes provenances sur la souche H4, on constate que tous provoquent l'agrégation de cet isolat et que les palmettes régénérées ont une morphologie semblable quand les quatre extraits sont concentrés 1, 2, 3 et 5 fois. On en conclut que les quatre isolats fabriquent le facteur actif sur l'agrégation en quantités équivalentes. Cependant, si les estimations précédentes sont

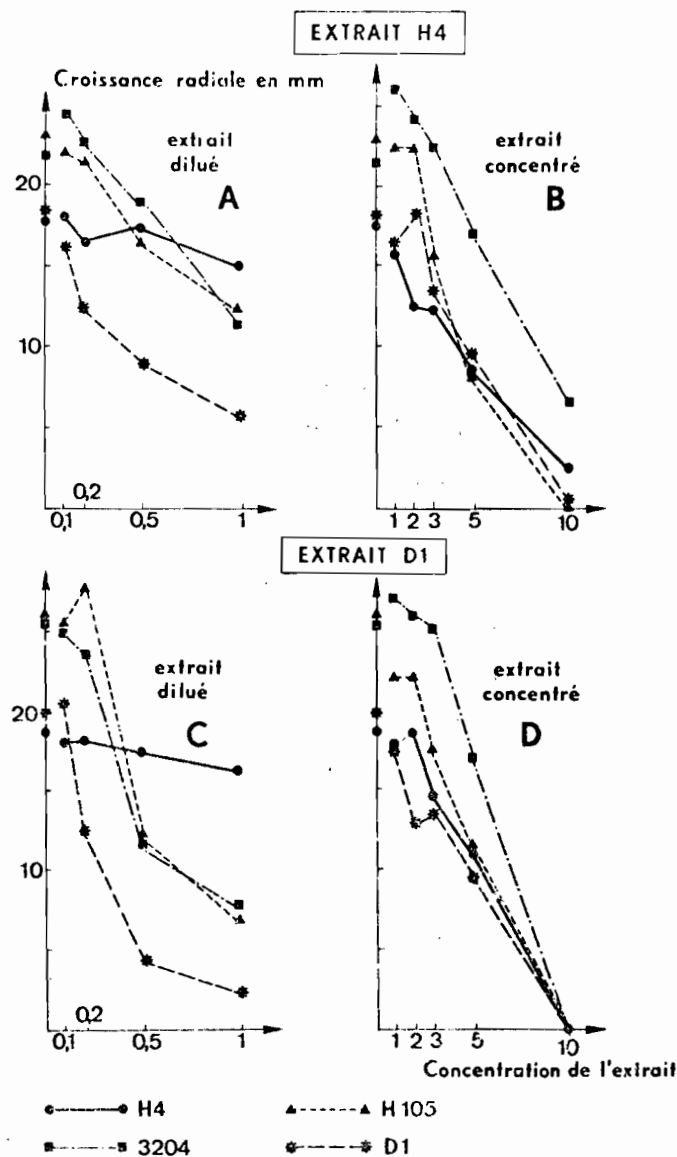


FIGURE 18

Influence des extraits bruts dilués ou concentrés sur la croissance radiale des thalles au cours des tests sur lame

Les points portés sur l'axe des ordonnées correspondent à la croissance différentes souches sur le témoin (eau à pH 7,4).

rapportées à la teneur en azote protéique des extraits de H4, D1, H105 et 3204 (4,5 - 2,9 - 6,8 et 5,6 mg/ml respectivement) on constate que, compte tenu des erreurs possibles sur les teneurs en azote protéique et sur l'appréciation de l'agrégation, la synthèse des substances actives est à peu près équivalente pour les isolats H4, H105 et 3204, mais plus forte pour D1.

La concentration de plus en plus grande des extraits se traduit, comme nous l'avons déjà signalé, par une apparition de moins en moins rapide des structures agrégées régénérées. Ce retard se traduit dans la croissance des thalles mesurée 48 h après la mise en culture (courbes B et D de la fig. 18). Cette inhibition peut même, avec les extraits des souches D1 et H105 concentrés 10 fois, être totale ou empêcher complètement la régénération de mycélium rampant agrégé, au moins pendant la durée limitée de nos expériences. Il est possible que les effets sur l'agrégation et sur la croissance soient liés et que l'agrégation plus nette en présence d'extraits concentrés soit due en partie à l'inhibition qu'ils exercent au moment de la régénération. Cependant, quand on compare dans les courbes B et D de la figure 18, la croissance des thalles à celle des témoins obtenus sur de l'eau à pH 7,4 (points portés sur l'axe des ordonnées), on constate que l'action agrégative est indépendante, au moins pour les concentrations 1 et 2, de l'action inhibitrice sur la régénération. Cela rejoint les résultats des mesures effectuées précédemment : les structures agrégées régénérées au cours des tests sur lame en présence d'extrait, croissent d'abord à la même vitesse puis plus rapidement que les filaments libres qui se développent dans les mêmes conditions, sur de l'eau à pH 7,4. L'agrégation observée en présence d'extrait ne peut donc pas s'expliquer en faisant intervenir seulement une action inhibitrice sur la croissance.

Si, maintenant, on observe l'effet des extraits provenant de H4 sur les différentes souches, on constate que, concentrés de 2 à 5 fois, ils exercent une action agrégative forte sur H4, moyenne sur H105 et 3204, faible sur D1. Il semble donc que l'on puisse classer les souches en fonction de leur sensibilité aux effets morphogènes des extraits de la souche H4. Remarquons par ailleurs que le classement s'établit dans le même ordre avec les extraits provenant des souches H105, D1 et 3204, ce qui

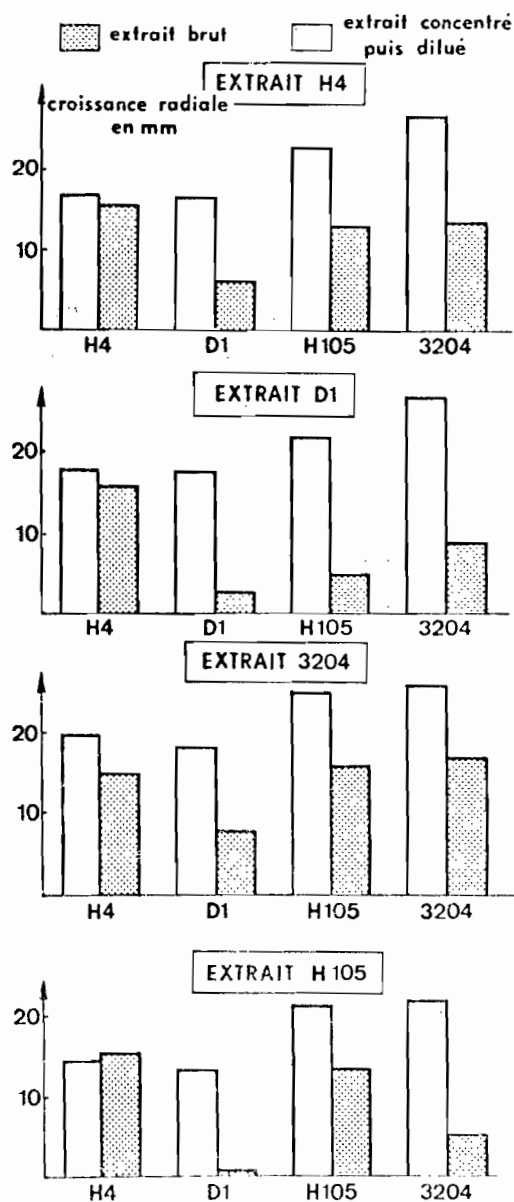


FIGURE 19

Les effets comparés sur la croissance d'extraits bruts et d'extraits concentrés 10 fois puis ramenés par dilution à la concentration initiale

confirme le fait établi précédemment d'une synthèse équivalente du facteur actif sur l'agrégation par les quatre souches.

Au cours de ces expériences, il est apparu un fait nouveau, jamais observé au cours des essais effectués avec la seule souche H4. En effet, les extraits concentrés 10 fois puis dilués jusqu'à la concentration initiale (concentration 1) ont une action différente de celle des extraits bruts, aussi bien sur l'agrégation que sur la croissance, sauf quand ils sont testés sur la souche H4.

Les différences portant sur la croissance apparaissent très nettement dans les courbes A et C de la figure 18 et dans les graphiques de la figure 19. Les premières donnent la croissance radiale des thalles 48 h après la mise en place du test, en fonction de la dilution de l'extrait brut. L'allure décroissante des courbes, exceptée de celle correspondant à H4, quand la dilution décroît (ou quand la concentration croît) montre que l'extrait brut contient un inhibiteur dont l'action diminue en même temps que la dilution de l'extrait augmente. Cet inhibiteur est présent aussi bien dans les extraits de la souche H4 que dans ceux des trois autres souches.

La réaction des différents isolats apparaît très clairement dans les graphiques de la figure 19 où nous avons figuré pour chaque extrait et pour chaque souche la croissance radiale en présence d'extrait concentré 10 fois puis ramené à la concentration initiale et en présence d'extrait brut (partie pointillée). H4 n'est pas sensible à l'inhibiteur, alors que D1, H105 et 3204 y sont très sensibles, D1 plus que les deux autres pour autant que l'on puisse tirer des données quantitatives de ces expériences portant sur un petit nombre d'échantillons. Il semble, également, que l'inhibition exercée par les extraits de la souche D1 soit plus forte que celle des extraits provenant des trois autres souches.

L'inhibition que nous venons de constater agit indirectement sur l'agrégation. En effet, alors que les souches H105 et 3204 se développent sous forme agrégée dans les extraits concentrés 1, 2, 3 et 5 fois, elles ne le font pas à partir de l'extrait brut dilué ou non. Remarquons enfin que nous avons, là encore, séparé les "effets agrégatif" et "inhibiteur" des extraits et montré que le premier n'est pas une conséquence du second.

Les conclusions de ces expériences sont de deux sortes. Les premières concernent l'action des extraits de mycélium agrégé. Quelle que soit leur provenance ils exercent, au cours des tests sur lame, une double action, inhibitrice sur la croissance et inductrice sur l'agrégation. La première peut parfois masquer la seconde ; elle peut être éliminée par évaporation sous vide à 40°. Dans l'état actuel de nos connaissances, il n'est pas possible de déterminer si ces deux actions morphogènes doivent être rapportées à deux substances différentes dont l'une serait détruite par évaporation sous vide à 40°, ou à une seule substance ayant deux sites actifs dont l'un serait altéré par le traitement précité. Il est certain, en revanche, que les deux actions ne découlent pas d'un mécanisme unique et que l'une n'est pas une conséquence de l'autre.

La deuxième série de conclusions concerne la synthèse des substances actives par différents isolats du L. lignosus et leur sensibilité vis-à-vis de ces substances. Nous avons vu que toutes les souches sont capables de synthétiser le facteur actif sur l'agrégation à des taux que l'on peut estimer à peu près équivalents, au moins quand on le rapporte à la quantité de mycélium frais ; toutes sont capables aussi de synthétiser le facteur inhibiteur de la croissance. La sensibilité des souches vis-à-vis de ces substances varie assez fortement. H4, H105 et 3204, D1 présentent des sensibilités décroissantes au facteur inducteur de l'agrégation et des sensibilités croissantes au facteur inhibiteur de la croissance. Quand on sait que ces souches, rangées dans le même ordre, présentent en culture des palmettes de moins en moins agrégées, il est logique de se demander si les caractéristiques précédentes sont à l'origine des faits observés in vitro. Nous ne possédons aucun élément de réponse à cette question.

Les résultats obtenus jusqu'à maintenant montrent que des substances inductrices de l'agrégation sont présentes dans les filaments des palmettes et qu'elles manifestent leurs effets quand elles sont testées sur des filaments de la phase B. Il est naturel de se demander si les facteurs actifs sont également synthétisés au sein des autres types mycéliens (filaments A et B) et s'ils sont efficaces sur les filaments A et sur les filaments agrégés, de la même manière que sur les filaments B. Cela revient en définitive à étudier la synthèse et l'activité de ces facteurs au cours du développement.

5 - Synthèse et activité du facteur inducteur de l'agrégation au cours du développement.

a - Synthèse du facteur inducteur de l'agrégation par les différentes formes mycéliennes.

Cette synthèse peut être étudiée en comparant l'activité d'extraits préparés à partir de mycélium appartenant aux phases A, B et agrégée.

Les filaments B et les palmettes sont récoltés dans des cultures réalisées sur des membranes de cellophane placées respectivement sur du milieu malté ou du milieu MS₁ à pH 4,5 contenant 2 g/l d'asparagine. Les filaments A, du fait de leur position immergée dans le substrat, ne peuvent être obtenus dans les mêmes conditions. La technique de culture que nous avons adoptée à la suite d'essais préliminaires consiste à ensemercer des boutures de grande taille au fond d'un Erlenmeyer contenant une quantité importante de milieu liquide à l'extrait de malt 2% (200 ml dans des fioles de 250 ml). Les thalles sont récoltés avant que les filaments ne se développent à la surface du milieu liquide ; ils sont récupérés par filtration sur une plaque de verre fritté puis essorés sous vide. L'extraction et les tests sont faits de la manière habituelle.

Les extraits bruts ont une activité faible ou nulle lorsqu'ils proviennent du mycélium de type A et une activité un peu plus forte lorsqu'ils sont préparés à partir de filaments B. Leurs effets sur l'agrégation sont particulièrement nets quand ils sont issus de mycélium agrégé.

L'utilisation d'extraits dilués et concentrés a permis de confirmer ces observations qualitatives. Les premiers donnent des résultats peu précis car il est difficile d'évaluer exactement à partir de quelle dilution l'extrait est inactif sur l'agrégation. Cependant, l'estimation de cette dilution limite correspondant au 1/4, au 1/8 et au 1/16 pour les extraits provenant du mycélium des phases A, B et agrégée respectivement permet déjà leur classification en fonction de leur activité. Plus nettes sont les différences qui apparaissent quand on utilise des extraits concentrés de 2 à 10 fois. Si l'on choisit comme critère d'interprétation l'agrégation et que l'on prenne comme référence l'action de l'extrait brut de mycélium agrégé, on constate que l'extrait de filaments A concentré dix fois a une action inférieure à la précédente et qu'il faut concentrer de 5 à 10 fois les extraits de filaments B pour avoir une action identique.

