

N° d'ordre : 577

50376
1983
103

50376
1983
103

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Gérard VIDAL

**RELATIONS ENTRE LE METABOLISME
INTERMEDIAIRE, LE METABOLISME LIPIDIQUE ET
LA REPRODUCTION SEXUEE DU *LEPTOSPHAERIA
TYPHAE* (AUERSW.) KARSTEN.**



Soutenue le 23 mars 1983 devant la Commission d'Examen :

MM.	L.	LACOSTE	Professeur à l'Université de Lille 1
	P.	MAZLIAK	Professeur à l'Université de Paris 6
	C.	MONTANT	Professeur à l'Université de Toulouse 3
	G.	TURIAN	Professeur à l'Université de Genève
	P.	VERNET	Professeur à l'Université de Lille 1

*Jamais je ne passerai sous
silence Toulouse, ma nourrice...*

AUSONE

*Tu que siàs còr de la tèrra
Ó fòc cramant las estèlas
Escota : ma votz te cèrca
Cresent que me pòdes comprene.*

MARTI

*Rien ne sert de soutenir
ce qui ne tient pas debout.*

Pierre DAC

AVANT - P R O P O S

Avant d'exposer ce qui constitue le résultat d'une partie de mes recherches, je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur MORQUER, qui, il y a déjà fort longtemps, m'honora de sa confiance et guida mes premiers pas dans cette carrière. Appréciant tout le privilège d'avoir été son élève, je me suis toujours efforcé avec plus ou moins de bonheur de mériter sa sollicitude et de faire honneur à son Ecole. Mon immense regret aujourd'hui est qu'il ne puisse lire cet ouvrage et le critiquer avec la rigueur et la compréhension qui le caractérisaient.

Il m'est très agréable d'exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur LACOSTE. Il a bien voulu me recueillir dans son Laboratoire et a pris le risque de me confier des responsabilités dans ses travaux de recherche et d'enseignement. Je ne l'oublie pas et j'espère que ce travail est la preuve qu'il n'a pas eu tort de me faire confiance.

Monsieur le Professeur MAZLIAK m'a reçu très cordialement dans son Laboratoire en dépit de ses multiples charges ; il a bien voulu s'intéresser à mon travail et cet ouvrage doit beaucoup à ses conseils. Il a enfin accepté de faire partie de ce jury. Je l'en remercie très vivement.

J'ai toujours rencontré auprès de Monsieur le Professeur MONTANT la plus bienveillante compréhension. Il a fait preuve à mon égard de la plus grande patience et a toujours cherché à faciliter au maximum ma carrière scientifique. Pour couronner le tout, il a accepté de faire le lointain voyage de Lille pour venir juger ma Thèse. Qu'il soit assuré de mon extrême reconnaissance.

Je suis très reconnaissant à Monsieur le Professeur TURIAN d'avoir bien voulu honorer de sa présence mon Jury de Thèse, malgré l'éloignement et les difficultés du voyage de Genève à Lille. Je suis d'autant plus heureux de sa participation que mon travail s'inscrit dans la ligne de ses propres recherches sur la différenciation fongique.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur VERNET, qui, en dépit de l'accumulation d'obligations qu'entraîne pour lui sa récente installation à Lille, n'a pas hésité à lire cette Thèse et à la juger.

J'ai une dette particulière de reconnaissance envers le Révérend Père CARLES, Directeur du Laboratoire de Physiologie Végétale du C.N.R.S. de Toulouse. C'est dans son Service qu'ont été réalisés tous les dosages d'acides organiques dont les résultats figurent dans cet ouvrage. Il m'a toujours reçu avec la plus grande amabilité et n'a jamais été avare de conseils très précieux.

Sans la confiante collaboration de mon ami G. VIALA, la première partie de cet ouvrage n'aurait jamais vu le jour. Qu'il sache que je lui en suis très reconnaissant et que je serai toujours disponible pour lui rendre une part de l'immense dette que j'ai envers lui.

Madame ALAIS, Chargée de Recherches C.N.R.S., a réalisé toutes les extractions et analyses de stérols qui figurent dans ce Mémoire. Sans son intervention, la troisième partie de ma Thèse eut été fort courte ! Je tiens à la remercier tout particulièrement. Je remercie aussi Monsieur le Professeur LABLACHE-COMBIER, Directeur du Laboratoire dont Madame ALAIS faisait partie à Lille.

J'ai appris la majeure partie des techniques de lipidologie lors de stages dans les Laboratoires de Messieurs les Professeurs ASSELINEAU et DOUSTE-BLAZY. Je tiens à les en remercier, ainsi que tout le Personnel de leurs Services.

Je n'aurai garde d'oublier d'adresser mes très sincères remerciements à Mademoiselle CHAUDORGE dont l'aide dévouée m'a été extrêmement précieuse tout au long de mes expériences. J'ai aussi mis à profit ses talents de dessinatrice pour la réalisation des figures de ce Mémoire.

Madame LECOQ d'abord, puis Madame DAHLEM ont assuré avec dévouement et bonne humeur la dactylographie de cette Thèse dans des conditions souvent difficiles. Qu'elles en soient remerciées ici.

Je remercie enfin tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé au cours de ce travail, et tout particulièrement mes collègues R. BLONDEAU, G. BOUDART et B. DEHORTER, ainsi que le personnel du Laboratoire de Cryptogamie, Madame AGUS, Mademoiselle MILLET, Monsieur LECLERCQ.

S O M M A I R E

INTRODUCTION	1
MATÉRIEL ET MÉTHODES	3
I. LE <i>Leptosphaeria typhae</i>	5
II. CONDITIONS DE CULTURE	11
III. MORPHOGENESE DU CHAMPIGNON	15
IV. LE PROBLEME DE L'ECHANTILLONNAGE	17
PREMIÈRE PARTIE : RELATION ENTRE LA REPRODUCTION SEXUÉE, LE MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE ET LA LUMIÈRE	19
INTRODUCTION	21
MATERIEL ET METHODES	25
CHAPITRE I. Essais de stimulation des cycles citrique et glyoxylique	29
CHAPITRE II. Influence de l'éclairement continu sur la croissance, la reproduction sexuée et le métabolisme intermédiaire	51
CHAPITRE III. Influence de la date d'éclairement sur la fructification et le métabolisme du <i>Leptosphaeria typhae</i>	61
CONCLUSION	81
DEUXIÈME PARTIE : RELATION ENTRE LA FRUCTIFICATION SEXUÉE ET LE MÉTABOLISME LIPIDIQUE	83
INTRODUCTION	85
MATERIEL ET METHODES	87

CHAPITRE I. Evolution de la teneur lipidique du mycélium au cours du développement	89
CHAPITRE II. Analyse des lipides au cours du développement	99
CHAPITRE III. Modification de la composition lipidique du Champignon sous l'action d'agents stimulant ou réduisant sa reproduction sexuée	125
TROISIÈME PARTIE : VARIATION DES STÉROLS ET DES SUBSTANCES PHOTOMIMÉTIQUES EN RELATION AVEC LA REPRODUCTION SEXUÉE DU <i>Leptosphaeria typhae</i> EN FONCTION DES CONDITIONS DU MILIEU.....	147
INTRODUCTION	149
CHAPITRE I. Etude des stérols du <i>Leptosphaeria typhae</i>	151
CHAPITRE II. Recherche sur la mycosporine, substance photo-mimétique, activateur de la différenciation	173
CONCLUSIONS GENERALES.....	179
BIBLIOGRAPHIE	183

I N T R O D U C T I O N

Les Champignons sont des êtres très polymorphes qui subissent de profondes variations morphologiques et physiologiques au cours de leur cycle de développement : il n'est que de citer l'exemple des Urédinales pour se rendre compte de la complexité que peut atteindre le phénomène de différenciation fongique. D'ailleurs, même des cas d'apparence plus simple posent des problèmes d'abord extrêmement ardu. De nombreux "modèles" ont été étudiés : le *Taphrina deformans* se multiplie en formes-levure *in vitro* alors qu'il est filamenteux à l'état parasite. L'*Histoplasma capsulatum* prend une forme mycélienne à 25°C, levure à 37°C ; suivant les conditions de culture, les *Aspergillus* et les *Penicillium* produisent seulement des filaments mycéliens ou différencient des appareils conidiens. La différenciation sexuelle de ces organismes pose aussi des questions difficiles : par exemple, pourquoi le *Neurospora* produit-il des périthèces à 25°C et demeure-t-il totalement stérile à 37°C, tout comme le *Leptosphaeria acuta* l'est à 18°C alors qu'il est fertile à 10°C ?

Les Mycologues se sont d'abord efforcés de décrire ces phénomènes ; ensuite, ils ont cherché à comprendre le déterminisme des modifications qui interviennent chez les Champignons et ont mis en évidence l'importance des facteurs externes : milieu de culture, environnement physique et chimique

(température, lumière, O₂, CO₂...). A l'heure actuelle, de multiples équipes (CANTINO, LACOSTE, MANACHERE, MARIAT, MONTANT, TURIAN, etc...) s'efforcent d'éclaircir les mécanismes physiologiques qui conduisent la cellule fongique à orienter son métabolisme dans une direction précise.

Comment des variations de conditions de vie paraissant mineures provoquent-elles de si profonds bouleversements physiologiques qu'ils entraînent des différenciations biologiques fondamentales ? Telle est la question que nous nous posons. Car, si de très grands progrès ont été réalisés dans la connaissance de la morphogenèse fongique, il est encore difficile de dégager les lois générales qui la dirigent. Le travail exposé ici a pour but de répondre à une infime partie de cette interrogation en précisant quelques points particuliers de la reproduction sexuée des Ascomycètes homothalliques. Pour cette étude, nous avons utilisé le *Leptosphaeria typhae* (Auers.) Karsten. Celui-ci présente deux particularités intéressantes pour l'étude de sa reproduction sexuée : sur un milieu synthétique, il forme des périthèces lorsqu'il est soumis à une photopériode de 12 heures alors qu'il ne se reproduit pas à l'obscurité constante ; d'autre part, il ne présente aucune figure de différenciation asexuée (conidie, chlamydospore, etc...) qui pourrait rendre plus complexe l'interprétation des études physiologiques et biochimiques.

Dans la première partie de notre Thèse, nous avons essayé de relier la reproduction sexuée du Champignon au fonctionnement de son métabolisme intermédiaire en relation avec la variation de certains paramètres de l'environnement : lumière, aération du mycélium, milieu de culture.

A la suite de cette étude, nous avons, dans une deuxième partie, tenté d'évaluer dans le même esprit l'évolution du métabolisme des lipides.

Nous avons enfin commencé une recherche des métabolites photosensibles et d'éventuelles hormones dirigeant la morphogenèse du Champignon.

M A T E R I E L E T

M E T H O D E S

I. LE LEPTOSPHAERIA TYPHAE

DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE ET POSITION SYSTÉMATIQUE

Cet Ascomycète, décrit pour la première fois par KARSTEN, est rare dans la nature. LACOSTE, au cours de son étude du genre *Leptosphaeria*, ne l'a rencontré que deux fois, en 1961 et 1962, toujours sur *Typha latifolia* ; il en donne la description morphologique suivante (1965) :

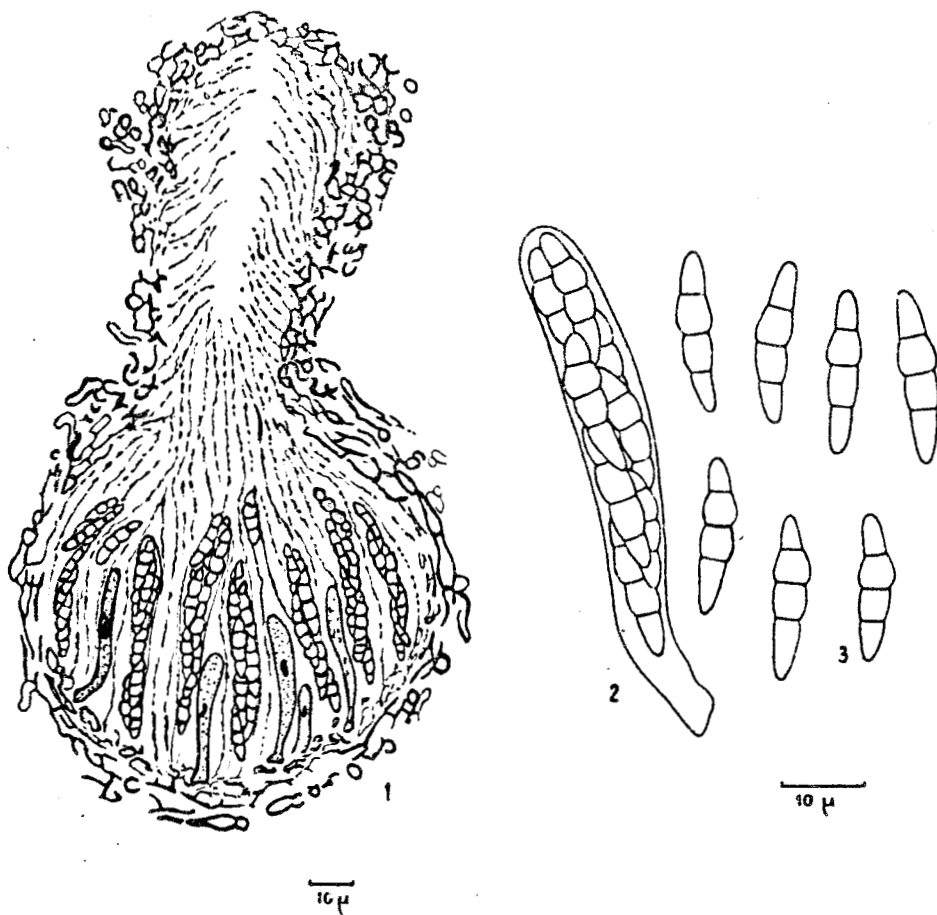
"Les périthèces sont très dispersés, sous-épidermiques et entièrement enfoncés dans le substrat ; globuleux, ils atteignent un diamètre d'environ 80 à 100 μ ... Les parois sont assez minces, pigmentées, noires et constituées de 3 ou 4 couches de cellules polyédriques allongées. A la base, un tissu ascogène peu abondant donne naissance à de nombreux asques cylindriques, légèrement en massue, qui se dressent au sein d'un tissu nourricier pseudoparaphysoïde. Ce dernier disparaît lorsque les conditions de maturation de l'appareil sexuel sont satisfaisantes.

... les ascospores, toujours au nombre de 8, triseptées, sont droites ou légèrement arquées. La deuxième cellule est élargie et présente, comme MUNK l'a observé, son maximum d'élargissement plus près de la cloison médiane que de l'axe de la cellule". La cellule distale est plus large que celle de la partie proximale, ordinairement fortement atténuée. Leur dimension varie de 18-20 x 4-5 μ . La couleur est jaune assez clair" (planche I).

Les ascospores contiennent un grand nombre de globules lipidiques (planche II).

Planche I : La reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae* d'après L. LACOSTE.

1 : périthèce - 2 : asque - 3 : ascospores.



Il convient de remarquer que les planches I et II ont été exécutées à partir de périthèces obtenus en culture, dont le col ostiolaire est nettement plus long que dans la nature, allongement dû à l'éclaircissement nycthéral.

PARGUEY (1966) a pu observer dans des cultures fournies par LACOSTE le développement des primordiums périthéciaux et en donne la description suivante (figure 1) :

"Le massif méristogène dont dérive chacun des périthèces provient d'une portion d'hyphe, non pas intercalaire, mais généralement terminale. En effet, ce sont les cellules situées à l'extrémité d'un filament mycélien qui se dilatent (figure 1A), puis se cloisonnent longitudinalement et transversalement (figure 1B) ; le primordium semble alors porté sur un pied, constitué par la partie sous-jacente du filament. Ensuite les cloisons se multiplient, et la masse méristogène se transforme en un petit nodule pseudoparenchymateux sphérique (figure 1C). Dans celui-ci, après coloration au bleu C4B au lactophénol, un ascogone et son trichogyne sont visibles par transparence (figure 1D).

La transformation de ce nodule en un périthèce adulte comporte les phénomènes habituels : différenciation d'une paroi et d'un carpocentre ; dans celui-ci, lyse des cellules nourricières et formation, à partir des autres cellules, d'une garniture périloculaire dont la cloche produit des pseudoparaphyses.

Figure 1 : Les primordiums périthéciaux du *Leptosphaeria typhae* d'après A. PARGUEY.

A-B-C Evolution des primordiums stromatoïdes terminaux

D Mise en évidence, par la coloration au bleu C4B au lactophénol d'un archicarpe dans une ébauche de pyrénosphère femelle.

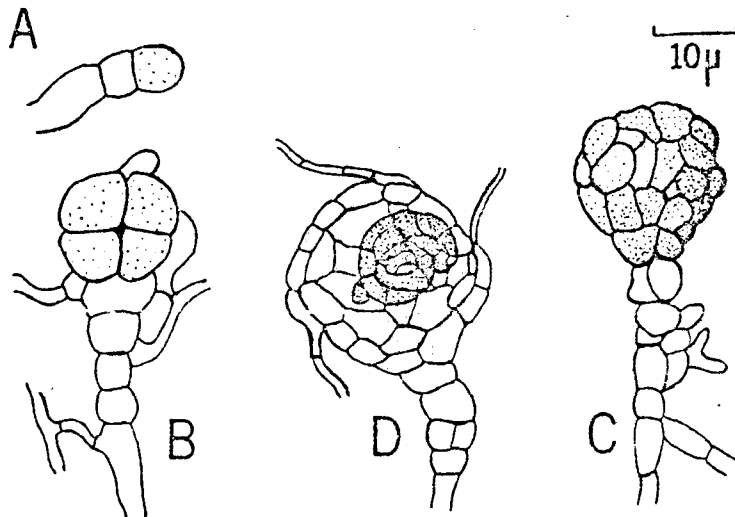
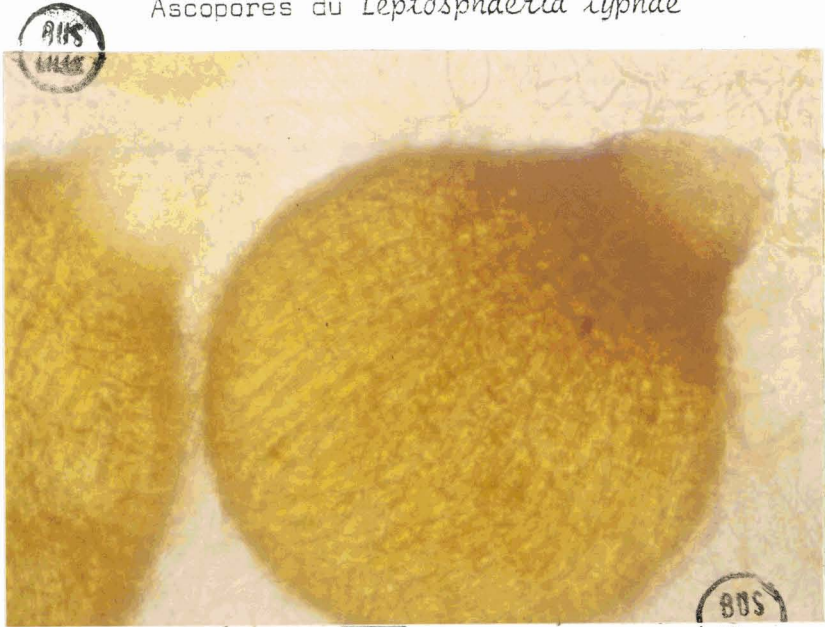
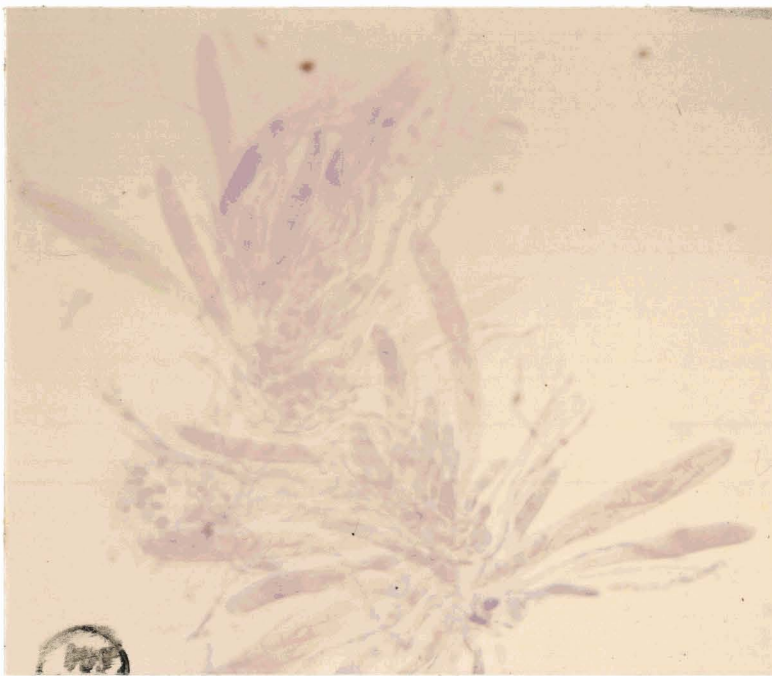


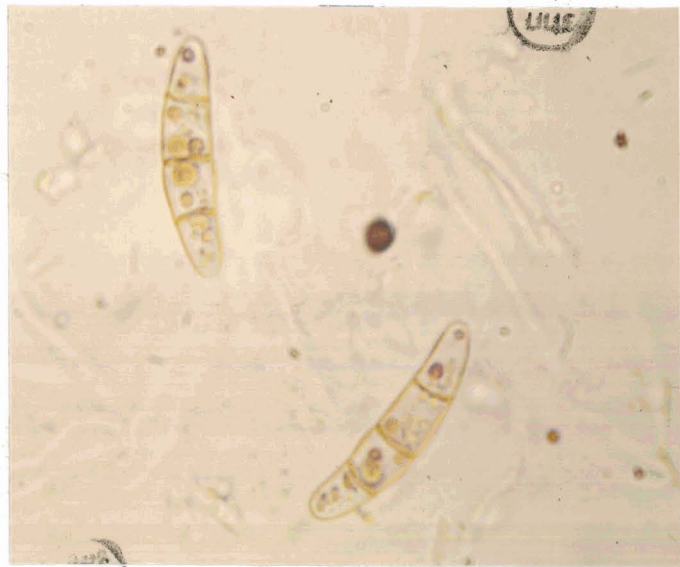
Planche II : Périthèce, Asques et
Ascospores du *Leptosphaeria typhae*



Périthèces



Asques



Ascospore
observée dans
le rouge Soudan au
lactophénol

On peut constater que le Champignon ne différencie ni spermatie ni filament paraascogonial. Il est donc probable que c'est par thallogamie que se réalise la fécondation.

La souche dont nous disposons provenant d'un isolement monoascosporal effectué au micromanipulateur de Fonbrune par LACOSTE, nous pouvons affirmer que le *Leptosphaeria typhae* est homothallique, car il est apte à produire d'abondants périthèces à partir de ces formes monoascosporées.

La position systématique du *Leptosphaeria typhae* a été définie par LACOSTE (1965) :

"Les *Leptosphaeria*, entendus dans un sens large, appartiennent à l'ordre des *Pleosporales* dont l'espèce-type est le *Pleospora herbarum*. Aux *Pleosporales*, déjà considérées comme *Pseudosphaeriaceae* depuis VON HOHNEL, on reconnaît.... une structure *Ascoloculaire*".

Enfin, LACOSTE fait sienne la conception d'HOLM (1957) qui divise les *Leptosphaeria* en :

"quatre grands genres nouveaux caractérisés comme suit :

- 1) les vrais *Leptosphaeria*
- 2) les *Melanoma*
- 3) les *Nodulosphaeria*
- 4) les *Phaeosphaeria* : vivant essentiellement sur graminées et familles voisines, possèdent des parois minces. Le pseudo-tissu paraphysoïde est toujours beaucoup moins important que dans les trois autres genres. Ces spores cylindriques n'ont jamais d'appendices".

A partir de l'étude morphologique du *Leptosphaeria typhae* exposée plus haut, on pourrait classer cette espèce dans le genre *Plaeosphaeria*. Mais ce dernier n'ayant pas reçu un accord international, nous continuerons dans la suite de ce travail à employer le nom donné par CESATI et DE NOTARIS.

II. CONDITIONS DE CULTURE

II.1 CONDITIONS PHYSIQUES

Dans sa Thèse, LACOSTE (1965) a mis en évidence le rôle du couple lumière-température sur la fructification des *Leptosphaeria*. Pour *L. typhae*, l'optimum se situe à 18°C ; sous éclairement alterné : 12 heures de lumière, 12 heures d'obscurité. Les cultures ont donc été faites dans des chambres climatisées dont la température était réglée à 18 ± 1°C.

Les cultures en tubes, flacons d'Erlenmeyer et boîtes de Roux destinés à former des périthèces, recevaient l'éclairement de tubes fluorescents "blanc brillant de luxe" situés à 30 cm au-dessus de l'étagère sur laquelle elles étaient disposées. Cela leur permettait de recevoir un éclairement de 3 000 ergs/cm⁻²/sec⁻¹. Les cultures étaient soumises à un rythme nyctéméral.

Si nous désirions que le Champignon demeure stérile, nous placions les récipients de culture, enveloppés de papier noir, dans une enceinte non éclairée.

II.2 MILIEUX DE CULTURE

II.2.1 MILIEU-HOTE.

Il s'agit de fragments de feuilles de *Typha latifolia*, disposés verticalement ou obliquement dans un Erlenmeyer de 300 ml avec 100 ml d'eau distillée.

II.2.2 DECOCTION D'AVOINE A 20 G/L.

Ce milieu mis au point par LACOSTE nous a servi de milieu de référence. Sa préparation est relativement longue : 20 g de farine d'avoine complète sont placés dans un litre d'eau distillée, agités 10 minutes puis mis à l'étuve à 65°C pendant 15 heures. La décoction est alors centrifugée pour éliminer les particules les plus grossières puis filtrée sur filtre Laurent 6B. Le volume du filtrat est ramené à la valeur initiale par de l'eau distillée. Après une première stérilisation, on filtre à nouveau et on répartit en boîtes de Roux d'un litre, 100 ml par flacon. Le pH de la solution est alors de 5,8.

Ce milieu a été analysé par VIALA au laboratoire de Physiologie végétale du C.N.R.S. (Institut Catholique, Toulouse). On peut constater, à la lecture des résultats, que la solution est très diluée par rapport aux milieux de culture de la Mycologie classique.

II.2.2.1) Glucides : La décoction ne contient que très peu de glucides (tableau 1) mais cela est nécessaire pour déclencher une abondante reproduction sexuée du Champignon, ainsi que l'a remarqué LACOSTE (1965) qui obtenait sur moût de bière des résultats d'autant meilleurs que ce milieu était plus dilué. Lors de nos études pour mettre au point un milieu chimiquement défini, nous avons aussi constaté que le *Leptosphaeria typhae* exigeait pour produire des périthèces que son milieu ne renferme que de faibles quantités de carbone (VIDAL et al., 1974)

Tableau 1 : Teneur du milieu en glucides (mg/l).

Dextrines.....	800	Maltose.....	50
Fructose.....	120	Raffinose.....	30
Glucose.....	120	Stachyose.....	30
Saccharose.....	60	Xylose.....	30
Amidon.....	traces	Glucides totaux.....	1,24g/l.

II.2.2.2) Acides aminés : Les acides aminés libres fournissent à la solution 5 mg d'azote par litre. Cette teneur passe à 25 mg/l si la décoction est hydrolysée. Il s'agit là encore de concentrations faibles mais favorables à la différenciation sexuelle du Champignon -le milieu synthétique que nous avons mis au point contient seulement 50 mg d'azote par litre-.

Tableau 2 : Pourcentage des acides aminés contenus dans la décoction d'avoine.

Ac. glutamique.....	10,7	Sérine.....	9,2
Ac. γ amino butyrique.....	3,8	α -alanine.....	12,6
Proline.....	3,3	Valine.....	6,9
Ornithine.....	0,5	Leucine.....	8,5
Arginine.....	5,7	Isoleucine.....	3,6
Lysine.....	8,8	Méthionine.....	0,5
Ac. aspartique.....	0,8	Histidine.....	2
Thréonine.....	7,6	Phénylalanine.....	4,7
Glycocolle.....	6,4	Tyrosine.....	3,2

II.2.2.3) Acides organiques :

Tableau 3 : Acides organiques contenus par la décoction d'avoine (teneur totale, environ 500 meq/l).

Acide lactique.....	53,7 %
Acide malique.....	25,9 %
Acide succinique.....	8,3 %
Acide citrique.....	7,1 %
Acide fumarique.....	4,8 %
Acide malonique.....	traces
Acide quinique.....	traces

II.2.2.4) Eléments minéraux :

Tableau 4 : Eléments minéraux contenus par la décoction d'avoine (mg/l).

K.....	104
Ca.....	32,5
P.....	17,6
Mg.....	9,8
Fe.....	1,3
Zn.....	0,2
Mn.....	0,1
Cu.....	0,04

II.2.3 MILIEU FARINE D'AVOINE 40 G/L GELOSE.

Plus riche que la décoction à 20 g/l, ce milieu nous servait à l'entretien de la souche. Après passage à l'étuve à 65°C, le mélange farine-eau n'était pas centrifugé mais immédiatement gélosé à 18 g/l et réparti eu tubes 25 x 200, à raison de 20 ml par tube.

II.2.4 STERILISATION.

Tous les flacons de culture, bouchés au coton hydrophile, étaient passés à l'autoclave sous une pression de 0,5 atmosphère, durant 20 minutes.

II.3 ENTRETIEN DE LA SOUCHE

La souche étaient entretenue sur milieu-hôte, repiquée tous les 20 jours, afin qu'elle conserve au maximum ses caractéristiques initiales. Périodiquement, on prélevait aseptiquement un fragment de feuille de *Typha* porteur de périthèces et on le déposait sur milieu de farine d'avoine gélosée à 40 g/l contenu dans un tube 25 x 200. Après 12 à 15 jours, la culture sur avoine ainsi obtenue nous servait à ensemercer les milieux d'expérience.

II.4 ENSEMENCEMENT

Pour ensemercer les boîtes de Roux contenant les milieux liquides, nous prélevions le plus petit nombre possible de périthèces (un seul en principe) et nous le mettions en suspension dans la solution, en agitant le fil de platine ensemeur afin de faciliter la dispersion des ascospores.

II.5 ETUDE DE LA CROISSANCE

La croissance a été suivie par mesure périodique du poids de matière sèche. Le mycélium était recueilli sur un papier filtre sans cendre "Durieux n° 111 étiquette rouge" par filtration sous vide dans un entonnoir à cartouche de verre fritté de porosité n° 2. Après un très abondant lavage à l'eau distillée, l'ensemble papier + Champignon était porté à l'étuve à 105°C dans un flacon à tare jusqu'à constance de poids.

II.6 OBSERVATION DE LA REPRODUCTION

Nous notions la date d'apparition des premières ébauches de périthèces, la parfaite conformation de ceux-ci et leur abondance. Ce dernier critère exprimé par un nombre directement proportionnel à la quantité de périthèces, en prenant pour base 100 les fioles-témoin contenant la décoction d'avoine à 20 g/l comme milieu de culture.

III. MORPHOGENESE DU CHAMPIGNON SUR LES MILIEUX UTILISES

Nous décrivons ici l'aspect des cultures dans les conditions physiques optimales pour la reproduction sexuée : 18°C, éclairément par photopériodes de 12 heures.

III.1 SUR MILIEU-HÔTE

Un mycélium léger, très aérien, peu abondant, de couleur gris-blanc, n'apparaît que vers le 4ème ou 5ème jour de culture.

Les premiers périthèces sont visibles aux environs du 10ème jour et mûrissent rapidement. Ils envahissent peu à peu tous les fragments du limbe de *Typha latifolia*.

III.2 SUR FARINE D'AVOINE À 40 G/L GÉLOSÉ

La croissance est assez lente les premiers jours. Le 6ème jour apparaissent les premières ébauches de périthèces, qui mûrissent très rapidement (24 heures). Les fructifications sont, au début, régulièrement disposées au

rythme d'une zonation par 24 heures. Mais, dès le 9ème ou 10ème jour, les zonations ne sont plus visibles, étant donné le nombre très élevé de périthèces qui couvrent toute la surface de la gélose.

III.3 SUR DÉCOCTION D'AVOINE À 20 G/L LIQUIDE

De petits flocons mycéliens apparaissent au sein du milieu dès le 2ème jour de culture. Ces flocons grossissent pour confluer aux environs du 8ème-9ème jour en une nappe continue qui émerge progressivement. Dès le 7ème jour, sur les parties émergées (en particulier au contact des parois de la fiole) on observe des ébauches périthéciales d'abord verdâtres puis noires ; ces formations sexuelles sont de plus en plus nombreuses les jours suivants, jusqu'à recouvrir tout le mycélium aux environs du 11ème jour.

IV. LE PROBLEME DE L'ECHANTILLONNAGE

Au cours de cet exposé, nous allons utiliser les résultats d'analyses biochimiques du mycélium et il nous arrivera de faire appel à la notion "d'unité culturelle". Nous pensons que celle-ci mérite d'être discutée et précisée avant que nous exposions les résultats de nos recherches. Pour nous, une "unité culturelle" est constituée par le mycélium contenu dans une fiole de culture. Elle est "indépendante" et "autonome" (VIALA, 1972) car séparée du milieu extérieur par le bouchon de coton de la boîte de Roux et n'utilisant, pour sa croissance, que le milieu de culture introduit dans le récipient au début de l'expérience.

Il faut aussi reconnaître dans le mycélium une certaine hétérogénéité. En effet, la croissance des hyphes est localisée à leur apex ; c'est en ces extrémités que se produisent les principales synthèses, grâce à une forte concentration en mitochondries (REISS, 1967) ; les parties plus anciennes des filaments, encore capables de puiser des nutriments dans le milieu de culture et d'effectuer certaines synthèses, sont le siège d'actives translocations au profit des régions les plus jeunes (LARPENT, 1965 ; DARGENT, 1969) et finalement se vident. On peut donc distinguer au minimum trois zones le long d'une hyphe : une région apicale jeune et physiologiquement très active, une portion "adulte" et enfin une zone "vieillissante" (VIALA, 1972) presque passive. Il est évident que la composition chimique et l'activité physiologique de ces diverses régions du mycélium sont différentes. Mais il serait pratiquement très difficile et même impossible de séparer les différents articles

des filaments afin de les analyser individuellement et, surtout, les travaux de CHEVAUGEON (1959), NGUYEN VAN HUONG (1967) et MANACHERE (1970) montrent clairement que les diverses parties du thalle sont étroitement dépendantes les unes des autres et constituent une unité physiologique. Cet ensemble peut être dans une certaine mesure comparé à un individu de plante supérieure. L'évolution des métabolites et des activités enzymatiques dans le mycélium, témoignera donc de son activité métabolique. Remarquons enfin, que dans tous les cas nos dosages ont pour but de comparer entre eux différents types de cultures et non de donner des résultats absolus.