		Extrait brut	Milieu malté	tampon
Rayon des thalles en mm 24 h (1er chiffre) et 48 h (2ème chiffre) après l'ensemencement		7,7 - 11,8	10 - 17,8	11,1 - 1
Croissance radiale journalière en mm (de 24 à 48 h)		4,1	7,8	7,3
Ramification	24 h après le repiquage			
	distance apex-1er rameau	305	464	585
	distance 1er-2ème rameaux	268	409	496
	distance 2ème-3ème rameaux (en microns)	260	-	-
	48 h après le repiquage			
	distance apex-1er rameau	302	519	567
	distance 1er-2ème rameaux	261	459	546
	distance 2ème-3ème rameaux (en microns)	270	390	-

TABLEAU IX

Influence d'un extrait brut de mycélium agrégé sur la croissance et la
ramification des filaments A de la souche H4

Tous ces faits tendent à prouver que l'activité du facteur responsable de l'agrégation est plus forte dans les extraits de mycélium agrégé que dans ceux de filaments B et qu'elle reste toujours très faible dans les liqueurs provenant de filaments A. Ceci est encore vrai si les activités précédentes sont rapportées à la quantité de matière vivante puisque les teneurs en azote organique mesurées par la technique du biuret, sont de 2,4 - 4,2 et 7,2 mg/ml dans les extraits provenant du mycélium des phases A, B et agrégée respectivement.

b - Action des substances inductrices de l'agrégation sur les différents types filamenteux.

Cette action a été étudiée avec des extraits bruts provenant de mycélium agrégé.

Des boutures de petite taille (0,4 mm de côté) sont ensemencées à la surface d'une membrane de cellophane déposée sur du milieu malté. 24 heures après le repiquage, le jeune thalle est déposé avec la cellophane sous-jacente sur l'extrait de mycélium agrégé. Cette opération est réalisée chaque jour, d'abord avec des thalles entiers, puis, lorsque le diamètre des thalles est tel qu'ils ne peuvent plus être transférés intégralement sur une lame de verre, avec des boutures découpées dans le front de croissance selon la technique décrite précédemment. Les témoins sont constitués par des thalles identiques transférés soit sur la solution d'extraction, soit sur du milieu malté liquide.

Lorsque les cultures se développent dans la phase A, elles ne s'agrègent jamais au cours des tests sur lame. Cependant, les extraits ne sont pas totalement inactifs. En leur présence les filaments régénérés s'allongent moins vite (tabl. IX). Les rameaux qu'ils portent sont plus rapprochés (tabl. IX) et restent toujours bien écartés de l'axe qui leur a donné naissance. Cette action persiste quel que soit l'âge des thalles, tant que leur développement a lieu dans la phase A. Les filaments A ne sont donc pas sensibles à l'action des extraits sur l'agrégation.

Dès que les filaments B apparaissent, l'action des extraits se traduit, comme nous l'avons vu précédemment, par un ralentissement de leur croissance et par l'apparition d'hyphes agrégées.

L'effet des extraits sur les structures agrégées a été testé de la même manière que précédemment mais les boutures sont constituées par des palmettes de 1,5 cm de long prélevées sans léser la zone en croissance dans des cultures sur cellophane. Lorsqu'elles sont déposées sur la solution

d'extraction, elles donnent naissance à du mycélium non agrégé. En présence d'extract, les filaments continuent à croître sous forme de faisceaux après une courte période suivant le repiquage durant laquelle ils régénèrent surtout du mycélium aérien dressé.

Les résultats des expériences précédentes montrent que les extraits sont, en ce qui concerne leurs effets sur l'agrégation, inactifs sur les thalles de la phase A, actifs, en revanche, sur ceux des phases B et agrégée. La comparaison de leurs modalités d'action sur les filaments B et sur les filaments agrégés montrent que les substances actives qu'ils contiennent interviennent aussi bien sur l'initiation que sur le maintien de l'état agrégé.

6 - Conclusions.

L'étude du mécanisme interne de l'agrégation a été effectuée avec des broyats préparés à partir des différents types mycéliens du L. lignosus. Elle a montré que les extraits provenant de mycélium de type B ou de mycélium agrégé sont actifs sur l'initiation et le maintien de l'état agrégé.

Ces résultats doivent être interprétés avec prudence étant donné que les effets morphogènes des extraits peuvent théoriquement dépendre de causes très variées agissant indirectement sur l'agrégation, par exemple, en inhibant la croissance des filaments libres.

Plusieurs faits expérimentaux sont défavorables à cette hypothèse. Nous avons en effet démontré que les substances actives dans les extraits sont synthétisées par le thalle, ce qui permet d'éliminer une action directe des facteurs chimiques du milieu nutritif après leur absorption par les filaments. Par ailleurs, bien que les extraits soient capables d'exercer une action inhibitrice sur la croissance des filaments, ils conservent leur effet inducteur sur l'agrégation dans des conditions où les actions inhibitrices ne se manifestent plus. Les premiers ne sont donc pas une conséquence des seconds. Il semble, au contraire, qu'ils interviennent directement dans l'agrégation.

Comme beaucoup de substances agissant sur une fonction physiologique ou sur un mécanisme morphogénétique, les substances extraites du mycélium ne sont actives sur l'agrégation qu'au-dessus d'un seuil de concentration déterminé ; elles deviennent inhibitrices lorsqu'elles sont trop concentrées.

Les modalités de leur synthèse et de leur activité au cours du développement des thalles sont également en faveur de leur intervention directe sur l'agrégation. En effet, elles ne sont synthétisées qu'à partir du stade B du développement et les filaments A ne sont pas sensibles à leur action sur l'agrégation. Le même argument peut être tiré du fait que toutes les souches testées fabriquent ce facteur, même celles qui s'agrègent mal en culture in vitro, mais qu'elles n'y sont pas toutes sensibles de la même manière.

En définitive, les résultats obtenus jusqu'à présent sont en faveur de l'interprétation selon laquelle l'action morphogène des extraits est supportée par des substances qui sont élaborées par le thalle et jouent un rôle inducteur sur l'agrégation. Compte tenu de ces caractéristiques, on peut dorénavant parler de facteur morphogène inducteur de l'agrégation.

Jusqu'à maintenant, l'expérimentation sur la formation des palmettes chez le L. lignosus a eu pour but, soit d'interdire ou de modifier l'accumulation des substances diffusibles excrétées par les filaments, soit de déterminer les effets morphogènes des facteurs actifs au sein des extraits mycéliens. Il nous paraît nécessaire d'étudier en dernier lieu ce qui se passe dans les conditions normales du développement en cultures in vitro en cherchant à déterminer comment se traduisent les actions exercées à travers le substrat par les substances diffusibles excrétées par les filaments en croissance.

C - ACTION INHIBITRICE DES SUBSTANCES DIFFUSIBLES EXCRETEES PAR LE THALLE DANS LE ===== SUBSTRAT. ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE PALMETTES. =====

Dans les conditions normales du développement en culture in vitro, les palmettes croissent et se ramifient en restant côte à côte ; elles sont toujours orientées radialement par rapport au thalle non agrégé, de forme circulaire, dont elles partent. Il est facile de voir que les palmettes ne s'entrecroisent et ne se chevauchent pratiquement jamais. Au contraire, chaque palmette semble occuper, avec ses rameaux, une zone bien délimitée du substrat, sans empiéter sur les zones occupées par les palmettes voisines. Cette disposition fait certainement intervenir des phénomènes de régulation. Nous les avons analysés en confrontant des palmettes issues de boutures différentes.

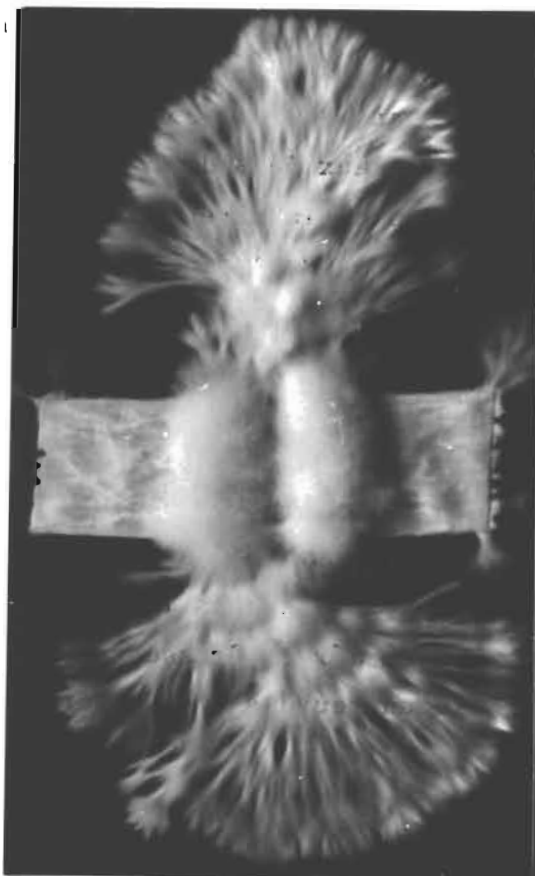
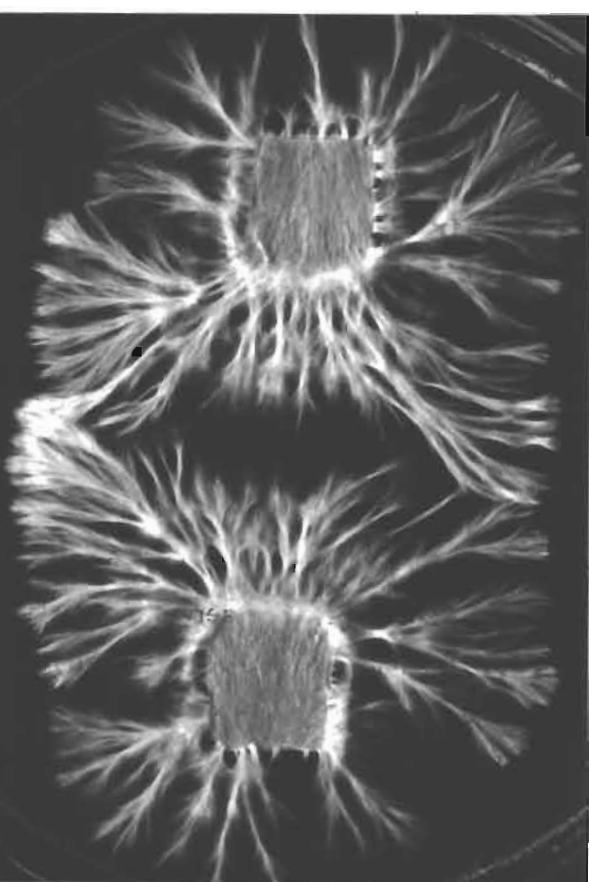
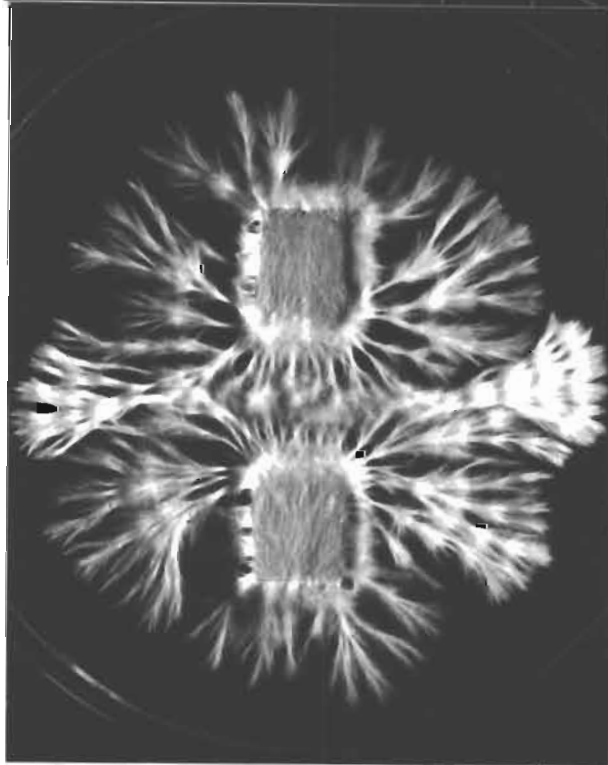
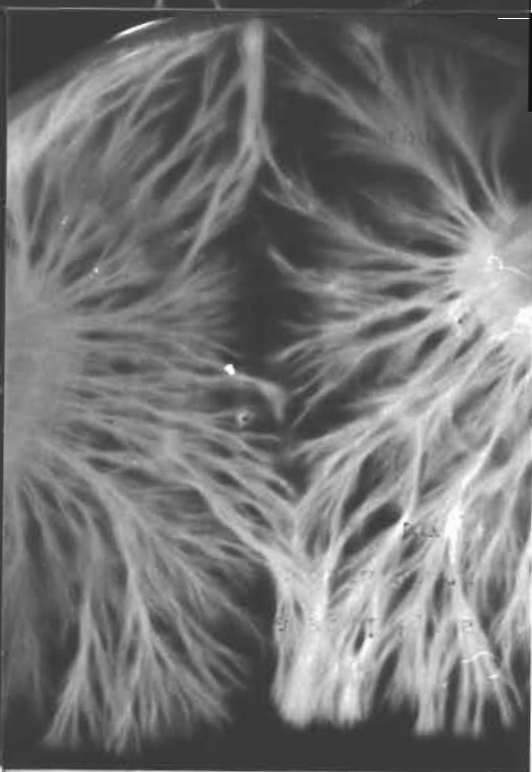
A**B****C****D**

PLANCHE XVII

Les interactions entre palmettes sur des milieux gélifiés

A, B et C - boutures placées face à face à 1 cm (A), 2 cm (C) et 4 cm (B) l'une de l'autre.

D - entre des palmettes issues de boutures dont les axes font entre eux un angle de 120° .

Cette étude a été effectuée en boîtes de Pétri sur le milieu MS₁ à pH 4,5 contenant 2 g/l d'asparagine. Grâce aux lois de la polarité, on peut prévoir de manière précise la localisation et la direction de la croissance des palmettes régénérées à partir de boutures de 1,5 cm de côté, prélevées dans le front de croissance de cultures de la phase B. Ces caractéristiques permettent de faire converger des palmettes selon des angles différents et après des temps de croissance variables. Pratiquement, les boutures sont ensemencées à quelques centimètres l'une de l'autre, leurs axes de polarité faisant entre eux un angle de 90 à 120°, ou bien face à face et à des distances variant de 0,5 à 4 cm.

Lorsque les semis sont face à face et très près l'un de l'autre (0,5 cm dans nos expériences), le mycélium aérien dressé régénéré sur chacun des deux fronts de croissance constitue un seul centre de formation des palmettes ; les structures agrégées se différencient latéralement, perpendiculairement à la direction de la croissance. Lorsque les semis sont un peu plus éloignés (1 cm), il n'y a plus convergence des centres de formation des palmettes, mais les structures agrégées apparaissent encore latéralement (pl. XVII A). Enfin, quand les boutures sont séparées par des espaces plus grands (de 2 à 4 cm), qu'elles soient disposées face à face ou latéralement, (pl. VII B, C et D) on observe, entre les structures agrégées régénérées dans la zone apicale de chaque bouture, deux types de réactions. Les structures agrégées qui se rencontrent face à face s'inhibent à distance : elles donnent naissance, dans la marge en croissance, à des filaments immergés intensément ramifiés et à quelques filaments superficiels libres qui s'arrêtent de croître rapidement. Tant que l'angle fait entre les palmettes qui convergent reste supérieur à 90° environ, c'est ce type d'interactions qui se manifeste. S'il est inférieur à cette valeur, les structures agrégées modifient progressivement leurs parcours en se repoussant, puis elles entrent en contact et s'entremêlent.

La dernière réaction observée est susceptible de résulter, au moins en partie, des effets mécaniques dus à la rencontre entre filaments. Pour éliminer ces effets, le dispositif expérimental suivant a été adopté (fig. 20). Une membrane de papier filtre recouverte de cellophane sur ses deux faces est maintenue verticale en la fixant sur un tube coudé en U. Ce dispositif est placé verticalement dans un bœcher de 600 ml qui renferme 40 ml d'une solution nutritive liquide autorisant l'agrégation (milieu MS₁ à pH 4,5 contenant 5 g/l d'asparagine). Des boutures semblables à celles

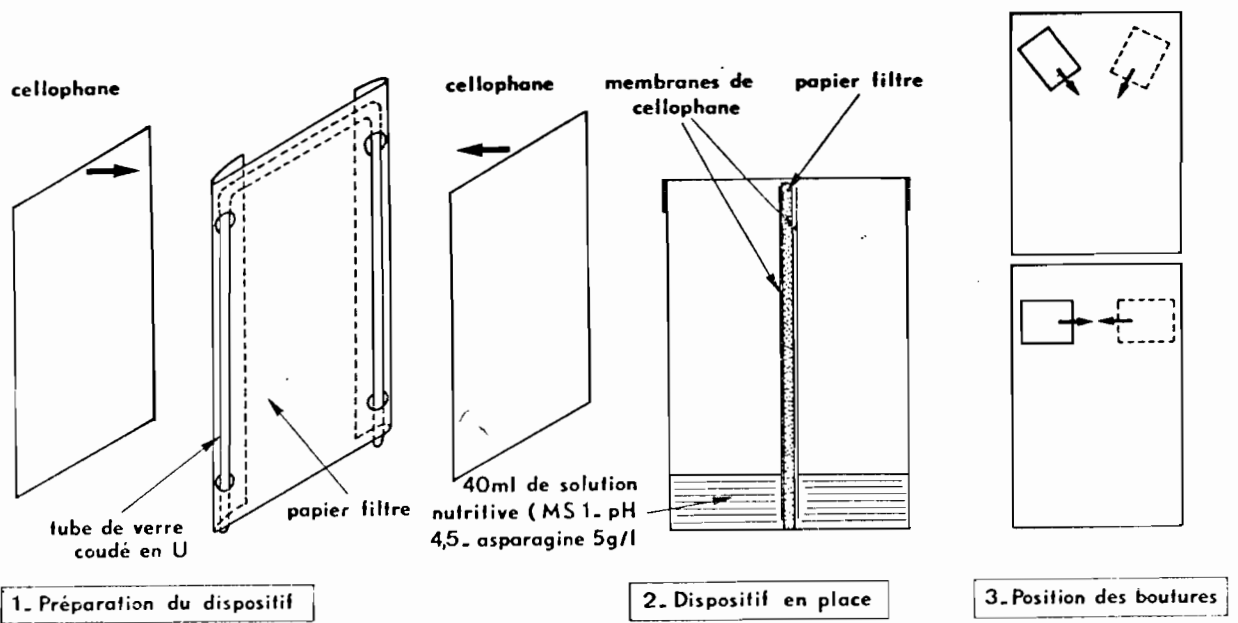


FIGURE 20

Schéma du dispositif utilisé pour l'étude des interactions qui s'exercent entre les palmettes par l'intermédiaire du substrat

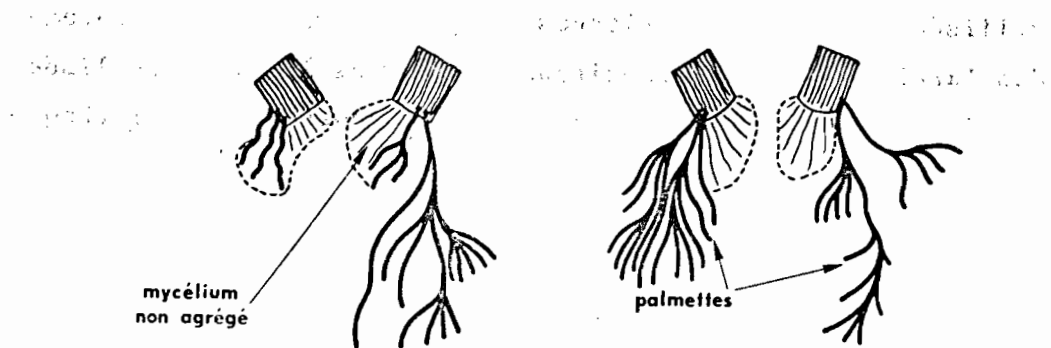


FIGURE 21

Réactions observées entre les structures agrégées régénérées sur chacune des faces d'un papier filtre imbibé de substrat nutritif permettant l'agrégation (Dispositif de la fig. 20)

Nombre de couches de papier filtre	1	2	3	4	5
Croissance radiale en mm des palmettes du côté apical des boutures après 8 j. de culture	15,0	18,5	22,5	30,8	36

TABEAU X

Mesure de l'inhibition exercée entre palmettes poussant face à face sur deux côtés de membranes de papier filtre de différentes épaisseurs

utilisées dans les expériences sur milieu gélosé sont ensemencées sur chacune des faces selon des dispositions analogues à celles réalisées dans les essais précédents. Les thalles se développent donc sur chaque face d'une membrane de papier filtre imbibée par trempage dans la solution nutritive. La cellophane empêchant le passage des hyphes, les seules relations possibles entre les deux cultures sont celles qui peuvent s'établir par l'intermédiaire du substrat.

Les palmettes convergentes réagissent, comme précédemment, en différenciant dans le front de croissance des filaments rampants non agrégés, intensément ramifiés, dont l'élongation est rapidement stoppée, mais à des distances bien supérieures à celles observées dans les milieux gélosés, dépassant souvent 1 cm. Il n'y a pratiquement jamais chevauchement de palmettes et la partie du substrat occupée par un thalle sur l'une des faces du papier filtre n'est jamais envahie, sur son autre face, par des palmettes issues de l'autre bouture (fig. 21). Ces phénomènes se traduisent en définitive par des réactions d'évitement entre les structures agrégées qui croissent en direction l'une de l'autre. Aucune des réactions enregistrées ne peut être expliquée par des phénomènes d'attraction entre palmettes toutes ces réactions traduisent au contraire des phénomènes d'inhibition à distance.

L'inhibition mise en évidence grâce au dispositif précédent et dans les cultures sur milieux gélosés peut théoriquement s'expliquer par un épuisement local du substrat nutritif. Cette hypothèse doit cependant être repoussée du fait que des réactions semblables se manifestent entre des palmettes qui se développent sur de l'eau à partir de bûchettes d'*Hévéa*.

Lorsque, dans le dispositif précédent, on remplace la cellophane par une membrane à dialyse ou par une feuille mince de papier d'aluminium, les réactions d'inhibition se manifestent seulement dans le premier cas. Les facteurs responsables de l'inhibition, qui sont vraisemblablement de nature chimique, sont donc constitués par des petites molécules dialysables excrétées par les filaments en croissance.

Leur nature chimique est confirmée par le fait que leur action dépend de leur accumulation plus ou moins grande dans le substrat, donc, en définitive, de leur concentration. En effet, sur milieux gélosés, les phénomènes d'inhibition sont d'autant plus nets et se manifestent à des distances d'autant plus grandes que le substrat est moins épais.

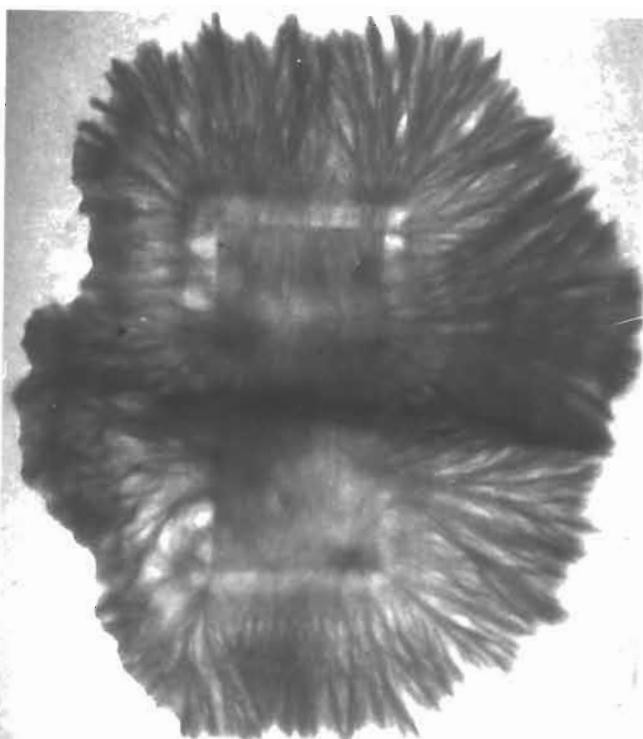
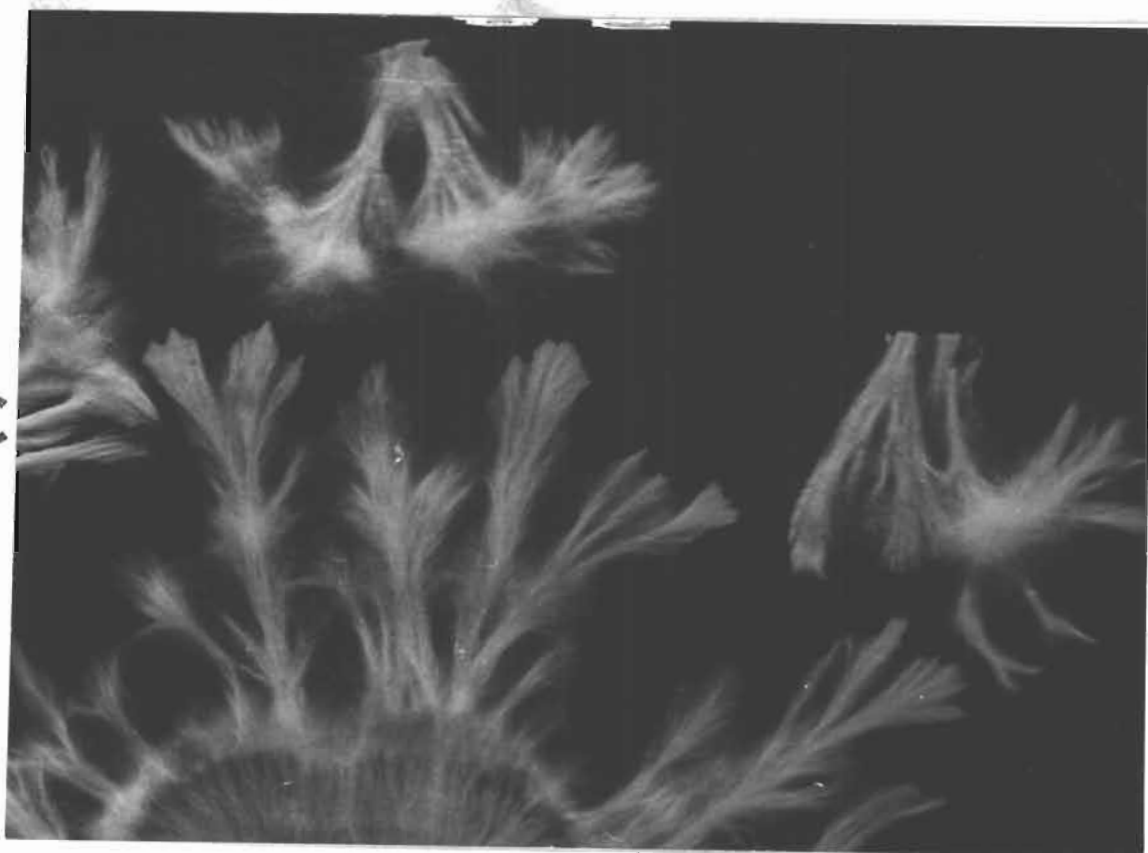
A**B****C**

PLANCHE XVIII

Les interactions entre palmettes dans différentes conditions

- A -- développement sur du papier filtre imbibé de substrat nutritif.
- B -- le milieu sous-jacent est constamment recyclé sous le thalle en croissance.
- C -- l'orientation des structures agrégées régénérées à partir d'une palmette sous l'influence des structures agrégées voisines.

Dans les expériences où les thalles sont cultivés sur chacune des faces d'un support imbibé de solution nutritive, on peut remplacer le papier filtre utilisé habituellement par une ou plusieurs couches de papier à chromatographie. Lorsque les boutures sont ensemencées face à face à 4 cm l'une de l'autre, l'inhibition peut être évaluée par la croissance radiale du thalle dans la zone apicale de la bouture au bout d'une période de temps déterminé. Le tableau X montre que cette croissance est d'autant plus forte, donc l'inhibition d'autant plus faible, que la couche de papier filtre séparant les deux thalles est plus épaisse. Remarquons par ailleurs que, bien que l'action inhibitrice diminue, on n'observe jamais de phénomènes d'attraction entre palmettes.

Il est un autre moyen de diminuer la concentration des substances actives au niveau des thalles en croissance. Il suffit de reprendre le dispositif de recyclage continu de la solution nutritive décrit au début de ce chapitre et d'ensemencer les boutures face à face à 0,5 - 1 et 2 cm de distance. Dans le témoin, le papier filtre est imbibé par trempage dans la solution nutritive. Les cultures traitées se développent sur du papier filtre au sein duquel le milieu diffuse continuellement. Les résultats apparaissent de manière très nette dans la planche XVIII. Sur les témoins, les palmettes sont peu nombreuses et se différencient en position latérale (pl. XVIII A). Quand le substrat sous-jacent est constamment recyclé sous les cultures, les palmettes se différencient sur les 4 faces de chaque bouture (pl. XVIII B). Ces expériences ne peuvent s'interpréter qu'en faisant intervenir un lessivage des substances inhibitrices excrétées par les filaments résultant de la circulation de la solution nutritive.