P R E M I E R E P A R T I E

RELATION ENTRE LA REPRODUCTION SEXUEE, LE METABOLISME
INTERMEDIAIRE ET LA LUMIERE

INTRODUCTION : RELATIONS DU MÉTABOLISME DES ACIDES ORGANIQUES AVEC LE DÉVELOPPEMENT DES CHAMPIGNONS.

Il y a déjà de nombreuses années que l'on sait que certains *Aspergillus* et *Penicillium* accumulent de grandes quantités d'acide citrique dans leur milieu de culture. D'autres espèces synthétisent aussi divers intermédiaires du cycle tricarboxylique, tels que l'acide succinique, l'acide fumarique (FOSTER et WAKSMAN, 1939), l'acide malique ou l'acide acétique (COCHRANE, 1958 ; LONG, 1968). Il s'agit là plutôt du résultat d'un blocage des processus métaboliques que d'une activité enzymatique normale. Des preuves beaucoup plus claires du fonctionnement du cycle citrique chez les Champignons ont été fournies par des expériences plus précises telles que l'utilisation d'inhibiteurs d'enzymes, l'étude de l'incorporation de substrats marqués au ^{14}C et surtout la mise en évidence d'activités enzymatiques dans des extraits acellulaires. Ce n'est qu'au cours de la décennie : 1950-1960 que fut découvert le cycle glyoxylique (CAMPBELL et al., 1953). Après que les enzymes caractéristiques : isocitrate-lyase (OLSON, 1954 ; SAZ et HILLANY, 1956 ; SMITH et GUNSALUS, 1954, 1955) et malate synthétase (WONG et AJL, 1956) eurent été découvertes chez des bactéries, ces études furent d'abord étendues aux levures (OLSON, 1959) puis aux autres groupes de Champignons (CASSELTON et al., 1959 ; GOTTLIEB et RAMACHANDRAN, 1960 ; KORNBERG et COLLINS, 1958 ; Mc CURDY et CANTINO, 1960 ; RAMAKRISHNAN et MARTIN, 1955 ; TOKUNAGA et al., 1969 ; TURIAN, 1960, 1961, 1963 ; TURIAN et al., 1962, etc...).

L'étude du rôle du métabolisme intermédiaire dans la morphogenèse sexuée a été menée sur un nombre relativement réduit de Champignons. LE ROUX (1962, 1966) montre que l'activité respiratoire des lamelles de l'*Agaricus campestris* est plus grande que celle des autres "tissus" du carpophore. Dès 1939, FOSTER et WAKSMAN constatent une plus grande richesse en acide fumari- que des souches + (femelles) de *Rhizopus* que des souches - (mâles), résultat confirmé par SCHOCH en 1959. Cela montre déjà que les dissemblances biologi- ques et morphologiques se retrouvent au niveau du métabolisme, mais la liaison entre différenciation sexuelle et métabolisme intermédiaire n'est pas éviden- te. Les principaux travaux ont été réalisés sur des Champignons aquatiques *Blastocladiella* (CANTINO et al.) et *Allomyces* (TURIAN et al.) et sur des Ascomycètes du genre *Neurospora* (TURIAN et al.). Chez les *Allomyces*, la déter- mination du sexe n'est pas seulement génétique mais aussi partiellement phéno- typique (TURIAN, 1969 ; TURIAN et MATIKIAN, 1966). En modifiant les conditions de culture, on peut modifier le rapport gamétocystes mâles/gamétocystes femel- les -la "sex-ratio" de TURIAN (TURIAN, 1969)- dans de notables proportions de l'ordre de 4 : 1. Des inhibiteurs du cycle citrique, tels que le malonate ou l'arsénite (TURIAN, 1958) ou un "dérépresseur" du cycle glyoxylique comme l'acétate (TURIAN, 1958, 1960c, 1963) augmentent la proportion de mâles et peuvent même provoquer une nette réversion des souches femelles isolées par EMERSON (TURIAN, 1960c). Des phénomènes semblables sont observés sur des *Achlya* (RAPER, 1952). Les dosages de quelques enzymes montrent bien que la différenciation sexuelle mâle peut être la conséquence d'un blocage du cycle citrique compensé par une stimulation du cycle glyoxylique (TURIAN, 1960c, 1961).

De même, on constate une insuffisance en cytochrome-oxydase, succi- nate déshydrogénase et α -céto-glutarate oxydase sur une souche hybride mâle n'ayant subi aucun traitement chimique (TURIAN, 1960a) ; d'autre part, cette souche élabore plus d'acide lactique que la souche femelle (TURIAN, 1960b). Une certaine déficience oxydative accompagne donc toujours la différenciation mâle, même si celle-ci n'est pas induite par des artifices de culture, alors qu'une forte oxygénation du mycélium favorise la différenciation sexuelle femelle (KOBZ et TURIAN, 1967). Chez les *Neurospora* les cultures conidiennes (potentiellement mâles) obtenues par culture à 35°C montrent une faible acti- vité du cycle citrique, compensée par une nette stimulation du cycle glyoxy- lique, alors que les mycéliums cultivés à 25°C et producteurs d'ascogones présentent un cycle tricarboxylique très actif (COMBEPINE et TURIAN, 1970 ;

TURIAN, 1960b, 1960c). Une inhibition du cycle citrique ou une dérégulation de l'isocitratase par des produits chimiques, donnent des résultats analogues à ceux observés chez les *Allomyces* (COMBEPINE, 1969 ; REDDY et TURIAN, 1968 ; TURIAN, 1961a, 1962, TURIAN et SEYDOUX, 1962 ; TURIAN et al., 1962).

CANTINO et al. (CANTINO, 1952, 1956, 1961, 1966 ; CANTINO et GOLDSTEIN, 1967 ; CANTINO et TURIAN, 1959 ; MC CURDY et CANTINO, 1960) arrivent à des conclusions analogues sur le *Blastocladiella emersonii*.

Il semble donc que chez ces Champignons, un blocage du cycle citrique compensé par une stimulation du cycle glyoxylique, entraîne le processus de différenciation dans le sens mâle.

Plus récemment, FAYRET (1975), parallèlement à nos propres travaux, a constaté que la différenciation des fructifications sexuées du *Gnomonia leptostyla* s'accompagne d'une accélération du métabolisme oxydatif.

CAS DU LEPTOSPHAERIA TYPHAE

Le *Leptosphaeria typhae* se distingue nettement des modèles déjà étudiés par son homothallisme ; chez lui, aucune différenciation mâle ni femelle n'est décelable morphologiquement et la fécondation se produit vraisemblablement par thallogamie. Celle-ci n'est effectuée que sous une photopériode de 12 h/12 h alors que le mycélium demeure purement végétatif à l'obscurité (LACOSTE, 1965).

Préalablement à notre travail, VIALA (VIALA et CARLES, 1969 ; VIALA et LACOSTE, 1971 ; VIALA et al., 1968) a suivi dans les deux types de culture l'évolution des acides organiques aminés libres au cours de la croissance ; l'acide lactique est toujours présent en plus forte quantité dans les mycéliums stériles, tout comme l'acide succinique, "sous-produit" de l'activité du cycle glyoxylique, alors que l'acide fumarique apparaît plus tardivement ; les acides aminés libres, et surtout l'acide glutamique, sont moins abondants. Cet ensemble de résultats semble prouver qu'en présence de lumière une orientation du métabolisme vers des voies plus oxydatives accompagne la formation des appareils reproducteurs.

Le but de notre travail était de vérifier cette hypothèse. Pour cela, nous avons agi sur l'équilibre entre les diverses voies métaboliques en stimulant séparément chacune d'elles afin de préciser l'influence qu'elle pourrait exercer sur la différenciation sexuelle. Nous avons essayé aussi, en jouant sur les durées d'éclairement du Champignon, d'agir séparément sur le métabolisme intermédiaire et la reproduction sexuée afin de tenter de mieux cerner la relation liant les deux phénomènes. Toute cette expérimentation a été menée en collaboration avec G. VIALA.

MATERIEL ET METHODES

I. DOSAGES ENZYMATIQUES

I.1 OBTENTION DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE.

Les cultures étaient centrifugées 6 000 g, à 0°C, durant 5 minutes. On rejetait le milieu surnageant, puis on remettait le mycélium en suspension dans le tampon Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 M à +4°C. On centrifugeait à nouveau dans les mêmes conditions et on rejetait le surnageant.

On mettait alors le mycélium en suspension dans une faible quantité de tampon Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,5, contenant 10^{-5} M/l d'EDTA-Mg. La suspension subissait à 0°C un passage d'une minute au broyeur "Ultra-Turrax", dont le plongeur avait séjourné 30 minutes à -18°C.

On centrifugeait le broyat 15 minutes à 0°C et 3 000 g, afin d'éliminer les parois des filaments dans le culot tout en conservant les mitochondries dans le surnageant. Ce dernier, conservé dans la glace, était immédiatement utilisé pour les dosages enzymatiques.

Il est évident qu'il eût été intellectuellement préférable à effectuer ces mesures sur un culot mitochondrial, facile à obtenir par centrifugation à 10 000 g, que sur un extrait acellulaire total. Mais le grand nombre de mesures à effectuer ne nous permettait pas de vérifier l'état des mitochondries ainsi purifiées. On sait, en effet, que certaines enzymes sont peu

liées aux mitochondries et une bonne part d'entre elles risque d'être perdue. On a ainsi longtemps pensé que l'isocitrate-lyase était localisée dans le hyaloplasme (DUNTZE et al., 1969) alors qu'on admet à présent qu'elle est portée par les glyoxysomes, particules spécialisées qui normalement sont recueillies dans le même culot que les mitochondries. FAYRET (1975) a d'ailleurs pu constater une perte de 10 % de l'activité des enzymes du cycle citrique lorsqu'il passait de l'extrait total au culot mitochondrial. Nous avons donc préféré nous en tenir à une technique plus simple, avec d'autant plus de raisons que notre but n'était pas d'obtenir des valeurs absolues d'activités enzymatiques, mais seulement d'avoir une idée relative de chacune d'entre elles afin de comparer les divers extraits. Ceux-ci étant tous rigoureusement préparés de la même manière, nous pensons que les chiffres sont ainsi comparables.

I.2 TECHNIQUES DES DOSAGES.

Ces dosages ont été effectués à la température de 20°C à l'aide d'un spectrophotomètre Unicam SP 800 B.

1.2.1) Isocitrate déshydrogénase : Nous avons utilisé la technique de TOKUNAGA et al. (1969) qui consiste à suivre, à 340 nm, la réduction du NADP⁺ en NADPH en présence d'isocitrate de sodium.

1.2.2) Succinate déshydrogénase : Le dosage a été fait selon la méthode de ELLS (1968) adaptée par TOKUNAGA et al. (1969) : on mesure la décoloration (réduction) du 2,6-dichloro-phénol-indophénol par l'hydrogène libéré du succinate en présence de phénazine-métasulfate ($\lambda = 600$ nm).

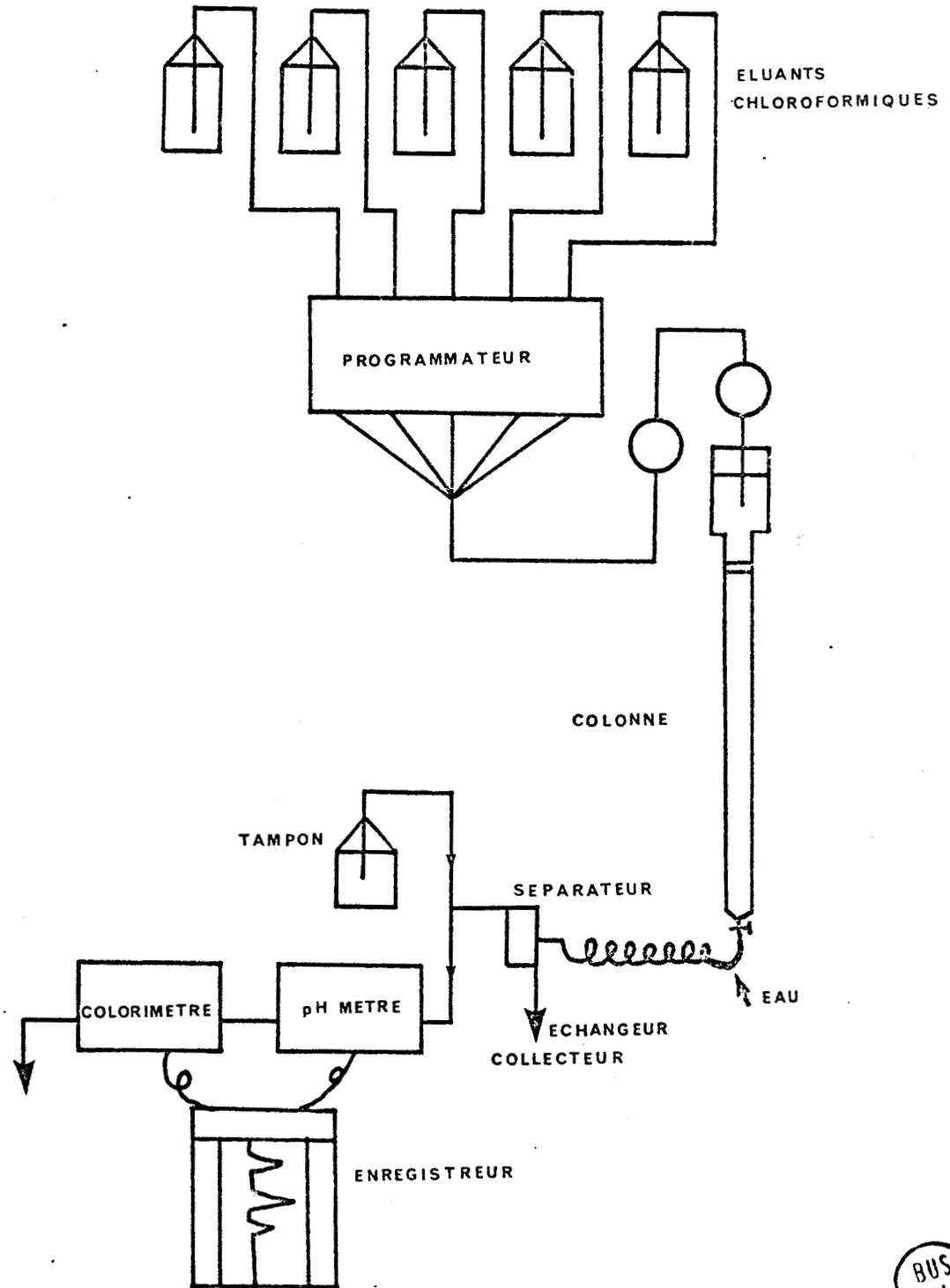
1.2.3) Fumarate hydratase : La technique (TOKUNAGA et al., 1969) consiste à suivre à 240 nm la formation du fumarate à partir du L-malate.

1.2.4) Isocitratase : Le dosage a été réalisé selon la méthode classique de DIXON et KORNBERG (1959). On note l'augmentation de D.O. à 324 nm due à la formation d'acide glyoxylique-phénylhydrazone à partir de phénylhydrazone et du glyoxylate provenant de la transformation de l'isocitrate.

I.3 UNITES.

Selon les normes internationales, une unité d'enzyme correspond à la quantité de protéine apte à transformer 1 μ mole de substrat en 1 minute.

PLANCHE III : TECHNIQUE DE DOSAGE DES ACIDES ORGANIQUES



1.4 DOSAGE DES PROTEINES.

Nous avons employé la méthode de LOWRY et al. (1951). Les dosages étaient effectués après purification des protéines par précipitation au SO_4 $(\text{NH}_4)_2$ afin d'éliminer les phénols.

II. DOSAGES DES ACIDES ORGANIQUES

Le mycélium, recueilli par centrifugation à 0°C, est lavé à l'eau distillée à 5°C. Il est ensuite fixé par l'azote liquide puis lyophilisé. Après broyage, on en extrait les acides organiques par l'éthanol à 70 % ; les acides sont isolés de l'extracteur par passage sur résine échangeuse d'ions ; on peut alors passer au dosage proprement dit (planche III). Ce travail a été réalisé par VIALA au laboratoire de Physiologie végétale du C.N.R.S. (Institut Catholique, Toulouse) selon la technique automatique de J. CARLES et al. (1968, 1971, 1967). Les acides séparés les uns des autres par chromatographie de partage sur colonne de célite, sont dosés corimétriquement. La solution d'acides est déposée sur une colonne de célite 535 acidifiée par l'acide sulfurique. Un programmeur (Brevet C.N.R.S. 154 6645) envoie successivement sur la colonne des solvants chloroformiques qui entraînent progressivement les acides organiques grâce à des quantités croissantes de butanol. A la sortie de la colonne, le solvant, repris par une pompe proportionnante, est mélangé à de l'eau dans un échangeur : les acides passent dans l'eau, dont un séparateur envoie une faible partie dans la suite du circuit d'analyse, alors que le reste des solvants est dirigé vers un collecteur de fractions. La solution aqueuse est divisée en 2 ou 3 courants qui sont mélangés à un tampon borax-phosphate monopotassique de pH 8 coloré par du rouge de phénol. Lorsque dans le courant se trouve un acide organique, le pH du tampon s'abaisse et la couleur rouge s'atténue : ces variations sont enregistrées sur un pH-mètre et un colorimètre réglé à 550 nm.

CHAPITRE I : ESSAIS DE STIMULATION DES CYCLES CITRIQUE ET GLYOXYLIQUE.

LEURS EFFETS SUR LA CROISSANCE, LA REPRODUCTION SEXUÉE ET LE MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE DU CHAMPIGNON.

Le but de cette expérience était de déplacer l'équilibre oxydation-réduction dans les deux sens afin de préciser son influence réelle sur la morphogénèse du Champignon. Il fallait donc perturber le moins possible ses conditions de développement.

Ce travail a fait l'objet de publications (VIDAL, 1971 ; VIALA et VIDAL, 1972 ; VIALA, 1972).

I. STIMULATION DES VOIES OXYDATIVES (CYCLE CITRIQUE)

Le meilleur moyen consiste à faciliter l'oxygénation du mycélium par un artifice physique. Nous avons fait des essais de cultures agitées en flacons et en fermenteur ; ces techniques ne pouvaient nous convenir, car elles provoquent une profonde modification de la morphogénèse du Champignon : formation de boulettes mycéliennes ("pellets") de consistance très dure et... absence de différenciation de périthèces. Nous ne pouvions pas utiliser non plus de milieu

solidifié (agar ou silica gel) car cela rendait extrêmement difficile la récupération du Champignon pour des études biochimiques ou enzymatiques. Nous avons donc aéré le mycélium cultivé en milieu liquide en tapissant le fond des boîtes de Roux de baguettes de Pyrex de 6 mm de diamètre : ces fioles, d'une contenance d'un litre, recevaient 100 ml de décoction d'avoine à 20 g/l. Le Champignon était ensemencé sur la surface des baguettes, qui affleuraient le niveau supérieur du liquide. L'aération du mycélium ainsi obtenue était inférieure à celle qu'auraient pu fournir les autres méthodes mais était très supérieure à celle des cultures se développant selon la méthode classique.

II. STIMULATION DU CYCLE GLYOXYLIQUE

Plusieurs procédés étaient utilisables :

- diminuer l'aération des culture, en augmentant, par exemple, le volume du liquide contenu dans chaque fiole de culture ; le mycélium aurait été plus profondément immergé, mais au bout de quelques jours sa partie supérieure aurait émergé, faussant les résultats. On aurait pu aussi essayer de modifier la composition de l'atmosphère respirée par le Champignon, mais cela eût entraîné de trop lourdes servitudes techniques ;
- utiliser des inhibiteurs spécifiques du cycle citrique. Nous avons fait en particulier des essais d'incorporation de malonate composé inhibiteur de la succinate-déhydrogénase (THORN, 1953 ; TOKUNAGA et al., 1969). Mais ce corps bloque presque totalement la croissance du *Leptosphaeria typhae*. De plus, il ne résiste pas aux températures de stérilisation à l'autoclave et compliquerait donc la mise en oeuvre des très nombreuses fioles de culture nécessaires pour notre expérimentation ;
- introduire dans le milieu des substances stimulant les réactions enzymatiques recherchées. Nous avons retenu cette solution car, étant donné le but de notre étude, une stimulation nous paraissait préférable à une inhibition. Nous avons utilisé pour cela l'acétate de sodium, agent "dérépresseur" de l'isocitratase et, par conséquent, stimulant de toute la voie glyoxylique (COTTER et al., 1970 ; KORNBERG et COLLINS, 1958 ; KORNBERG et al., 1958 ; SMITH et GUNSALUS, 1955 ; TURIAN, 1960, 1961 ; TURIAN et al., 1962). Ce sel (CH_3COONa , $3\text{H}_2\text{O}$) présentait de surcroît l'avantage de n'être en aucun cas toxique pour le *Leptosphaeria typhae*, même s'il était introduit en forte proportion (1 %) dans le milieu de culture.

PROCESSUS EXPERIMENTAL

Le milieu de base était la décoction d'avoine à 20 g/l. Pour des raisons techniques (nombre de boîtes de Roux utilisables, volume des enceintes de culture, etc...) nous avons dû réaliser deux séries d'expériences séparées :

- 1) des cultures aérées par introduction de baguettes de verre dans le milieu ;
- 2) des cultures enrichies en acétate de sodium. Après quelques essais, nous avons introduit ce corps dans la décoction d'avoine aux concentrations de 0,1 % - 0,5 % - 1 %.

Le développement s'effectuait à $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Ces cultures ont été menées à l'obscurité et sous éclairage alterné 12/12.

Bien entendu, dans tous les cas, nous comparions les mycéliums ainsi obtenus à des colonies-témoins cultivées sur décoction d'avoine dans les mêmes conditions physiques.

RÉSULTATS

I. INFLUENCE DE L'AERATION.

Les courbes de croissance et les mesures d'activités enzymatiques ont été réalisées sur les mêmes séries culturales. Par contre, le dosage des acides organiques a été fait sur des mycéliums spécialement mis en culture, car il exige de fortes quantités de matière.

I.1) Croissance et reproduction : Les résultats sont résumés dans le tableau 5 et les figures 2 et 3.

Tableau 5 : Reproduction sexuée en cultures aérées.

Conditions de culture	Date d'apparition des périthèces	Abondance des périthèces au 9ème jour
Obscurité sans baguette	-	-
Obscurité avec baguettes	-	-
Lumière sans baguette	7ème jour	100
Lumière avec baguettes	6ème jour	130

FIGURE 2 : EVOLUTION DU POIDS DE MATIÈRE SÈCHE (CULTURES ÉCLAIRÉES)

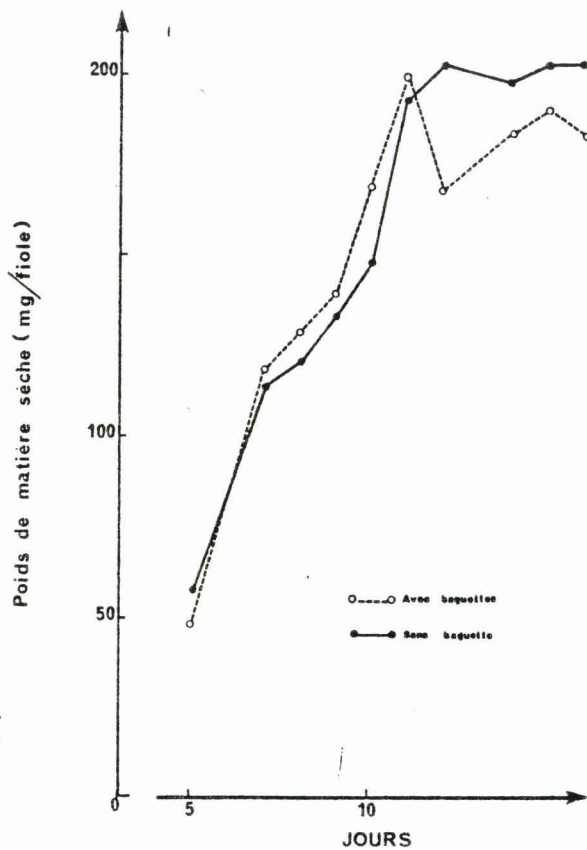
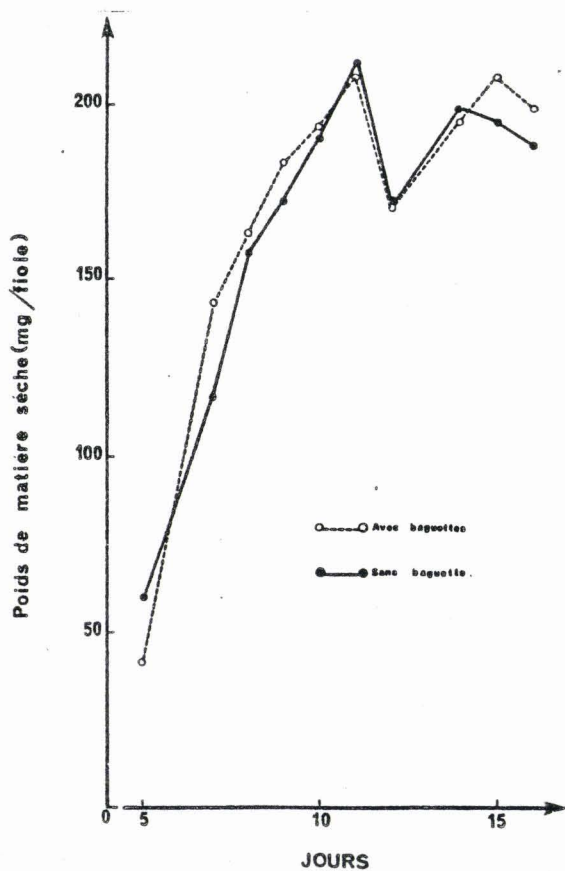


FIGURE 3 : EVOLUTION DU POIDS DE MATIÈRE SÈCHE (CULTURES A L'OBSCURITE)



BUS
L141

Le démarrage de la croissance est faiblement retardé par la présence des baguettes, car une partie des ascospores ensemencées dans le milieu tombe au fond du flacon et donc germe sous les baguettes. Mais, dès le 6ème jour, le mycélium se développe en émergence et le rendement est amélioré : les masses de matière sèche des cultures émergées sont alors légèrement supérieures à celles des cultures témoins et le maximum de croissance est atteint légèrement plus tôt ; les différences entre les deux formes de culture sont minimes, au plan du rendement pondéral.

Par contre, l'aération exerce un très net effet sur la reproduction. En effet, si les premières ébauches périthéciales apparaissent sur les cultures émergées 24 heures plus tôt seulement, dès le 8ème jour le mycélium est couvert de périthèces. A ce moment-là, les cultures témoins portent des ascocarpes beaucoup moins nombreux, seulement groupés en îlots, essentiellement le long des parois de la fiole. A l'obscurité aucun périthèce n'apparaît.

I.2) Activités enzymatiques et acides organiques : Les mesures d'activités enzymatiques étaient effectuées quotidiennement. Il ne pouvait en être de même des dosages d'acides organiques, qui ont été réalisés en deux points de la phase de végétation active du Champignon (6ème et 8ème jours) puis au moment du maximum de croissance (10ème jour) et enfin dans la phase de sénescence (12ème jour).

Les résultats sont groupés dans les figures 4, 5, 6, 7 et 8 et le tableau 6.

Le développement du Champignon met en jeu les trois voies classiques au niveau du métabolisme intermédiaire des acides organiques :

- formation d'acide lactique, ou "glycolyse lactique aérobie" (TURIAN, 1969) ;
- cycle citrique ;
- cycle glyoxylique.

L'acide lactique est dans toutes les cultures le plus important quantitativement de tous les acides. Il joue un rôle moins important dans les mycéliums en émergence. En particulier, on constate une très forte chute de la teneur en cet acide au 10ème jour de culture sur baguettes, au moment où la majeure partie du mycélium est émergée. Cela montre une plus grande orientation de la lactico-déshydrogénase dans le sens oxydatif.

TABLEAU 6 : INFLUENCE DE L'ÆRATION SUR LA TENEUR MYCÉLIENNE EN ACIDES ORGANIQUES.

	8ème JOUR				8ème JOUR				10ème JOUR				12ème JOUR			
	LB	L	OB	O	LB	L	OB	O	LB	L	OB	O	LB	L	OB	O
Poids de matière sèche	84	46	32,2	34,8	150	127	132,8	95,1	228	304	225	184	239	247	249	218
Acide lactique	5434 (54,2)	6448 (72)	4960 (33)	5348 (65,8)	3268 (54,2)	3780 (49,2)	4940 (67,4)	3165 (60,1)	731 (29,3)	3516 (51)	1575 (35)	3110 (35,5)	2711 (58,5)	3393 (48,3)	1760 (40,7)	1561 (27,7)
Acide fumarique	176 (1,7)	106 (1,18)	-	58 (0,7)	134 (2,2)	95 (1,2)	146 (2)	99 (1,8)	-	137 (0,7)	35 (0,7)	142 (1,6)	87 (1,9)	69 (1)	159 (3,7)	90 (1,5)
Acide succinique	2376 (23,7)	966 (10,8)	-	1890 (23,2)	1218 (20,2)	1195 (15,5)	1070 (14,6)	1205 (22,9)	296 (11,9)	863 (12)	475 (10,5)	2225 (25,4)	895 (19,3)	1452 (20,7)	785 (18,2)	1000 (16,7)
Acide malique	808 (8)	595 (6,5)	314 (5,3)	465 (5,7)	670 (11,1)	1028 (13,3)	-	355 (6,7)	562 (22,6)	1455 (21,1)	1535 (34,1)	505 (5,7)	318 (6,8)	1114 (15,8)	577 (13,3)	2035 (34)
Acide citrique	556 (5,5)	-	-	-	456 (7,5)	743 (9,6)	240 (3,2)	220 (4,1)	670 (26,9)	608 (8,8)	455 (10)	485 (10,1)	263 (5,8)	746 (10,6)	795 (18,4)	305 (15,1)
Acide malonique	303 (3)	-	346 (5,8)	-	80 (1,3)	-	425 (5,8)	-	108 (4,3)	-	116 (2,6)	378 (4,3)	-	-	-	-
Acide glycolique	353 (3,5)	829 (9,2)	346 (5,8)	378 (4,6)	201 (3,3)	316 (4,1)	505 (6,9)	218 (4,1)	119 (4,7)	307 (4,4)	232 (5,1)	1278 (14,6)	230 (4,9)	238 (3,4)	238 (5,5)	203 (3,4)
Acide glycéinique	-	-	-	-	-	522 (6,7)	-	-	-	-	-	81 (1,8)	221 (2,5)	120 (2,8)	-	90 (1,5)
Pyrrrolidone	1542 (13,3)	672 (7)	894 (13)	1984 (19,8)	1162 (16,1)	943 (10,9)	431 (5,5)	309 (5,5)	270 (9,8)	268 (3,7)	954 (17,5)	350 (3,8)	570 (11)	527 (7)	1257 (22,5)	2431 (28,8)

Les poids de matière sèche sont exprimés en mg par fiole de culture.

Les concentrations en acides en nano équivalents pour 100 mg de matière sèche.

Les chiffres entre parenthèses expriment les pourcentages des acides par rapport à l'ensemble.



FIGURE 4 : EVOLUTION DE L'ACTIVITÉ ISOCITRATE-DÉSHYDROGÉNASIQUE
(MOYENNE DE 4 MESURES)

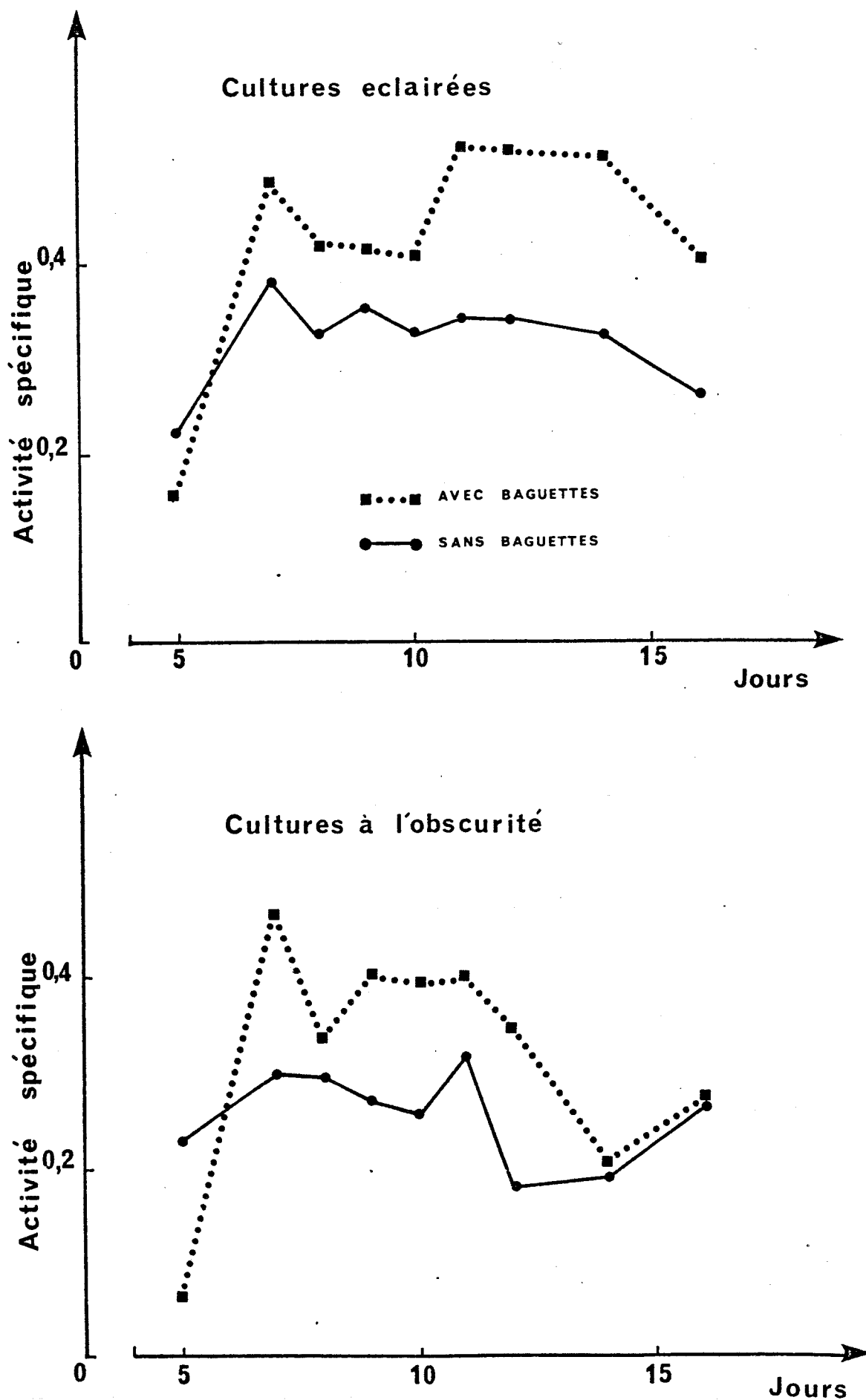


FIGURE 5 : EVOLUTION DE L'ACTIVITÉ ISOCITRATE-LYASIQUE
(MOYENNE DE 4 MESURES)

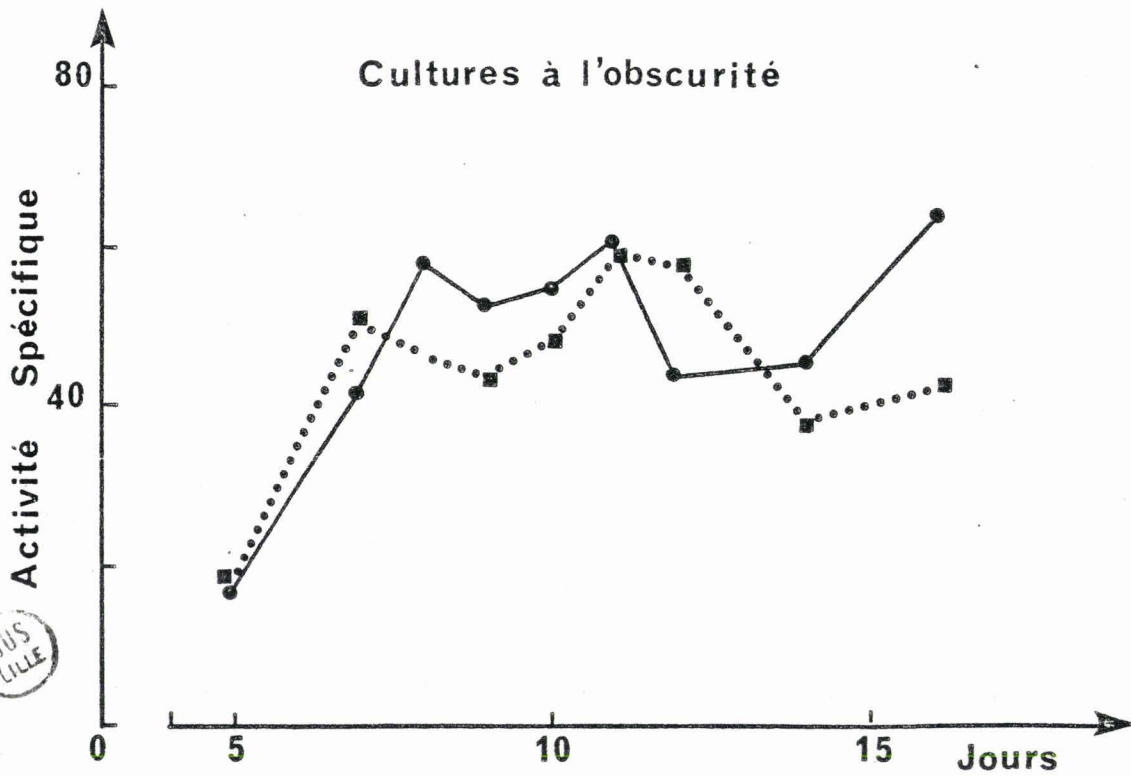
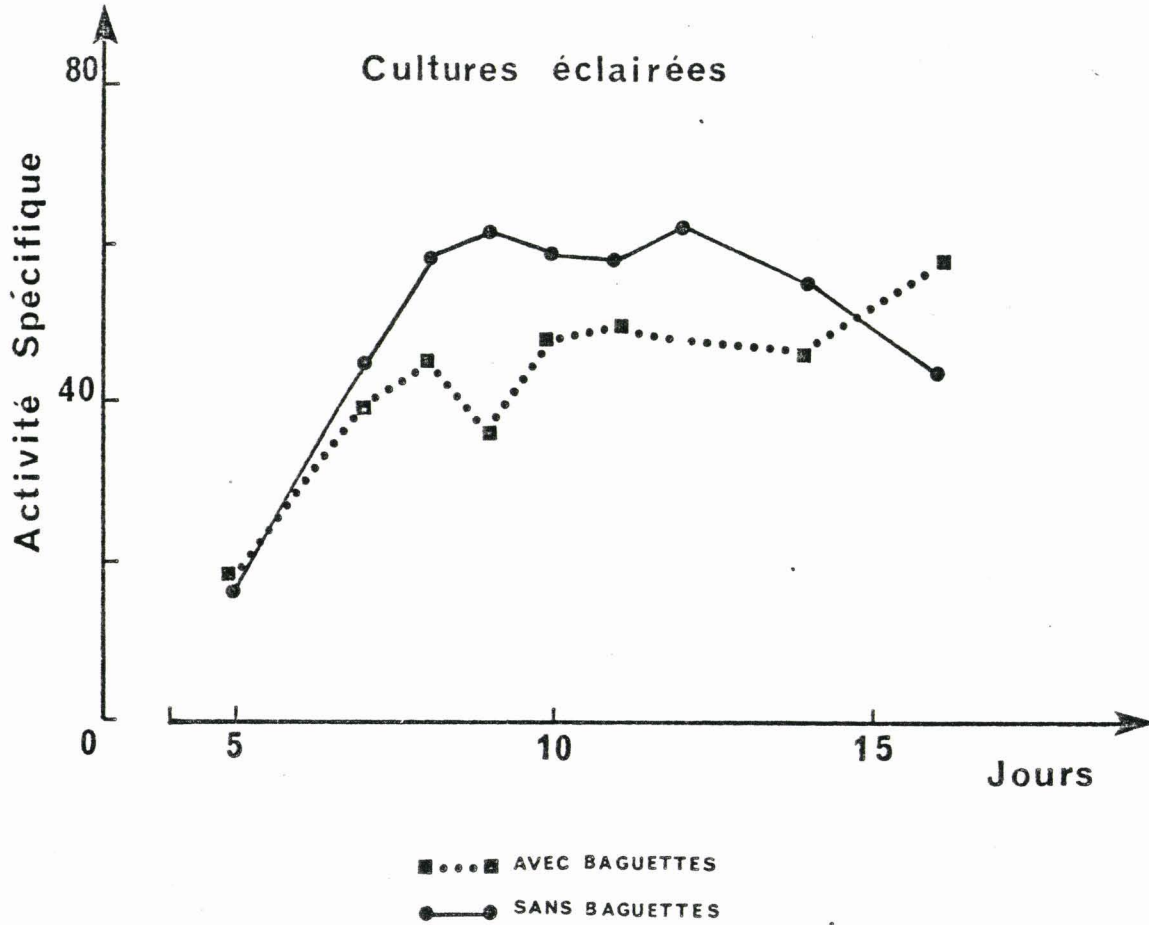


FIGURE 6 : EVOLUTION DU RAPPORT ISOCITRATE DÉSHYDROGÉNASE/
ISOCITRATE LYASE

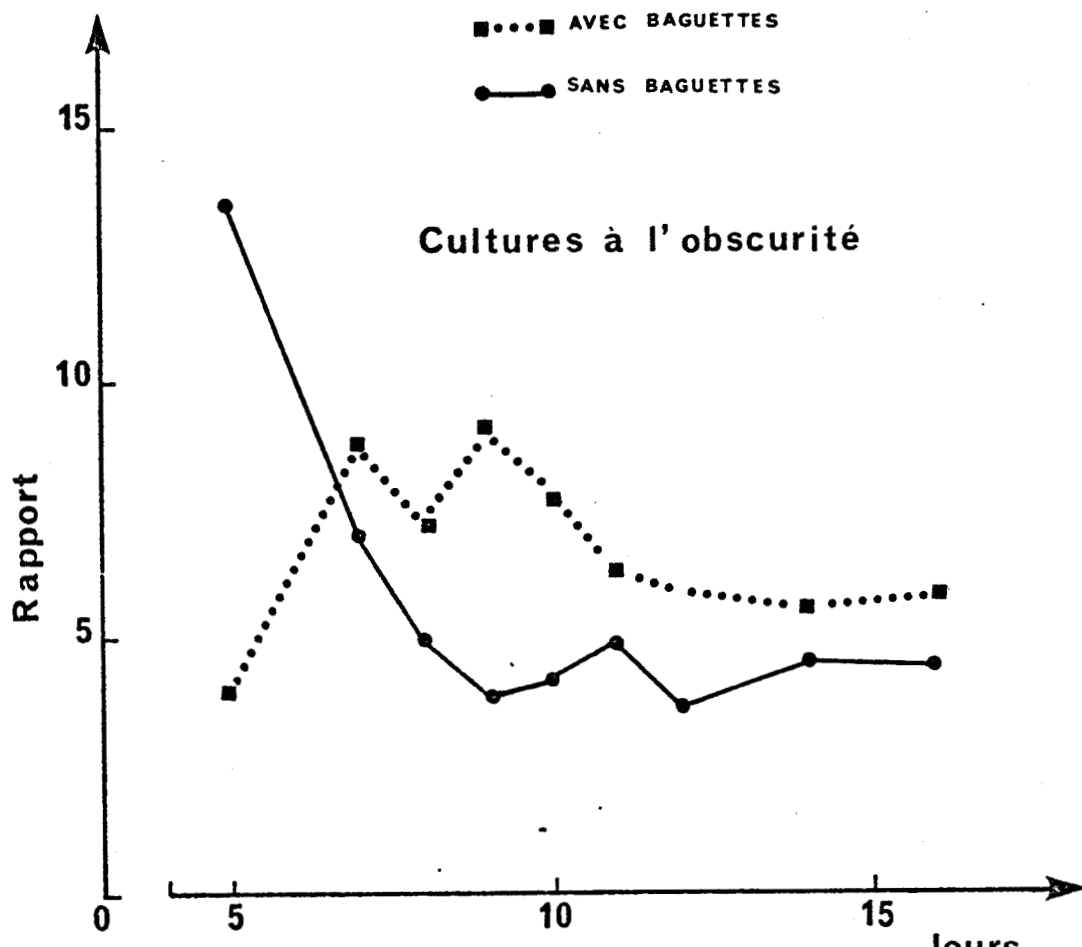
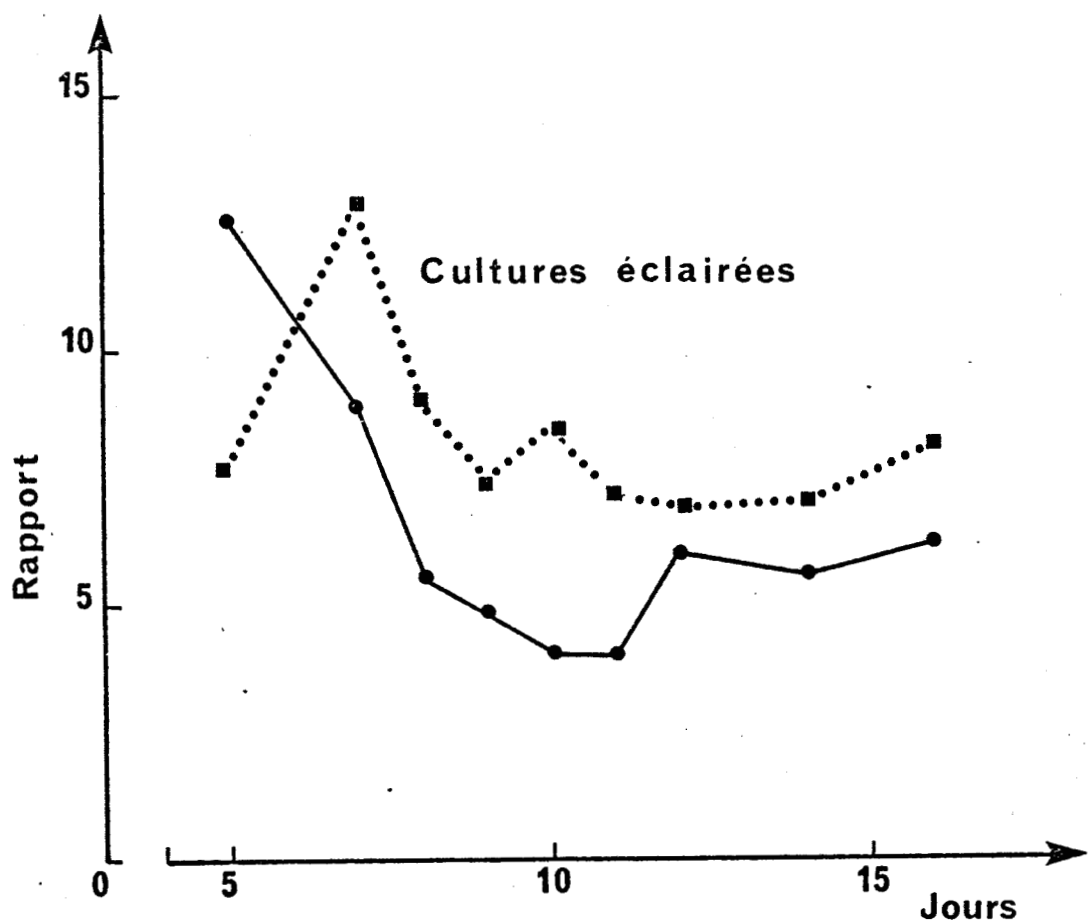


FIGURE 7 : EVOLUTION DE L'ACTIVITÉ DE LA
FUMARATE-HYDRATASE (MOYENNE DE 4 MESURES)

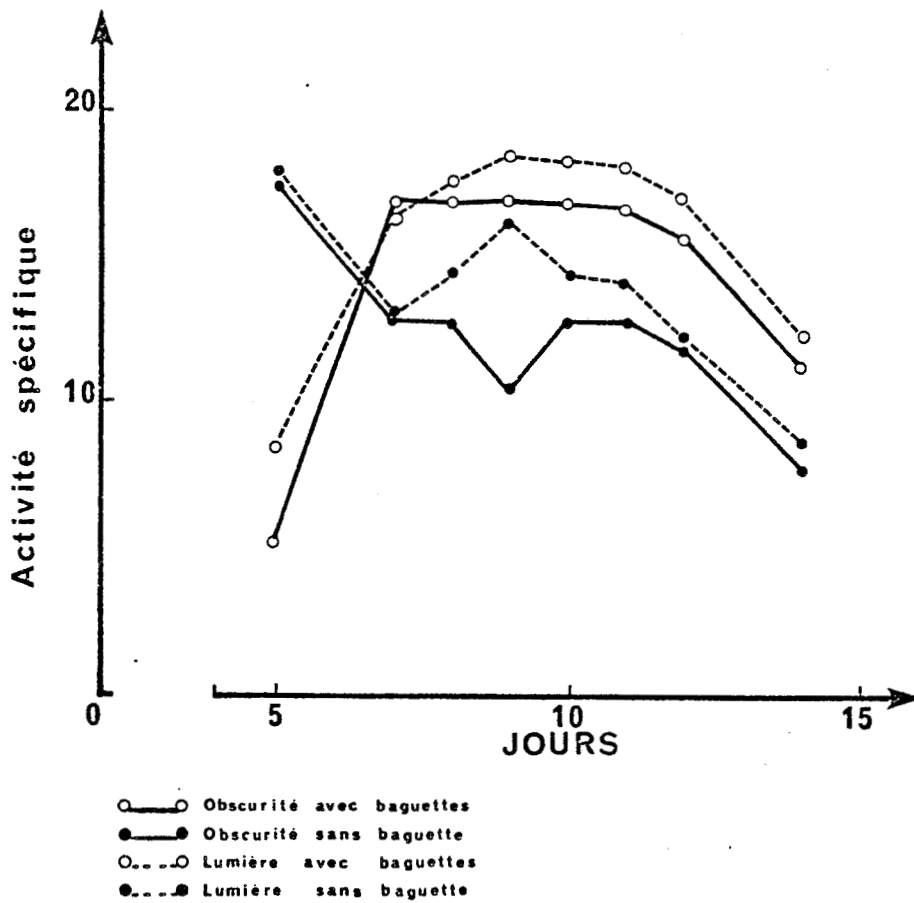
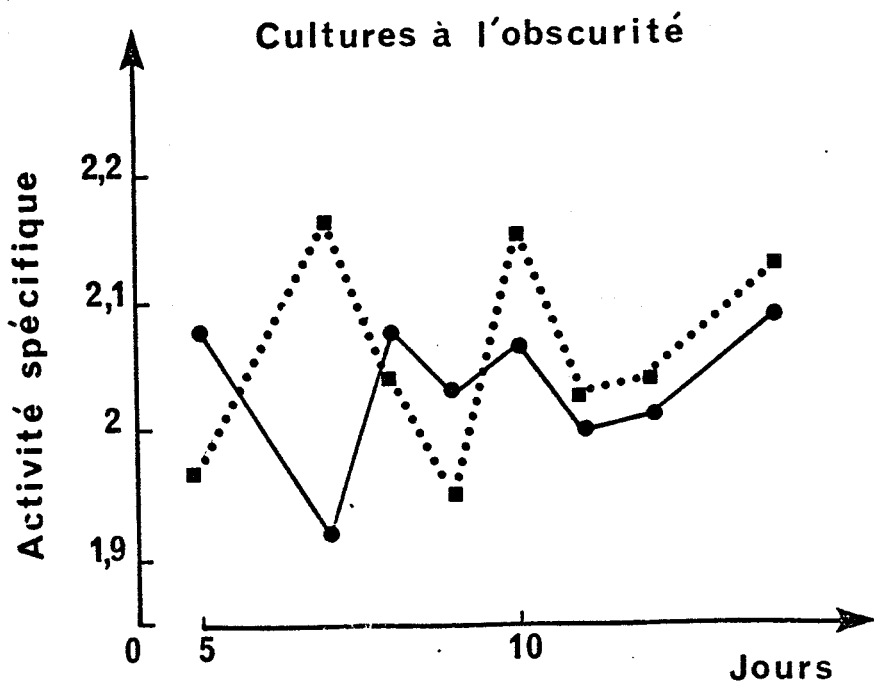
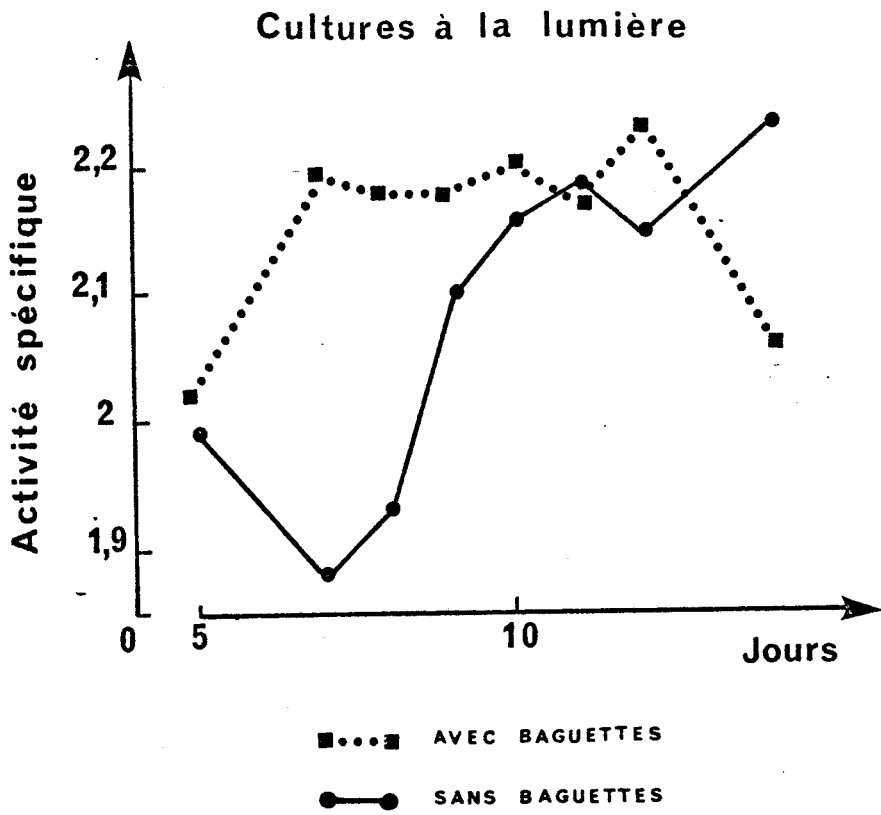


FIGURE 8 : EVOLUTION DE L'ACTIVITÉ DE LA SUCCINATE-DÉSHYDROGÉNASE
(MOYENNE DE 4 MESURES)



La lumière et l'aération stimulent l'isocitrate-déshydrogénase, comme elles stimulent la production de périthèces. La succinate-déshydrogénase et la fumarate-hydratase subissent les mêmes variations que l'isocitrate-déshydrogénase. Enfin, l'acide fumarique paraît légèrement plus abondant dans les cultures émergées, surtout celles qui reçoivent un éclaircissement, donc dans les mycéliums les plus fertiles. Le cycle citrique a donc une activité plus grande lorsque le *Leptosphaeria typhae* se développe sur baguettes.

L'enzyme caractéristique du cycle glyoxylique, l'isocitratase, paraît par contre inhibée à la fois par l'éclaircissement et l'aération. Cette inhibition est confirmée par la présence de quantités d'acide succinique généralement plus faibles dans les cultures sur baguettes. Ces effets de l'éclaircissement et de l'oxygénation apparaissent nettement si on suit l'évolution du rapport isocitrate déshydrogénase/isocitratase : à partir du 8ème jour de culture, il est plus fort dans les cultures émergées et, dans les mêmes conditions d'aération, il est plus élevé dans les mycéliums éclairés.

Les autres acides détectés fournissent quelques renseignements : l'acide malique est en général moins abondant en conditions d'émersion. L'acide citrique est décelé plus précocement dans les cultures éclairées. En moyenne, et surtout dans les mycéliums éclairés, le rapport malique/citrique est supérieur à 1 pour les cultures sans baguette et voisin de 1 dans les fioles à forte aération.

Les cultures immergées contiennent davantage d'acide glycolique. L'acide glycérique, présent à l'état de traces, apparaît plus tôt et est plus abondant dans les cultures sans baguette.

Enfin, la chromatographie sur papier met en évidence l'acide quinique tout au long du développement dans toutes les conditions de culture.

II. INFLUENCE DE L'ACETATE.

II.1) Croissance et reproduction : Les résultats sont résumés dans les tableaux 7 et 8 et les figures 9 et 10.

En présence d'acétate, la croissance mycélienne est ralentie dans un premier temps puis fortement stimulée à partir du 5ème jour de culture ; l'intensité de ces deux phénomènes successifs varie dans le même sens que la

Tableau 7 : Stade lipidique du mycélium à l'observation microscopique au 9ème jour.

Milieu de culture	Lumière	Obscurité
Témoin	1	1
+ 0,1 % d'acétate	1 à 2	2
+ 0,5 % d'acétate	3	2
+ 1 % d'acétate	3	3

Légende : Stade 1 : 1 à 2 globules lipidiques par cellule
 Stade 2 : 2 à 4 globules lipidiques par cellule
 Stade 3 : nombreux globules lipidiques accolés.

Tableau 8 : Cultures éclairées : richesse en périthèces.

Milieu de culture	Date d'apparition	Abondance
Témoin	7ème jour	100
+ 0,1 % d'acétate	8ème jour	70
+ 0,5 % d'acétate	9ème jour	30
+ 1 % d'acétate	12ème jour	très faible



FIGURE 9 : EVOLUTION DU POIDS DE MATIERE SECHE DES CULTURES SUR MILIEU A L'ACETATE (CULTURES ECLAIREES)

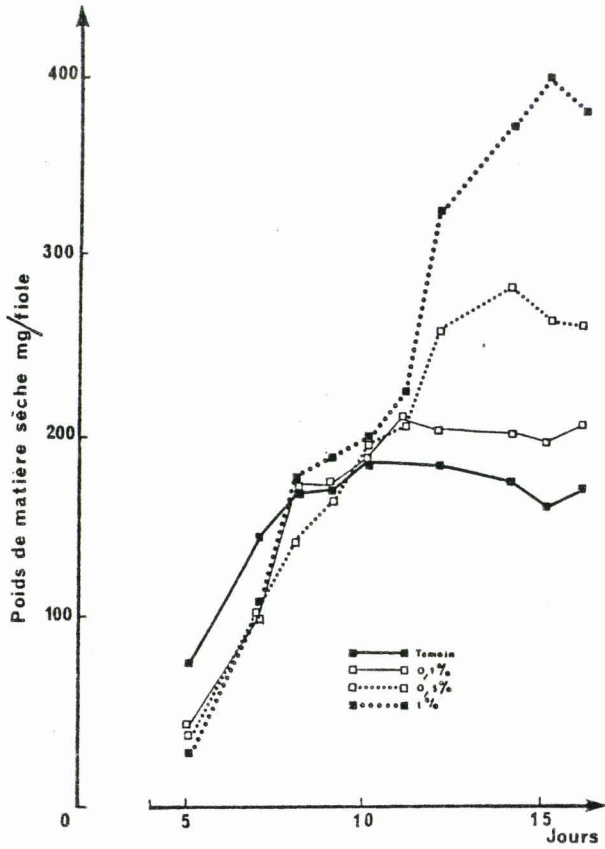
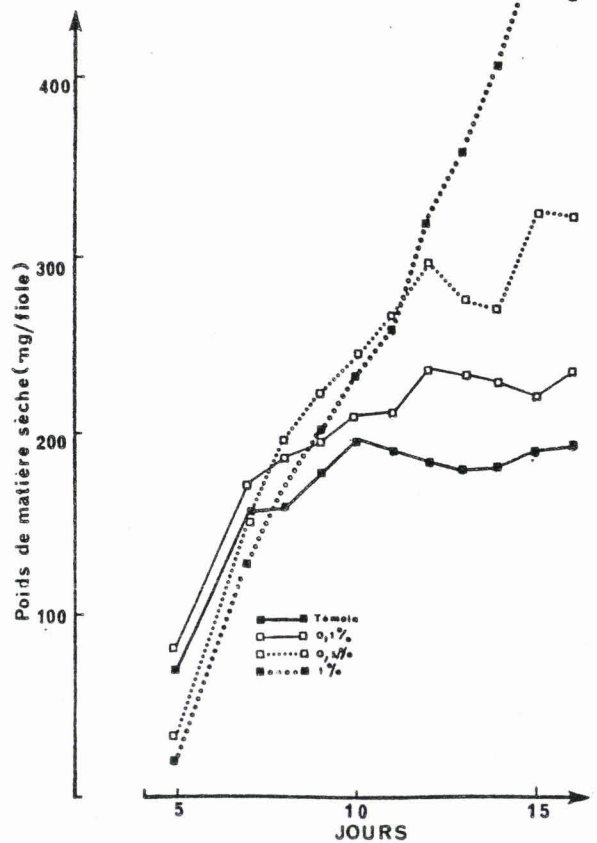


FIGURE 10 : EVOLUTION DU POIDS DE MATIERE SECHE DES CULTURES SUR MILIEU A L'ACETATE (CULTURES A L'OBSCURITE)



concentration du milieu. De même, les poids de matière sèche maximaux sont d'autant plus élevés et la date où ils sont atteints d'autant plus retardée que la solution de culture est plus riche en acétate.

Sur tous les milieux supplémentés, les articles du mycélium contiennent de nombreuses gouttelettes lipidiques (tableau 6). Les fortes accumulations lipidiques se traduisent à l'observation visuelle par une surface mycélienne se couvrant de tâches noir-verdâtre alors que les cultures témoins demeurent très peu pigmentées.

En ce qui concerne la reproduction (tableau 7), l'effet de l'acétate est extrêmement net : des doses croissantes inhibent de plus en plus l'apparition des périthèces.

II.2) Activités enzymatiques et acides organiques : Les tableaux 9, 10, 11 et 12 et les figures 11, 12 et 13 rendent compte des principaux résultats.

Etant donné le grand nombre de types de cultures étudiés, nous avons limité les dosages d'acides organiques à trois points des courbes de croissance : 7ème, 9ème et 11ème jours.

Au 7ème jour, la teneur mycélienne en acide lactique est directement liée aux quantités d'acétate contenues dans le milieu. Par la suite, cette "proportionnalité" ne se vérifie pas, mais les mycéliums ayant végété sur acétate sont toujours plus riches en acide lactique que les témoins.

L'activité de l'isocitrate-déshydrogénase est faiblement inhibée par l'acétate sous éclaircissement, alors qu'elle est plutôt stimulée à l'obscurité (figure 13).

La succinate-déshydrogénase (tableau 9) subit de la part de l'acétate une inhibition pouvant atteindre 40 %, ce qui a déjà été constaté chez le *Neurospora sitophila* (TURIAN et SEYDOUX, 1962). La fumarate-hydratase subit de faibles variations allant plutôt dans le sens d'une augmentation de son activité, phénomène observé aussi chez le *Neurospora crassa* (FLAVELL et FINCHAM, 1968).

L'activité de l'isocitratase est stimulée par la présence d'acétate dans le milieu et ceci d'autant plus que la concentration de ce sel est plus élevée. On peut d'ailleurs constater que l'acide succinique se trouve aussi en plus grande quantité dans les mycéliums-essais que dans les cultures-témoins. De plus, dans ces dernières, sa concentration s'abaisse au cours du développement, alors qu'elle a tendance à s'élever dans les cultures nourries d'acétate.

Tableau 9 : Activités enzymatiques exprimées en unités internationales.

JOUR	MILIEU	FUMARASE		SUCCINO-DESHYDROGENASE		ISOCITRATE-DESHYDROGENASE	
		Lumière	Obscurité	Lumière	Obscurité	Lumière	Obscurité
5ème	T	0,017	0,017	0,019	0,019	0,015	0,018
	+ 0,1 %	0,018	0,019	0,019	0,019	0,006	0,011
	+ 0,5 %	0,018	0,020	0,017	0,016	0,006	0,018
	+ 1 %	0,017	0,018	0,018	0,015	0,014	0,014
7ème	T	0,021	0,020	0,021	0,021	0,046	0,036
	+ 0,1 %	0,022	0,023	0,017	0,015	0,025	0,024
	+ 0,5 %	0,021	0,020	0,015	0,014	0,025	0,019
	+ 1 %	0,022	0,022	0,015	0,013	0,024	0,023
8ème	T	0,021	0,019	0,021	0,020	0,049	0,032
	+ 0,1 %	0,022	0,022	0,016	0,015	0,031	0,030
	+ 0,5 %	0,022	0,022	0,015	0,014	0,031	0,035
	+ 1 %	0,023	0,022	0,014	0,013	0,036	0,046
9ème	T	0,017	0,017	0,022	0,021	0,042	0,033
	+ 0,1 %	0,021	0,020	0,016	0,015	0,040	0,049
	+ 0,5 %	0,022	0,023	0,015	0,014	0,029	0,030
	+ 1 %	0,023	0,023	0,014	0,013	0,028	0,041

Milieu : T : témoin (avoine 20 g/l)
+ 0,1 % : + 0,1 % d'acétate
+ 0,5 % : + 0,5 % d'acétate
+ 1 % : + 1 % d'acétate

Tableau 10 : Activités enzymatiques exprimées en unités internationales (suite).

JOUR	MILIEU	FUMARASE		SUCCINO-DESHYDROGENASE		ISOCITRATE-DESHYDROGENASE	
		Lumière	Obscurité	Lumière	Obscurité	Lumière	Obscurité
10ème	T	0,017	0,017	0,021	0,021	0,045	0,039
	+ 0,1 %	0,021	0,019	0,015	0,015	0,038	0,049
	+ 0,5 %	0,022	0,020	0,015	0,015	0,031	0,043
	+ 1 %	0,023	0,021	0,013	0,013	0,029	0,051
11ème	T	0,017	0,017	0,021	0,021	0,049	0,045
	+ 0,1 %	0,020	0,019	0,015	0,015	0,035	0,051
	+ 0,5 %	0,022	0,020	0,015	0,015	0,033	0,055
	+ 1 %	0,023	0,022	0,013	0,013	0,028	0,049
12ème	T	0,017	0,016	0,021	0,020	0,044	0,037
	+ 0,1 %	0,020	0,018	0,015	0,015	0,034	0,041
	+ 0,5 %	0,022	0,020	0,015	0,014	0,030	0,038
	+ 1 %	0,023	0,023	0,013	0,012	0,026	0,041
14ème	T	0,017	0,016	0,020	0,020	0,039	0,023
	+ 0,1 %	0,020	0,017	0,015	0,015	0,030	0,020
	+ 0,5 %	0,022	0,019	0,014	0,014	0,014	0,027
	+ 1 %	0,023	0,023	0,013	0,013	0,025	0,021

Milieu : T : témoin (avoine 20 g/l)
+ 0,1 % : + 0,1 % d'acétate
+ 0,5 % : + 0,5 % d'acétate
+ 1 % : + 1 % d'acétate.