En définitive, il apparaît très clairement que l'inhibition de la croissance des filaments agrégés est sous la dépendance de substances excrétées par les hyphes elles-mêmes. Le fait qu'elles ne soient actives qu'à partir d'une certaine concentration permet d'expliquer les deux types de réactions décrits lorsque des palmettes se rencontrent. Il est vraisemblable que les effets morphogénétiques observés ne dépendent pas directement de l'angle fait entre les palmettes mais de l'accumulation plus ou moins forte des facteurs excrétés. Quand les structures agrégées se rencontrent face à face, la diffusion est limitée par les palmettes voisines qui excrètent les mêmes substances et il est vraisemblable que leur concentration

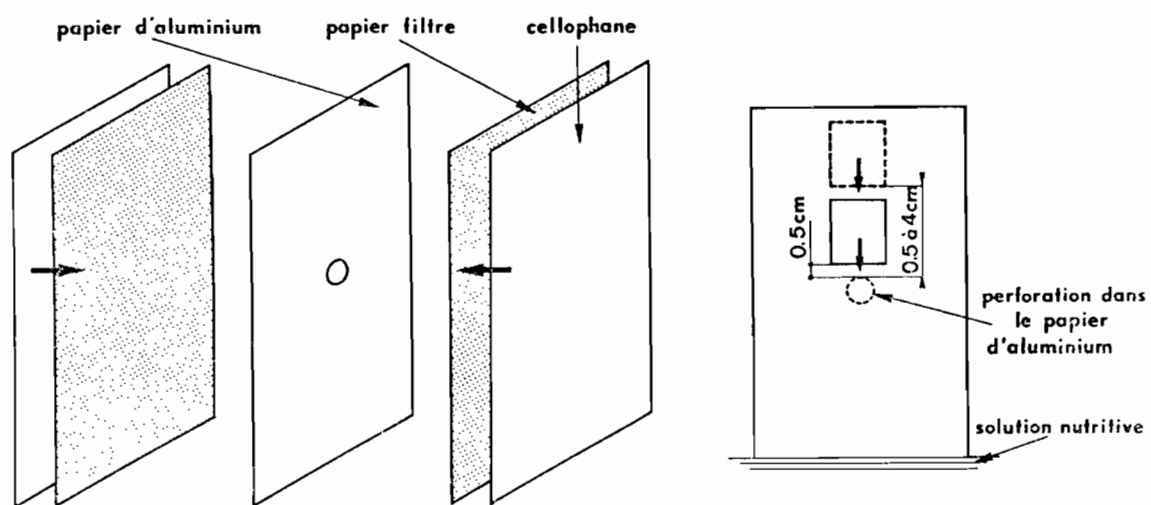


FIGURE 22

Dispositif utilisé pour étudier la localisation de l'excrétion des subst
diffusibles sur les palmettes

Toutes les membranes sont placées sur un support en U comme dans le dispo
sitif de la figure 20.

atteint rapidement le seuil d'action sur la croissance des structures agrégées. Ce sont les palmettes nées près des faces latérales de la bouture qui se rencontrent selon un angle inférieur à 90°. Devant ces palmettes, la diffusion peut s'effectuer librement et leur concentration n'atteint jamais le seuil d'action sur l'inhibition.

On peut enfin se demander à quels niveaux ces substances sont excrétées. Est-ce uniquement à l'apex ou bien sur une zone plus ou moins étendue de la palmette ?

Des indications à ce sujet ont été obtenues en utilisant à nouveau le dispositif qui permet la culture de mycélium agrégé sur chaque face d'une membrane de papier filtre. Lorsqu'on place entre deux membranes de papier filtre recouvertes de cellophane et imbibées en permanence par la solution nutritive une feuille mince d'aluminium portant en son centre une perforation circulaire de 8 mm de $\varnothing$ (fig. 22), les relations entre les deux thalles sont possibles seulement au niveau de cette perforation. Les boutures sont ensemencées de chaque côté du dispositif, l'une à 0,5 cm de la perforation et l'autre à des distances variant de 0,5 à 4 cm. Les palmettes issues de la bouture la plus rapprochée vont excréter les substances diffusibles au niveau de la perforation, créant ainsi un gradient au sein duquel les palmettes issues de l'autre bouture vont se développer. On constate que les phénomènes d'inhibition se manifestent aussi bien quand c'est l'apex qui se trouve au niveau de la perforation que lorsque ce sont des parties plus âgées correspondant au maximum, dans nos expériences, à du mycélium de six jours. Ceci est donc en faveur de l'excrétion par l'ensemble de la palmette.

Ce dernier dispositif donne par ailleurs des indications supplémentaires sur l'action des substances inhibitrices. Les palmettes se dissocient si leur trajet est orienté radialement par rapport au gradient ; elles contournent la perforation à distance s'il est orienté tangentiellement. Il semble donc que les substances inhibitrices soient capables d'orienter la croissance des palmettes.

Ces derniers faits sont confirmés par des expériences dans lesquelles des palmettes de grande taille (1,5 cm) sont repiquées au voisinage d'un thalle agrégé en cours de croissance (pl. XVIII C). Pour éviter les interactions mécaniques entre les filaments, le thalle-mère cultivé sur une membrane de cellophane est retourné contre le substrat gélosé et les

palmettes sont repiquées au voisinage de la marge en croissance soit face à face, soit latéralement.

Quelle que soit la position du semis par rapport aux palmettes appartenant au thalle-mère, on constate que la régénération donne toujours naissance à des structures agrégées orientées vers les zones du substrat non occupées par le thalle-mère. Cette orientation est due au fait que les filaments régénérés en direction des palmettes du thalle-mère sont inhibés. Etant donnée l'absence d'obstacles mécaniques à l'envahissement du substrat, cette action ne peut être rapportée qu'à la présence des substances excrétées par les palmettes sous-jacentes.

L'étude des interactions entre structures agrégées chez le L.lignosus montre que les palmettes excrètent dans le substrat des substances inhibitrices de la croissance des filaments non agrégés et agrégés. En effet, ces interactions se traduisent toujours par des inhibitions à distance attestées par l'apparition, dans la marge des palmettes, de mycélium non agrégé dont la croissance cesse rapidement. La manifestation et l'intensité de ce phénomène dépendent de la concentration des facteurs diffusibles au niveau de la zone apicale des palmettes.

Lorsque la croissance n'est pas totalement arrêtée, l'inhibition se traduit dans l'orientation de la croissance des structures agrégées les unes par rapport aux autres et permet de comprendre pourquoi les palmettes ne se chevauchent pas. L'action des substances inhibitrices excrétées par les palmettes doit également être responsable de l'orientation radiale des palmettes issues d'un thalle non agrégé. Il est en effet logique d'admettre que la croissance est orientée dans le sens correspondant à la concentration minimale de substances inhibitrices à l'intérieur du gradient créé par l'excrétion.

D - CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS.

L'ensemble des expériences présentées dans le chapitre V conduit à des conclusions conformes aux hypothèses présentées dans l'introduction. L'agrégation des filaments en palmettes met en jeu des informations qui transitent à la fois par voie interne et par voie externe. Elles nous apprennent, de plus, que ces informations sont supportées par des substances élaborées par le thalle. Deux types de facteurs ont, en effet, été reconnus

au sein des extraits préparés à partir du mycélium agrégé des palmettes. Le premier correspond à une substance morphogène inductrice de l'agrégation, le second à une substance inhibitrice de la croissance du mycélium agrégé et des filaments non agrégés. Rappelons qu'une substance unique portant deux sites actifs différents peut également rendre compte complètement des résultats obtenus.

Plusieurs caractéristiques du facteur morphogène inducteur de l'agrégation ont été mises en évidence, en particulier, la dépendance de son action vis-à-vis de sa concentration, les modalités de sa synthèse au cours du développement, enfin son spectre d'activité sur les différentes formes mycéliennes. Nous savons, par ailleurs, que ce facteur morphogène élaboré par le thalle est excrété dans le substrat par les hyphes en croissance et que, dans des conditions qui favorisent son accumulation en grande quantité, son action morphogène peut être décelée à partir de filtrats de culture. Il est donc logique d'admettre que l'effet inducteur qui s'exerce par voie externe et que nous avons démontré directement par les expériences de lavage continu des thalles en croissance avec une solution nutritive autorisant l'agrégation, est dû au facteur morphogène présent dans les extraits. Cette identification permet d'ailleurs d'interpréter complètement les expériences de lavage.

Lorsque la solution nutritive circule par diffusion sous le thalle en croissance, le facteur morphogène qu'il synthétise et qu'il excrète dans le substrat est constamment éliminé. Si le milieu est renouvelé en permanence, le lessivage ininterrompu du facteur morphogène maintient sa concentration au sein des filaments en dessous du seuil d'activité et l'agrégation n'est pas induite. Quand, en revanche, la solution nutritive est constamment recyclée, le facteur morphogène s'accumule dans le substrat et limite sa propre excrétion, de sorte que sa concentration interne augmente progressivement. Lorsque le seuil d'action est atteint, l'agrégation est induite.

En définitive, l'agrégation est induite et entretenue par un facteur morphogène synthétisé au sein des thalles et excrété par les filaments dans le substrat. Ce facteur impose aux filaments leur morphologie particulière et leur groupement en faisceaux ; il est également responsable des modifications physiologiques observées en particulier au niveau des propriétés des parois des filaments agrégés. Il n'est pas possible de déterminer la

part jouée par ce facteur par voie externe et par voie interne. Il est certain, cependant, qu'il n'intervient pas par l'intermédiaire d'un gradient externe au sein duquel les hyphes seraient orientées et rassemblées.

L'étude des interactions entre palmettes n'est, en effet, pas favorable à l'existence de phénomènes d'attraction entre les filaments. Au contraire, les interactions qui s'exercent entre des structures agrégées voisines sont toutes de type inhibiteur et conduisent soit à des inhibitions de la croissance des palmettes, soit à des modifications du trajet des palmettes les conduisant à s'écarter l'une de l'autre. Ces deux types d'action dépendent de la concentration des substances inhibitrices excrétées par les filaments agrégés dans le substrat. Nous ignorons la nature des facteurs inhibiteurs responsables de cette action. Il est bon de rappeler que nous avons mis en évidence dans les extraits de mycélium agrégé la présence de substances inhibitrices de la croissance des filaments agrégés et non agrégés, substances qui peuvent être éliminées ou dénaturées par évaporation sous vide à 40° et qui pourraient être responsables des interactions observées entre palmettes.

Quelle que soit la substance responsable des effets inhibiteurs, il n'en reste pas moins certain que des corrélations entre palmettes s'exercent par l'intermédiaire du mycélium externe et qu'elles sont responsables de l'orientation de la croissance des structures agrégées.

DISCUSSION ET CONCLUSION

De la basidiospore au rhizomorphe, tel est le pas que nous nous proposons de franchir dans l'introduction de ce mémoire. Ce but a-t-il été atteint ? Autrement dit, les résultats obtenus permettent-ils de construire un modèle de développement du L. lignosus ? Quels sont les problèmes qui restent à résoudre et comment peut-on les aborder ? C'est à cet ensemble de questions que nous essaierons de répondre maintenant.

Dans cette discussion, nous envisagerons essentiellement les phénomènes qui préparent et induisent l'agrégation des filaments en palmettes, étape préliminaire à l'édification des organes agrégés les plus différenciés, les cordonnets et les rhizomorphes. Pour faciliter le début de la discussion, nous rappellerons au préalable, que l'agrégation des filaments est induite par un facteur morphogène élaboré par le thalle et qu'elle conduit à un organe très polarisé, aussi bien dans l'orientation de sa croissance que dans ses potentialités de régénération.

A - LES ETAPES DU DEVELOPPEMENT QUI PREPARENT L'AGREGATION - MORPHOGENESE DES ===== THALLES NON AGREGES. =====

Lorsqu'on ensemence une basidiospore sur du milieu malté, le développement du thalle non agrégé s'opère en deux phases A et B caractérisées par la nature des filaments qui assurent l'extension du thalle. Intramatriciels et à croissance lente au cours du premier stade (filaments A), ils se ramifient en donnant un système aérien dressé et, au bout d'un délai moyen constant pour chaque souche, des filaments superficiels à élongation rapide caractéristiques de la deuxième phase du développement (filaments B).

L'un des caractères les plus originaux de la morphogénèse des thalles non agrégés est l'existence de phénomènes de corrélation s'exerçant, au cours de l'une et l'autre des deux phases de la croissance, entre le mycélium immergé et le mycélium superficiel. Ils obligent le thalle à se développer sous forme A pendant un temps déterminé ; autrement dit, ils sont responsables de l'existence et de la durée du délai qui précède l'apparition des filaments B dans une culture d'origine monobasidiosporée.

Les variations morphologiques portant sur le diamètre des filaments et sur leur ramification sont accompagnées de différenciations physiologique directement perceptibles ou non, qui se traduisent :

- par une adaptation à la vie au contact direct de l'air, s'effectuant vraisemblablement au niveau du métabolisme respiratoire, par l'intermédiaire du mycélium aérien dressé de la phase A.

- par une vitesse de croissance plus rapide.

- par l'apparition d'une polarité de régénération liée au drainage de substances provenant de l'arrière du thalle en direction des apex en croissance.

- enfin, par la mise en route de la synthèse du facteur morphogène inducteur de l'agrégation.

L'existence de deux types mycéliens dont l'un est capable de croître rapidement à la surface du milieu n'a été signalée, à notre connaissance, que chez le Corticium reilsii (GOUJON, 1971). Un examen rapide des thalles de nombreux Champignons indique que tous ne possèdent pas cette faculté qui semble caractéristique des espèces capables de croître à l'extérieur de leurs hôtes sous forme de filaments isolés (Rhizoctonia solani, par exemple) ou, plus généralement, de filaments agrégés en faisceaux (Larasmium sp., par exemple). L'existence de corrélations entre la différenciation d'un type de filament analogue au filament B et l'adaptation à la propagation sous forme agrégée dans des conditions de milieu normalement peu favorables à la croissance des Champignons reste encore à démontrer.

Chez le L. lignosus, plusieurs faits tendent à vérifier le postulat précédant. En effet, lorsque les thalles ne peuvent se développer dans l'état B, ils sont également incapables de différencier des structures agrégées. Filaments B et filaments agrégés possèdent en commun des propriétés physiologiques que ne possèdent pas les filaments A. Les premiers sont fortement polarisés, tant dans l'orientation de leur croissance que dans leurs potentialités de régénération, alors que les seconds ne le sont que faiblement. D'autre part, le facteur morphogène est abondant dans les filaments B et dans les filaments agrégés ; il n'est pas synthétisé sous sa forme active, ou l'est en faible quantité seulement dans les filaments A.