FIGURE 11 : EVOLUTION DE L'ACTIVITÉ ISOCITRATE-LYASIQUE SUR MILIEU A L'ACÉTATE (CULTURES ÉCLAIRÉES)

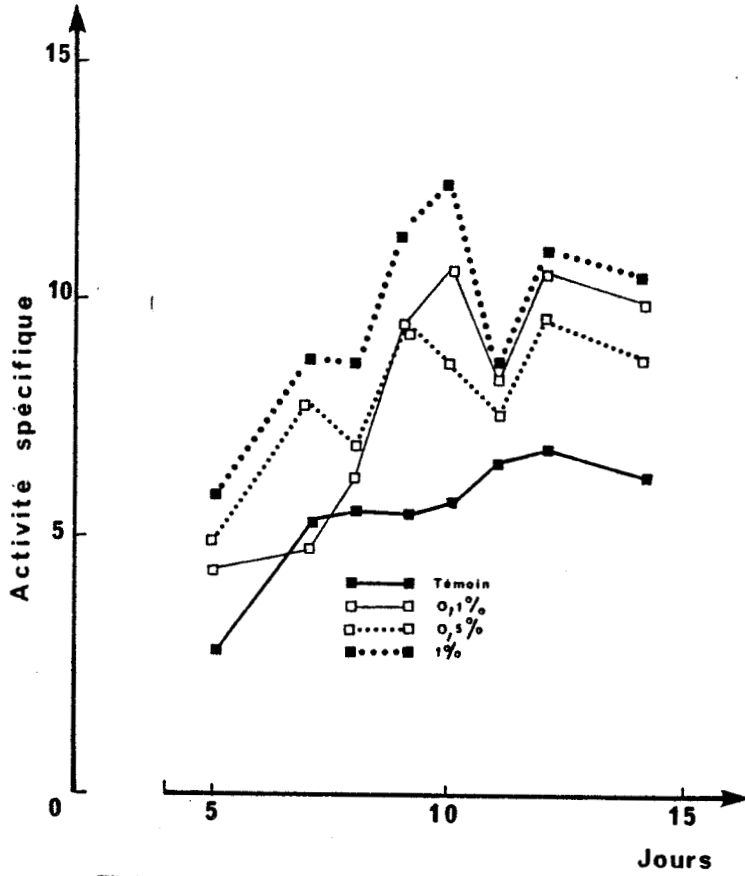


FIGURE 12 : EVOLUTION DE L'ACTIVITÉ ISOCITRATE-LYASIQUE SUR MILIEU A L'ACÉTATE (CULTURES A L'OBSCURITÉ)

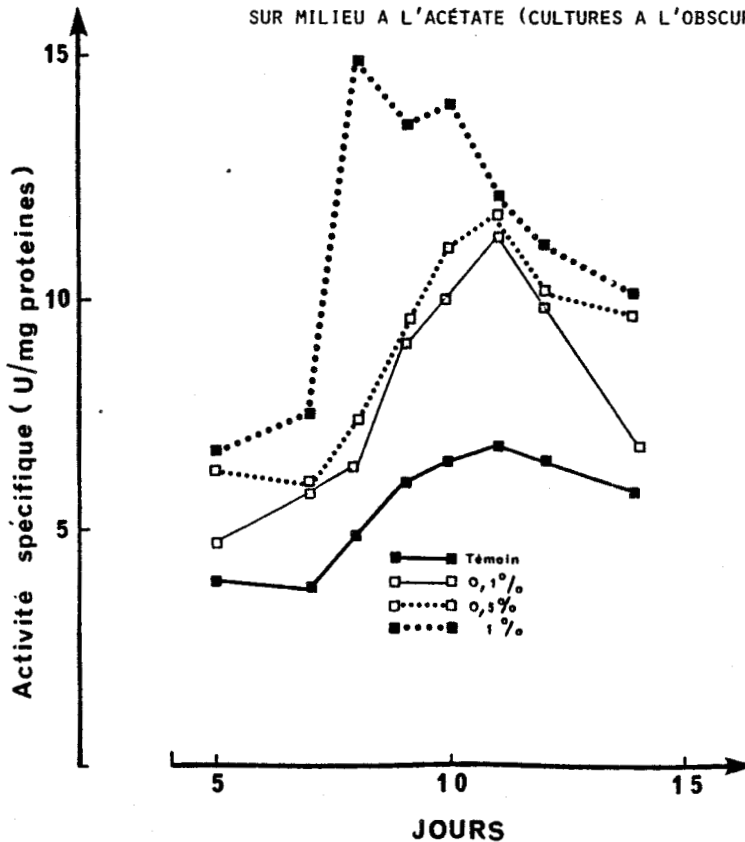
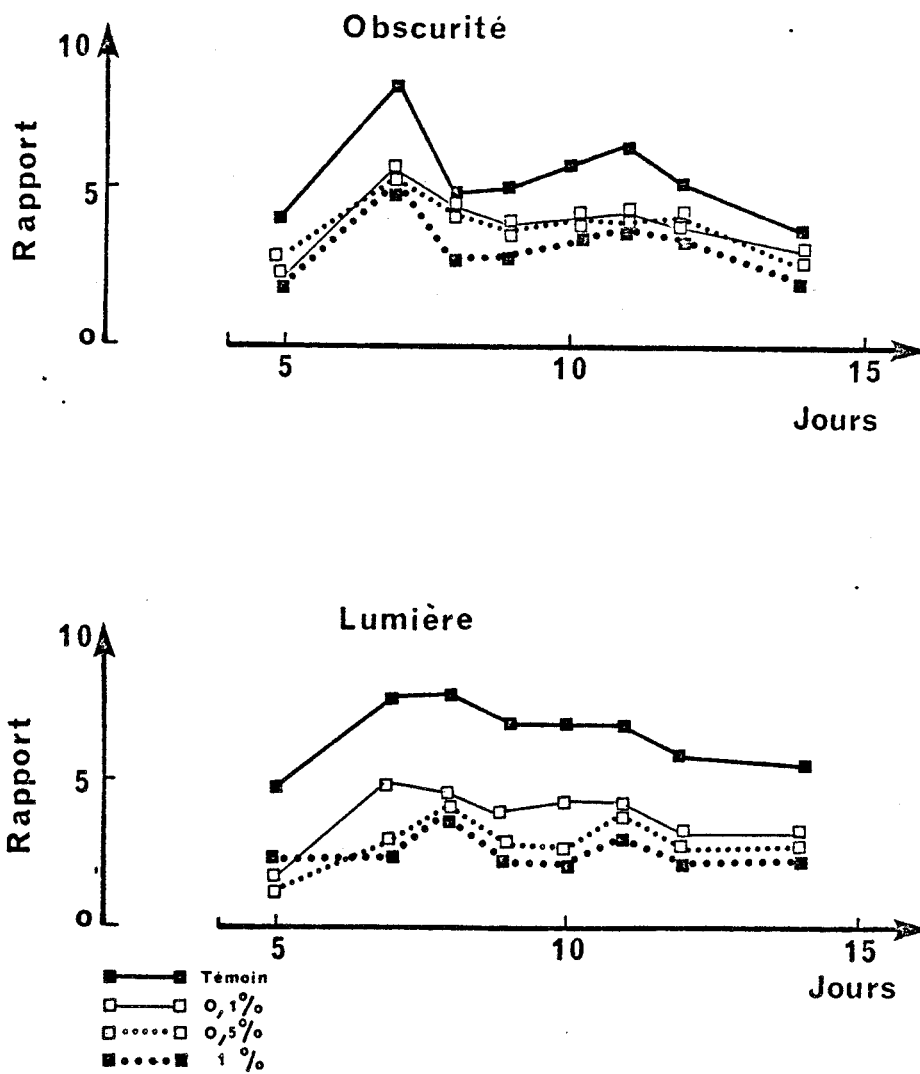


FIGURE 13 : ÉVOLUTION DU RAPPORT ISOCITRATE DÉSHYDROGÉNASE/
ISOCITRATASE SUR MILIEU CONTENANT DE L'ACÉTATE



Le cycle glyoxylique est donc bien stimulé par l'acétate ainsi que le confirment les rapports isocitrate-déshydrogénase/isocitratase (figure 13).

L'éclairement des cultures entraîne chez celles-ci d'une part une concentration plus élevée en acide citrique, d'autre part une augmentation plus rapide de cette teneur au cours de la végétation. Quel que soit l'âge du mycélium, il contient de plus fortes quantités d'acide malonique s'il s'est développé sur acétate.

DISCUSSION

I. EFFET DE L'AERATION.

Le but de notre expérience est atteint. La présence de baguettes de verre dans le milieu, en favorisant les processus oxydatifs au niveau du métabolisme des acides organiques, augmente parallèlement la production de périthèces par le Champignon. Ce n'est pas seulement le rapport cycle citrique/cycle glyoxylique qui est modifié, mais tout le métabolisme intermédiaire qui change. En effet, le ralentissement du cycle de Krebs dans les cultures stériles ou peu fertiles laisserait prévoir une métabolisation plus lente du pyruvate et sa transformation accrue en lactate ; mais l'action compensatrice menée par le cycle glyoxylique ne permet pas de retenir cette explication. L'orientation réductrice de la lactico-déshydrogénase à l'obscurité, même dans les cultures émergées, semble résulter d'une déviation profonde de la physiologie de la cellule dans cette direction. La présence d'acide glycolique dans ces mycéliums confirme cette interprétation. TURIAN a d'ailleurs constaté des phénomènes analogues chez les *Allomyces* (1960).

Nous pouvons rapprocher nos résultats de ceux de TURIAN (1960) sur les *Allomyces* et les *Neurospora* : chez ces organismes, la "féminisation" est liée à une plus forte activité du cycle citrique, alors que la "masculinisation" s'accompagne d'une réduction de cette activité compensée par une augmentation de celle du cycle glyoxylique. Dans le cas du *Leptosphaeria typhae*, la définition du sexe est absolument impossible. Nous ne pouvons que constater qu'au niveau du métabolisme intermédiaire il semblerait que les cultures ne produisant pas de périthèces se rapprochent des mycéliums "masculinisés" étudiés par TURIAN et des cultures à spermaties (gamètes mâles) du *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1975).

TABEAU 11 : INFLUENCE DE L'ACÉTATE SUR LA TENEUR MYCÉLIENNE EN ACIDES ORGANIQUES (mono-éq./100 mg).

Les chiffres entre parenthèses expriment les pourcentages des acides par rapport à l'ensemble.

ACIDE	MILIEU	7ème JOUR		9ème JOUR		11ème JOUR	
		Lumière	Obscurité	Lumière	Obscurité	Lumière	Obscurité
LACTIQUE	T	5900 (6,2)	2100 (38,7)	5300 (44,4)	3700 (44)	4500 (43,8)	2300 (31,6)
	+ 0,1 %	6400 (55,2)	3400 (46)	4400 (43,3)	11300 (64,7)	5300 (38,6)	3100 (31,7)
	+ 0,5 %	5400 (56,7)	4100 (50,9)	5500 (53,4)	4800 (34,7)	5100 (38,8)	4000 (30,4)
	+ 1 %	9300 (55,3)	4700 (60)	4000 (60)	4100 (42,1)	5600 (41,7)	3000 (31,2)
SUCCINIQUE	T	1700 (18,5)	1100 (19,6)	1500 (12,2)	1000 (11,6)	600 (5,3)	900 (13,2)
	+ 0,1 %	1900 (16,7)	1700 (23)	2000 (19,7)	3900 (22,3)	2300 (17)	1700 (17,5)
	+ 0,5 %	1100 (11,8)	1500 (19,2)	1500 (14,9)	2100 (15,4)	1400 (10,8)	2300 (17,5)
	+ 1 %	600 (3,1)	1100 (14,5)	800 (10,6)	1500 (15,8)	800 (5,6)	1500 (15,9)
MALIQUE	T	400 (4,3)	900 (16,5)	1100 (9,3)	1100 (12,7)	1200 (11,2)	1800 (24,8)
	+ 0,1 %	700 (8,1)	800 (10,2)	900 (8,8)	500 (3)	1900 (13,8)	2200 (22,7)
	+ 0,5 %	700 (8,9)	200 (2,4)	500 (4,4)	1300 (9,2)	1800 (13,8)	1800 (19,9)
	+ 1 %	1300 (7,7)	200 (2,9)	400 (5)	900 (9,1)	1200 (9)	900 (9,5)
POIDS DE MATIÈRE SÈCHE (mg/flacon)	T	68	118	143	131	146	164
	+ 0,1 %	68	145	151	151	149	179
	+ 0,5 %	58	31	129	191	176	211
	+ 1 %	19,5	85	115	161	145	229

TABEAU 12 : INFLUENCE DE L'ACÉTATE SUR LA TENEUR MYCÉLIENNE EN ACIDES ORGANIQUES (mono-éq./100 mg).

Les chiffres entre parenthèses expriment les pourcentages des acides par rapport à l'ensemble.

ACIDE	MILIEU	7ème JOUR		9ème JOUR		11ème JOUR	
		Lumière	Obscurité	Lumière	Obscurité	Lumière	Obscurité
CITRIQUE	T	600 (8,8)	800 (13,7)	1900 (15,6)	1400 (16,2)	3100 (29,5)	700 (10,3)
	+ 0,1 %	1200 (19,9)	800 (10,9)	1600 (18)	300 (1,6)	2800 (20,5)	1500 (14,9)
	+ 0,5 %	900 (9,5)	700 (8,9)	800 (8,1)	1000 (6,9)	2000 (15,3)	1100 (8,5)
	+ 1 %	3900 (22,5)	600 (7,4)	900 (12,8)	600 (6,7)	1600 (12)	700 (6,7)
FUMARIQUE	T	?	-	-	100 (1,5)	-	-
	+ 0,1 %	200 (1,4)	90 (1,2)	80 (0,8)	100 (0,8)	200 (1,2)	100 (1,3)
	+ 0,5 %	200 (2,2)	80 (1)	200 (2,1)	500 (3,7)	-	100 (0,9)
	+ 1 %	200 (1,2)	100 (1,2)	-	-	100 (0,9)	-
MALONIQUE	T	200 (2)	300 (4,8)	400 (3,8)	400 (4,2)	300 (2,6)	200 (2,4)
	+ 0,1 %	400 (3,4)	400 (4,9)	400 (3,4)	700 (3,8)	1000 (7,2)	600 (6,1)
	+ 0,5 %	600 (6,7)	700 (8,7)	900 (9,2)	3200 (23,4)	2400 (18,7)	3000 (22,9)
	+ 1 %	600 (3,5)	500 (5,9)	400 (3,7)	1800 (18,6)	2600 (19,3)	3000 (30,6)
GLYCÉRIQUE	T	300 (3,2)	60 (1)	700 (6,2)	100 (1,7)	-	200 (3,3)
	+ 0,1 %	400 (3,7)	80 (0,8)	300 (3,3)	200 (1,2)	200 (1,7)	100 (1,3)
	+ 0,5 %	200 (2,4)	200 (2,1)	400 (3,8)	100 (0,6)	100 (0,8)	100 (0,9)
	+ 1 %	1000 (5,7)	50 (0,6)	300 (3,7)	100 (1,2)	700 (5,4)	50 (0,5)



II. INFLUENCE DE L'ACETATE.

La présence d'acétate dans le milieu de culture "déréprime" l'isocitratase, débloquent ainsi la voie glyoxylique ; concurremment, la reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae* est inhibée et même totalement bloquée. Ici aussi, les résultats confirment l'hypothèse de départ.

Au début du développement, le retard de croissance des cultures sur acétate peut être expliqué par le temps d'adaptation du Champignon à cette source de carbone (MONOD, 1942). Ensuite, les vitesses de croissance et les poids de matière sèche deviennent supérieurs à ceux des cultures témoins. Cette stimulation provient de l'apport supplémentaire de carbone assimilable. Le *Leptosphaeria typhae* s'adapte à l'acétate mieux que beaucoup d'autres Champignons, en particulier les *Allomyces* et les *Neurospora* (TURIAN, 1960, 1961). Peut être son adaptation est-elle facilitée par la présence d'autres substances nutritives dans la décoction d'avoine.

A première vue, il semblerait y avoir contradiction entre l'accroissement de l'activité isocitratasique consécutif à l'augmentation de la teneur du milieu en acétate et la réduction de la richesse du mycélium en succinate. Cette disparition du succinate est très certainement due aux besoins plus intenses consécutifs aux vitesses de croissance plus grandes.

Contrairement à ce qu'on aurait pu attendre, l'acétate provoque une augmentation de la synthèse d'acide lactique chez le *Leptosphaeria typhae*. On était en effet en droit de penser que la glycolyse ne fonctionnerait pas et ne pourrait donc fournir le pyruvate, matière première de la fabrication de l'acide lactique. Mais, là encore, nous devons nous rappeler que dans notre milieu complexe l'acétate ne constitue pas l'unique source de carbone : il est fort possible que la glycolyse fonctionne à partir des glucides dissous dans la décoction d'avoine.

Quoiqu'il en soit, l'ensemble de nos observations montre que, sous l'action de l'acétate, le métabolisme intermédiaire est orienté dans le sens réducteur, comme le confirment l'inhibition de la succinate-déshydrogénase et les valeurs du rapport isocitrate-déshydrogénase/isocitratase. Ce déplacement de l'équilibre fonctionnel paraît lié directement à la richesse en acétate du milieu de culture.

Enfin, on peut noter l'abondance de l'acide malonique dans les cultures effectuées avec acétate ; ceci est à rapprocher de l'importance de ces deux corps dans le métabolisme des acides gras (MAZLIAK, 1968 ; WEETE, 1974) et de la présence dans le mycélium de grandes quantités de lipides. Une telle lipogénèse paraît correspondre à une physiologie d'un type, sinon pathologique, du moins très éloigné de la biologie "naturelle" du Champignon.

Nous avons fait enfin une autre observation importante : l'acide citrique s'accumule d'autant plus dans les mycéliums que ceux-ci sont porteurs d'un plus grand nombre de périthèces ; ceci n'avait jamais été observé chez aucun autre Ascomycète. FRANKE-RINKER et BEHRENS (1979) ont montré que l'acide citrique accumulé par les Champignons supérieurs est dû à l'activité de leur cycle tricarboxylique : notre constatation confirme donc l'orientation oxydative du métabolisme. LE ROUX (1962, 1966) constate que les lamelles du Champignon de couche sont plus riches en acide citrique que la chair du carpophore ; de même, les plantes supérieures accumulent ce corps dans leurs ovaires (COIC et al., 1968). Cette observation s'étend donc à une grande partie du Règne Végétal. Encore une fois, les cultures fertiles du *Leptosphaeria typhae* peuvent être assimilées à des organismes "féminisés", chez qui les voies oxydatives (cycle citrique) sont plus actives. En effet, elles différencient des ascogones (gamètes femelles) qui, après fécondation, provoquent la formation des périthèces.

CONCLUSION

La corrélation entre la reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae* et l'équilibre oxydations-réductions de son métabolisme intermédiaire est donc évidente. Notre Champignon est le premier Ascomycète homothallique à fécondation thallogamique chez qui ce phénomène ait été démontré.

Une inhibition des voies oxydatives limite la fertilité du mycélium, une stimulation l'augmente. Mais cette stimulation ne suffit pas à induire à elle seule la reproduction sexuée. L'énergie lumineuse s'avère être dans notre expérimentation le facteur inducteur indispensable : en son absence pas d'ascogone, pas de périthèce. Il convient maintenant d'essayer de voir dans quelle mesure la lumière peut influencer la fertilité et le métabolisme intermédiaire du *Leptosphaeria typhae*.

CHAPITRE II : INFLUENCE DE L'ÉCLAIREMENT CONTINU SUR LA CROISSANCE, LA REPRODUCTION SEXUÉE ET LE MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE.

INTRODUCTION

L'effet que la durée de l'éclairement exerce sur la reproduction sexuée des Champignons est extrêmement variable. Ainsi, le *Gnomonia leptostyla* ne forme de périthèces qu'à l'obscurité alors que ses spermaties ont besoin, pour apparaître, d'un rythme nycthéral (FAYRET, 1975). La maturation des primordiums du *Coprinus congregatus* nécessite une période d'obscurité constante (DURAND et ROBERT, 1980). Les *Pyricularia* exigent au contraire un éclairement constant pour fructifier (YAEGASHI et HEBERT, 1976). Le *Diaporthe phaseolarum* produit moins d'ascocarpes sous éclairement constant (TIMNICK et al., 1951). Le *Nectria galligena*, enfin, fructifie seulement sous photopériode 12/12 (DEHORTER, 1972). On constate donc de nombreuses différences de comportement vis-à-vis de ce paramètre suivant l'espèce ; d'ailleurs au sein d'une espèce, les résultats peuvent même varier d'une souche mycélienne à l'autre : ainsi l'éclairement continu est favorable à la reproduction d'une souche (S12) de l'*Hypomyces solani*, alors qu'une autre (S28) donne de meilleurs résultats lorsqu'elle est soumise à une alternance : 16 heures de lumière/8 heures d'obscurité (CURTIS, 1964).

Au cours du chapitre précédent, nous avons pu constater que le *Leptosphaeria typhae* ne produit de périthèces que s'il reçoit un éclairement

suffisant ; celui-ci lui a toujours été appliqué sous une photopériode de 12 heures. Il était tentant de rechercher l'effet d'un éclairage plus prolongé qui pourrait provoquer soit une stimulation plus forte de la fructification et du métabolisme, soit au contraire un effet régressif sur les deux phénomènes, soit enfin une action distincte ou même opposée sur la sexualisation et l'activité métabolique. Des études préliminaires avaient montré que la reproduction sexuée paraissait inhibée par l'éclairage constant. Par comparaison avec le métabolisme intermédiaire des *Allomyces* et des *Neurospora* (TURIAN, 1960, 1961, 1966), des *Blastocladiella* (CANTINO, 1956, 1961) et du *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1975) nous avons émis une hypothèse de travail que les expériences décrites dans ce chapitre devaient nous permettre de vérifier : au niveau du métabolisme intermédiaire, le *Leptosphaeria typhae* cultivé à l'obscurité est comparable à des souches "masculinisées" ; lorsqu'il reçoit ses 12 heures d'éclairage quotidiennes, il se rapproche des souches "femelles" et puisqu'il produit des périthèces, il est en effet "féminisé" et émet des organes aptes à capter le noyau mycélien qui, par thallogamie, permettra la constitution du dicaryon ; si, sous éclairage constant, sa reproduction sexuée est inhibée, peut être est-ce parce qu'il est trop orienté dans le sens "femelle" par la lumière et cela serait facile à contrôler en étudiant son métabolisme intermédiaire, qui serait alors dirigé vers les voies oxydatives. Ce qui, par extension, permettrait de comprendre la stérilité apparente de nombreux Champignons homothalliques dans certaines conditions : ceux-ci ne seraient pas stériles à proprement parler, mais leur métabolisme serait trop orienté dans le sens oxydatif (femelle) ou réducteur (mâle), la fertilité exigeant un équilibre parfait entre les deux tendances.

Nous avons donc comparé le développement et le métabolisme intermédiaire de trois types de cultures du *Leptosphaeria typhae* :

- maintenues à l'obscurité ;
- éclairées douze heures par jour ;
- éclairées continuellement.

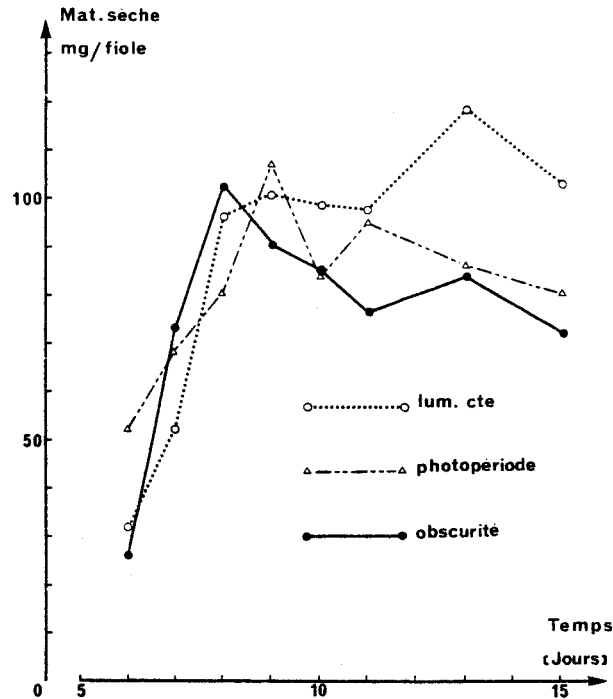
Les trois lots de boîtes de Roux étaient cultivées dans une seule enceinte de culture afin que tous les autres paramètres soient rigoureusement les mêmes pour tous les mycéliums, ce qui nous a contraint à ne faire que trois prélèvements : aux 7ème, 9ème et 11ème jours. Ces travaux ont été publiés en 1979 (VIDAL et VIALA).

RÉSULTATS

I. CROISSANCE ET FRUCTIFICATION.

Les résultats, résumés dans la figure 14 et le tableau 13 montrent que la croissance mycélienne est stimulée en début de culture par l'éclairage surtout lorsqu'il est alterné, puis se prolonge plus longtemps, particulièrement sous lumière constante.

Figure 14 : Evolution du poids de matière sèche en fonction des diverses conditions de culture.



La fructification dépend nettement de l'intervention de la lumière : pratiquement nulle à l'obscurité, active et précoce sous éclairage alterné, elle est plus tardive et surtout moins intense sous lumière constante.

Tableau 13 : Reproduction sexuée.

Conditions de culture	Richesse relative en périthèces au 13ème jour de culture	Date d'apparition des premiers périthèces
Obscurité constante	très faible	11ème jour
Photopériode	100	7ème jour
Lumière constante	35	8ème jour

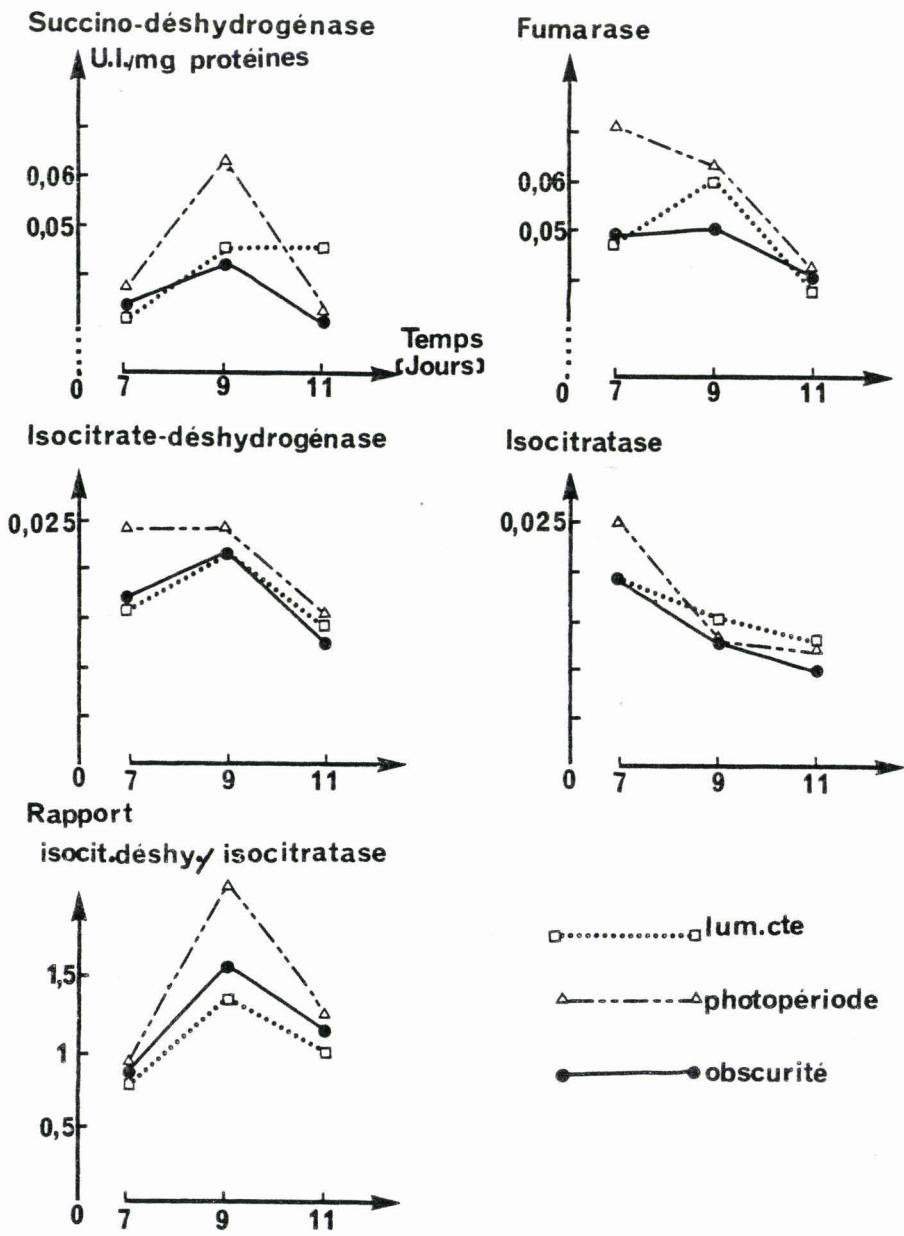


Figure 15 : Résultats des dosages enzymatiques



II. EVOLUTION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES.

Les activités enzymatiques indiquées dans la figure 15 correspondent aux valeurs moyennes de 5 séries culturales.

L'isocitrate-déshydrogénase est nettement plus active dans les mycéliums soumis à photopériode que dans les autres types de cultures. Sous éclairément constant, on note des valeurs de même ordre que dans les mycéliums maintenus à l'obscurité et même inférieures au 7ème jour ; c'est seulement en fin de croissance (11ème jour) qu'elles sont plus élevées.

C'est également dans les cultures éclairées suivant un rythme nycthéméral que la fumarase est la plus active. Elle évolue dans tous les cas parallèlement à l'isocitrate-déshydrogénase. Dans les mycéliums constamment éclairés, c'est seulement au 9ème jour qu'on constate une stimulation de cette enzyme par rapport à ceux qui ont végété à l'obscurité.

La teneur en succino-déshydrogénase augmente entre les 7ème et 9ème jours, puis diminue. En début de croissance, elle est particulièrement grande dans les cultures soumises à photopériode ; sous éclairément constant, elle est alors du même ordre qu'à l'obscurité, puis elle s'élève et se maintient à un haut niveau en fin de développement.

Le rapport isocitrate-déshydrogénase/isocitrate-lyase qui traduit l'équilibre fonctionnel entre les cycles citrique et glyoxylique, évolue de la même manière dans toutes les cultures : relativement faible au 7ème jour, il s'élève au 9ème puis s'abaisse à nouveau. Mais il est toujours plus élevé dans les mycéliums recevant un éclairément alterné et c'est sous lumière constante qu'il est le plus bas à tous les stades de la croissance.

III. LES ACIDES ORGANIQUES.

Les dosages d'acides organiques ont été effectués sur une seule série culturale (tableau 14).

Dans les mycéliums éclairés, la teneur de l'ensemble des acides organiques augmente entre les 7ème et 9ème jours, puis diminue ; elle suit une évolution inverse dans les cultures réalisées à l'obscurité.

Tableau 14 : Evolution des acides organiques. Les quantités sont exprimées en nanoéquivalents pour 100 mg de mycélium sec. Le chiffre mis entre parenthèses indique le pourcentage.

Acides	7ème jour			9ème jour			11ème jour		
	L. c.	12/12	Obsc.	L. c.	12/12	Obsc.	L. c.	12/12	Obsc.
Lactique	2360 (28,8)	1350 (20,3)	1710 (24,1)	890 (10,2)	1275 (15,4)	850 (13,3)	515 (7,7)	720 (9,8)	1065 (10,5)
Succinique	2785 (34,1)	2690 (40,4)	2135 (30,1)	2645 (30,2)	2765 (33,5)	1855 (29,1)	1405 (21,1)	900 (12,2)	1395 (13,7)
Malique	1345 (16,4)	1335 (20,1)	1425 (20,1)	2285 (26,1)	1440 (17,4)	1800 (28,3)	2375 (35,7)	2970 (40,3)	3815 (37,6)
Citrique	1295 (15,8)	700 (10,5)	1270 (17,9)	1500 (17,1)	2365 (28,6)	1000 (15,7)	1840 (27,6)	2320 (31,5)	2950 (29,1)
Malonique	370 (4,5)	390 (5,8)	530 (7,5)	714 (8,2)	390 (4,7)	565 (8,9)	345 (5,1)	150 (2,1)	450 (4,4)
Fumarique	traces			665 (7,6)	traces	270 (4,2)	175 (2,6)	300 (4,1)	460 (4,5)
Glycolique	15 (0,2)	185 (2,8)	22 (0,3)	40 (0,4)	17 (0,2)	21 (0,3)			
TOTAL	8175	6650	7100	8740	8260	6365	6655	7360	10140

L'acide lactique, très abondant au 7ème jour, diminue ensuite d'autant plus vite que les cultures sont soumises à une durée d'éclairement plus grande.

En début de croissance, l'acide succinique est toujours plus abondant dans les mycéliums éclairés. En fin de développement, surtout sous photopériode, il diminue fortement. Au contraire, la teneur en acide malique s'élève progressivement entre les 7ème et 11ème jours dans toutes les conditions de culture.

Au 7ème jour, la teneur en acide citrique des cultures soumises à photopériode est relativement faible : ensuite, elle augmente fortement et devient proportionnellement plus grande que dans les autres types de cultures.

L'acide malonique paraît d'autant moins important que la fructification devient plus active.

L'acide fumarique, présent à l'état de traces en début de croissance tend ensuite à s'accumuler. Au contraire, on ne décèle la présence d'acide glycolique qu'aux 7ème et 9ème jours.

DISCUSSION

Nous attribuons la faiblesse des poids de matière sèche obtenus au cours de cette étude au fait que nous avons dû cultiver le Champignon dans les seules enceintes de notre laboratoire susceptibles d'être constamment éclairées ; ces étuves presque parfaitement étanches sont de volume beaucoup plus réduit que la pièce régulée qui nous avait servi pour les expériences précédentes. L'oxygénation des cultures du *Leptosphaeria typhae* est peut-être trop faible, ou la concentration en CO₂ dégagé par la respiration trop forte. Nous n'avons fait aucune expérience pour vérifier ces hypothèses et nous nous contentons pour l'heure de constater des faits. De toutes façons, les trois types de cultures ont été effectués dans les mêmes enceintes au même moment et les résultats sont donc très comparables entre eux.

Au cours de la croissance, la teneur en acide lactique et la proportion de celui-ci par rapport à l'ensemble des acides diminuent très nettement. Cette évolution est due à l'émersion du mycélium qui facilite une orientation métabolique plus oxydative. Et, en effet, les activités enzymatiques du cycle citrique augmentent ou demeurent très importantes entre les 7ème et 9ème jours. Ensuite, elles deviennent beaucoup plus faibles, traduisant ainsi la fin du développement : le mycélium dans sa partie gamétophytique est sénescant. Il en est de même de la partie sporophytique de l'ascocarpe, puisque les ascques sont formées et contiennent des ascospores à l'état de dormance.

Si l'on compare les trois types de culture, on note une activité métabolique plus grande sous éclairage, surtout lorsque celui-ci subit un rythme nycthéral. Dans ce cas la stimulation s'exerce dès le début du développement sur toutes les enzymes étudiées et s'avère particulièrement nette au 7ème jour pour l'isocitrate-déshydrogénase, la fumarase et l'isocitrate-lyase. Cette activité enzymatique plus intense se trouve d'ailleurs en accord avec les masses importantes de matière sèche obtenues au 6ème jour, exprimant une croissance plus rapide que dans les deux autres conditions culturales. On constate également, sous photopériode au 7ème jour, une teneur assez faible pour l'ensemble des acides organiques : les synthèses très actives empêchent l'accumulation des produits du métabolisme intermédiaire. Bien que générale, la stimulation métabolique précoce des cultures fertiles est orientée avant tout

dans un sens oxydatif comme en témoignent les valeurs du rapport isocitrate-déshydrogénase/isocitrate-lyase ; celles-ci plus élevées dans les mycéliums très riches en périthèces que dans les deux autres types de cultures, montrent que l'équilibre fonctionnel entre les cycles citrique et glyoxylique est déplacé en faveur de la voie oxydative.

Sous éclairage constant, les périthèces apparaissent un peu plus tardivement que sous photopériode et sont nettement moins nombreuses. Cette fertilité moindre peut être reliée aux quantités plus faibles d'acide citrique observées aux 9ème et 11ème jours ; cela confirme ce que nous avons déjà constaté plus haut : la formation des périthèces s'accompagne d'une accumulation de cet acide.