Plusieurs questions se posent à propos du développement des thalles non agrégés, en relation avec la présence du facteur morphogène dans le mycélium de la phase B, questions auxquelles nous ne pourrions répondre que par des hypothèses.

Nous savons que la polarité met en jeu des transports de substances des régions âgées du thalle vers les apex en croissance. Par ailleurs, l'état B n'est maintenu, par bouturage, que lorsque les semis emportent une grande quantité de cellules. Les résultats peuvent être interprétés, entre autres hypothèses, en faisant intervenir une substance à seuil dans l'apparition et le maintien de l'état B, substance qui pourrait être le facteur morphogène inducteur de l'agrégation. On est tenté de répondre que, ce facteur n'étant pas synthétisé dans le mycélium de type A, il ne peut pas intervenir dans l'induction de la forme B. La réponse doit cependant être plus nuancée. La présence d'un précurseur dans le mycélium de type A suffirait pour expliquer les faits précédents. Il faut aussi se rappeler que les extraits de filaments A sont rarement totalement inactifs. On peut donc formuler une autre hypothèse : la synthèse du facteur morphogène débiterait dans le mycélium aérien dressé apparu par ramification des filaments A au cours de la première phase de croissance. Elle est conforme au fait que la différenciation des filaments B est préparée dans ce mycélium et que les extraits de filaments A ont toujours été faits dans des thalles possédant peu ou pas du tout de mycélium aérien dressé. En l'absence d'expériences précises, il nous est, pour l'instant, impossible de résoudre ces problèmes mais rien, dans nos résultats, ne permet d'infirmer à coup sûr les hypothèses énoncées ci-dessus.

B - LES CONDITIONS DU PASSAGE A LA PHASE AGREGÉE.

1 - Les conditions internes.

Les structures agrégées ne peuvent apparaître que lorsque le thalle issu de la basidiospore est potentiellement capable de se développer dans l'état B. Autrement dit, l'initiation des palmettes du L. limosus n'est possible qu'à partir d'un thalle non agrégé, ce qui correspond à une caractéristique très générale de la formation des rhizomorphes.

La condition précédente est impérative au niveau des potentialités seulement et n'implique pas nécessairement l'expression morphologique de la différenciation, c'est-à-dire un développement préalable sous la forme B. Ces résultats peuvent encore être énoncés en disant que les filaments B sont compétents pour l'agrégation alors que les filaments A ne le sont pas. L'insensibilité de ces filaments vis-à-vis du facteur morphogène inducteur de l'agrégation suffit à expliquer leur incompétence.

2 - Les conditions externes.

Le mycélium de type B n'exprime sa compétence pour l'agrégation que dans des conditions particulières de milieu que nous avons, tout au long de ce mémoire, qualifiées de "conditions autorisant l'agrégation". De très nombreux facteurs peuvent créer un tel environnement ; ils appartiennent à deux grandes catégories.

La première correspond aux substrats ne contenant pas de substance nutritive ou lorsqu'il y a compétition pour ces substrats. Dans la nature, les structures agrégées se développent dans le sol ; expérimentalement, nous en avons obtenues sur du sable ; en cultures sur milieu gélosé, des palmettes se développent parfois sur des colonies bactériennes ou des thalles fongiques résultant de contaminations accidentelles. La deuxième catégorie comprend les substrats gélosés dont les caractéristiques physiques ou certains constituants chimiques sont inhibiteurs de la croissance des filaments libres : les pH acides, le nitrate d'ammonium en grande quantité (5 g/l), le chlorure mercurique ou d'autres substances toxiques à des doses léthales.

Toutes ces conditions ont en commun la propriété d'interdire au thalle de s'alimenter sur place, soit que le milieu ne contienne pas de substance nutritive, soit que les substrats ne soient pas accessibles, soit, enfin, parce que l'absorption des constituants du milieu conduirait à la mort des cellules. Les filaments se procurent les éléments nécessaires à leur croissance et à leur développement à partir d'un mycélium non agrégé qui exploite une base nutritive arrière ; les transports au sein des filaments agrégés doivent donc être très actifs ce que nous espérons démontrer par l'utilisation de composés radio-actifs. Les propositions précédentes, déduites logiquement des caractéristiques du développement des structures agrégées, ont reçu des confirmations expérimentales. Nous savons déjà que les palmettes ne peuvent se différencier qu'à partir d'un thalle non agrégé. Par ailleurs, quand les transports au sein des filaments agrégés sont interrompus par incision au scalpel sur le trajet des palmettes, l'état agrégé ne persiste pas. Enfin, l'expérience nous permet d'affirmer que l'alimentation par transport à partir d'une base nutritive arrière est une condition impérative pour l'agrégation ; en effet, lorsque les transports ne sont plus nécessaires et que les structures agrégées peuvent à nouveau s'alimenter sur place, l'état agrégé est perdu et le mycélium se développe à nouveau sous forme libre (pl. XII, p. 46).

C - L'INITIATION DES STRUCTURES AGREGÉES. =====

Comment se différencient les structures agrégées lorsque les conditions internes et externes requises sont réalisées ?

Les premières réactions du thalle correspondent à l'arrêt de croissance des filaments libres et à l'édification de massifs denses de mycélium aérien dressé. Ces massifs représentent les seules parties du thalle en croissance active et jouent, en conséquence, le rôle de centre d'appel aussi bien pour les substances nutritives que pour le facteur morphogène synthétisé dans le mycélium libre. Il est vraisemblable que ce mode de fonctionnement provoque l'accumulation du facteur morphogène jusqu'au seuil au-dessus duquel il induit l'agrégation. Nous ne discuterons pas à nouveau cette notion de seuil puisqu'elle apparaît clairement à partir des essais de dilution des extraits et des expériences de lavage continu des thalles en croissance par une solution nutritive autorisant l'agrégation. Nous nous demanderons, en revanche, quels sont les effets du facteur morphogène.

Le facteur morphogène modifie profondément la physiologie cellulaire des filaments. Ces modifications se traduisent dans la morphologie : les hyphes agrégées sont peu ramifiées et portent des rameaux qui restent accolés aux axes, elles sont groupées en faisceaux. Ces modifications s'expriment aussi dans la structure et les propriétés des parois des filaments. Elles sont épaisses et établissent entre elles de nombreux contacts. Elles sont peu perméables comme tendent à le prouver, d'une part, leur pouvoir de traverser sans dommage des substrats contenant des substances toxiques, d'autre part, l'excrétion très faible d'exoenzymes dans le milieu (GEIGER, non publié) ; cette faible perméabilité va de pair avec l'incapacité des filaments à s'alimenter sur place que nous avons signalée précédemment. Enfin, ces modifications se traduisent dans les propriétés physiologiques des filaments agrégés. Ils sont capables de transporter activement des substances en provenance de l'arrière ; cette dernière propriété est à l'origine des phénomènes de polarité de régénération mis en place dans les filaments B et renforcés dans les filaments agrégés.

Le drainage exercé par les centres de formation des palmettes vis-à-vis du facteur morphogène et des éléments nutritifs présents ou synthétisés dans le thalle non agrégé est responsable des corrélations d'inhibition qui s'établissent entre eux.

Nous avons vu que, généralement, la répartition des palmettes à la périphérie d'un thalle non agrégé se fait au hasard. Cependant, elle est parfaitement déterminée quand les cultures sont issues d'une bouture carrée ou en forme de croissant ; les structures agrégées se forment de préférence dans les zones de densité mycélienne particulièrement forte, localisées en face des quatre côtés de la bouture carrée, ou au lieu de rencontre entre les filaments pour les boutures en forme de croissant. Il est vraisemblable que le facteur morphogène s'accumule plus rapidement dans ces zones privilégiées. Lorsque les corrélations d'inhibition sont intenses, elles interdisent l'édification de nouveaux centres. Quand elles sont moins fortes, les centres de formation sont à nouveau répartis au hasard. La localisation des palmettes n'est donc pas déterminée à l'avance au sein des thalles non agrégés mais dépend uniquement des corrélations d'inhibition mises en jeu lors de la réalisation des conditions autorisant l'agrégation.

D - LE DEVELOPPEMENT DES STRUCTURES AGREGÉES.

Une fois initiées, les palmettes poursuivent leur croissance en se ramifiant. Le maintien de la structure agrégée est lié à la présence au niveau des apex en croissance de substances synthétisées en arrière et transportées par les filaments. Ce fait est bien démontré par les corrélations d'inhibition qui interviennent aussi bien entre les initiales de palmettes qu'entre les différents rameaux d'une palmette, et par la perte de l'état agrégé provoquée par l'arrêt des transports suite à une incision pratiquée sur le parcours des palmettes.

Les substances mises en cause sont, comme précédemment, des facteurs nutritifs et des substances morphogènes. Lorsque les palmettes se développent sur du sable, il est bien évident que ces besoins ne peuvent être satisfaits que par le mycélium présent dans la bûchette de bois d'Hévée. Si les relations avec la base nutritive sont coupées, le développement est en effet rapidement stoppé (BOISSON, à paraître). Dans les substrats gélosés autorisant l'agrégation, la situation est quelque peu différente. Les palmettes de grande taille (2 à 2,5 cm) repiquées sur ces milieux sont capables, après une perte momentanée de l'état agrégé, de reprendre rapidement leur croissance. L'activité morphogène particulièrement grande des extraits préparés à partir du mycélium agrégé ne semble donc pas correspondre à une simple accumulation du facteur morphogène au sein des hyphes des

palmettes. Dans certaines conditions, le mycélium agrégé est susceptible de synthétiser le facteur morphogène au sein des filaments des palmettes ou de certains des filaments libres régénérés.

Les corrélations qui s'exercent au cours du développement des structures agrégées ne sont pas seulement d'ordre interne. Les palmettes excrètent dans le substrat des substances inhibitrices de la croissance des filaments non agrégés et des filaments agrégés. Ces substances orientent la croissance des faisceaux les uns par rapport aux autres et sont responsables du fait que les structures ne se chevauchent jamais et qu'elles occupent un espace bien délimité par rapport aux structures voisines. Il est vraisemblable que les substances inhibitrices sont excrétées sur toute la longueur de la palmette. Il est alors possible d'envisager leur intervention dans l'orientation des structures agrégées par rapport au thalle-mère, dans le sens décroissant d'un gradient de concentration approximativement circulaire.

Les mécanismes d'initiation et de développement des structures agrégées du L. lignosus que nous proposons ci-dessus permettent d'expliquer les principaux faits connus mais posent aussi plusieurs problèmes que nous évoquerons maintenant.

Tout d'abord, ils ne tiennent pas compte des informations montrant qu'une substance inductrice de l'agrégation est excrétée dans le substrat et que l'agrégation n'est ni initiée, ni maintenue lorsque le thalle est lavé en permanence par une solution nutritive autorisant l'agrégation. Plusieurs faits, en particulier des propriétés chimiques communes, sont en faveur de l'identité de ce facteur avec le facteur morphogène synthétisé dans les filaments. C'est pourquoi nous avons interprété les expériences de lavage par une dilution du facteur morphogène au sein des filaments, de sorte que la concentration interne est constamment inférieure au seuil d'action. Mais, il est également possible que le facteur morphogène agisse partiellement par voie externe. Notre expérimentation ne permet pas d'infirmer l'une ou l'autre des deux hypothèses précédentes. A notre avis, le choix entre les deux alternatives nécessitera au préalable la détermination de l'identité chimique du ou des facteurs actifs.

De même, nous ignorons si les substances inhibitrices excrétées par les palmettes sont identiques ou différentes de celles présentes dans les extraits. Là encore, seule l'étude chimique conduira à une conclusion

définitive. Par ailleurs, la mise en évidence assez récente de ces substances n'a pas permis d'étudier leur cycle de synthèse au cours du développement.

Enfin, les mécanismes de formation des structures agrégées du L. lignosus proposés ci-dessus n'expliquent que le début de la morphogénèse. En effet, si nous avons décrit l'édification des cordonnets et des rhizomorphes, l'étude expérimentale du déterminisme de l'agrégation a été restreinte au stade palmette. Des résultats que nous publierons ultérieurement (BOISSON, à paraître) ont montré que des corrélations interviennent pour limiter le nombre de cordonnets et de rhizomorphes formés à partir du mycélium agrégé construit par la palmette. Mais des questions importantes restent posées. Par exemple, qu'est-ce qui incite les rameaux néoformés au moment de l'apparition des cordonnets à rester collés contre les groupes d'axes dont ils partent ? Ou encore, est-ce que les structures agrégées du type palmette peuvent s'allonger indéfiniment sans qu'il y ait édification, en arrière de la marge, d'organes agrégés mieux structurés tels que les cordonnets et les rhizomorphes ?

Après le regroupement de l'ensemble de nos résultats et leur interprétation, nous avons conscience que bien des problèmes se posent encore dont l'étude pourrait apporter des informations intéressantes sur la morphogénèse des palmettes. Dans l'état actuel de nos connaissances, les mécanismes de l'agrégation chez le L. lignosus peuvent être résumés ainsi.

L'agrégation des filaments en palmettes chez le L. lignosus est induite par un facteur morphogène dont les modalités de synthèse et d'activité au cours du développement permettent d'expliquer que seuls les filaments B soient compétents pour l'agrégation. Le milieu externe joue un rôle déterminant dans l'initiation et le maintien de l'état agrégé. Il intervient vraisemblablement en permettant l'accumulation du facteur morphogène au-dessus du seuil d'activité et en obligeant le mycélium à s'alimenter à partir d'une base nutritive arrière, par transport de substances dans les filaments en direction des apex en croissance. Le développement des structures agrégées est soumis à des corrélations s'exerçant par voie interne, qui font intervenir des compétitions pour des facteurs trophiques et pour le facteur morphogène, et à des corrélations s'exerçant par voie externe, qui mettent en jeu des substances inhibitrices de la croissance, excrétées dans le substrat par les filaments agrégés.

E - LA COMPLEXITE DES PHENOMENES D'AGREGATION.

Le modèle de développement que nous venons d'élaborer peut être comparé à d'autres modèles établis pour expliquer l'agrégation chez des organismes différents du L. lignosus.

En ce qui concerne l'édification des structures agrégées de type rhizomorphe chez les Champignons, dont les principaux faits connus ont été résumés dans l'introduction de ce mémoire, notre étude apporte des éléments nouveaux permettant de mieux comprendre le déterminisme de leur formation.