Par rapport aux cultures maintenues à l'obscurité la croissance est plus précoce et les activités enzymatiques sont, dans l'ensemble, plus élevées. Mais la stimulation du métabolisme est beaucoup moins importante que sous photopériode et apparaît plus tardivement : elle n'est vraiment nette qu'au 9ème jour. Elle est surtout sensible pour l'isocitrate-lyase et la succinodéshydrogénase qui, au 11ème jour, atteignent des taux d'activité plus élevés dans ces mycéliums que dans les deux autres types de cultures. Les valeurs du rapport isocitrate-déshydrogénase/isocitrate-lyase demeurent faibles tout au long du développement et témoignent d'un équilibre fonctionnel entre les cycles citrique et glyoxylique moins favorable à la voie oxydative que dans le cas de rythme nyctéméral et même d'obscurité. C'est peut être la raison pour laquelle, en éclairage continu, la différenciation des périthèces reste peu importante, étant donné les corrélations étroites qui existent chez le *Leptosphaeria typhae* (VIALA et VIDAL, 1972 ; VIALA, 1972) entre le métabolisme oxydatif et la reproduction sexuée. Chez lui, comme chez le *Neurospora crassa* (KOBBER et al., 1967 ; OULEVEY-MATIKIAN et TURIAN, 1968) et l'*Aspergillus niger* (NG et al., 1973) un développement purement végétatif se caractérise par un métabolisme réducteur, sans qu'on puisse relier cet état à une orientation sexuelle quelconque. La stimulation du cycle citrique dans les mycéliums fertiles pourrait n'être que le reflet du phénomène de différenciation (TURIAN, 1969 ; NG et al., 1973).

L'abondance de l'acide malonique au début du développement, particulièrement dans les mycéliums soumis à photopériode, est l'indice d'une synthèse active des lipides. Ensuite, sa diminution, plus importante dans les

cultures à fructification intense, traduit leur mobilisation pour les nouvelles synthèses qu'implique la formation des périthèces, ce qui se traduit sous le microscope par l'observation des mycéliums gamétophytiques perdant leurs globules lipidiques au profit des périthèces.

En résumé, chez le *Leptosphaeria typhae*, si l'éclairement est un facteur d'induction indispensable à l'apparition des périthèces (VIALA, 1972 ; VIALA et VIDAL, 1972 ; VIDAL, 1971 ; VIDAL et VIALA, 1973), son action continue, au lieu de produire un effet cumulatif, devient néfaste à la fois au métabolisme oxydatif et à la reproduction sexuée. Celle-ci se produit lorsque le Champignon est soumis à un rythme nyctéméral, c'est à dire lorsqu'il rencontre les conditions les plus proches de la nature.

CHAPITRE III : INFLUENCE DE LA DATE D'ÉCLAIREMENT SUR LA FRUCTIFICATION ET LE MÉTABOLISME DU LEPTOSPHAERIA TYPHAE.

INTRODUCTION

Le chapitre précédent a confirmé que la reproduction sexuée de notre Champignon s'accompagnait toujours d'une stimulation des voies oxydatives du métabolisme intermédiaire. Il nous a montré aussi qu'une durée d'éclairement trop prolongée inhibait à la fois ces deux phénomènes, presque au même titre que l'obscurité constante. Au cours de la recherche décrite ci-dessous, nous avons voulu préciser la durée d'éclairement nécessaire pour induire la fructification du *Leptosphaeria typhae*. Nous avons en même temps étudié l'effet que de courtes durées d'éclairement appliquées à différents temps de culture exercent sur son métabolisme intermédiaire. Nous avons donc essayé de séparer reproduction sexuée et stimulation du cycle citrique en jouant à la fois sur la date et la durée d'éclairement des cultures.

Ce travail a été publié dans les "Annales des Sciences Naturelles", Botanique, 12ème séries, tome 14, fascicule 1, pages 53 à 69 (1973). Nous reproduisons ci-dessous le texte intégral de cette publication.

Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Paris.
12^e Série, 1973, Tome 14, pp. 53-70.

INFLUENCE DE LA DATE D'ÉCLAIREMENT
SUR LA FRUCTIFICATION
ET LE MÉTABOLISME
DU *LEPTOSPHERIA TYPHÆ*

Par Gérard VIDAL et Guy VIALA

*Laboratoire de Cryptogamie, Université des Sciences et Techniques de Lille,
Groupe de Mycologie fondamentale et appliquée de Lille,
B. P. 36, F 59650 Villeneuve-d'Ascq,
et Laboratoire de Physiologie végétale de l'Institut Catholique,
C.E.A.R.N. de l'Université Paul-Sabatier,
31, rue de la Fonderie, 31068 Toulouse Cédex.*

RÉSUMÉ

Des cultures *in vitro* du *Leptosphaeria typhæ* sont soumises à un certain nombre de photopériodes 12/12 durant leur croissance. Les témoins demeurent à l'obscurité. Dans tous les cas, la lumière stimule le métabolisme oxydatif et la reproduction sexuée. Mais l'effet quantitatif de l'éclairement dépend du moment où il est appliqué au cours de la croissance. L'action de la lumière est faible en début et en fin de développement. Le champignon est plus sensible à l'énergie photonique aux environs du 7^e jour. Entre les 7^e et 11^e jours la fructification et la stimulation du métabolisme sont d'autant plus intenses que les photopériodes sont plus nombreuses. Au 11^e jour et au-delà, la sensibilité du champignon à l'action spécifique de la lumière sur la reproduction sexuée s'affaiblit, bien que l'on constate toujours une stimulation nette du métabolisme.

SUMMARY

**Influence of the time of lighting on fructification
and metabolism of *Leptosphaeria typhæ*.**

Cultures *in vitro* of *Leptosphaeria typhæ* are submitted to a certain number of photoperiods 12/12 during a 13 days growth. The control remains in the dark.

In all cases, light stimulates oxydative metabolism and sexual reproduction. But the quantitative effect of light depends on the time of action in the course of growth. Light influence is slight if applied either at the beginning, or at the end of growth. The fungus is more sensitive to light energy near the 7th day. From 7th to 11 days, metabolism enhancement and fructification are higher if 12/12 photoperiods are more numerous. After the 11th day, the fungus sensitivity to specific action of light on sexual reproduction decreases, although the metabolism is strongly stimulated.

INTRODUCTION

Parmi les phénomènes morphogénétiques qui caractérisent la différenciation fongique, la reproduction sexuée nous paraît le plus important en raison du rôle essentiel qu'elle joue dans la vie des organismes (TURIAN, 1976).

Pour l'étude de la fructification sexuée, le choix du *Leptosphaeria typhae* (Auers.) Karsten (Ascomycète, ordre des Pleosporales) paraît particulièrement propice. L'aptitude de ce champignon à former des périthèces en milieu liquide et à ne différencier aucune forme de multiplication végétative est assez rare chez les Ascomycètes. De plus, grâce à l'action de la lumière, nous pouvons contrôler la fructification de ce microorganisme (LACOSTE, 1965). Soumises à un éclairage convenable, les cultures deviennent fertiles, tandis que placées à l'obscurité elles demeurent stériles. Nous avons entrepris une étude physiologique du développement du *Leptosphaeria typhae* et montré, au cours du métabolisme intermédiaire, l'existence de trois voies prépondérantes : cycle citrique, cycle glyoxylique et formation d'acide lactique. L'équilibre entre ces trois systèmes est orienté dans le sens oxydatif pour le mycélium fertile (photo-induit), alors que les voies réductrices prennent plus d'importance dans les cultures maintenues à l'obscurité et donc stériles (VIALA, 1969, 1972, VIALA *et al.*, 1968, 1969). La stimulation de la voie glyoxylique par l'ion acétate inhibe la reproduction sexuée. Inversement, une stimulation du métabolisme oxydatif, obtenue en facilitant le contact du mycélium avec l'air, augmente le nombre de périthèces et rend leur différenciation plus précoce. Mais, dans aucun cas, nous n'avons obtenu de périthèces à l'obscurité : la lumière demeure, dans nos conditions expérimentales, le facteur d'induction indispensable à la reproduction sexuée (VIALA et VIDAL, 1972).

Après avoir comparé les cultures de *Leptosphaeria typhae*, réalisées d'une part à l'obscurité et d'autre part à la lumière suivant un rythme nycthéral 12/12, nous nous proposons d'étudier l'influence, sur le développement du champignon, d'une ou plusieurs photopériodes de 12 heures intervenant à divers moments de la croissance.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les cultures.

Le champignon, isolé et décrit par LACOSTE (1965), est cultivé à 18 °C dans des boîtes de Roux d'un litre contenant 100 ml d'une décoction d'avoine à 20 g/l.

Les cultures diffèrent entre elles par le nombre de photopériodes et le moment où celles-ci interviennent. Chaque photopériode correspond à 12 heures de lumière pour 12 heures d'obscurité, l'éclairage, fourni par des tubes fluorescents « blanc brillant de

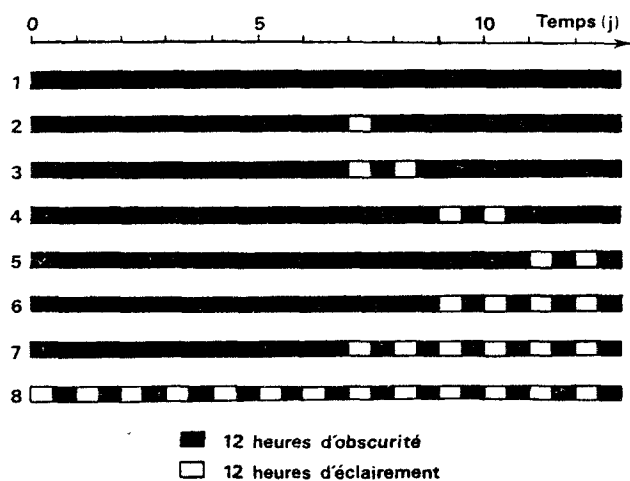


FIG. 1. — Différents types de cultures réalisées.

luxé », est de 3 000 ergs/cm²/sec⁻¹. Nous avons résumé dans la figure 1 les quatre types de cultures :

- 1 : cultures réalisées constamment à l'obscurité;
- 2-3-4 : cultures placées d'abord à l'obscurité, puis soumises à l'influence d'une ou deux photopériodes, et enfin replacées à l'obscurité;
- 5-6-7 : cultures commençant leur développement à l'obscurité et le poursuivant ensuite sous l'action d'un rythme nyctéméral 12/12;
- 8 : enfin des cultures soumises régulièrement et dès le premier jour à un rythme nyctéméral 12/12.

Dosages enzymatiques.

Techniques.

Les mesures sont effectuées à la température du laboratoire (20° C environ), à l'aide d'un spectrophotomètre Unicam SP 800 B. Nous avons dosé l'isocitratase selon la technique de DIXON et KORNBERG (1959) adaptée par TOKUNAGA *et al.* (1969) en suivant l'apparition de la glyoxylate phénylhy-

drazone à 324 nm et l'isocitrate-déshydrogénase en notant la réduction du NADP en NADPH-H⁺ à 340 nm (TOKUNAGA *et al.*, 1969). Nous n'avons pas fait de dosage de l'isocitrate-déshydrogénase NAD-dépendante, l'extrême labilité de cette enzyme ne nous permettant pas d'obtenir des résultats fiables.

Enfin, nous avons utilisé la méthode de ELLS (1959), adaptée par TOKUNAGA *et al.* (1969) pour le dosage de la succino-déshydrogénase. On mesure à 600 nm la décoloration du 2,6-dichlorophénol-indophénol par l'hydrogène libéré du succinate en présence de phénazine méthosulfate.

Unités.

Suivant les conventions internationales nous avons défini une unité d'enzyme d'après la quantité de matière protéique nécessaire pour transformer une micromole de substrat en une minute.

Extraits acellulaires.

Le mycélium, recueilli par centrifugation puis lavé dans le tampon Tris-HCl 0,2 M pH 7,5 est mis en suspension dans le même tampon contenant de l'EDTA-Mg à la concentration de 10⁻⁵ M. Il subit ensuite un broyage à l'Ultra-Turrax à 0° C durant 1 minute. Le broyat est centrifugé à 3 000 g et à 0° C pendant 20 minutes. Le surnageant, conservé dans la glace, constitue l'extrait acellulaire.

Protéines.

Les protéines sont purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium, ce qui permet notamment l'élimination des composés phénoliques, puis dosées selon la méthode de LOWRY *et al.* (1951) avec la sérum-albumine de bœuf (Sigma) pour étalon.

Dosages des acides organiques.

Nous avons dosé les acides organiques mycéliens selon la méthode automatique de CARLES *et al.* (1967), CARLES (1968) et CARLES et ABRAVANEL (1971). Le mycélium utilisé avait été recueilli par centrifugation, lavé, fixé à l'azote liquide et lyophilisé. Les dosages sont exprimés en micro-équivalents pour 100 mg de matière sèche. Pour des substances qui, comme les acides organiques, n'existent qu'en solution, la référence au poids sec peut paraître anormale, mais il est difficile de préciser la teneur en eau du mycélium.

Dosages des acides aminés.

Après extraction, les acides aminés ont été dosés à l'aide d'un appareil Technicon, selon la méthode de CARLES et ABRAVANEL (1970).

*RÉSULTATS**I. — La croissance et la fructification.*

La croissance des diverses cultures, mesurée par la variation du poids de matière sèche, ne présente pas de différences significatives et l'on peut considérer que toutes évoluent de la même façon que les témoins éclairés dès le premier jour (fig. 2).

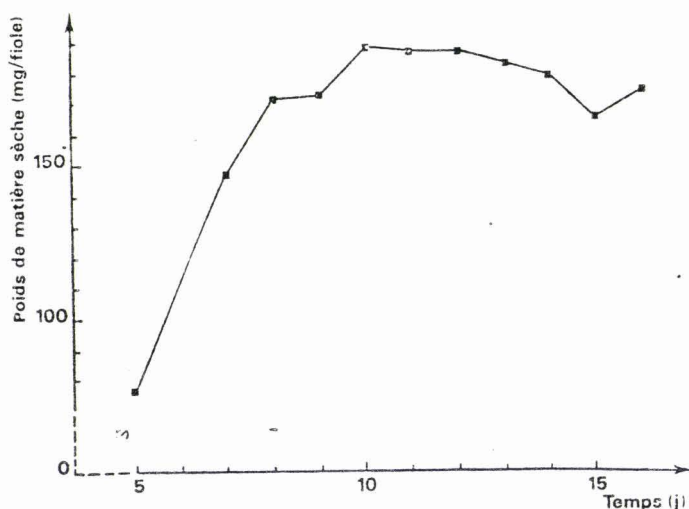


FIG. 2. — Evolution du poids de matière sèche d'une culture en fonction du temps.

TABLEAU I. — RICHESSE RELATIVE EN PÉRITHÈCES AU 13^e JOUR

	Type de culture							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Richesse en périthèces	0	10	40	20	0	25	100	100

Par contre, on note de grandes différences dans la fructification (tableau I). Les premiers périthèces apparaissent dès le 6^e jour dans les cultures-témoins (8). A l'obscurité, aucune fructification ne se forme au cours du développement (1); si ces cultures sont soumises à des photopériodes après quelques jours de croissance, des périthèces se différencient 24 à 48 heures après le premier éclaircissement (2) (3) (4) (5) (6) (7). Un faible

nombre de périodes lumineuses, une ou deux, reçues pendant la phase de croissance, suffit pour induire la reproduction, mais le nombre de périthèces formés varie suivant le moment d'application et demeure toujours faible. D'une façon générale, ils sont d'autant plus abondants que les photopériodes sont plus nombreuses et appliquées plus précocement. Le champignon soumis à deux photopériodes en fin de croissance, c'est-à-dire au 11^e jour, reste pratiquement stérile.

II. — Les activités enzymatiques.

a) L'isocitrate-déshydrogénase.

L'activité de l'isocitrate-déshydrogénase est toujours plus grande dans les cultures recevant un éclaircissement que dans celles maintenues constam-

ISOCITRATE DESHYDROGENASE

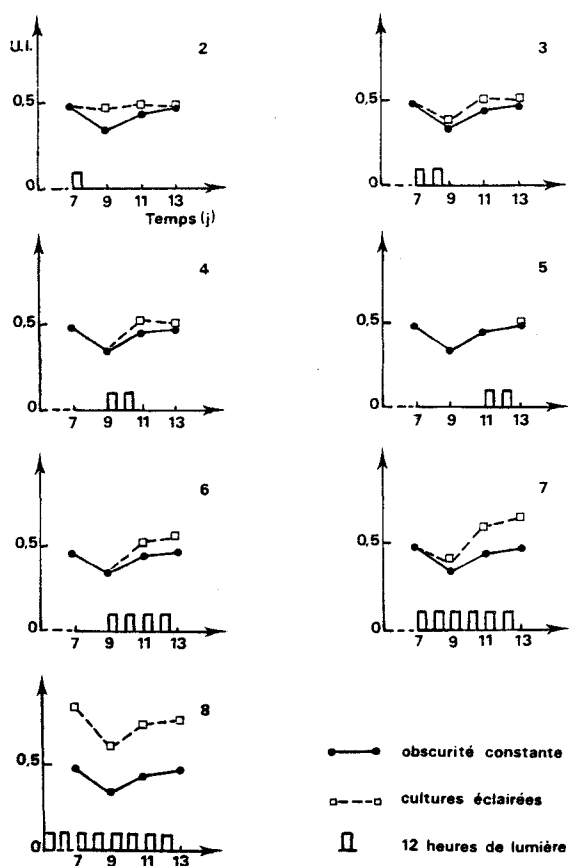


FIG. 3.

FRUCTIFICATION ET MÉTABOLISME DU « LEPTOSPHERIA TYPHÆ » 59

ment à l'obscurité (fig. 3). Dans le cas des cultures placées à l'obscurité mais soumises, au cours de leur développement, à une ou plusieurs photopériodes, on constate qu'une seule photopériode appliquée au 7^e jour suffit à stimuler l'activité de l'isocitrate-déshydrogénase. Une deuxième photopériode au 8^e jour augmente et prolonge, dans le temps, cette activité.

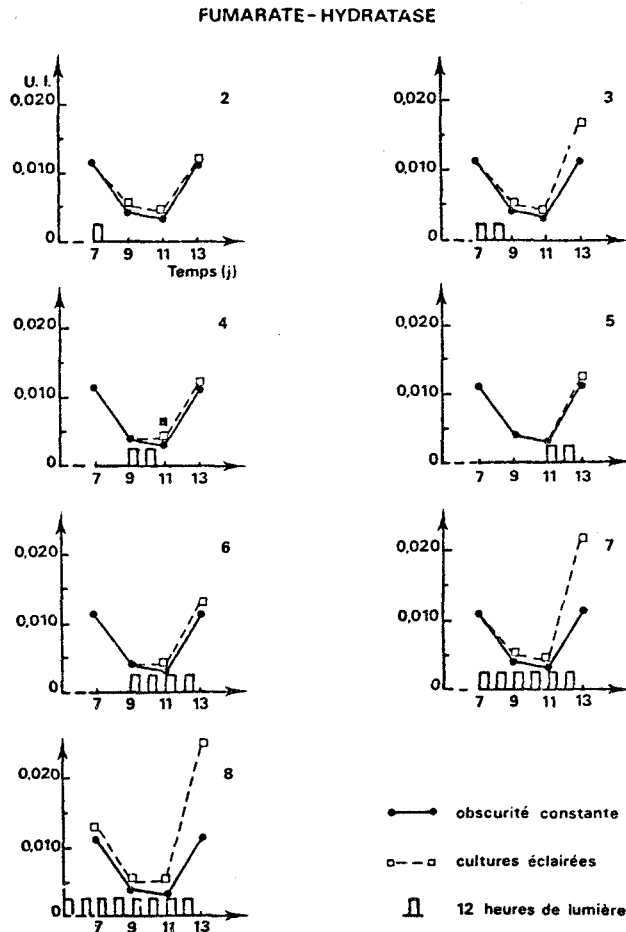


FIG. 4.

Cependant, pour les cultures qui après éclairage sont à nouveau portées à l'obscurité, l'activité de l'isocitrate-déshydrogénase reste toujours inférieure à celle des cultures qui, éclairées au même stade de développement, demeurent ensuite soumises à un rythme nyctéméral.

En définitive, l'activité de l'isocitrate-déshydrogénase est d'autant plus grande que les photopériodes sont précoces et nombreuses. Étant donné que



la lumière ne modifie pas de façon significative l'activité isocitratasique, il en résulte que le rapport : activité de l'isocitrate-déshydrogénase/activité isocitratasique, augmente d'autant plus que les photopériodes sont plus nombreuses.

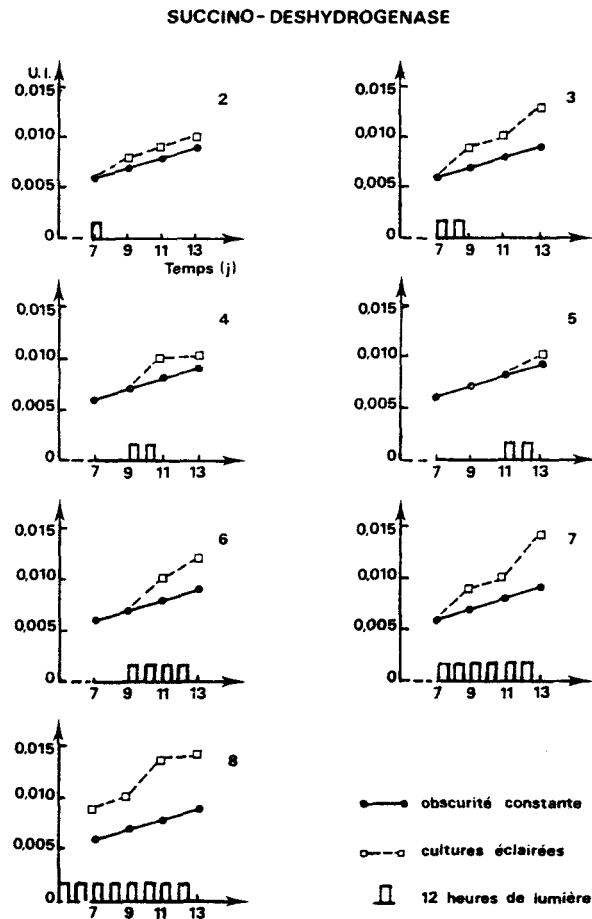


FIG. 5.

b) Succino-déshydrogénase et fumarate-hydratase.

L'activité de la fumarate-hydratase et surtout celle de la succino-déshydrogénase évoluent généralement dans le même sens que celui que nous venons de décrire avec l'isocitrate-déshydrogénase, à savoir une stimulation très nette sous l'action des photopériodes particulièrement sensible pour la succino-déshydrogénase (fig. 4 et 5).



III. — *Les acides organiques du mycélium* (fig. 6, 7, 8, 9 et 10).

Les acides organiques, considérés dans leur ensemble, deviennent toujours abondants dès qu'on soumet le mycélium à une ou plusieurs photo-périodes.

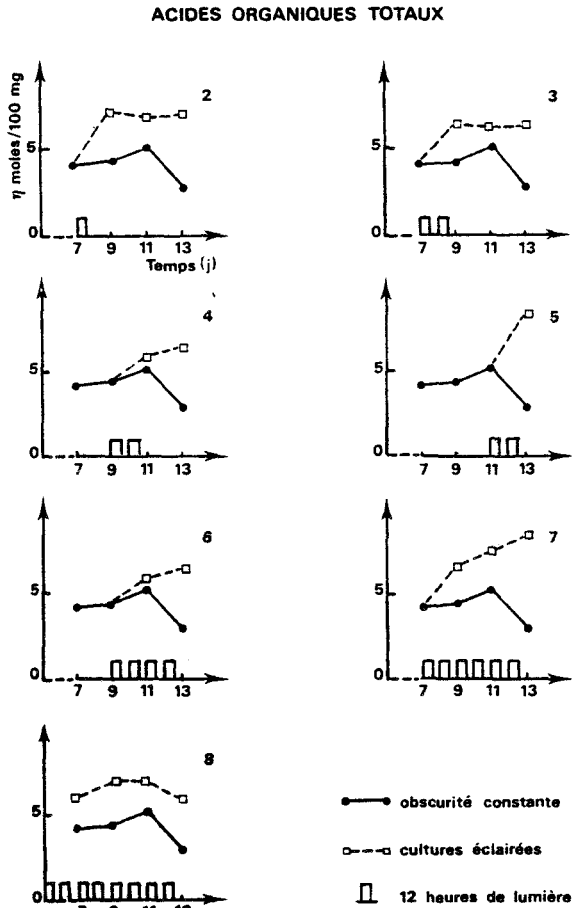


FIG. 6.

Ainsi, au 13^e jour, dans les cultures maintenues constamment à l'obscurité, les teneurs, pour 100 mg de mycélium, sont de 3 μmoles tandis que dans tous les autres cas elles sont au moins égales à 6 μmoles. Ces différences se retrouvent avec chacun des quatre principaux acides organiques : acides lactique, succinique, malique et citrique. Signalons la présence, en faibles quantités, des acides fumarique, malonique, glycolique et glycérique.



ACIDE LACTIQUE

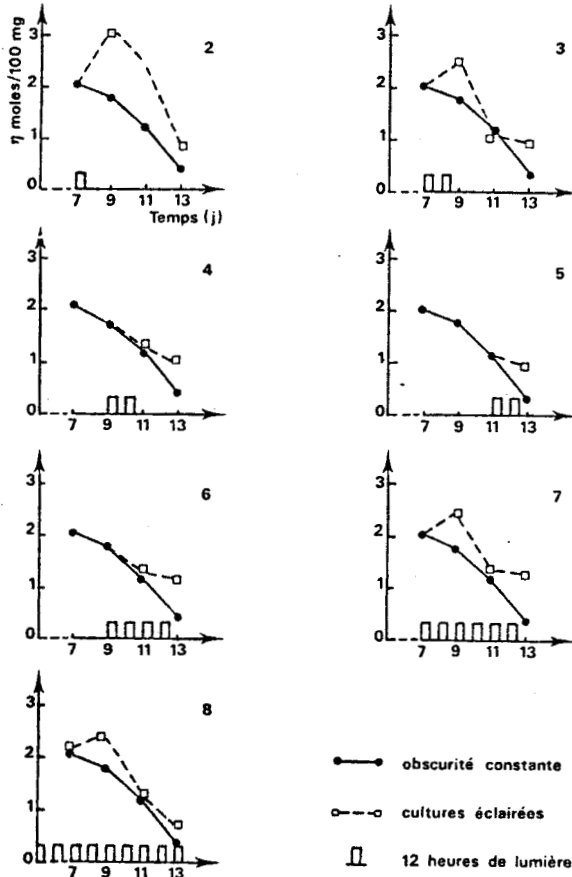


FIG. 7.

IV. — *Les acides aminés libres du mycélium*
(tableau II).

TABLEAU II. — TENEUR DU MYCÉLIUM EN ACIDES AMINÉS LIBRES
EXPRIMÉE EN MICROMOLES POUR 100 MG DE MATIÈRE SÈCHE

	Type de culture							
	1	2	3	4	5	6	7	8
7 ^e jour	21,8	21,8	21,8	21,8	21,8	21,8	21,8	24,6
9 ^e jour	13,9	15,3	13,9	13,9	13,9	13,9	14,2	15,4
11 ^e jour	12,0	11,4	11,5	12,0	12,0	12,0	11,8	14,7
13 ^e jour	14,4	14,4	15,2	15,3	14,3	13,8	15,3	11,0



ACIDE SUCCINIQUE

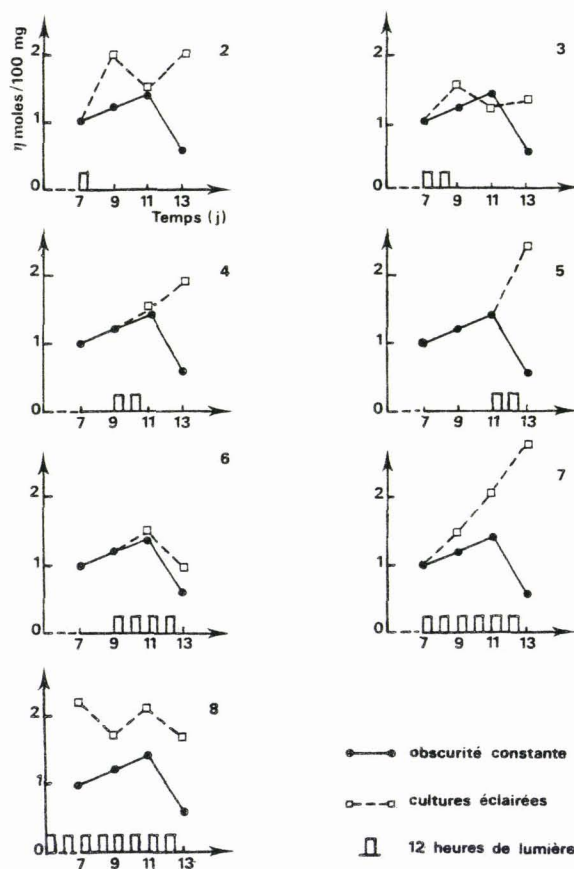


FIG. 8.

Lorsque le champignon est éclairé dès le premier jour, l'ensemble des acides aminés libres est plus abondant que dans le mycélium développé à l'obscurité, excepté au 13^e jour. Bien que nous ayons dosé individuellement tous les acides aminés libres, nous examinerons surtout les variations qui nous paraissent les plus significatives, à savoir celles des acides aminés basiques et celles de l'acide γ -amino-butérique.

Quelles que soient les conditions culturales, la proportion des acides aminés basiques diminue considérablement entre le 7^e et le 13^e jour : de 16 à 4 % pour l'arginine, de 8 à 4 % pour la lysine, de 4 à 0,5 % pour l'ornithine et de 3 à 1,5 % pour l'histidine, soit au total de 31 à 10 %. Toutefois, sous l'action de la lumière, les teneurs restent toujours plus grandes.



Le tableau 15 complète les informations contenues dans l'article que nous citons. Il permet de mieux préciser le raisonnement relatif à la synthèse des acides aminés.

Tableau 15 : Evolution des acides aminés les plus importants (pourcentage du total).

Type de culture Jour	α -ALANINE							
	1	2	3	4	5	6	7	8
7ème	22,6	22,6	22,6	22,6	22,6	22,6	22,6	18,4
9ème	22,8	20,7	23,2	22,8	22,8	22,8	23,2	22,4
11ème	21,5	22	22,1	25,4	21,5	25,4	21,7	22,4
13ème	21,9	21,2	24	23,3	24,8	24,4	24,4	21,9
	ACIDE γ -AMINO-BUTYRIQUE							
7ème	14,4	14,4	14,4	14,4	14,4	14,4	14,4	14,6
9ème	16,1	15,4	15,3	16,1	16,1	16,1	15,3	15,7
11ème	18,9	15,4	17,9	18,9	18,9	13,7	15,3	15,4
13ème	21,5	17,2	13,4	16,6	17,7	14,7	16,7	17,7
	ACIDE GLUTAMIQUE							
7ème	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	3,2
9ème	3,8	4,5	4,7	3,8	3,8	3,8	4,7	4,1
11ème	4,7	9,4	9,5	6,6	4,7	6,6	6,6	4,3
13ème	8,5	8,8	8,9	7,9	6,1	9,8	6,9	9,5
	ACIDES AMINES BASIQUES							
7ème	30,5	30,5	30,5	30,5	30,5	30,5	30,5	36,9
9ème	24,5	21,1	21,1	21,1	21,1	21,1	21,1	28,1
11ème	14,9	16,3	12,3	15,6	14,9	15,6	20,2	17,2
13ème	9,5	12,1	16,9	13,0	12,3	14,4	11,6	17,2



ACIDE CITRIQUE

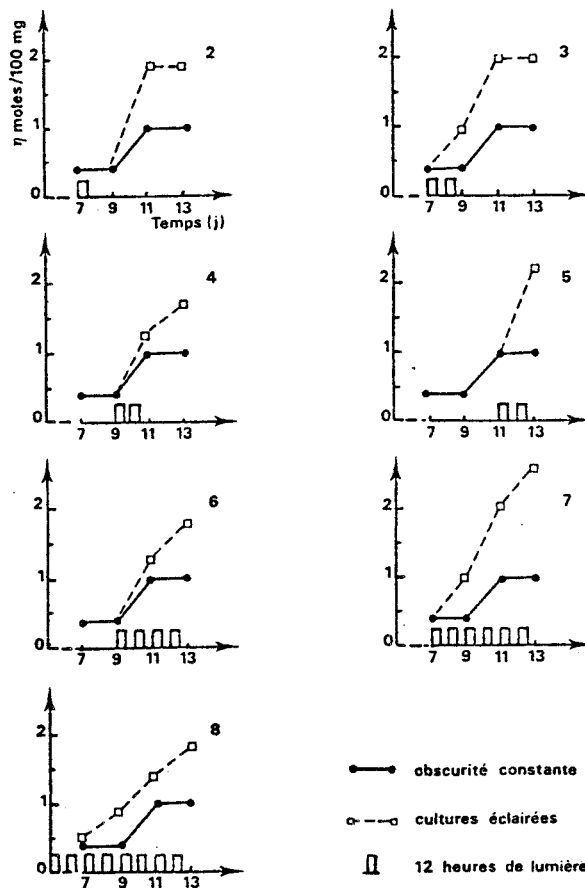


FIG. 9.

Lorsque les cultures sont réalisées à l'obscurité, la proportion de l'acide γ -amino-butérique, par rapport à l'ensemble des acides, croît régulièrement du 7^e au 13^e jour, et passe de 14,5 % à 21,5 %. Avec seulement une ou deux photopériodes, la proportion n'atteint que 17 à 18 %; enfin, à un rythme nyctéméral 12/12 elle se stabilise aux environs de 15 %. Donc l'importance de l'acide γ -amino-butérique diminue d'autant plus que les cultures sont éclairées et fertiles, variant en sens inverse de celle des acides aminés basiques.

ACIDE MALIQUE

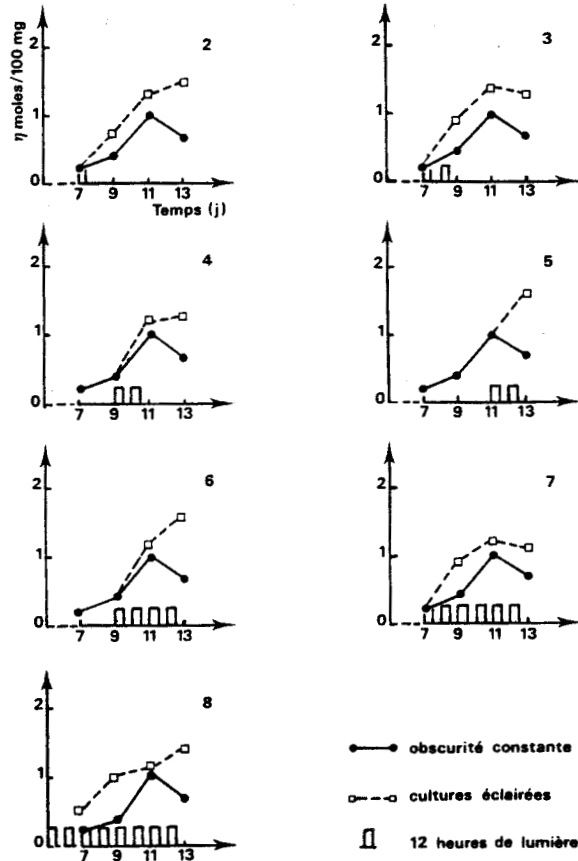


FIG. 10.