L'intervention de substances morphogènes dans l'agrégation des filaments est l'un d'entre eux. Il permet d'envisager sous un angle différent les corrélations entre mycélium non agrégé et structures agrégées qui, jusqu'à maintenant, étaient presque exclusivement attribuées à des facteurs d'ordre trophique. Mises à part l'étude de Mme WATKINSON (1971 a et b) sur la formation des cordonnets sur le Merulius lacrymans et la nôtre, personne n'a jamais cherché à expliquer le mécanisme du rassemblement des hyphes. Ceci est dû, sans doute, au fait que les recherches ont été effectuées sur des espèces à rhizomorphes hautement différenciés (Armillariella mellea essentiellement), construits à partir d'une zone méristématique, pour lesquelles le phénomène de rassemblement est difficilement accessible à l'expérience car il se produit très tôt au cours du développement.

Il est intéressant de rapprocher nos résultats de ceux obtenus par GOUJON (1971) sur la formation des sclérotés chez le Corticium rolfsii. Nos conclusions présentent en effet bien des similitudes.

A la fin de sa thèse, GOUJON (loc. cit.) écrit : "les sclérotés apparaissent à la suite de la cessation ou de la diminution d'un antagonisme croissance-sclérogénèse. Leur formation est commandée par un facteur morphogène dont l'action primaire et, sans doute, essentielle, consiste à favoriser le développement des hyphes de type latéral aux dépens des filaments conducteurs. Ce faisant, il induit l'agrégation mycélienne et, peut être, met un frein à la concurrence trophique due à l'élongation".

Chez le L. lignosus, des relations étroites existent entre croissance et formation des palmettes. Dans les substrats favorables à une élongation rapide des filaments B comme le milieu malté, les palmettes n'apparaissent jamais. D'autre part, l'état agrégé apparaît toujours après cessation ou

ralentissement de la croissance des filaments B non agrégés. Comme chez le C. rolfssii, l'agrégation des filaments en palmettes est sous la dépendance d'un facteur morphogène qui n'est actif qu'au-dessus d'une concentration seuil et qui manifeste ses effets sur le mode de croissance des filaments, sur leur morphologie et leur physiologie. La différence essentielle entre les actions morphogènes qui conduisent à la formation des sclérotés et des rhizomorphes doit être recherchée dans l'action du facteur morphogène au niveau cellulaire. Celui responsable de la sclérogénèse favorise le développement des filaments latéraux par rapport aux filaments conducteurs et conduit les premiers à se pelotonner sur eux-mêmes ; cette action s'exerce en définitive au profit des filaments les moins polarisés et se traduit par la disparition de la polarité de croissance des hyphes latérales. Le facteur morphogène inducteur de l'agrégation chez le L. lignosus agit, en revanche, en inhibant la croissance des filaments A et des filaments B (équivalents des latéraux et conducteurs respectivement) et en favorisant celle des filaments agrégés qui sont encore plus polarisés que les filaments B. La polarisation accrue se manifeste au niveau du filament par une faible ramification et surtout par le fait que les rameaux restent étroitement accolés à l'axe qui leur a donné naissance. Notons que ce caractère n'est pas particulier au L. lignosus ; on le retrouve en effet lors de la formation des cordonnets à partir des filaments conducteurs du Corticium rolfssii (GOUJON, 1971) et dans les filaments qui s'agrègent au sein des cérémies du Doratomyces sp. (BRETON, 1971 a).

Les similitudes précédentes sont encourageantes pour l'avenir des études sur l'agrégation chez les Champignons car elles sont favorables à l'existence d'une certaine unité dans le mécanisme d'un phénomène qui peut conduire à la construction d'organes assez divers. Notre étude vient de démontrer que les organes agrégés construits sur le type symphogène constituent un matériel intéressant du point de vue expérimental, du fait que l'agrégation met en jeu des mécanismes internes et externes agissant sur la croissance et la ramification des filaments et sur les relations qu'ils établissent entre eux, sans être compliqués au départ par des différenciations cellulaires trop importantes. Cependant, ce n'est pas encore le matériel idéal pour étudier l'agrégation, celui-ci correspondant en fait à un organisme où des cellules d'abord isolées se rassemblent activement pour construire un organe multicellulaire.

Ce matériel existe dans l'ordre des Acrasiales et les études effectuées depuis une trentaine d'années sur le Dictyostelium discoïdeum Raper sont bien connues des biologistes (mises au point des travaux par BONNER, 1967 ; LARPENT, 1970, 1971 et 1972). Les spores placées sur un substrat nutritif libèrent des cellules amiboïdes qui se nourrissent par phagocytose de Bactéries, se divisent activement et se déplacent librement à la surface du substrat. Quand les aliments sont épuisés, on assiste à une phase de rassemblement actif des cellules amibes conduisant à la formation d'un organe agrégé, le pseudoplasmode qui donnera plus tard naissance à la fructification.

RUNYON (1942) et BONNER (1947) ont montré que les amibes sont orientées par chimiotactisme au cours de la phase d'agrégation ; le centre d'attraction secrète de l'acrasine, substance qui attire les amibes vers le point de plus forte concentration. Cependant, il n'a jamais été possible de démontrer la présence d'un gradient à partir, par exemple, de blocs de gélose prélevés sous le centre attractif. Ceci, essentiellement car l'acrasine est continuellement détruite par une enzyme qui empêche toute accumulation. SHAFER (1956 a et b), en séparant par dialyse l'enzyme de son substrat l'acrasine, a pu isoler cette dernière et étudier son action. En présence d'acrasine, une amibe proche du stade de l'agrégation devient visqueuse et se met à produire elle-même de l'acrasine. L'attraction ne s'exerce pas par un gradient de grande étendue mais par des gradients locaux qui agissent de proche en proche sur les cellules isolées. Les variations en fonction du temps de la production d'acrasine au niveau du centre attractif permet à celui-ci de garder sa fonction jusqu'à la fin du stade de l'agrégation.

En plus de son rôle attractif, l'acrasine agit sur les parois en les rendant visqueuses, ce qui facilite leur agrégation. Certaines de ces transformations ont été mises en évidence par différents auteurs grâce aux techniques immunologiques (GREGG, 1956 et 1961 ; SONNEBORN, 1962 ; TAKEUCHI, 1963 et SONNEBORN et coll. 1964) ; de nouveaux antigènes sont formés durant le passage du stade végétatif au stade pseudoplasmode et il est probable qu'ils jouent un rôle dans l'agrégation puisque ce processus est inhibé par les anticorps correspondants.

Différents auteurs ont essayé de déterminer la nature chimique de l'acrasine. De nombreux faits montrent que l'acide 3', 5', adénosine-monophosphorique pourrait être la substance responsable de l'attraction chimiotactique (KOHLEN et coll. 1967, 1968, 1969 ; PARKLEY, 1969) et la phosphodiesterase l'enzyme mise en évidence par SHAFER (loc. cit.) responsable de sa dégradation (CHANG, 1968).

La différence la plus grande entre le développement des structures agrégées chez les Champignons et chez le D. discoïdeum réside dans le mécanisme du rassemblement des cellules ou files de cellules. Chez le Dictyostelium, les amibes se déplacent et migrent en direction d'un centre d'attraction en réponse à un stimulus chimiotactique. Chez le L. lignosus, il n'y a pas de rassemblement actif à proprement parler ; à la suite des ordres perçus par voie interne, les filaments sont accolés les uns aux autres dès leur différenciation à partir des centres de formation. Ce mode de construction ressemble beaucoup à celui des organismes dont le développement se fait à partir de la division d'une cellule oeuf, dans lesquels les cellules-filles restent accolées car elles établissent des contacts entre elles dès les premières divisions.

Les études effectuées à partir d'embryon de Vertébrés parvenus à différents stades de leur développement ont mis en évidence l'importance des propriétés de surface des cellules dans les phénomènes d'agrégation. Il est relativement facile de dissocier les cellules embryonnaires soit en introduisant de la potasse dans le milieu de culture jusqu'à ce que le pH atteigne une valeur de 9,6 à 9,8, soit, pour les tissus plus âgés, en faisant agir la trypsine. La réagrégation des tissus dissociés est possible si les conditions de culture redeviennent normales. Cette technique a été utilisée par de nombreux auteurs pour essayer de déterminer le mécanisme des mouvements morphogénétiques qui se produisent au cours de l'embryogénèse (TOWNES et HOLTFRETER, 1966 ; MOSCONA, 1961, 1966 ; STEINBERG, 1966), en combinant des cellules dissociées provenant de différentes parties de l'embryon et d'embryons d'espèces différentes. Des expériences témoins sont constituées par des greffes des tissus ou initiales utilisées. STEINBERG (loc. cit.) a fort bien résumé les phénomènes que l'on peut observer à la suite d'expériences de ce type.

a - quand les cellules de différents tissus embryonnaires de Vertébrés sont dissociées et mélangées, elles sont capables d'adhérer les unes aux autres et de construire des agrégats communs ;

b - dans ces agrégats, les différents types de cellules homologues se regroupent, par migration, pour reconstruire les différents tissus d'origine ;

c - ces tissus sont reconstruits dans des positions définies ;

d - quand les tissus utilisés font partie d'un complexe dans l'embryon, la géométrie du complexe normal dans l'embryon se reflète dans les structures reconstruites.

MOSCONA (1966), travaillant avec des tissus de plusieurs origines prélevés sur des embryons de poulet ou de souris, a montré que les cellules dissociées se regroupent préférentiellement selon leur type original sans tenir compte de l'espèce à laquelle elles appartiennent.

TOWNES et HOLTFRETER (loc. cit.) pensent que la répartition spécifique des cellules au sein de l'agrégat après migration serait due à l'existence en son sein d'un gradient de concentration auquel les types cellulaires en présence réagiraient différemment. STEINBERG a montré qu'il n'était pas nécessaire de postuler l'existence d'un gradient chimique pour expliquer ces phénomènes. Si l'en suppose en effet que les forces d'adhésion qui s'exercent entre deux cellules appartenant au même tissu ou à deux tissus différents sont spécifiques et constants pour une même combinaison, une simple application des lois de la thermodynamique permet de montrer que dans un agrégat de deux ou plusieurs types cellulaires, ceux-ci vont se disposer et se grouper l'un par rapport à l'autre selon la valeur de ces forces de cohésion. Cet auteur pense que la sélectivité des processus d'adhésion entre cellules proviendrait d'une répartition différente des sites d'adhésion ; la force d'adhésion entre deux cellules serait alors directement proportionnelle au nombre de sites adhésifs.

L'utilisation de cytochalasine B, substance qui inhibe les mouvements amiboïdes des cellules placées sur un substrat solide, a permis de montrer récemment que ces mouvements interviennent conjointement aux forces d'adhésion intercellulaires dans les phénomènes de réagrégation de cellules isolées (STEINBERG et WISEMAN, 1972 ; ARMSTRONG et PARENTI, 1972).

Des phénomènes d'adhésion intercellulaire ont été également décrits par GREGG (1966) chez les Acrasiales. Si l'on mélange des cellules amibes de différentes espèces, l'agrégation se fait vers un centre attractif commun. Mais, par la suite, les cellules se séparent et forment chacune la fructification caractéristique de l'espèce. A une agrégation non spécifique commandée par l'acrasine, succède donc un stade où chaque espèce exprime des propriétés adhésives spécifiques, stade qui coïncide avec l'apparition des antigènes spécifiques mis en évidence par les techniques immunologiques.

Des expériences réalisées avec des éponges apportent des informations supplémentaires sur les facteurs mis en jeu dans les phénomènes d'agrégation (MOSCONA, 1961 ; HULPHREYS, 1966). Il est possible de dissocier les cellules constitutives d'une éponge par des moyens mécaniques (passage à travers un tamis de mailles suffisamment fines) et par des moyens chimiques (en présence d'eau de mer débarrassée des cations Ca^{++} et Mg^{++}). La réagrégation de ces cellules est possible à 25°C et met en jeu trois facteurs : les propriétés de surface des cellules, des cations divalents et un facteur organique. La présence de ce dernier a été mise en évidence en expérimentant à basse température (5°C). Les cellules dissociées mécaniquement s'agrègent normalement à 5°C bien qu'en donnant des agrégats de petite taille. En revanche, les cellules dissociées par des moyens chimiques sont incapables de le faire mais se réagrègent si le surnageant résultant du traitement chimique de dissociation est ajouté à nouveau à la suspension cellulaire. Il est probable qu'un facteur organique dont la synthèse est nulle ou très faible à 5°C intervient, et qu'il est séparé des cellules lors de la dissociation chimique.

Si l'on mélange dans un même substrat des cellules provenant d'espèces différentes, elles se réagrègent séparément. On a constaté parallèlement que le facteur organique impliqué dans l'agrégation est particulier à chaque espèce.

L'intervention de substances organiques servant de lien entre les cellules est étayée par les expériences de fusion cellulaire en présence d'une phytochémagglutinine : la concanavaline A, avec des cellules de Mammifères (INBAR et SACHS, 1969 ; EDELLAN et MILLETTE, 1971) ou des cellules d'Insectes (BECKER, 1972). L'étude de la structure tridimensionnelle de cette substance (EDELLAN et coll., 1972) et l'examen de la fixation à la surface de la cellule d'une concanavaline A marquée à la fluorescéine (SHOHAM et SACHS, 1972) ont permis de formuler des hypothèses sur le mode d'action de cette substance.

Les résultats de ces études montrent qu'il n'est pas toujours nécessaire de faire intervenir des substances chimiotactiques pour expliquer les mécanismes de l'agrégation. En fait, mise à part l'étude de Miss WATKINSON (1971 a) sur les cordonnets du Merulius lacrymans, ce phénomène n'a jamais été impliqué dans la construction des organes agrégés chez les champignons. Le petit nombre d'études fondamentales réalisées

dans ce domaine est peut être à l'origine des faits précédents. Il est possible que des mécanismes de ce type soient mis en évidence dans l'avenir d'autant plus que l'attraction chimiotactique est bien connue, dans quelques cas, au niveau de filaments isolés. Citons par exemple les tropismes observés lors de la germination de groupes de spores (STADLER, 1952 ; JAFFE, 1963 ; ROBINSON, PARK et GRAHAM, 1968), l'orientation de la croissance des zygophores du Mucor mucedo (PLEMPEL, 1960 ; PLEMPEL et DAVID, 1961), celle des filaments anthéridiaux de l'Achlya bisexualis Coker et Couch. et de l'Achlya ambisexualis Raper sous l'influence de l'hormone A (RAPER, 1960 ; BARKSDALE, 1963), celle, enfin, du trichogyne sous l'influence de la spermatie chez l'Ascobolus stercorarius (Bull.) Schroet (BISTIS, 1956, 1957).

L'intérêt de la comparaison de la construction d'organes pluricellulaires chez les Champignons et chez les Vertébrés réside en définitive dans l'orientation qu'elle suggère pour poursuivre les recherches sur l'agrégation. Il est vraisemblable que les propriétés adhésives des parois des filaments agrégés sont modifiées comme le sont les propriétés concernant leur perméabilité. L'existence de deux types de filaments, libres et agrégés dans la palmette est favorable techniquement à l'étude de ces transformations, comme l'est également leur dépendance vis-à-vis du facteur morphogène. L'existence et le rôle joué par ce facteur constituant, sans doute, le fait nouveau le plus original de notre étude, au moins quand on les compare aux résultats obtenus avec les embryons de Vertébrés et avec les Eponges qui permettent, dans le meilleur des cas, de soupçonner l'intervention de substances organiques dans le mécanisme de la réagrégation.

REPERTOIRE DES PRINCIPALES TECHNIQUES DE CULTURE

Les pages indiquent la place, dans le mémoire, de la description de la technique mentionnée.

Pages

1 - Culture du mycélium non agrégé	
- milieu malté et gélosé à 2%	
- milieu synthétique	18
- culture du mycélium de type B (pour préparer des extraits)	94
- culture du mycélium de type A en milieu liquide (pour préparer des extraits)	94
2 - Culture du mycélium agrégé	
- à partir de bûchettes de bois d'Hévéa	18
- à partir de disques de cultures	18
- sur milieux synthétiques gélosés (milieux MS ₁ , MS ₂ , MS ₃)	19
- culture de mycélium agrégé (pour préparer des extraits)	fig.17 - 82
- culture de mycélium agrégé sur les deux faces d'une membrane de papier filtre	fig.20 - 98
3 - Technique de culture par recyclage ou renouvellement permanent de la solution nutritive.	fig.16 76 et 78
4 - Tests avec des extraits acellulaires	
- préparation des extraits	fig.17 - 81
- test d'activité des extraits : test sur lame	fig.17 - 82
- purification des extraits	
. thermo-inactivation	84
. dialyse	85
. adsorption sur charbon actif et élution par la pyridine	85

Toutes les cultures sont faites à la température de 29-30°C, en général à l'obscurité (boîtes de Pétri déposées dans une boîte métallique, type "boîte à biscuits"), à une humidité proche de la saturation.

BIBLIOGRAPHIE

Les abréviations des titres des revues sont celles recommandées dans "World list of Scientific Periodicals (1900-1960 et nouveaux titres 1960-1968)". 4ème édition, 1963 et supplément, 1970, Butterworth, Londres.

ALTSON R.A., 1953 - Annual Reports for 1949-1951 of the Pathological Division. Rep. Rubb. Res. Inst. Malaya, 1949-1951, 34 p.

ARMSTRONG P.B. et PARENTI D., 1972 - Cell sorting in the presence of cytochalasin B. J. cell Biol., 55, 542-553.

BAREYRE M.J. et BOISSON C., 1969 - Relations entre la morphogénèse de l'appareil végétatif non agrégé du Leptoporus lignosus (Kl.) Heim et le métabolisme respiratoire des filaments caractéristiques du développement. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 268, série D, 2256-2259.

BARKLEY D.S., 1969 - Adenosine 3', 5'-Phosphate : Identification as acrasine in a species of cellular slime mold. Science, N.Y., 165, 1133-1134.

BARKSDALE A.W., 1963 - The role of hormone A during sexual conjugation in Achlya ambisexualis. Mycologia, 55, 627-632.

BECKER J.L., 1972 - Fusions in vitro de cellules somatiques en culture de Drosophila melanogaster, induites par la Concanavaline A. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 275, série D, 2969-2972.

BISTIS G., 1956 - Sexuality in Ascobolus stercorarius. I. Morphology of the ascogonium ; plasmogamy ; evidence for a sexual hormonal mechanism. Am. J. Bot., 43, 389-394.

BISTIS G., 1957 - Sexuality in Ascobolus stercorarius. II. Preliminary experiments on various aspects of the sexual process. Am. J. Bot., 44, 436-443.

- BLOCH R., 1965 - Polarity and gradients in plants : a survey. Handb. PflPhysiol., 15/1, 234-274.
- BOISSON C., 1965 - Contribution à l'étude biologique du Leptoporus lignosus (Kl.) Heim. Mémoire présenté à la Faculté des Sciences d'Abidjan pour l'obtention du D.E.S. de Sciences Naturelles.
- BOISSON C., 1968a - Mise en évidence de deux phases mycéliennes successives au cours du développement du Leptoporus lignosus (Kl.) Heim. C. R. hebdomadaire. Séanc. Acad. Sci., Paris, 266, série D, 1112-1115.
- BOISSON C., 1968b - Modalités du franchissement d'une étape de son développement par le mycélium du Leptoporus lignosus (Kl.) Heim. C. R. hebdomadaire. Séanc. Acad. Sci., Paris, 267, série D, 1435-1438.
- BOISSON C., 1968c - Morphogénèse des structures agrégées de l'appareil végétatif du Leptoporus lignosus (Kl.) Heim. C. R. hebdomadaire. Séanc. Acad. Sci., Paris, 267, série D, 1578-1581.
- BOISSON C., 1968d - Constitution et évolution du thalle du Leptoporus lignosus (Kl.) Heim. Relation entre les formes mycéliennes et la différenciation des rhizomorphes. Agron. trop., Nogent, 23, 1328-1333.
- BOISSON C., 1972 - Etude de la formation des rhizomorphes du Leptoporus lignosus (Kl.) Heim : le déterminisme de l'agrégation des filaments en palmettes. C. R. hebdomadaire. Séanc. Acad. Sci., Paris, 274, série D, 2481-2484.
- BOISSON C., à paraître - Influence des facteurs externes dans la formation des structures agrégées du Leptoporus lignosus (Kl.) Heim.
- BONNER J.T., 1947 - Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold Dictyostelium discoideum. J. exp. Zool., 106, 1-26.
- BONNER J.T., 1952 - Morphogenesis. An essay on development. Princeton University Press.

- BONNER J.T., 1967 - The cellular Slime Molds. 2ème édition, Princeton University Press.
- BORRISS H., 1934 - Über der Einfluss äusserer Faktoren auf Wachstum und Entwicklung der Fruchtkörper von Coprinus lagopus. Planta, 22, 644-684.
- BREFELD O., 1877 - Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze III. Basidiomycetes. Arthur Felix, Leipzig, 136-173.
- BRETON A., 1971a - Croissance et développement des corémies du genre Doratomyces Corda. Mém. Soc. bot. Fr., 1971, 19-27.
- BRETON A., 1971b - Morphogénèse des corémies du genre Doratomyces Corda. Relations entre le mycélium végétatif et les fructifications. Annls Sci. nat., 12, 9-16.
- BURNETT J.H., 1968 - Fundamentals of Mycology. Ed. Edward Arnold Ltd., Londres.
- BUTLER G.M., 1957 - The development and behaviour of mycelial strands in Merulius lacrymans (Wulf.) Fr. I. Strand development during growth from a food-base through a non-nutrient medium. Ann. Bot., 21, 523-537.
- BUTLER G.M., 1958 - The development and behaviour of mycelial strands in Merulius lacrymans (Wulf.) Fr. II. Hyphal behaviour during strand formation. Ann. Bot., 22, 219-236.
- BUTLER G.M., 1966 - Vegetative structure. In the Fungi, Ed. AINSWORTH G.C. et SUSSMAN A.S., Ac. Press, New York et Londres, II, 83-113.
- CAMPBELL A.H., 1934 - Zones lines in plant tissues. II. The black-lines formed by Armillaria mellea (Vahl) Quélet. Ann. appl. Biol., 21, 1-22.
- CHAMPAGNAT P., 1969 - Croissance, morphogénèse et développement. In Biologie Végétale, tome III. Précis de Sciences Biologiques, sous la direction de GRASSE P.P., Ed. Masson et Cie.

- CHANG Y.Y., 1968 - Cyclic 3', 5'- adenosine monophosphate phosphodiesterase produced by the slime mold Dictyostelium discoideum. Science, N.Y., 161, 57-59. ===
- CHEVAUGEON J., 1959 - Sur le déterminisme interne du rythme de croissance chez un mutant "vague" de l'Ascobolus immersus. C. R. hebdomadaire. Séances Acad. Sci., Paris, 248, 1841-1844. ===
- CHEVAUGEON J. et NGUYEN VAN H., 1969 - Internal determinism of hyphal growth rhythms. Trans. Br. mycol. Soc., 53, 1-14. ==
- DE JONG W.H., 1933 - Het parasitisme van Rigidoporus microporus (Swartz) Van Overheem syn. Fomes lignosus Klotzsch, bij Hevea brasiliensis. Arch. Rijksherb. Indië, 17, 83-104. ==
- DUPONT G. et JULIEN M., 1969 - Contribution à l'étude des corrélations de croissance, de la différenciation cellulaire et de la polarité dans les sporangiophores du Mucor Prainii Chodat et Nechitch. C. R. hebdomadaire. Séances Acad. Sci., Paris, 269, série D, 1642-1645. ===
- EDELMAN G.M. et MILLETTE C.F., 1971 - Molecular probes of spermatozoan structures. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 68, 2436-2440. ==
- EDELMAN G.M., CUNNINGHAM B.A., REEKE G.N., BECKER J.W., WAXDAL M.J. et WANG J.L., 1972 - The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2580-2584. ==
- FALCK R., 1909 - Die Lenzitzesfäule des Koniferenholzes. Hauschwammforschung, 3, 1-234. =
- FASSI B., 1964 - Evolution du pourridié blanc, dû au Fomes lignosus (Kl.) Bres., dans une plantation d'Hevea brasiliensis aménagée immédiatement après l'abattage de la forêt. Publ. Inst. natn. Etude agron. Congo Belge, 105, 54p. ===
- FINDLAY W.P.K., 1932 - A study of Paxillus panuoides Fr. and its effect upon wood. Ann. appl. Biol., 19, 331-350. ==

- GARRAWAY M.O., 1967a - Nutrition and metabolism of Armillaria mellea (Vahl ex Fr.) Qué1. in relation to growth and rhizomorph formation. Diss. Abstr., série B, 28, 16 B.
- GARRAWAY M.O., 1967b - Ethanol suppresses uptake and metabolism of glucose by Armillaria mellea. Résumé in Phytopathology, 57, 812.
- GARRAWAY M.O., 1969 - Influence of compounds related to shikimic acid pathway on rhizomorph initiation and growth in Armillaria mellea. Résumé in Phytopathology, 59, 1027.
- GARRAWAY M.O. et WEINHOLD A.R., 1965 - Uptake and metabolism of glucose and ethanol by Armillaria mellea. Résumé in Phytopathology, 55, 1059.
- GARRAWAY M.O. et WEINHOLD A.R., 1967 - Ethanol induced accumulation of a pentose in Armillaria mellea. Can. J. Microbiol., 13, 1705-1707.
- GARRAWAY M.O. et WEINHOLD A.R., 1968a - Period of access to ethanol in relation to carbon utilization and rhizomorph initiation and growth in Armillaria mellea. Phytopathology, 58, 1190-1191.
- GARRAWAY M.O. et WEINHOLD A.R., 1968b - Influence of ethanol on the distribution of glucose C14 assimilated by Armillaria mellea. Phytopathology, 58, 1652-1657.
- GARRETT S.D., 1944 - Root disease fungi. Ed. Frans Verdoorn, Chronica Botanica Company.
- GARRETT S.D., 1953 - Rhizomorph behaviour in Armillaria mellea (Vahl) Qué1. I. Factors controlling rhizomorph initiation by A. mellea in pure culture. Ann. Bot., 17, 63-79.
- GARRETT S.D., 1954 - Function of the mycelial strands in substrate colonization by the cultivated mushroom Psalliota hortensis. Trans. Br. mycol. Soc., 37, 51-57.

- GARRETT S.D., 1956 - Biology of root-infecting fungi. Ed. Cambridge University Press.
- GARRETT S.D., 1960 - Inoculum potential. In Plant pathology, an advanced treatise, Ed. HORSFALL J.G. et DIMOND A.E., Ac. Press, New York et Londres, III, 23-56.
- GAUDET-DUPONT G., 1970 - Régénération des sporangiophores de Mucor Prainii Chodat et Nechitch. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 271, série D, 652-655.
- GAUDET-DUPONT G., 1971 - Corrélations de croissance et régénération des sporangiophores du Mucor Prainii Chodat et Nechitch. Annls Sci. nat., 12, 109-208.
- GAÜMANN E.A., 1928 - Comparative morphology of fungi. Ed. anglaise, Mc Graw Hill Book Company, Londres.
- GEIGER J.P. et GOUJON M., 1970 - Mise en évidence, dans les extraits de thalle, d'un facteur morphogène responsable de l'apparition des sclérotés du Corticium rolfsii (Sacc.) Curzi. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 271, série D, 41-44.
- GOUJON M., 1965 - Etude expérimentale du développement du thalle du Trachysphaera fructigena Tab. et Bunt. Revue gén. Bot., 72, 353-412.
- GOUJON M., 1967a - Orientation et fonction des transferts de protoplasme chez le Corticium rolfsii (Sacc.) Curzi. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 264, série D, 261-264.
- GOUJON M., 1967b - Mise en évidence de trois phases distinctes dans le développement du Corticium rolfsii (Sacc.) Curzi en ce qui concerne la formation des sclérotés. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 264, série D, 2889-2891.
- GOUJON M., 1968 - Mise en évidence dans le mycélium du Corticium rolfsii (Sacc.) Curzi, d'un facteur morphogène responsable de l'apparition des sclérotés. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 267, série D, 409-411.