DISCUSSION

Synthèse des acides aminés.

Aux 7^e, 9^e et 11^e jours, les acides aminés libres du mycélium sont plus abondants dans les cultures éclairées dès le début de la croissance que dans celles maintenues à l'obscurité. Cette observation est en accord avec nos résultats antérieurs (VIALA, 1969), qui ont montré que la lumière stimulait la synthèse des acides aminés. Cependant, il semblerait que ce ne soit plus le cas après 13 jours de culture, étant donné que les valeurs deviennent alors plus grandes à l'obscurité. En fait, nous savons que cette baisse de concentration en fin de développement est à rapprocher des besoins de la fructifi-



cation (VIALA, 1972) et, par conséquent, n'est pas incompatible avec notre interprétation.

L'influence d'éclairement, intervenant après le 6^e jour, se traduit rarement par une augmentation de la teneur en acides aminés. Cela ne signifie pas pour autant l'absence de stimulation; en effet, il ne faut pas oublier que l'accumulation des acides aminés libres du mycélium correspond à un bilan résultant des quantités synthétisées et des quantités utilisées. Or si la lumière stimule la synthèse des acides aminés, elle déclenche également la fructification et par conséquent crée des besoins nouveaux. Malgré la formation souvent importante de périthèces, le stock des acides aminés libres demeure parfois supérieur à celui des cultures stériles et ne devient inférieur que dans certains cas pour lesquels, d'ailleurs, la différence n'est jamais très grande : moins de 10 %.

Enfin, nous avons toujours constaté qu'au fur et à mesure de la croissance des cultures du *Leptosphaeria typhæ*, l'importance des acides aminés basiques diminuait alors que celle de l'acide γ -amino-butyrique augmentait. Pour ce dernier acide, cette évolution se conçoit aisément puisque chez le *Leptosphaeria typhæ* il peut être considéré comme une forme de réserve (VIALA, 1972). Il nous paraît significatif de souligner qu'en présence de photopériodes, l'importance des acides aminés basiques demeure toujours plus grande qu'à l'obscurité, et celle de l'acide γ -amino-butyrique, au contraire, toujours plus faible. Ceci suggère une stimulation, par la lumière, de l'activité métabolique et probablement aussi une prolongation de cette activité.

Les acides organiques et le métabolisme oxydatif.

La stimulation de l'activité métabolique par la lumière se constate aussi pour les acides organiques. En effet, tout stimulus lumineux provoque une accumulation de ces corps. Une ou deux photopériodes suffisent pour provoquer une augmentation très nette; cependant, si elles ne sont pas suivies de nouveaux éclaircissements, la différence tend, par la suite, à s'atténuer. Cette abondance accrue d'acides organiques témoigne de synthèses plus actives, devenant largement excédentaires par rapport aux besoins. La synthèse de l'acide citrique est particulièrement stimulée; mais ce phénomène se retrouve également avec les acides malique, succinique et même avec l'acide lactique.

En ce qui concerne ce dernier acide, il convient de faire plusieurs observations. Dans le mycélium éclairé dès le premier jour, l'acide lactique est un peu plus abondant que dans les cultures réalisées à l'obscurité, mais la proportion de cet acide par rapport à l'ensemble y est toujours plus faible : par exemple, 36 % au lieu de 50 % au 7^e jour. Cette différence mérite d'être soulignée car elle signifie qu'en présence de lumière, la formation d'acide lactique devient physiologiquement moins importante qu'à l'obscurité. Pour les cultures ne recevant de l'éclairement qu'après le 7^e jour, et

quel que soit le nombre de photopériodes, les teneurs en acide lactique sont, au 13^e jour, bien supérieures à celles des cultures éclairées dès le premier jour. Par rapport à celles-ci, le champignon qui reçoit un éclairage tardif doit, pour assurer son développement, former davantage d'acide lactique. Il est probable que de cette façon il compense une insuffisance de régénération du NADH_2 au niveau de la chaîne respiratoire.

Ceci nous amène à considérer l'aspect oxydatif du métabolisme à partir des résultats des dosages enzymatiques. L'activité de l'isocitrate-déshydrogénase est, nous l'avons vu, d'autant plus stimulée que les photopériodes sont précoces et abondantes; par contre, on n'observe aucune influence de la lumière sur l'activité isocitratase. Etant donné que l'isocitrate-déshydrogénase est l'enzyme clé de la voie citrique, et l'isocitratase celle de la voie glyoxylique, il résulte de ces observations un net déplacement de l'équilibre fonctionnel du métabolisme en faveur de la voie oxydative qu'est le cycle citrique. Plaide également dans le même sens le fait que plus les photopériodes sont nombreuses, plus grandes sont les activités de la fumarate-hydratase et surtout celles de la succino-déshydrogénase.

Donc l'accumulation des acides organiques et les résultats des dosages enzymatiques s'accordent pour témoigner d'une stimulation de l'activité métabolique par la lumière. Simultanément, les photopériodes déclenchent la reproduction sexuée et la rendent d'autant plus abondante qu'elles sont plus nombreuses. Aussi il est particulièrement significatif de pouvoir établir une corrélation entre la multiplication du nombre de périthèces et la stimulation de l'activité métabolique, notamment celle de type oxydatif.

Importance de la date de l'éclairage.

Deux conditions d'éclairage nous semblent présenter un intérêt particulier; il s'agit, d'une part, des cultures soumises à un rythme nyctéméral à partir du 7^e jour (7) et, d'autre part, des cultures éclairées uniquement en fin de croissance, c'est-à-dire au 11^e jour (5).

Il paraît très important de constater que le fait que le rythme nyctéméral intervienne dès le premier jour, ou seulement à partir du 7^e, ne modifie pas l'abondance des périthèces au 13^e jour (tableau I). Dans le cas d'éclairage au 7^e jour, la formation des périthèces déclenchée plus tardivement demeure très intense, jusqu'au 13^e jour; par contre, dans les cultures témoins la fructification, commencée plus tôt, se stabilise et l'activité métabolique se ralentit comme semble l'indiquer la baisse de l'ensemble des acides organiques et des acides aminés libres.

Un éclairage tardif : 11^e jour, provoque une forte accumulation de tous les acides organiques et une légère stimulation de l'activité enzymatique : en particulier de la succino-déshydrogénase et de la fumarate-hydratase. Malgré cela, le champignon n'a, au 13^e jour, différencié aucun périthèce.

Il nous apparaît donc qu'en fin de croissance la sensibilité du cham-

pignon à l'action spécifique de la lumière sur la reproduction sexuée soit affaiblie; le métabolisme est toujours stimulé, mais l'activité sexuelle qui en résulte est pratiquement nulle. De même, les éclaircissements subis en début de culture ne semblent pas très efficaces. Par contre, entre les 7^e et 11^e jours, les photopériodes ont un effet cumulatif : plus elles sont précoces et nombreuses, plus le métabolisme oxydatif et la reproduction sexuée sont stimulés, alors que ces effets s'atténuent si, après une ou deux phases lumineuses, le champignon est replacé à l'obscurité.

Comme pour le *Nectria galligena* (DEHORTER, 1972), il existe chez le *Leptosphaeria typhae* un stade de développement où le champignon est particulièrement sensible à l'action de la lumière. A la suite de ces premiers résultats, que nous nous proposons de préciser ultérieurement, il est possible de situer aux environs du 7^e jour la période de sensibilité maximale.

CONCLUSION

Nos travaux antérieurs ont montré l'existence de corrélations étroites liant la reproduction sexuée à l'action de la lumière et au métabolisme intermédiaire de type oxydatif. Cette nouvelle expérimentation confirme et complète les observations précédentes. En effet, par un apport contrôlé de lumière tout au long de la croissance, nous parvenons à modifier le rapport isocitrate-déshydrogénase/isocitratase et, par là même, à modifier l'intensité de la fructification.

Le fait essentiel que nous avons pu constater est une variation de la sensibilité du champignon à l'énergie lumineuse au cours de sa croissance. L'action de la lumière est maximale aux environs du 7^e jour; un seul stimulus lumineux suffit alors à induire la reproduction sexuée. Cependant, si l'on veut maintenir l'intense activité métabolique et la production de périthèces, il est nécessaire d'éclairer à nouveau le champignon. En effet, du 7^e au 11^e jour, la réponse du champignon est d'autant plus importante que le nombre de photopériodes est plus élevé. Il semble que la reproduction sexuée dépende étroitement d'un facteur spécifique synthétisé sous l'action de la lumière et indépendant de l'excitation métabolique qu'induit le flash lumineux, facteur que le champignon ne serait plus capable de synthétiser au 11^e jour et plus tard.

BIBLIOGRAPHIE

1. CARLES (J.), 1968. — Le dosage automatique des acides organiques. *J. Chromatogr.*, 35, 158-167.
2. CARLES (J.), VIAU (M.), VIALA (G.) et CALMES (J.), 1967. — Dosage automatique des acides organiques par chromatographie. Symposium Technicon, Brighton, England, 255-277.
3. CARLES (J.) et ABRAVANEL (G.), 1970. — Dosage automatique et simultané des acides aminés et des guanidines. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 52, 453-454.

FRUCTIFICATION ET MÉTABOLISME DU « LEPTOSPHERIA TYPHLE » 69

4. CARLES (J.) et ABRAVANEL (G.), 1971. — Etude théorique et expérimentale d'un gradient d'éluion pour la chromatographie de partage des acides organiques. *J. Chromatogr.*, 56, 231-240.
5. DEHORTER (B.), 1972. — Biologie et physiologie de la reproduction sexuée du *Nectria galligena* Bres. *Thèse Doct. Sc. nat.*, 3^e cycle, Lille.
6. DIXON (G. H.) et KOHNBERG (H. L.), 1959. — Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem. J.*, 72.
7. ELLS (H. A.), 1959. — A colorimetric method for the assay of soluble succinic-deshydrogenase and pyridine-nucleotide linked deshydrogenases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 85, 561-562.
8. LACOSTE (L.), 1965. — Biologie naturelle et culturale du genre *Leptosphaeria Cesati* et de *Notaris*. Déterminisme de la reproduction sexuelle. *Thèse Doct. d'Etat Sc. nat.*, Toulouse.
9. LOWRY (O. H.), ROSEBROUGH (N. J.), FARR (A. L.) et RANDALL (R. J.), 1951. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
10. TOKUNAGA (J.), MALCA (I.), SIMS (J. J.), ERWIN (D. C.) et KEEN (N. T.), 1969. — Respiratory enzymes in the spores of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopath.*, 59, 1829-1832.
11. TURIAN (G.), 1969. — Différenciation fongique. *Masson et C^{ie}*, édit., Paris.
12. VIALA (G.), 1969. — La synthèse des acides aminés au cours du développement du *Leptosphaeria typhae* (Auersw.) Karsten. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 268, 298-301.
13. VIALA (G.), 1972. — Développement du *Leptosphaeria typhae*. Métabolisme intermédiaire et reproduction sexuée. *Thèse Doct. d'Etat, Sc. nat.*, Toulouse.
14. VIALA (G.), LACOSTE (L.) et CARLES (J.), 1968. — Evolution des acides organiques mycéliens chez le *Leptosphaeria typhae* (Auersw.) Karsten, cultivé à la lumière et à l'obscurité. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 267, 1230-1233.
15. VIALA (G.) et CARLES (J.), 1969. — Influence de la lumière sur les variations de l'acide glutamique libre durant la croissance du *Leptosphaeria typhae* (Auersw.) Karsten. *C. R. Soc. Biol.*, 163, 2750-2754.
16. VIALA (G.) et LACOSTE (L.), 1971. — Action de la lumière sur le métabolisme des acides organiques du *Leptosphaeria typhae* (Auersw.) Karsten. *Bull. Soc. Mycol, Fr.*, 87, 629-645.
17. VIALA (G.) et VIDAL (G.), 1972. — Reproduction sexuée, croissance et métabolisme intermédiaire chez le *Leptosphaeria typhae*. *Physiol. Vég.*, 10, 481-494.

En 1980, DEHORTER et LACOSTE ont étudié, d'une manière approfondie, l'effet de la lumière sur la différenciation des périthèces du *Nectria galligena*. En particulier, ils ont pu constater que l'éclairement en début de culture (de 0 à 6 jours) était inutile pour l'obtention des périthèces. Une seule période de lumière, appliquée au moment favorable (7^{ème} ou 8^{ème} jour) suffit pour induire une importante fructification, mais on n'atteint un maximum d'efficacité qu'en multipliant le nombre des photopériodes. Le *Nectria galligena* réagit donc de manière très voisine du *Leptosphaeria typhae*.

CONCLUSION A LA PREMIERE PARTIE

L'ensemble des résultats des trois chapitres de la première partie de notre Thèse nous permet d'aboutir à un certain nombre de conclusions :

- 1) on constate une corrélation constante entre la fructification sexuée et une stimulation des activités oxydatives du cycle citrique ;
- 2) l'éclairement est indispensable à la reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae* dans nos conditions de culture : les cultures maintenues à l'obscurité demeurent stériles même si on favorise l'activité du métabolisme oxydatif ;
- 3) l'éclairement ne suffit pas à lui seul à assurer l'induction de la fructification : le Champignon doit se trouver dans des conditions de milieu équilibré pour avoir un bon développement. L'acétate, en dérégulant le cycle glyoxylique, bloque la différenciation ;
- 4) un éclairement rythmé tout au long de la culture est inutile. On peut maintenir le Champignon à l'obscurité durant les 6 premiers jours de croissance ; si, à partir du 7ème jour, il reçoit une dose de lumière suffisante, sa reproduction sexuée sera aussi active et son métabolisme intermédiaire aussi nettement orienté dans le sens oxydatif.

De même, dans les cultures âgées maintenues à l'obscurité, la lumière appliquée le 11ème jour stimule encore le cycle citrique mais les périthèces ne se forment plus.

L'éclairement continu dans le nycthémère est nuisible à la fructification et inhibe l'activité du cycle citrique, le cycle glyoxylique compensant ce ralentissement. Peut être le Champignon a-t-il besoin d'une "phase obscure" pour différencier ses ascocarpes, dont l'initiation serait sous la dépendance exclusive de la lumière, comme chez le *Nectria galligena* (DEHORTER, 1980).

5) le *Leptosphaeria typhae* passe par une période de sensibilité maximale à la lumière ; cette phase se situe aux alentours du 7ème jour de culture c'est-à-dire au moment où justement apparaissent les premiers périthèces dans nos conditions expérimentales. Il ne nous est pas possible d'expliquer ce phénomène ; il ne peut en particulier être relié à une phase quelconque du processus de différenciation des ascocarpes, qui est extrêmement rapide chez notre Champignon (moins de 48 heures), contrairement à ce qui se passe chez le *Nectria galligena* (DEHORTER, 1972). Nous pouvons supposer que cette sensibilité est plutôt en rapport avec le stade de développement végétatif du mycélium, qui se trouve alors dans sa phase de croissance la plus rapide, la proportion d'hyphes jeunes en pleine activité physiologique atteignant son maximum. Une partie de notre travail actuel et futur sera orientée vers la précision de cette période de grande sensibilité à la lumière et la recherche du ou des photorécepteurs et des métabolites intervenant dans le transfert de l'énergie (mycosporine ?), responsables de la modification du comportement cellulaire aboutissant à la reproduction sexuée ;

6) nous avons remarqué qu'une forte teneur mycélienne en acide citrique était concomitante à la formation des périthèces. Cette observation confirme les constatations faites sur certains Champignons (LE ROUX, 1962) et sur des plantes supérieures. D'après FRANKE-RINKER et BEHRENS (1979) cet acide provient de l'activité du cycle citrique.

D E U X I E M E P A R T I E

RELATION ENTRE LA FRUCTIFICATION SEXUEE ET
LE METABOLISME LIPIDIQUE

INTRODUCTION

Au cours des recherches précédentes, nous avons pu constater quelques faits qui nous ont incité à entreprendre une étude du métabolisme lipidique au cours de la différenciation de notre Champignon :

- les ascospores sont très riches en globules de lipides (Planche II) ;
- au début de la croissance, les articles du mycélium des cultures fertiles contiennent un grand nombre de globules lipidiques. Mais lorsqu'apparaissent les ascocarpes, ces cellules semblent se vider de leurs réserves de lipides alors que les hyphes développées à l'obscurité conservent les leurs ;
- le cycle glyoxylique, voie du catabolisme des acides gras et de leur transformation en glucides, subit d'importantes variations suivant que le Champignon est fertile ou végétatif ;
- l'évolution des teneurs mycéliennes en acide malonique, précurseur des acides gras, semble indiquer des différences assez nettes dans le métabolisme lipidique du *Leptosphaeria typhae* selon qu'il produit des périthèces ou qu'il demeure stérile ;
- enfin, nous avons pu observer l'action de l'acétate sur la fructification sexuée. Or, ce corps est lui aussi un précurseur des acides gras.

Malgré une importante floraison de publications durant les années 1960/1980, résumées en particulier par WEETE (1974) et BRENNAN et LÖSL (1978), on ne sait encore que peu de choses sur les relations entre le métabolisme lipidique et la morphogenèse sexuée des Champignons. Les travaux les plus approfondis ont porté sur le *Saccharomyces cerevisiae* (TINGLE et al., 1973 ; ILLINGWORTH et al., 1973). DARNAUD (1971) a comparé les lipides de souches mâles et femelles d'*Achlya bisexualis*, FAYRET (1975) a étudié les relations entre la composition lipidique du mycélium et les diverses morphogenèses du *Gnomonia leptostyla*. Les résultats obtenus par ailleurs, en particulier par MILLS et al. (1974-1978) sur le *Blastocladiella emersonii* demeurent très fragmentaires.

Au cours des chapitres qui vont suivre, nous allons essayer de "débroussailler" ce problème dans le cas du *Leptosphaeria typhae* :

- en étudiant l'évolution des lipides totaux au cours de son développement ;
- en examinant ensuite le devenir de chacune des grandes familles lipidiques ;
- en observant, enfin, l'influence sur le métabolisme lipidique du Champignon de certains facteurs inhibant ou stimulant la différenciation sexuée : aération, lumière, acétate...

MATERIEL ET METHODES

Les méthodes utilisées pour ce travail sont très diverses. Aussi décrirons-nous au cours de chaque chapitre celles qui ont été plus particulièrement utilisées pour le réaliser. Nous résumons ci-dessous les techniques générales que nous avons employées le plus fréquemment.

CULTURES ET OBTENTION DU MYCELIUM

Le Champignon est cultivé sur la décoction liquide de farine d'avoine à 20 g/l à 18°C en boîtes de Roux. Quotidiennement 20 à 30 fioles sont prélevées. Le mycélium est recueilli par centrifugation à 0°C, remis deux fois en suspension dans l'eau distillée à +4°C, centrifugé à nouveau puis fixé par l'azote liquide. Il est ensuite lyophilisé et le lyophilisat est conservé à -24°C sous atmosphère d'azote dans des flacons hermétiquement clos.

EXTRACTION DES LIPIDES

Un gramme de mycélium lyophilisé est traité par l'eau bouillante durant quelques secondes afin de détruire ses enzymes puis mis en suspension dans 300 ml du mélange chloroforme-méthanol (2-1 volume à volume) selon la méthode de FOLCH et al. (1957). Après broyage à l'ultra-turrax pendant 30 secondes, on laisse l'extraction s'effectuer sous atmosphère d'azote pendant

15 heures à la température du laboratoire (+18°C environ). On filtre l'extrait sur filtre délipidé (filtre Durieux n° 111, ruban vert) puis on le lave par 1/5 de son volume d'une solution de NaCl à 9 g/l ; on laisse décanter le mélange eau + méthanol. On recueille l'extrait chloroformique qu'on sèche sur Na_2SO_4 anhydre, puis on l'évapore sous courant d'azote au bain-marie à 50°C. Le résidu lipidique est pesé ; on le conserve pour des analyses ultérieures dans un volume minimum de benzène, sous atmosphère d'azote, dans des flacons hermétiquement fermés par un bouchon de Téflon (Système Sovirel S.V.L.) à -24°C.

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ACIDES GRAS

Les lipides sont saponifiés par ébullition sous reflux pendant 3 heures dans une solution de KOH à 5 % dans le mélange benzène/méthanol (1/5 volume à volume). Les acides gras obtenus sont méthylés par le sulfate diméthylé en présence de méthanol saturé de K_2CO_3 (MARTIN et DRISCOLL, 1966). Les esters, dissous dans le sulfure de carbone, sont chromatographiés à travers une colonne en acier inoxydable de 1/8", longue de 2 m, contenant 10 % de D.E.G.S. sur Chromosorb WAW, dans un chromatographe Intersmat 12 DFL relié à un intégrateur L.T.T. ICAP 5. L'azote sert de gaz vecteur. Le four est programmé de 130°C à 180°C, 8°C/minute.

CHAPITRE I : EVOLUTION DE LA TENEUR LIPIDIQUE DU MYCELIUM AU COURS DU DEVELOPPEMENT.

I.1 LES LIPIDES TOTAUX

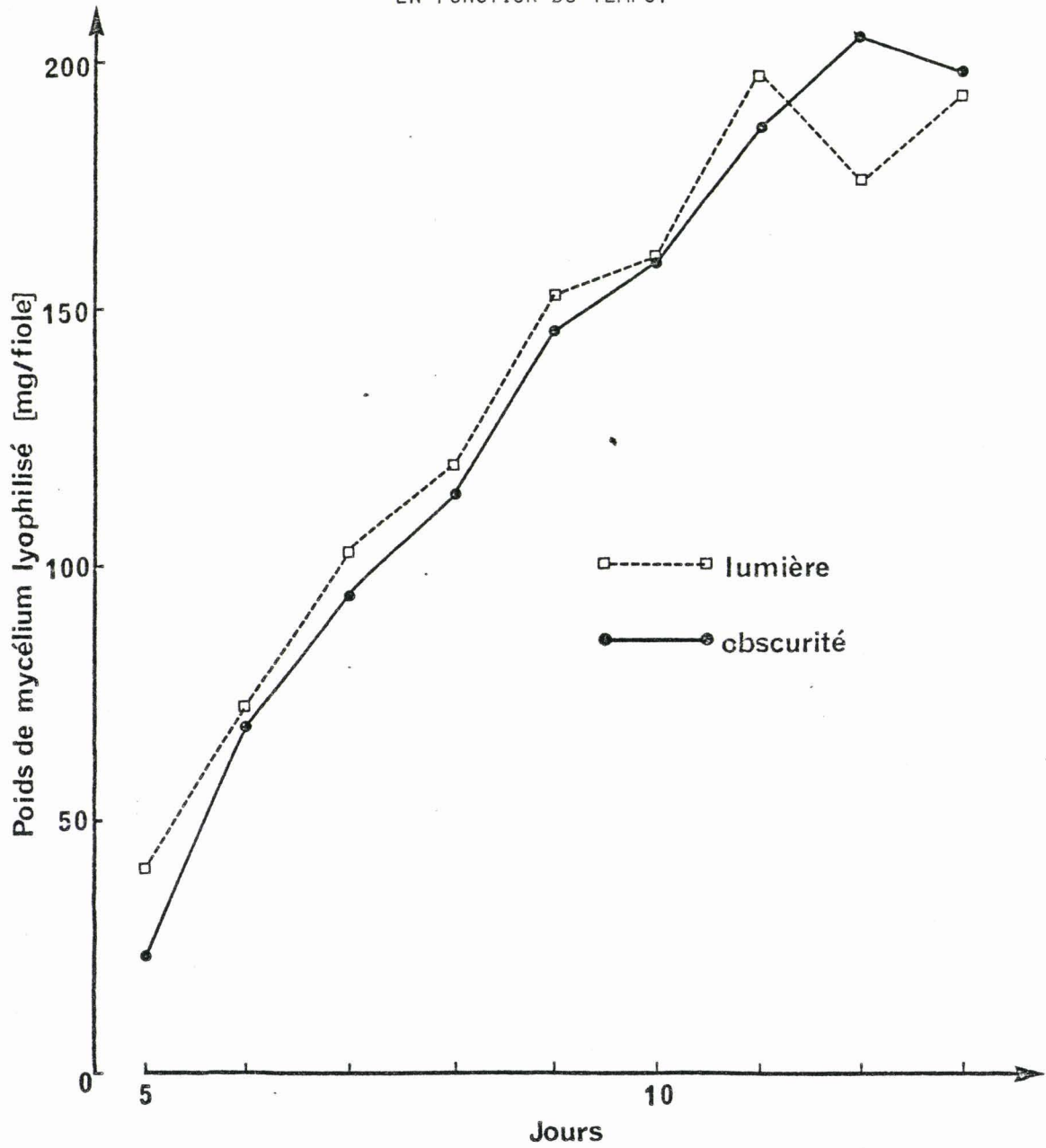
Nous avons tout d'abord cherché à vérifier les observations microscopiques (accumulation dans les filaments fertiles au début de leur croissance, puis disparition au moment de la formation des organes sexués) et les dosages d'acide malonique. Pour cela, nous avons procédé à des extractions et dosages de lipides totaux au cours de la croissance de cultures fertiles (éclairées) et stériles (maintenues à l'obscurité). Ces travaux ont été publiés dans le "Canadian Journal of Botany" (vol. 57, n° 16, p. 1701-1705, 1979).

RÉSULTATS

Dès le 7ème jour de culture, des périthèces apparaissent sur les cultures éclairées, alors que les mycéliums témoins demeurent stériles et strictement végétatifs.

La figure 16 montre que les différences de croissance entre les deux types de cultures sont assez faibles. Dans les deux cas, on observe un point d'inflexion sur la courbe entre les 9ème et 10ème jours, traduisant un

FIGURE 16 : EVOLUTION DU POIDS DE MATIÈRE SÈCHE
EN FONCTION DU TEMPS.



ralentissement de la croissance. Le poids du mycélium lyophilisé par fiole de Roux est légèrement supérieur dans les cultures éclairées, surtout au début du développement ; les cultures maintenues à l'obscurité croissent un peu plus longuement.

L'observation de la figure 17 permet de constater que dans les deux types de cultures les teneurs en lipides s'abaissent légèrement en tout début de développement. Elles s'élèvent ensuite jusqu'au 8ème jour, puis s'abaissent à nouveau. Après le 9ème jour, l'évolution est différente : dans les mycéliums éclairés le pourcentage de lipides diminue, alors qu'il augmente dans les colonies végétant à l'obscurité.

La figure 18 montre l'évolution des quantités de lipides contenues dans chaque unité culturale ; on constate que les colonies fertiles (éclairées) accumulent plus de ces substances que les mycéliums témoins jusqu'au 9ème jour. Après cette date, alors que les cultures maintenues à l'obscurité continuent jusqu'au 12ème jour à accumuler des lipides, ceux-ci ont tendance à disparaître des mycéliums éclairés puis ne sont reconstitués que lentement.

Le tableau 16 indique la composition en acides gras des lipides du Champignon. On n'observe aucune différence qualitative entre les deux types de cultures. La longueur de chaîne la plus représentée compte 18 atomes de carbone, les acides les plus abondants étant en général l'oléique ($C_{18} : 1$) et l' α -linoléique ($C_{18} : 2$) (déterminé par son temps de rétention en C.P.G.). Les acides palmitique (C_{16}), palmitoléique ($C_{16} : 1$), stéarique (C_{18}) et linoléique ($C_{18} : 3$), sont aussi toujours présents en quantités importantes. Nous avons aussi mis en évidence de faibles teneurs en acides en C_{12} et C_{14} et des traces d'acides à plus longue chaîne, C_{20} et C_{22} ainsi que de chaînes à nombre d'atomes de carbone impair : C_{15} et C_{17} . Jusqu'au 7ème jour, les mycéliums éclairés sont plus riches que les témoins en acides à 16 atomes de carbone et plus pauvres en acides en C_{18} . Ensuite, on note une tendance inverse. Les teneurs en acides polyinsaturés ($C_{18} : 2$ et $C_{18} : 3$) varient de manière différente selon que le Champignon se développe à l'obscurité : au début de la croissance, les témoins en contiennent la plus forte proportion ; après le 8ème jour, c'est sous photopériode qu'on en trouve la plus grande quantité. Le degré d'insaturation subit une évolution parallèle à celle de ces acides ⁽¹⁾.

(1) Degré d'insaturation = pourcentage d'acides à 1 double liaison + pourcentage d'acides à 2 doubles liaisons x 2 + pourcentage d'acides à 3 doubles liaisons x 3/100.

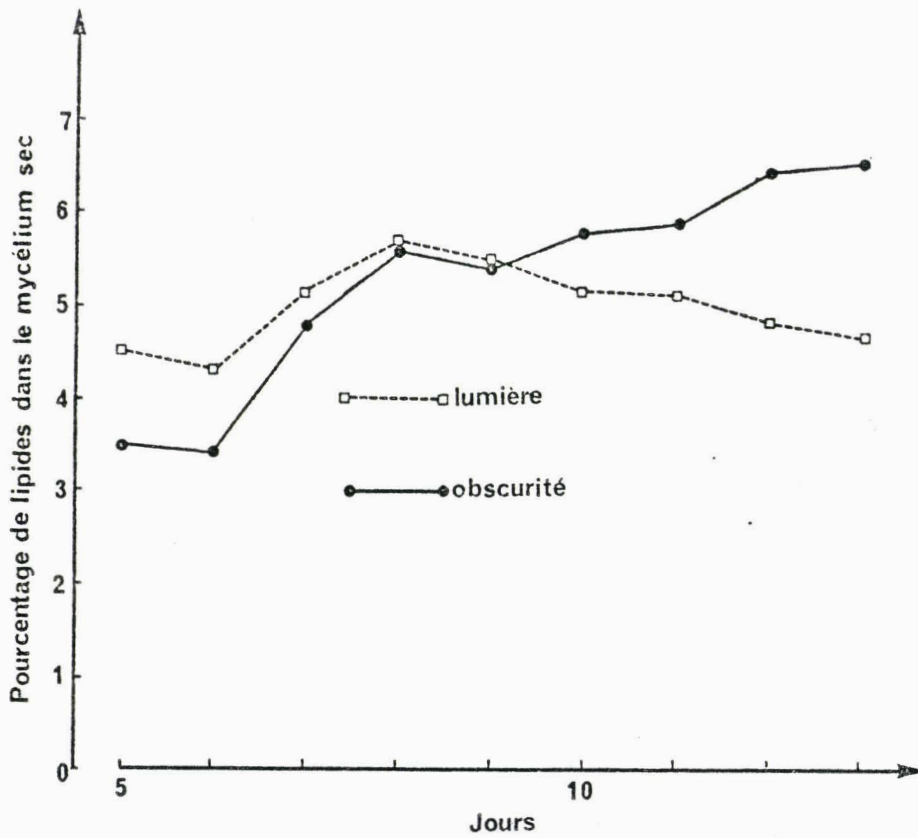


FIGURE 17 : EVOLUTION DE LA TENEUR MYCÉLIENNE EN LIPIDES.

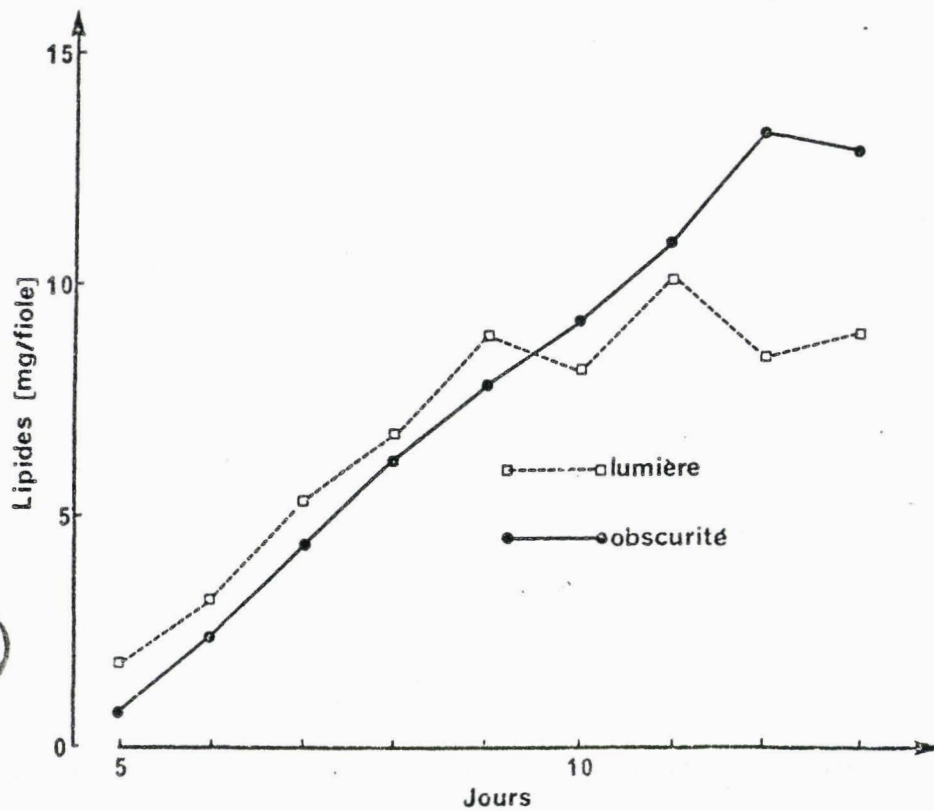


FIGURE 18 : EVOLUTION DE LA QUANTITÉ DE LIPIDES PAR UNITÉ CULTURALE.

BUS
LILLE

Tableau 16 : Composition en acides gras (%) des lipides des deux types de cultures, moyenne de quatre mesures.