- GOUJON M., 1969 - Nature et synthèse du facteur morphogène responsable de l'apparition des sclérotés chez le Corticium rolfsii (Sacc.) Curzi. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 269, série D, 2195-2198.
- GOUJON M., 1970 - Mécanismes physiologiques de la formation des sclérotés chez le Corticium rolfsii (Sacc.) Curzi. Physiolog. vég., 8, 349-360.
- GOUJON M., 1971 - Etude physiologique de la sclérogénèse chez le Corticium rolfsii (Sacc.) Curzi. Thèse Faculté des Sciences d'Orsay.
- GREGG J.H., 1956 - Serological investigations of cell adhesion in the slime molds, Dictyostelium discoideum, Dictyostelium purpureum and Polysphondylium violaceum. J. gen. Physiol., 39, 813-820.
- GREGG J.H., 1961 - An immunoelectrophoretic study of the slime mold Dictyostelium discoideum. Devl. Biol., 3, 757-766.
- GREGG J.H., 1966 - Organization and synthesis in the cellular slime molds. In The fungi, Ed. AINSWORTH G.C. et SUSSEMAN A.S., Ac. Press, New York et Londres, II, 235-281.
- GUILLAUMIN J.J., 1967 - Recherches sur la structure et le fonctionnement de l'apex du rhizomorphe d'Armillaria mellea (Vahl.) Quélet. D.E.A. Université de Clermont-Ferrand.
- GUILLAUMIN J.J., 1970a - Morphologie et anatomie des organes agrégés chez l'Ascomycète parasite Sphaerostilbe repens B et Br. Cah. ORSTOM, Ser. biol., 12, 51-64.
- GUILLAUMIN J.J., 1970b - Etude du déterminisme de la différenciation des organes agrégés chez l'Ascomycète Sphaerostilbe repens B. et Br. Cah. ORSTOM, ser. biol., 13, 41-65.
- GUILLAUMIN J.J., 1971 - Recherches sur la morphogénèse des organes agrégés chez le Champignon Ascomycète Sphaerostilbe repens B. et Br. Thèse 3ème cycle, Université de Clermont-Ferrand.

- HAGIMOTO H. et KONISHI M., 1959 - Studies on the growth of fruit body of fungi. I. Existence of a hormone active to the growth of fruit body in Agaricus bisporus (Lang.) Sing. Bot. Mag., Tokyo, 72, 359-366.
- HAGIMOTO H. et KONISHI M., 1960 - Studies on the growth of fruit body of fungi. II. Activity and stability of the growth hormone in the fruit body of Agaricus bisporus (Lang.) Sing. Bot. Mag., Tokyo, 73, 283-287.
- HEIN I., 1930 - Studies on the mycelium of Psalliota campestris. Am. J. Bot., 17, 197-211.
- HENIS Y. et CHET I., 1968 - Developmental biology of sclerotia of Sclerotium rolfsii. Can. J. Bot., 46, 947-948.
- HOW J.E., 1940 - The mycorrhizal relations of larch. I. A study of Boletus elegans Schum. in pure culture. Ann. Bot., 4, 135-140.
- HUMPHREYS T., 1966 - Chemical dissolution and in vitro reconstruction of sponge cell adhesions : isolation and fonctional demonstration of the components involved. In Molecular and cellular aspects of development, Ed. BELLE E., Harper Int. Ed., 78-91.
- HUTCHINSON F.W., 1960 - Factors affecting root diseases incidence and control in replantings. Proc. Nat. Rubb. Res. Conf., Kuala Lumpur, 483-495.
- INBAR M. et SACHS L., 1969 - Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 63, 1418-1425.
- JACQUES-FELIX M., 1967 - Recherches morphologiques, anatomiques, morphogénétiques et physiologiques sur des rhizomorphes de Champignons supérieurs et sur le déterminisme de leur formation. I. Observations sur les agrégats mycéliens dans le milieu naturel. Bull. Soc. mycol. Fr., 83, 5-105.

- JACQUES-FELIX M., 1968 - Recherches morphologiques, anatomiques, morphogénétiques et physiologiques sur des rhizomorphes de Champignons supérieurs et sur le déterminisme de leur formation. II. Recherches sur la morphogénèse des rhizomorphes et télépodes en culture pure. Bull. Soc. mycol. Fr., 84, 161-307.
- JAFFE L.F., 1966 - On autotropism in Botrytis : measurement technique and control by CO₂. Pl. Physiol., 41, 303-306.
- KONIJN T.M., VAN DE MEENE J.G.C., BONNER J.T. et BARKLEY D.S., 1967 - The acrasin activity of adenosine-3', 5' - cyclic phosphate. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 58, 1152-1157.
- KONIJN T.M., BARKLEY D.S., CHANG Y.Y. et BONNER J.T., 1968 - Cyclic AMP : a naturally occurring acrasin in the cellular slime molds. Am. Nat., 102, 225-233.
- KONIJN T.M., VAN DE MEENE J.G.C., CHANG Y.Y., BARKLEY D.S. et BONNER J.T., 1969 - Identification of adenosine-3', 5'-monophosphate as the bacteria attractant for myxamoebae of Dictyostelium discoideum. J. Bact., 99, 510-512.
- LARPENT J.P., 1962 - La notion de dominance apicale chez Rhizoctonia solani Kühn. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 254, 1137-1139.
- LARPENT J.P., 1966 - Caractère et déterminisme des corrélations d'inhibition dans le mycélium jeune de quelques champignons. Annls Sci. nat., 17, 1-130.
- LARPENT J.P., 1968 - Rôle de la polarité cellulaire et des corrélations intercellulaires dans la différenciation des rhizoïdes du Draparnaldia mutabilis (Roth.) Bory. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 267, 1713-1716.
- LARPENT J.P., 1970 - De la cellule à l'organisme. Collection Précis de Biologie Végétale, Ed. Masson, Paris.
- LARPENT J.P., 1971 - Quelques problèmes posés par le développement des Acrasiales. Année biol., 10, 511-531.

- LARPENT J.P., 1972 - Quelques données nouvelles de la biologie des Acrasiales et des Myxomycétales. Botaniste, 55, 39-69.
- MACDONALD J.A. et CARTTER M.A., 1961 - The rhizomorphs of Marasmius androsaceus Fries. Trans. Br. mycol. Soc., 44, 72-78.
- MATHEW T., 1961 - Morphogenesis of mycelial strands in the cultivated mushroom, Agaricus bisporus. Trans. Br. mycol. Soc., 44, 285-290.
- MOODY A.R., GARRAWAY M.O. et WEINHOLD A.R., 1968 - Stimulation of rhizomorph production in Armillaria mellea with oils and fatty acids. Résumé in Phytopathology, 58, 1060-1061.
- MOODY A.R. et WEINHOLD A.R., 1970 - Unsaturated fatty acids as natural stimulants of rhizomorph production by Armillaria mellea. Résumé in Phytopathology, 60, 1305.
- MOODY A.R. et WEINHOLD A.R., 1972 - Fatty acids and naturally occurring plant lipids as stimulants of rhizomorph production in Armillaria mellea. Phytopathology, 62, 264-267.
- MORQUER R. et HUBERT M.F., 1969a - Métabolisme des glucides et rhizomorphogénèse chez le Clitocybe mellea. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 269, série D, 2199-2204.
- MORQUER R. et HUBERT M.F., 1969b - Métabolisme comparé de Clitocybe mellea et de ses antagonistes. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 269, série D, 2323-2328.
- MORQUER R. et TOUVET A., 1972a - Déterminisme biochimique de la rhizomorphogénèse chez Clitocybe mellea (Vahl.) Ricken. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 275, série D, 2509-2514.
- MORQUER R. et TOUVET A., 1972b - Répression de la rhizomorphogénèse et antagonisme mycélien au cours de la lutte biologique contre le Clitocybe mellea (Vahl.) Ricken. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 275, série D, 2393-2398.

- MOSCONA A.A., 1961 - How cells associate. Scient. Am., 205, 143-162.
- MOSCONA A.A., 1966 - The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. In Molecular and cellular aspects of development, Ed. BELLE E., Harper Int. Ed., 55-64.
- MOTTA J.J., 1967 - A note on the mitotic apparatus in the rhizomorph meristem of Armillaria mellea. Mycologia, 59, 370-375.
- MOTTA J.J., 1969a - Cytology and morphogenesis in the rhizomorph of Armillaria mellea. Am. J. Bot., 56, 610-619.
- MOTTA J.J., 1969b - Somatic nuclear division in Armillaria mellea. Mycologia, 61, 873-886.
- PENTLAND G., 1968 - Ethanol produced by Aureobasidium pullulans and its effect on the growth of Armillaria mellea. Can. J. Microbiol., 13, 1631-1639.
- PHILIPS I.D.J., 1969 - Apical dominance. In Physiology of Plant growth and development. Ed. WILKINS M.B., Mc Graw Hill, Londres.
- PICHELL R.J., 1956 - Les pourridiées de l'Hévéa dans la cuvette congolaise. Publs Inst. natn. Etude agron. Congo Belge, 49, 1-480.
- PLEMPER M., 1960 - Die zygotropische Reaktion bei Mucorineen. I. Mitteilung. Planta, 55, 254-258.
- PLEMPER M. et DAVID W., 1961 - Die zygotropische Reaktion bei Mucorineen. II. Mitteilung. Planta, 56, 438-446.
- PUJARNISCLE S., Communication personnelle.
- QUENOUILLE R., 1964 - Méthodes de calcul statistique rapide, Ed. Dunod, Paris.
- RAPER J.R., 1960 - The control of sex in fungi. Am. J. Bot., 47, 794-808.

- RIGGENBACH A., 1957 - Fomes lignosus, a pyrimidine deficient fungus.
Nature, Lond, 180, 43-44.
- RIGGENBACH A., 1960 - On Fomes lignosus (Klotzsche) Bres., the causative agent of the white-root disease of the Para Rubber Tree, Hevea brasiliensis Muell. Arg. Phytopath. Z., 40, 187-212.
- ROBBINS W.J. et HERVEY A., 1959 - Light, growth and reproduction of Poria ambigua. Résumé in Science, N.Y., 129, 1288.
- ROBINSON P.M., PARK D. et GRAHAM T.A., 1968 - Autotropism in fungal spores. J. exp. Bot., 19, 125-134.
- ROGERS C.H. et WATKINS G.M., 1938 - Strand formation in Phymatotrichum omnivorum. Am. J. Bot., 25, 244-246.
- RUNYON E.H., 1942 - Aggregation of separate cells of Dictyostelium to form a multicellular body. Collecting Net, 17, 83.
- SCHÜTTE K.H., 1956 - Translocation in the fungi. New Phytol., 55, 164-182.
- SHAFFER B.M., 1956a - Properties of acrasin. Science, N.Y., 123, 1172-1173.
- SHAFFER B.M., 1956b - Acrasin, the chemotactic agent in cellular slime molds. J. exp. Biol., 33, 645-657.
- SHAFFER B.M., 1962 - The Acrasina. Adv. Morphogen., 2, 109-182.
- SHOHAM J. et SACHS L., 1972 - Differences in the binding of fluorescent concanavalin A to the surface membrane of normal and transformed cells. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2479-2482.
- SINNOT E.W., 1960 - Plant morphogenesis. Mc Graw-Hill Book Company, Londres.
- SMITH A.M. et GRIFFIN D.M., 1971 - Oxygen and the ecology of Armillariella elegans Heim. Aust. J. Biol. Sci., 24, 231-262.
- SNIDER P.J., 1959 - Stages of development in rhizomorphic thalli of Armillaria mellea. Mycologia, 51, 693-707.

- SONNEBORN D.R., 1962 - Immunological analyses of the development of the cellular slime mold, Dictyostelium discoideum. Ph. D. thesis, Brandeis University.
- SONNEBORN D.R., SUSSMAN M. et LEVINE L., 1964 - Serological analyses of cellular slime mold development. I. Changes in antigenic activity during cell aggregation. J. Bact., 87, 1321-1329.
- STADLER D.R., 1952 - Chemotropism in Phizopus nigricans. The staling reaction. J. cell. comp. Physiol., 39, 449-474.
- STEINBERG M.S., 1966 - Mechanism of tissue reconstruction by dissociated cells. In Molecular and cellular aspects of development, Ed. BELLE E., Harper Int. Ed., 64-78.
- STEINBERG M.S. et WISEMAN L.L., 1972 - Do morphogenetic tissue rearrangements require active cell movements ? The reversible inhibition of cell sorting and tissue spreading by cytochalasin B. J. cell. Biol., 55, 606-615.
- TABER W.A., 1966 - Morphogenesis in Basidiomycetes. In The Fungi, Ed. AINSWORTH G.C. et SUSSMAN A.S., Ac. Press, New York et Londres, II, 387-412.
- TAKEUCHI I., 1963 - Immunochemical and immunohistochemical studies on the development of the cellular slime mold Dictyostelium mucunoides. Devl. Biol., 8, 1-26.
- TOWNSEND B.B., 1954 - Morphology and development of fungal rhizomorphs. Trans. Br. mycol. Soc., 37, 222-233.
- TOWNSEND B.B. et WILLETS J.H., 1954 - The development of sclerotia of certain fungi. Trans. Br. mycol. Soc., 87, 213-221.
- TOWNES P.L. et HOLFTRETER J., 1966 - Directed movements and selective adhesion of embryonic Amphibian cells. In Molecular and cellular aspects of development, Ed. BELLE E., Harper Int. Ed., 3-40.

- URAYAMA T., 1956 - Das Wuchshormon des Fruchtkörpers von Agaricus campestris
L. Bot. Mag., Tokyo, 69, 817-818.
- VALDER P.G., 1958 - The biology of Helicobasidium purpureum Pat.
Trans. Br. mycol. Soc., 41, 283-308.
- WARDLAW C.W., 1968 - Morphogenesis in plants. A contemporary study.
Methuen and Co. Ltd.
- WAREING P.F. et PHILIPS I.D.J., 1970 - The control of growth and differentiation in plants. Pergamon Press.
- WATKINSON S.C., 1971a - The mechanism of mycelial strand induction in Serpula lacrymans : a possible effect of nutrient distribution.
New Phytol., 70, 1079-1088.
- WATKINSON S.C., 1971b - Phosphorus translocation in the stranded and unstranded mycelium of Serpula lacrymans. Trans. Br. mycol. Soc., 57, 535-539.
- WEINHOLD A.R., 1963 - Rhizomorph production by Armillaria mellea induced by ethanol and related compounds. Science, N.Y., 142, 1065-1066.
- WEINHOLD A.R., 1964 - Ethanol as a carbon source and growth stimulant for Armillaria mellea. Résumé in Phytopathology, 54, 912.
- WEINHOLD A.R. et GARRAWAY M.O., 1965 - Period of exposure to ethanol in relation to rhizomorph production by Armillaria mellea. Résumé in Phytopathology, 55, 1082.
- WEINHOLD A.R. et GARRAWAY M.O., 1966 - Nitrogen and carbon nutrition of Armillaria mellea in relation to growth-promoting effects of ethanol. Phytopathology, 56, 108-112.
- WETTSSTEIN D.V., 1965 - Die Induktion und experimentelle Beeinflussung der Polarität bei Pflanzen. Handb. PflPhysiol., 15/1, 275-330.
- ZALCKAR M., 1965 - Integration of cellular metabolism. In the fungi,
Ed. AINSWORTH G.C. et SLESSMAN A.S., Ac. Press New York and London, I,
377-426.