Acide	Jour de culture																	
	5		6		7		8		9		10		11		12		13	
	lumière	obscurité	lumière	obscurité	lumière	obscurité	lumière	obscurité	lumière	obscurité	lumière	obscurité	lumière	obscurité	lumière	obscurité	lumière	obscurité
C ₁₂	3.63	2.02	1.01	t	3.77	2.08	0.40	1.91	1.49	1.23	2.82	1.43	2.46	2.76	0.50	0.80	1.06	1.11
C _{12:1}	t†	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₄	1.74	1.89	1.18	0.87	2.78	1.37	0.40	1.85	1.44	0.63	1.07	1.32	1.14	2.19	0.65	0.83	1.60	1.51
C _{14:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₆	18.64	22.32	17.16	15.44	15.83	13.12	12.45	14.84	12.26	15.12	10.88	13.40	10.52	12.86	8.37	11.91	10.28	12.54
C _{16:1}	1.82	3.77	3.89	2.90	2.48	2.47	2.03	5.76	2.42	4.95	2.42	3.60	1.97	3.60	2.15	3.65	3.05	4.21
C ₁₈	5.17	5.77	5.60	5.84	5.77	4.37	4.67	5.96	6.09	7.16	5.00	5.81	5.15	6.60	3.73	4.95	5.36	6.42
C _{18:1}	30.66	34.97	32.18	31.67	28.01	28.07	25.50	29.97	28.43	31.68	24.47	28.83	24.66	29.28	29.87	30.38	31.64	33.29
C _{18:2}	26.62	17.97	26.26	28.90	26.58	31.70	35.70	27.48	33.50	25.21	34.68	32.34	36.61	29.40	40.09	33.55	34.69	28.92
C _{18:3}	11.76	11.28	12.06	14.38	14.77	16.55	18.35	12.22 ¹	14.18	9.29	17.88	12.50	17.47	12.33	15.03	13.40	12.32	12.00
Degré d'insaturation	1.21	1.09	1.25	1.36	1.28	1.42	1.54	1.27	1.40	1.15	1.50	1.35	1.52	1.29	1.57	1.41	1.41	1.31

DISCUSSION

Le *Leptosphaeria typhae* se montre relativement peu riche en lipides par rapport aux autres Champignons étudiés jusqu'ici. Chez lui, ces corps ne représentent en effet que 7 % du poids de mycélium sec au maximum (figure 2) alors que, par exemple, le *Dictyostelium discoideum* (LONG et COE, 1974) en fournit 10 à 12,5 %, le *Blastocladiella emersonii* 11 % (MILLS et CANTINO, 1974), le *Mucor mucedo* 13,5 %, l'*Aspergillus ochraceus* 14,8 % (SANCHOLLE et CHAVANT 1976), le *Gnomonia leptostyla* plus de 18 % (FAYRET, 1975), l'*Oudemansiella mucida* 29,1 % (NERUD et MUSILEK, 1974). Ceci est certainement dû en grande partie aux conditions de culture où notre Champignon se trouvait placé ; en particulier, le milieu que nous lui fournissons est relativement pauvre en carbone et en azote si on le compare aux solutions plus classiquement utilisées. Mais c'est sur ces milieux peu concentrés mais mieux équilibrés que nous obtenons sa différenciation sexuée (VIDAL et al., 1974), phénomène courant chez les Ascomycètes (DEHORTER, 1972 ; FAYRET, 1975).

Les teneurs mycéliennes en lipides évoluent différemment selon que les cultures se sont développées sous photopériode ou à l'obscurité. Le léger ralentissement de croissance constaté entre les 9ème et 10ème jours (figure 16) est précédé d'un abaissement général de la richesse en lipides (figure 17). Mais,

lorsque le Champignon végète à l'obscurité, et demeure donc stérile, l'accumulation de lipides reprend dès le 9ème jour et se poursuit jusqu'à la fin de la croissance (12ème jour). Jusqu'au 8ème jour les cultures éclairées contiennent une plus grande proportion de lipides que les témoins ; à ce moment-là, les périthèces commencent à se former en nombre élevé et ces substances sont vraisemblablement utilisées pour les multiples synthèses que l'organisation des organes sexuels nécessite. Cette mobilisation des réserves lipidiques est telle que même leur quantité absolue par unité culturale (figure 18) s'abaisse lors du ralentissement de croissance entre les 9ème et 10ème jours. Cette évolution de la richesse en lipides, accumulation avant la phase de sexualisation puis utilisation au cours de celle-ci, recoupe nos observations sur les variations des teneurs mycéliennes en acide malonique (VIDAL et VIALA, 1973). D'autres Champignons présentent des réactions analogues. Les cellules amiboïdes du *Dictyostelium discoideum* (LONG et COE, 1974) synthétisent de fortes quantités de lipides avant de s'agrèger pour constituer le sporocarpie puis ces substances sont utilisées. Chez le *Saccharomyces cerevisiae*, le taux de lipides augmente avant l'ascosporulation (CHASSANG et al., 1972 ; ILLINGWORTH et al., 1973). La lipogenèse est active chez le *Gnomonia leptostyla* lors de la formation des ascocarpes, qui est suivie d'une lipolyse (FAYRET, 1975). Il semble donc qu'il s'agisse là d'un mécanisme très général accompagnant la différenciation sexuée des Champignons ; WERKMAN et al. (1977) l'interprètent chez le *Zygorhynchus moelleri* comme une accumulation de lipides dans le mycélium suivie d'une migration de ceux-ci dans les gamétocystes puis dans les zygotes permettant à ces derniers d'assurer leur rôle de réserve bien que leur activité synthétique soit faible. De même, chez le *Leptosphaeria typhae* on peut observer que les ascospores sont très riches en globules lipidiques alors que les filaments mycéliens se vident des leurs lors de la formation des périthèces (VIALA, 1972). L'explication de WERKMAN et al. paraît donc être valable aussi pour notre Champignon. Il se pourrait aussi que les oscillations constatées après le 9ème jour dans les cultures fertiles (figure 18) soient en rapport avec des "vagues" d'ascocarpes mais nous n'avons pas pu constater de relation entre les deux phénomènes.

La composition en acides gras des deux types de cultures présente des variations concomitantes à celles de la teneur en lipides. Lors de la phase initiale d'intense accumulation lipidique, les mycéliums éclairés sont plus riches en acides palmitique et oléique et leur degré d'insaturation est

plus faible que celui des cultures stériles. Ceci pourrait indiquer une plus forte activité de synthèse car les acides à chaîne plus longue (C_{18}) proviennent de l'allongement des plus courts (C_{16}) et les polyinsaturés sont les produits de la désaturation de l'acide oléique (MAZLIAK, 1968 ; WEETE, 1974). Au contraire, après l'apparition des premiers périthèces, l'acide palmitique est moins abondant dans les cultures fertiles et le degré d'insaturation y devient plus élevé que dans les mycéliums témoins, les teneurs en acides linoélique et linoléique s'élevant nettement. Ceci est peut-être dû à un certain ralentissement de la synthèse lipidique. Mais la différenciation sexuelle des Champignons s'accompagne fréquemment d'accumulation d'acides gras insaturés, et tout particulièrement d'acides linoléique et linoléique : c'est le cas du *Saccharomyces cerevisiae* (ILLINGWORTH et al., 1973) ; le carpophore de l'*Agaricus bisporus* contient plus d'acides linoléique et linoléique que son mycélium (HOLTZ et SCHISLER, 1971) ; de même les basidiospores du *Cronartium fusiforme* sont plus riches en acides insaturés que les écidiospores (CARMACK et al., 1976 ; WEETE et al., 1977). Il est d'ailleurs intéressant de noter que DALPE et NEUMANN (1976) induisent la différenciation sexuée de divers *Ceratocystis* par apport aux cultures d'acide linoléique. ILLINGWORTH et al. (1973) pensent que la plus grande teneur en acides insaturés donne aux membranes des vésicules utilisées pour les translocations une mobilité plus élevée.

Des variations analogues de la composition en acides gras des cellules mycéliennes peuvent être induites par des modifications des conditions de culture : en particulier, l'oxygène est indispensable aux désaturations (MAZLIAK, 1968 ; WEETE, 1974). Une augmentation de l'aération active les désaturases ; ainsi, les cultures aérobies du *Mucor rouxii* (SAFE et DUNCAN, 1974) et du *Mucor genevensis* (GORDON et al., 1971) sont plus riches en acides insaturés à 18C et plus pauvres en acide palmitique que les cellules développées en anaérobiose ; il en est de même chez divers *Alternaria* (GERASIMOVA et al., 1974). Lorsque NISHIKAWA et al. (1974) inhibent l'activité respiratoire du *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 par un apport de thiamine, le degré d'insaturation des lipides de cette levure s'abaisse, alors qu'il s'élève si on stimule sa respiration par la pyridoxine. Il y a donc une relation très étroite entre l'activité générale des oxydations cellulaires des Champignons et leur teneur en acides gras insaturés, tout particulièrement linoléique et linoléique. Or, nous avons prouvé que la reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae* s'accompagne d'une forte stimulation des oxydations cellulaires. Nous retrouvons

donc ce phénomène au niveau du métabolisme lipidique. Les lipides de réserve pourraient non seulement être utilisés comme matière première pour l'élaboration des périthèces et des ascospores, mais aussi leur oxydation fournirait une partie de l'énergie nécessaire aux multiples synthèses que la différenciation de ces organes rend indispensable.

I.2 EVOLUTION DE L'ACTIVITE DE SYNTHÈSE LIPIDIQUE AU COURS DU DEVELOPPEMENT.

Les résultats que nous venons de résumer montrent que les mécanismes anaboliques et cataboliques du métabolisme lipidique sont profondément bouleversés par la sexualisation du Champignon. D'après les analyses que nous avons faites, il semblerait que l'activité de synthèse de lipides se ralentisse au moment de l'apparition des ascocarpes : réduction de la teneur mycélienne, abaissement du pourcentage en acide palmitique, élévation du degré d'insaturation. Cela peut paraître surprenant au moment où se forment ces organes de conservation riches en réserves que sont les périthèces et les ascospores. Il importe donc de vérifier cette hypothèse et la meilleure façon de le faire consiste à suivre au cours du développement l'évolution de l'activité "acides-gras synthétase". Cet homodimère, formé de deux polypeptides identiques portant sept sites actifs différents ne peut fonctionner totalement que lorsque les deux monomères sont juxtaposés (LYNEN, 1980, STOOPS et WAKYL, 1981) et catalyse la réaction globale :

$$\text{CH}_3(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{COOH} + 2n \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{malonyl-CoA}} \text{CH}_3(\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{n+1}-\text{CoASH} + n \text{CO}_2 + n-1 \text{H}_2\text{O} + 2n \text{NADPH} + 2 \text{H}^+$$

Cette réaction est à la base de l'édification de tous les acides gras, et par conséquent de toute molécule lipidique (MAZLIAK, 1969 ; LEDERER, 1970 ; WEETE, 1974).

METHODE DE DOSAGE

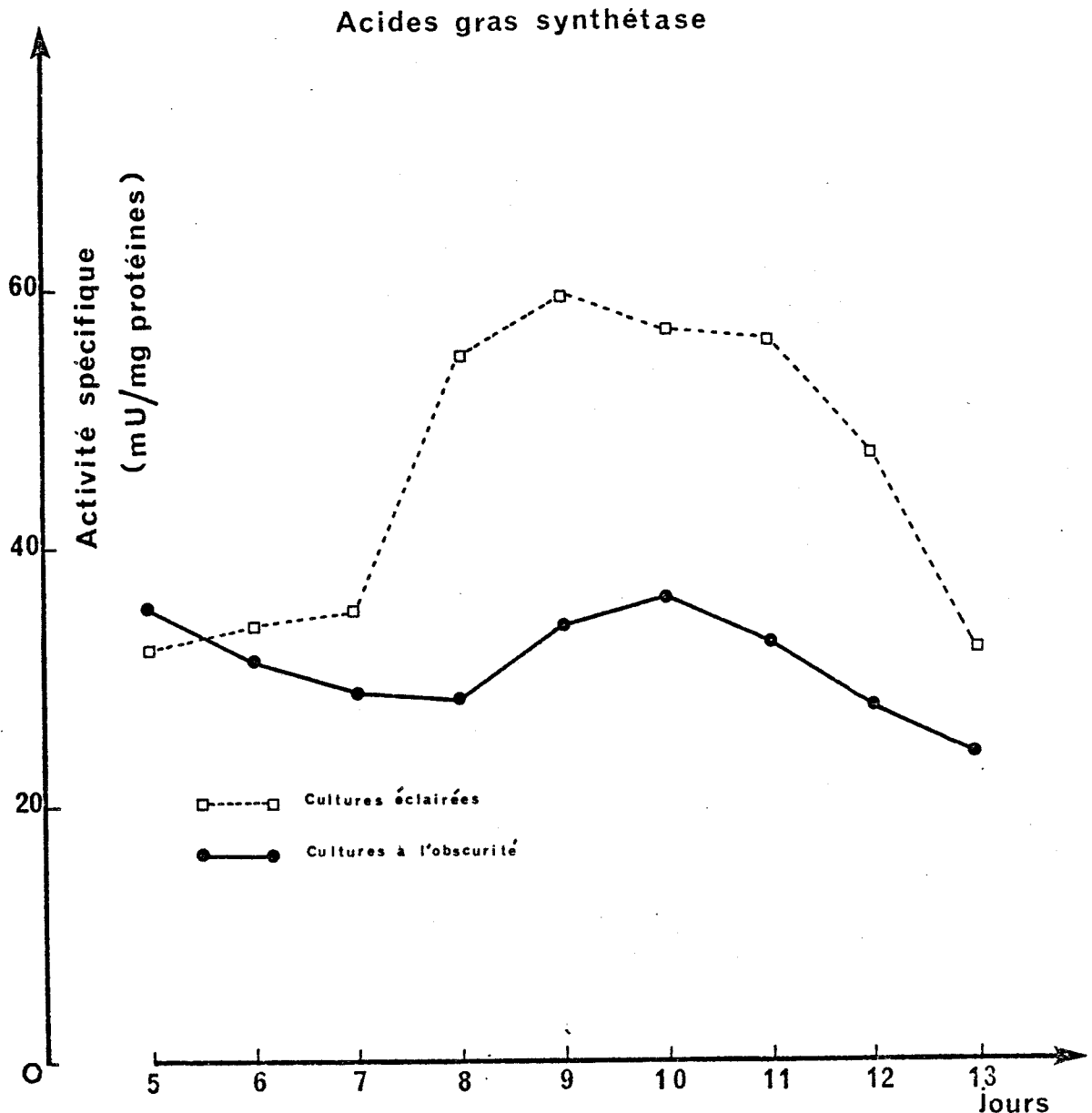
Nous avons utilisé la méthode spectrophotométrique de LYNEN et al. (1964). La technique consiste à suivre à 334 nm la disparition du NADPH_2 en présence d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA sous l'action de l'extrait enzymatique. Ce dernier est obtenu par broyage du Champignon à l'ultra-turrax à 0°C dans le tampon phosphate 0,2 M pH 6,5 contenant 2 mM/1 d'EDTA Na_2 et 1 mM/1 de dithiothreitol. Après centrifugation à 0°C à 10 000 g durant 10 minutes, le surnageant est immédiatement utilisé pour le dosage.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont résumés par la figure 19. Cette courbe exprime la moyenne de 5 séries culturales.

On peut constater que lorsque le mycélium végète à l'obscurité, son activité "acides-gras synthétase" diminue lentement jusqu'au 8ème jour de culture, alors que la croissance pondérale du Champignon commence à démarrer. Ensuite, on observe une légère reprise de la synthèse d'acides gras jusqu'à la fin de la phase de multiplication active.

FIGURE 19 : EVOLUTION DE L'ACTIVITÉ ACIDES-GRAS SYNTHÉTASIQUE EN FONCTION DU TEMPS (MOYENNE DE 5 MESURES)



Les cultures fertiles montrent un comportement très différent. Dès l'apparition des premiers périthèces, l'activité du complexe enzymatique augmente brutalement pour être, au 9ème jour, plus de 2 fois plus élevée que dans les mycéliums stériles : 60 milli-unités/mg de protéines au lieu de 26. Chez le zygomycète *Zygorhynchus moelleri* (Werkman et al. 1977) le même phénomène se produit au moment de la maturation des zygosporos, organes sexués. Le Phycomycète *Achlya* sp. (LAW et BURTON, 1976), lui aussi, présente un très fort pic d'activité "acides-gras synthétase" lors de la différenciation de ses spores asexuées. Le *Leptosphaeria typhae* permet d'étendre cette observation à la classe des Ascomycètes. Il s'agit vraisemblablement d'un fait général lors de la différenciation sexuée ou asexuée de tous les Champignons.

Ce résultat contredit apparemment les conclusions de nos dosages de lipides, puisque nous observons une diminution de la richesse mycélienne en ces composés au moment où l'activité de synthèse est la plus élevée. Nous devons donc conclure que l'apparition des périthèces s'accompagne aussi d'une forte stimulation du catabolisme lipidique, encore plus nette que celle de l'anabolisme. Ce phénomène paraît d'ailleurs lui aussi très général, puisque WERKMAN et al. l'observent chez le *Zygorhynchus moelleri* et LAW et BURTON chez l'*Achlya*. Le "turn-over" des lipides est donc, chez les Champignons, fortement accéléré sous tous ses aspects lors de la différenciation. Au cours d'études ultérieures, nous devons nous efforcer de localiser le siège de ces intenses activités enzymatiques : mycélium végétatif ? périthèces ? ascospores ? Il est possible que les deux actions : synthèse et dégradation, soient différemment situées. Malheureusement, nous n'avons jusqu'à présent pas réussi à séparer de manière satisfaisante les divers appareils produits par le thalle pour que nos dosages enzymatiques soient dignes de confiance. Mais, en analysant la vue globale que nous avons du métabolisme lipidique du Champignon, nous pensons qu'une première phase d'anabolisme se déroule dans le mycélium végétatif ; les lipides sont ensuite repris pour réaliser le sporophyte et le processus se termine par une phase de mise en réserve.

CHAPITRE II : ANALYSE DES LIPIDES AU COURS DU DEVELOPPEMENT.

Le chapitre précédent nous a permis de mettre en évidence les variations globales des lipides du Champignon au cours de son développement et de comprendre une partie du mécanisme de ces changements. Mais, pour mieux pénétrer la signification métabolique de l'évolution lipidique mycélienne, il importe de suivre les variations de chacun des composants de ce grand ensemble. En effet, les "lipides totaux" regroupent de nombreux corps dont le rôle dans la cellule peut être très différent : glycérides à rôle essentiel de réserve, lipides polaires (glycolipides, phospholipides) surtout présents dans les membranes, chacun de ces grands groupes étant lui-même subdivisé à son tour. Nous avons donc essayé de fractionner le plus possible les extraits lipidiques en suivant avec le maximum de précision le devenir de chacune des diverses classes de lipides.



II.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES.

II.1.1 - FRACTIONNEMENT DES LIPIDES TOTAUX - SEPARATION DES GRANDES CLASSES.

Nous avons utilisé la méthode de ROUSER et al. (1967) et DITTMER et WELLS (1969) rapportée par KATES (1972) : séparation en trois fractions de l'extrait lipidique brut sur colonne d'acide silicique :

- 20 g d'acide silicique (Mallinkrodt 80-100 Mesh) sont mis en suspension dans 50-80 ml de chloroforme après passage à 120°C pendant 3 à 4 heures. Le mélange est introduit dans une colonne de 2,5 cm de diamètre ; l'acide silicique constitue un cylindre de 10 cm de haut environ. La colonne est lavée par 300 ml de chloroforme, puis on dépose 150 à 200 mg de lipides en solution dans quelques millilitres de ce solvant. Les trois fractions sont obtenus en faisant passer sur la colonne (3 ml/min. environ) :

- . 500 ml de chloroforme (fraction I) ;
- . puis 2000 ml d'acétone (fraction II) ;
- . enfin, 500 ml de méthanol (fraction III).

Les éluats, évaporés au bain-marie à 50°C sous courant d'azote sont pesés puis conservés à -24°C sous atmosphère d'azote.

La fraction I contient les lipides neutres : glycérides, stérols, acides gras libres, hydrocarbures...

La fraction II regroupe les glycolipides, sulfolipides et cardiolipides...

La fraction III les autres phospholipides.

II.1.2 - ANALYSE ET DOSAGE DES LIPIDES NEUTRES

Nous avons séparé les diverses familles de lipides neutres par passage sur colonne de Florisil imprégné de 7 % d'eau (*in* KATES, 1972) : on réhydrate 12 g de Florisil (Merck) par agitation durant 12 à 15 heures avec 7 % d'eau distillée ; ensuite, l'adsorbant est mis en suspension dans l'hexane puis introduit dans une colonne de 1,2 cm de diamètre. On dépose les lipides neutres, en solution dans l'hexane, puis on fait circuler la séquence de solvants indiqués dans le tableau 17.

Tableau 17 : Analyse des lipides neutres sur colonne de Florisil. Séquence de solvants.

<u>Solvant</u>	<u>Volume</u>	<u>Eluat</u>
Hexane	50 ml	Hydrocarbures
Hexane-Ether (95:5)	100 ml	Stérols estérifiés
Hexane-Ether (85:15)	250 ml	Triglycérides
Hexane-Ether (75:25)	150 ml	Stérols libres
Hexane-Ether (50:50)	150 ml	Diglycérides
Ether-Méthanol (98:2)	135 ml	Monoglycérides
Ether-Acide acétique (96:4)	50 ml	Acides gras libres

Révélation, après évaporation des solvants :

- le plus souvent, par exposition de la chromatographie à la vapeur d'iode : les lipides apparaissent comme des tâches jaunes sur un fond blanc ;

- . 500 ml de chloroforme (fraction I) ;
- . puis 2000 ml d'acétone (fraction II) ;
- . enfin, 500 ml de méthanol (fraction III).

Les éluats, évaporés au bain-marie à 50°C sous courant d'azote sont pesés puis conservés à -24°C sous atmosphère d'azote.

La fraction I contient les lipides neutres : glycérides, stérols, acides gras libres, hydrocarbures... La fraction II regroupe les glycolipides, sulfolipides et cardiolipides... La fraction III les autres phospholipides.

II.1.2 - ANALYSE ET DOSAGE DES LIPIDES NEUTRES

Nous avons séparé les diverses familles de lipides neutres par passage sur colonne de Florisil imprégné de 7 % d'eau (in KATES, 1972) : on réhydrate 12 g de Florisil (Merck) par agitation durant 12 à 15 heures avec 7 % d'eau distillée ; ensuite, l'adsorbant est mis en suspension dans l'hexane puis introduit dans une colonne de 1,2 cm de diamètre. On dépose les lipides neutres, en solution dans l'hexane, puis on fait circuler la séquence de solvants indiqués dans le tableau 17.

Tableau 17 : Analyse des lipides neutres sur colonne de Florisil. Séquence de solvants.

<u>Solvant</u>	<u>Volume</u>	<u>Eluat</u>
Hexane	50 ml	Hydrocarbures
Hexane-Ether (95:5)	100 ml	Stérols estérifiés
Hexane-Ether (85:15)	250 ml	Triglycérides
Hexane-Ether (75:25)	150 ml	Stérols libres
Hexane-Ether (50:50)	150 ml	Diglycérides
Ether-Méthanol (98:2)	135 ml	Monoglycérides
Ether-Acide acétique (96:4)	50 ml	Acides gras libres

La pureté de chaque fraction est contrôlée par chromatographie sur couche mince de silicagel G selon la technique de FREEMAN et WEST (1966) : migration, dans la même direction, des deux solvants successifs :

- 1) éther-benzène-éthanol-acide acétique (40:50:2:0,2) sur les 2/3 de la plaque (10 cm) ;
- 2) éther-hexane (6:94) sur la totalité de la plaque (15 cm).

Révélation, après évaporation des solvants :

- le plus souvent, par exposition de la chromatographie à la vapeur d'iode : les lipides apparaissent comme des tâches jaunes sur un fond blanc ;

- pour une plus grande précision, traitement de la plaque par l'acide sulfurique concentré puis passage à 120°C jusqu'à carbonisation des lipides, qui ressortent sous forme de tâches noires sur un fond blanc.

On prélève ensuite un aliquote de chaque éluat : le solvant est évaporé au bain-marie à 50°C et le résidu lipidique dosé selon la méthode d'AMENTA (1964) : réduction d'une solution de K_2CrO_4 dans H_2SO_4 (2,5g/l) au bain-marie bouillant, puis lecture de la densité optique à 350 nm. Nous prenons pour témoins des produits du commerce dérivant de l'acide oléique (Sigma, Serva, Calbiochem).

II.1.3 - FRACTIONNEMENT, ANALYSE ET DOSAGE DE LA FRACTION II

La fraction II (acétonique) obtenue sur colonne d'acide silicique peut constituer un mélange assez complexe. Il importe donc de séparer le mieux possible ses constituants si on veut que les résultats des dosages aient une valeur suffisante.

Nous avons utilisé pour cela deux méthodes :

- chromatographie sur colonne d'acétate de DEAE cellulose (ROUSER et al., 1967 ; KATES, 1972) : 15 g de cellulose Whatman DE23 sont lavés par 300 ml de méthanol 0,5 N en HCl, rincés à l'eau distillée, lavés à nouveau par 300 ml de méthanol 0,5 N en OHNa, rincés à l'eau distillée, puis au méthanol. Après séchage sous courant d'azote, la cellulose est mise en suspension dans 100 ml d'acide acétique et versée dans une colonne de 2,5 cm de diamètre. On laisse sédimenter au moins 12 heures, puis on lave par 400 ml de méthanol, puis 500 ml du mélange méthanol-chloroforme (9:1), 500 ml de méthanol-chloroforme (1:1) et enfin 500 ml de chloroforme pur. Les lipides à déposer sont dissous dans ce dernier solvant. La séquence d'évolution est indiquée dans le tableau 18.

Le dosage des glycolipides est ensuite effectué sur une aliquote de l'éluat selon la méthode d'AMENTA (1964) et par la technique spécifique de GALANOS et KAPOULAS (1965) : réduction du mélange phénol-acide sulfurique.

- chromatographie sur couche mince de silicagel G dans le solvant : diisobutylcétone, acide acétique, eau (40-25-3,7) selon la méthode de MARINETTI et al. (1957) modifiée par NICHOLS (1963).

Tableau 18 : Analyse de la "Fraction 2" sur colonne.

<u>Solvant</u>	<u>Volume</u>	<u>Eluat</u>
1 : chloroforme-méthanol (98:2)	800 ml	monoglycosyl-diglycérides
2 : chloroforme-méthanol (9:1)	1000 ml	diglycosyl-diglycérides
3 : méthanol	1000 ml	sels
4 : chloroforme-méthanol (40:10) + 0,01 M acétate d'ammonium + 20 ml/l d'ammoniaque 28 %	1000 ml	sulfolipides + cardiolipides + sels
5 : méthanol	1000 ml	traces de sels et de lipides

II.1.4 - ANALYSE ET DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES

Les phospholipides sont analysés par chromatographie sur couche mince de Silicagel G dans le solvant : chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (SKIPSKI et al., 1964 ; RENKONEN et VARO, 1967).

On procède chaque fois à deux chromatographies sur une plaque de 20 x 20 cm : l'une est révélée par le révélateur de DITTMER et LESTER (1964) afin de déterminer avec précision les différents "spots". L'autre est simplement soumise à l'action de la vapeur d'iode et les tâches jaunes sont recueillies dans des tubes à essais. On dose le phosphore de chaque groupe de phospholipides par la technique de CHEN et al. (1956) : réactif à l'acide ascorbique-molybdate d'ammonium.

II.2 RESULTATS ET DISCUSSION

II.2.1 - FRACTIONNEMENT DES LIPIDES TOTAUX

Les résultats du fractionnement des lipides totaux sur colonne d'acide silicique sont exprimés dans les figures 20, 21, 22, 23.

FIGURE 20 : FRACTIONNEMENT DES LIPIDES TOTAUX
SUR ACIDE SILICIQUE, POURCENTAGE RELATIF
DE CHACUN DES 3 FRACTIONS OBTENUES.

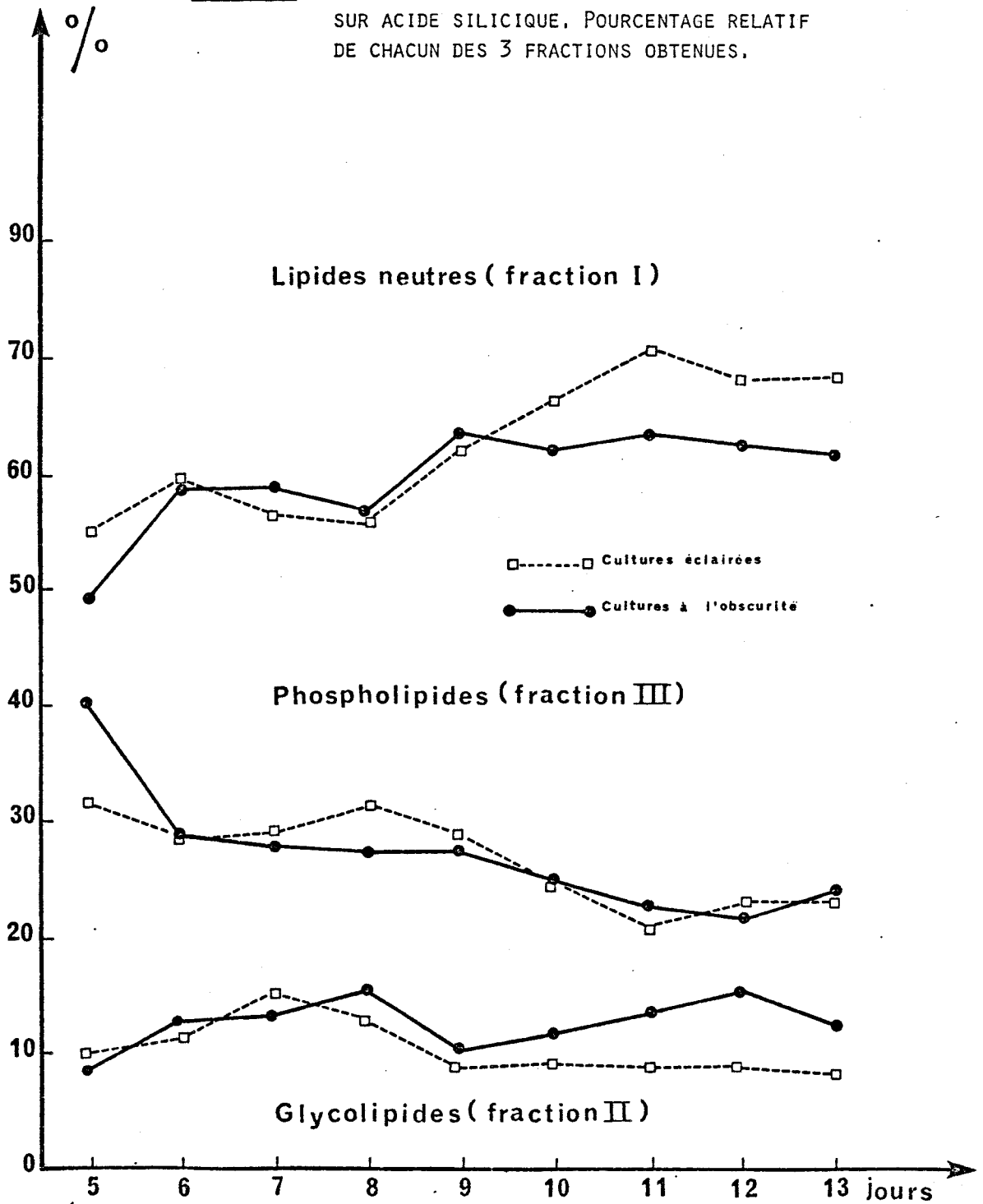
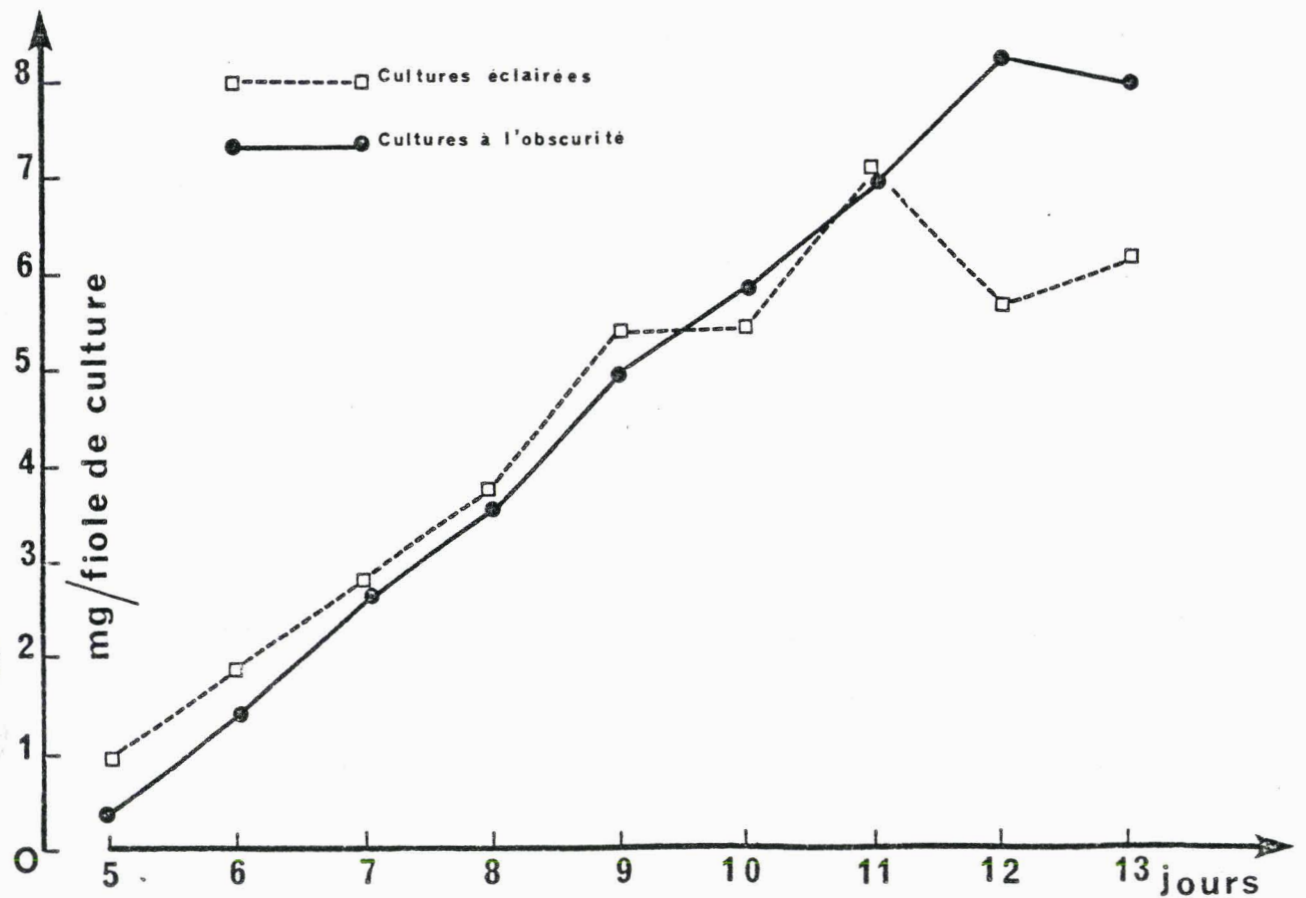
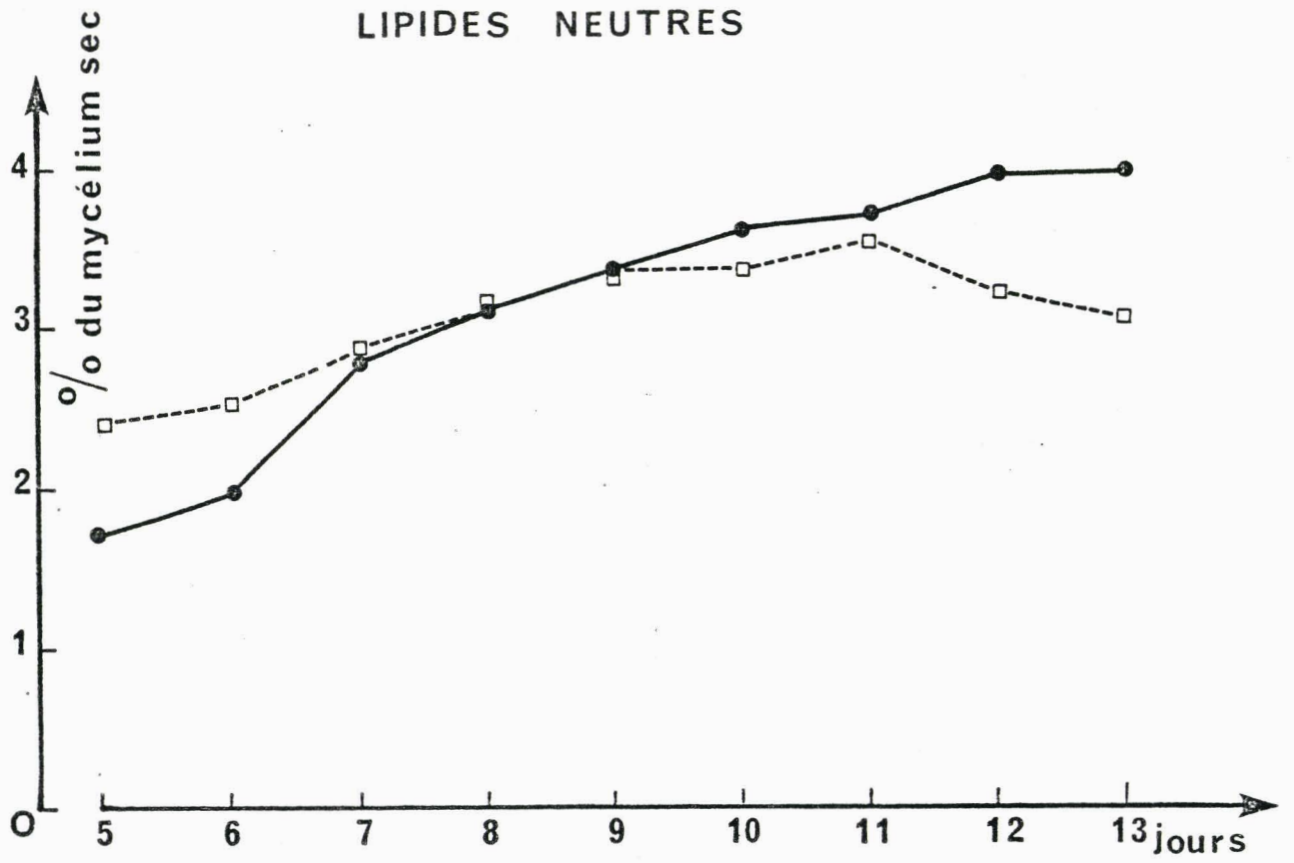


FIGURE 21 : EVOLUTION DE LA TENEUR MYCÉLIENNE EN LIPIDES NEUTRES (FRACTION 1)

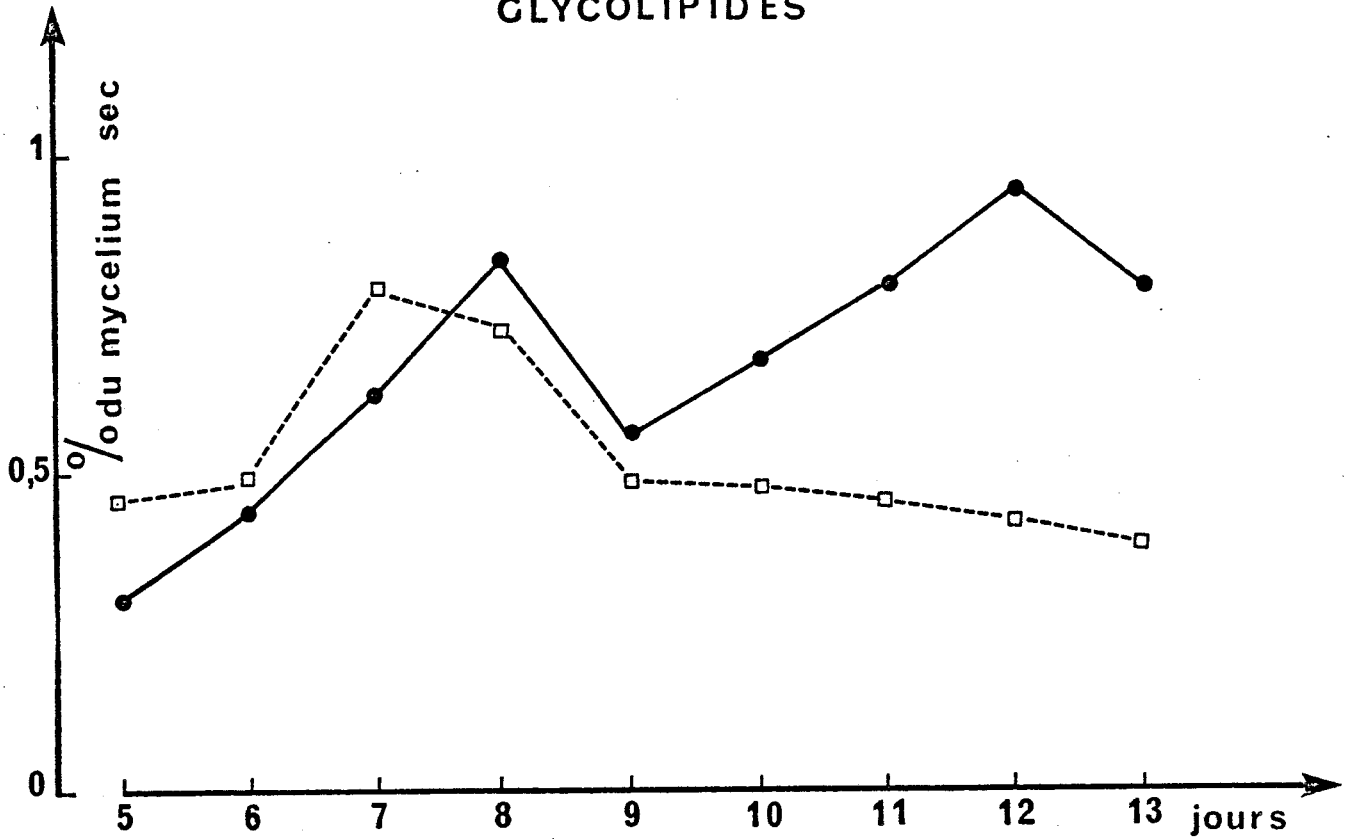


On peut constater que la fraction 1 (chloroformique) constituée par les lipides neutres est, tout au cours du développement, la plus importante quantitative-ment. Ceci se vérifie chez tous les êtres vivants, les végétaux et les Champignons en particulier (WEETE, 1974) qu'ils soient phycomycètes, zycomycètes ou ascomycètes (MILLS et CANTINO, 1974 ; CHAVANT, 1979). Cette fraction regroupe essentiellement des corps à rôle de réserve (glycérides) ou d'intermédiaire dans leur biosynthèse ou leur biodégradation (acides gras). Ces lipides constituent une réserve énergétique plus efficace que le glycogène (ILLINGWORTH et al., 1973) et on les trouve en grande quantité dans tous les organes de conservation des Champignons (WEBER et HESS, 1974) : ascospores de levures (TINGLE et al., 1973) du *Neurospora tetrasperma* dont ils forment jusqu'à 27 % du poids de matière sèche (LINGAPPA et SUSSMAN, 1959) ; les téliospores du *Tilletia controversa* contiennent 35 % de lipides (TRIONE et CHING, 1971) etc... Chez les Champignons supérieurs, outre les spores, les structures accessoires peuvent recéler des stocks de lipides : pycnides du *Puccinia poarum* (LOSEL et LEWIS, 1974), cléistocarpe du *Sphaerotheca morsuvae* (JACKSON et WHEELER, 1974). Nous avons nous aussi constaté la présence de globules lipidiques (Planche II) dans les ascospores du *Leptosphaeria typhae* mais nous n'en avons pas mis en évidence dans l'enveloppe périthéciale. Nous pensons qu'une étude en microscopie électronique des divers organes du thalle au cours du développement permettrait de préciser les localisations et les éventuelles translocations lipidiques. Cette accumulation de globules de lipides ("oléosomes") dans les ascospores de notre Champignon permet malgré tout d'expliquer l'augmentation de la proportion de "fraction 1" par rapport aux lipides totaux à partir du 8ème jour dans les cultures éclairées : ces réserves sont en effet essentiellement constituées de lipides neutres (MILLS et CANTINO, 1978). Dans les cultures stériles, au contraire, la proportion de ces corps est pratiquement constante après le 9ème jour de croissance. WERKMAN et al. (1977) ont aussi trouvé une plus grande quantité de triglycérides dans les souches fertiles du *Zygorhynchus moelleri* que dans les souches stériles ; il y a donc là confirmation de notre constatation. HOLTZ et SCHISLER (1971), au contraire, observent un rapport lipides neutres/lipides polaires plus élevé dans le mycélium que dans le basidiocarpe de l'*Agaricus bisporus* ; nous pensons que dans le cas de ce basidiomycète les lipides de réserve doivent se concentrer au niveau des lamelles, basides et basidiospores, qui constituent une fraction pondérale minime du carpophore : le faux-tissu de ce dernier synthétise sans doute des lipides neutres qui migrent dans les spores.

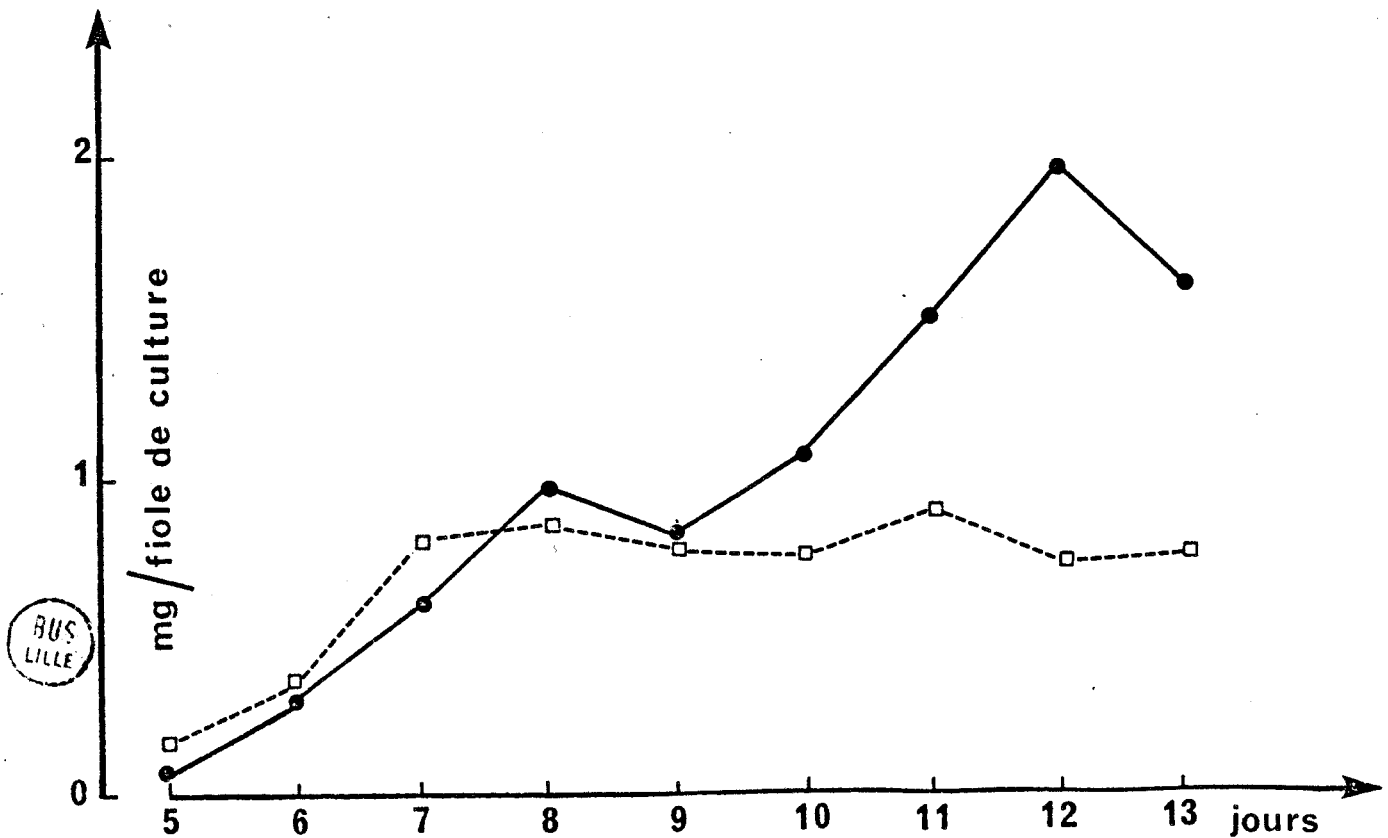
La figure 21 montre que le *Leptosphaeria typhae* continue jusqu'au 11ème jour de croissance à accumuler des lipides neutres lorsqu'il produit des périthèces ; les oscillations dans cette accumulation sont vraisemblablement

FIGURE 22 : EVOLUTION DE LA TENEUR MYCÉLIENNE
EN GLYCOLIPIDES (FRACTION 2)

GLYCOLIPIDES



●—● CULTURES A L'OBSCURITE
□- - - □ CULTURES ECLAIREES



BUS
LILLE

liées à des "vagues" de formation d'ascocarpes. Il semble donc que ce soit surtout aux dépens des fractions polaires que se fasse la réduction de la teneur mycélienne en lipides au moment de l'apparition des organes sexués. Les ascospores, organes à l'état de dormance, accumulent des lipides de réserve (neutres). Une étude en microscopie électronique permettra seule de juger l'importance des organites pourvus de membranes -riches en lipides polaires- qu'elles contiennent.

La Fraction 2, si elle est la moins riche des trois, compte malgré tout entre 8 % et 15 % du total lipidique, ce qui est loin d'être négligeable. Elle, et elle seule, s'avère positive à la réaction à l'antrone et au phénol-acide sulfurique. Elle contient donc bien une fraction glucidique.

Les glycolipides des champignons ont été beaucoup moins étudiés que les lipides neutres ou phospholipides. FAYRET (1975) par exemple considère que le *Gnomonia leptostyla* n'en contient pas. CHAVANT (1979), même s'il constate leur présence en faible quantité chez le *Mucor mucedo* et l'*Aspergillus ochraceus*, les néglige volontairement. Par contre, BARAUD et al. (1970) observent chez le *Saccharomyces cerevisiae* une quantité notable de mono et diglycosyl-diglycérides, de monogalactosyl-diglycérides, de sulfolipides. Chez cette même levure, STEINER et al. (1969) signalent la présence de lipides complexes contenant du mannose et de l'inositol ; BRENNAN et al. (1970) mettent également en évidence des glycolipides chez ce champignon. Des corps de cette famille ont aussi été observés chez d'autres levures, tels des *Rhodotorula* (THULLOCH et SPENCER, 1964) et le *Candida bogoriensis* (ESDERS et LIGHT, 1972). On en trouve aussi chez le *Dictyostelium discoideum* (RÖSSLER et al., 1978), l'*Achlya* (LAW et BURTON, 1976) et l'*Agaricus bisporus* (GRIFFIN, 1973). La présence de glycolipides semble donc assez constante dans tous les groupes de Champignons, et leur variété assez grande. Par contre, leur rôle physiologique a encore été peu étudié, sauf chez le *Blastocladiella emersonii* ; ce champignon inférieur contient des glycosyl-diglycérides (MILLS et CANTINO, 1974, 1977 ; SMITH et SILVERMAN, 1973) et MILLS et CANTINO (1978, 1980) ont montré que ces corps étaient des intermédiaires dans la synthèse de la chitine.

On ne peut donc être surpris de trouver une "Fraction 2" contenant des glycolipides chez le *Leptosphaeria typhae*. Par contre, elle représente une proportion des lipides trop élevée pour ne contenir que des glycolipides : elle est sans doute polluée par des traces de lipides neutres et de phospholipides.

Nous pouvons malgré cela comparer de manière significative les résultats obtenus dans les divers types de culture, étant donné que nous avons analysé tous nos extraits de manière rigoureusement semblable.

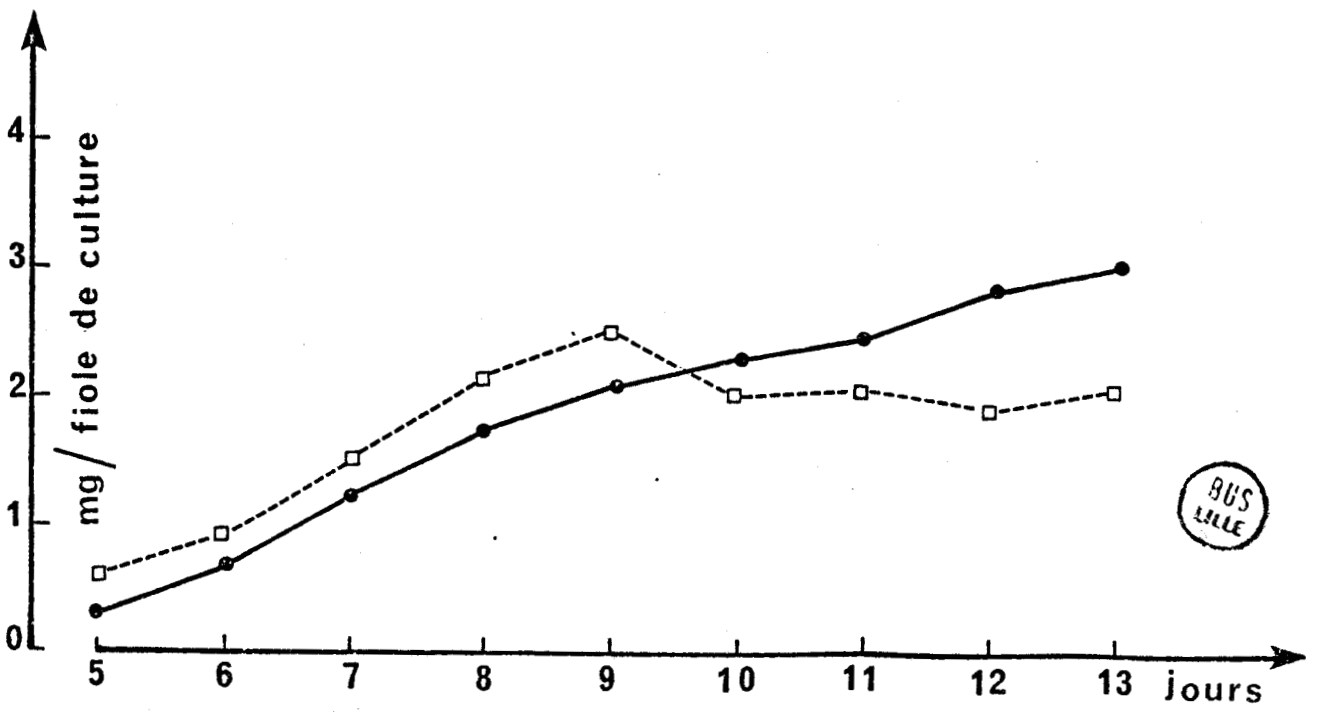
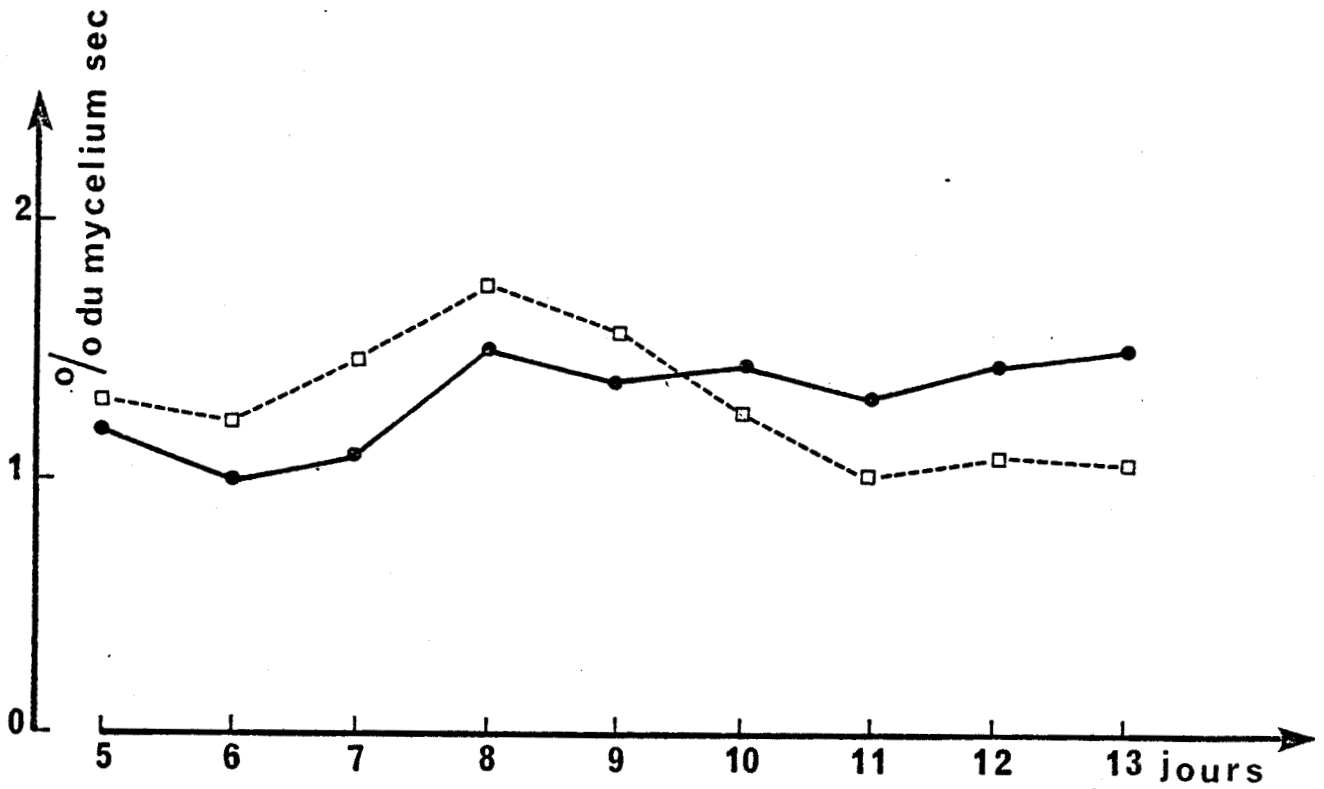
On peut constater que cet ensemble de lipides évolue différemment dans le Champignon suivant que celui-ci se développe à l'obscurité ou sous éclairage. Dans les cultures stériles, on observe (figure 22) une brutale baisse de la teneur mycélienne et même de la quantité de "fraction 2" par unité culturale entre les 8ème et 9ème jours. Cette disparition de "glycolipides" correspond à l'inflexion de la courbe de croissance (figure 16) constatée à ce stade du développement. Le Champignon a alors épuisé une grande partie des sources de carbone contenues dans le milieu de culture (MONOD, 1941) et doit s'adapter à l'assimilation d'autres corps ; il utilise partiellement ses réserves glucidiques, et en particulier les glycolipides, comme sources d'énergie. Ensuite, il accumule à nouveau activement des lipides de la "fraction 2" jusqu'à la fin de sa croissance ; on peut en particulier remarquer sur la figure 25, que la courbe d'accumulation de ces corps dans chaque unité de culture est, après le 9ème jour, pratiquement parallèle à ce qu'elle était avant le 8ème. Mis à part "l'accident" entre ces deux points, il y a donc synthèse régulière au cours de tout le développement mycélien.

Jusqu'au 7ème jour de croissance, les lipides des mycéliums fertiles contiennent une proportion de "fraction 2" comparable et même parfois supérieure à celle qu'on trouve dans les cultures stériles. Cette proportion s'abaisse dès l'apparition des premiers périthèces (figure 20) et la teneur mycélienne décroît brutalement entre les 7ème et 9ème jours (figure 22), plus vite encore que dans les colonies végétant à l'obscurité. Mais ici, cette baisse continue ensuite, même si elle se ralentit : le catabolisme l'emporte toujours sur l'anabolisme, puisque la quantité de lipides par fiole demeure à peu près constante alors que le poids de mycélium sec croît (figure 22). Un phénomène analogue est décrit par MILLS et al. (1974) lors de l'enkystement du *Blastocladiella emersonii*. Il est alors possible que notre Champignon utilise cette réserve de glucides que constituent les glycolipides pour l'édification des épaisses parois des organes reproducteurs, de la même manière que le *Blastocladiella emersonii* (MILLS et CANTINO, 1978, 1980).

La "Fraction 3" contient au minimum 92 % du phosphore lipidique total. Elle est exclusivement constituée de phospholipides. Elle aussi évolue différemment suivant que le mycélium dont elle est extraite se développe à l'obscurité ou sous photopériode. Dans les cultures stériles, la proportion de

FIGURE 23 : EVOLUTION DE LA TENEUR MYCÉLIENNE
EN PHOSPHOLIPIDES (FRACTION 3)

PHOSPHOLIPIDES



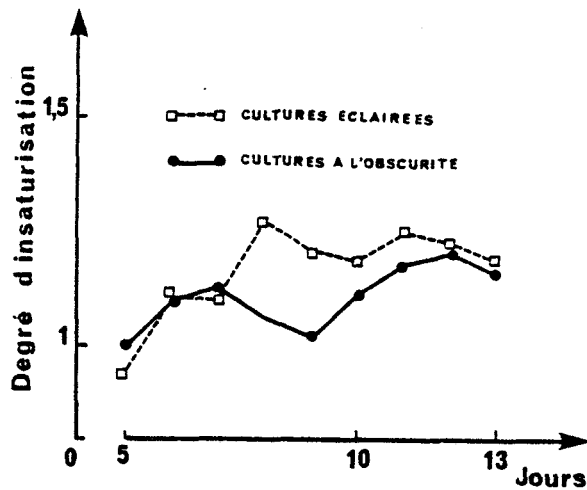
phospholipides, proche de 40 % au 5ème jour, s'abaisse rapidement jusqu'au 6ème jour, puis plus lentement et très régulièrement (figure 20) ; cela se traduit par une teneur mycélienne d'abord en baisse, puis s'élevant jusqu'au 8ème jour et demeurant à peu près constante ensuite (figure 23) : le métabolisme du Champignon atteint alors un niveau stable et la structure cellulaire des portions d'hyphes actives subit vraisemblablement peu de variations. Par contre, la production des périthèces et ascospores par les cultures éclairées se traduit à nouveau par de profonds changements du métabolisme lipidique : en début de croissance, le Champignon fertile accumule des teneurs assez fortes de phospholipides, nettement supérieures à celles des mycéliums stériles. Ces phospholipides sont en grande partie incorporés dans les membranes des organites très nombreux dans ces mycéliums à cycle citrique plus actif. Dès la maturation des premiers périthèces (8ème jour) la proportion de "fraction 3" s'abaisse, dans l'ensemble des lipides (figure 20) comme dans le mycélium (figure 23), et, au 10ème jour, devient inférieure à celle qu'on trouve dans les cultures stériles. A ce stade, l'accumulation de phospholipides cesse et même leur quantité par unité culturale décroît, puis reste constante, malgré la croissance du mycélium : cela montre clairement que la dégradation l'emporte sur la synthèse (figure 23). HENRY et HALVORSON (1973) observent aussi que la synthèse de phospholipides se ralentit lors de l'apparition des ascospores du *Saccharomyces cerevisiae*, alors que celle des lipides neutres continue. CHAVANT (1979) a constaté un phénomène analogue lors de la sporulation de l'*Aspergillus ochraceus*. FAYRET (1975) décrit une diminution de la richesse en lipides polaires du *Gnomonia leptostyla* lors de la maturation de ses périthèces, mais cette baisse est surtout sensible dans les cultures à ascocarpes stériles.

L'ensemble du mycélium du *Leptosphaeria typhae* contient alors une forte proportion d'organes à activité métabolique réduite : enveloppe périthéciale, ascospores ; une étude en microscopie électronique montrerait si ces cellules sont pauvres ou riches en membranes ; a priori, on peut supposer qu'elles en recèlent peu, étant donné leur état de semi-dormance, ce qui expliquerait partiellement l'abaissement de la teneur totale en phospholipides.

LEVY et ELLIOTT (1968) ont montré que les phospholipides provenant d'organites lysés peuvent être utilisés pour la synthèse des triglycérides. Ce fait permettrait de relier la richesse en lipides neutres des cultures fertiles à la diminution de leur teneur en phospholipides.

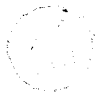
TABLEAU 19
 EVOLUTION DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE LA FRACTION 1 (LIPIDES NEUTRES).
 POURCENTAGE RELATIF DE CHACUN DES ACIDES DÉTECTÉS (MOYENNE DE 2 MESURES).

Acide	5ème JOUR		6ème JOUR		7ème JOUR		8ème JOUR		9ème JOUR		10ème JOUR		11ème JOUR		12ème JOUR		13ème JOUR	
	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
C ₁₂	1,09	2,22	0,44	1,82	t	t	0,85	1,86	0,90	1,00	0,90	0,80	1,02	1,05	1,26	1,08	1,32	1,11
C _{12:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₄	1,56	2,03	1,64	0,81	t	1,87	1,05	1,67	1,00	1,00	1,20	1,20	1,03	0,95	1,36	1,05	1,35	1,12
C _{14:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₆	23,76	23,20	20,27	20,95	18,70	17,15	13,63	21,03	14,87	20,10	18,90	17,05	16,18	18,42	15,98	16,21	17,74	17,40
C _{16:1}	4,13	3,40	3,10	3,98	4,00	4,34	2,10	3,88	2,88	3,80	2,52	5,10	3,66	4,82	3,50	3,24	3,58	3,22
C ₁₈	12,08	7,74	7,32	7,19	10,74	9,30	8,28	8,83	8,38	13,51	8,74	9,94	8,21	9,41	9,37	9,76	10,33	10,65
C _{18:1}	34,44	34,64	34,99	34,39	35,53	35,40	35,22	33,54	35,72	34,27	31,00	34,19	30,84	28,70	32,47	32,06	28,10	31,00
C _{18:2}	16,26	21,04	24,19	20,73	22,15	21,60	26,93	19,21	25,11	15,13	23,46	20,41	26,29	23,86	24,82	25,40	25,19	24,80
C _{18:3}	6,68	5,72	8,04	10,13	8,88	9,76	11,91	9,98	10,73	11,16	13,01	10,28	12,77	12,28	12,24	11,20	12,35	10,90
D. I	0,944	0,997	1,11	1,10	1,105	1,12	1,27	1,06	1,21	1,02	1,19	1,11	1,25	1,18	1,23	1,20	1,19	1,16



EVOLUTION DU DEGRÉ D'INSATURATION

(Représentation graphique de la dernière ligne du Tableau)



Enfin, il convient de rappeler que l'activité du métabolisme intermédiaire se situe à un niveau élevé, et une partie au moins du phosphore lipidique peut être utilisée pour la synthèse d'A.T.P. NISHI (1960) a d'ailleurs observé de même une baisse de la teneur en phospholipides des spores de *Aspergillus niger* lors de leur germination, processus très exigeant en énergie, comme l'ascosporulation.

II.2.2 - "LA FRACTION I"

La composition globale de cette "fraction" en acides gras est sur le plan qualitatif tout à fait semblable à celle des lipides totaux (tableau 19). Quantitativement, on remarque qu'elle est plus pauvre en acides poly insaturés et que son "indice d'insaturation" est toujours plus faible. Par contre, l'évolution globale est tout à fait parallèle à celle de l'ensemble des lipides : au moment de l'apparition des premiers périthèces, les acides gras des mycéliums fertiles deviennent plus riches en acides insaturés et leur indice d'insaturation s'élève pour demeurer toujours plus fort que celui des cultures maintenues à l'obscurité. Les lipides neutres, majoritaires dans le "pool" des lipides, reflètent les variations de l'ensemble.

Ainsi que le montre le tableau 20 nous avons séparé la Fraction I en 7 sous-fractions :

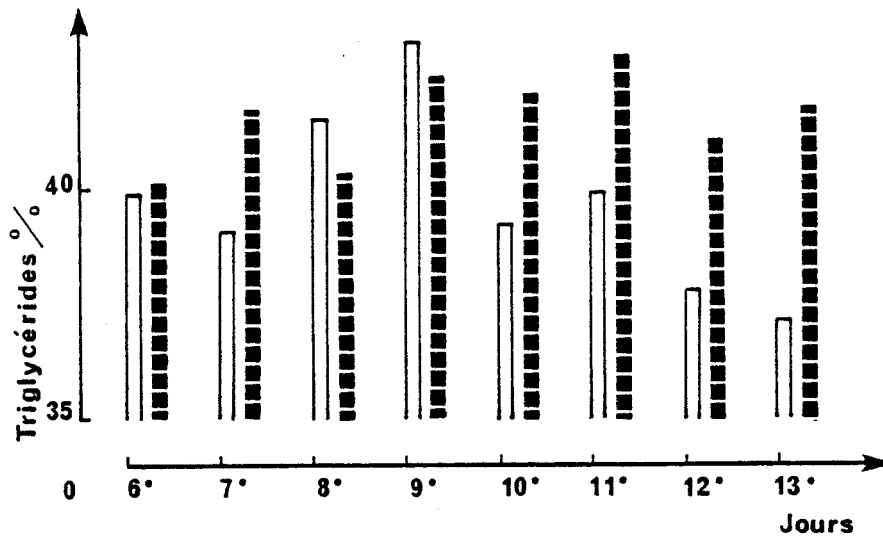
- hydrocarbures (plus peut-être quelques traces de caroténoïdes) ;
- esters de stérols et d'acides gras ;
- triglycérides ;
- stérols libres ;
- diglycérides ;
- monoglycérides ;
- acides gras libres.

Ces divers corps sont les lipides neutres habituellement reconnus chez les Champignons, hormis les monoglycérides qui semblent être absents, ou du moins ne sont pas décelés chez le *Phycomyces blakesleeanus* (CHENOUDA, 1970), le *Phymatotrichum omnivorum* (GUNASEKARAN et al., 1974), le *Chaetomium cochloides* (SAFE et BREWER, 1973), le *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1975) ; ils sont par contre mis en évidence chez le *Pythium ultimum* (BOWMAN et MUMMA, 1967), le *Rhizopus arrhizus* (GUNASEKARAN et al., 1972), le *Trichothecium roseum* (SAN-CHOLLE, 1970), certaines levures (PITRYUK et ZVIAGINTSEVA, 1976) etc... Ces corps se forment à partir des diglycérides par des voies secondaires du métabolisme lipidique (MAZLIAK, 1967) ce qui explique les résultats contradic-

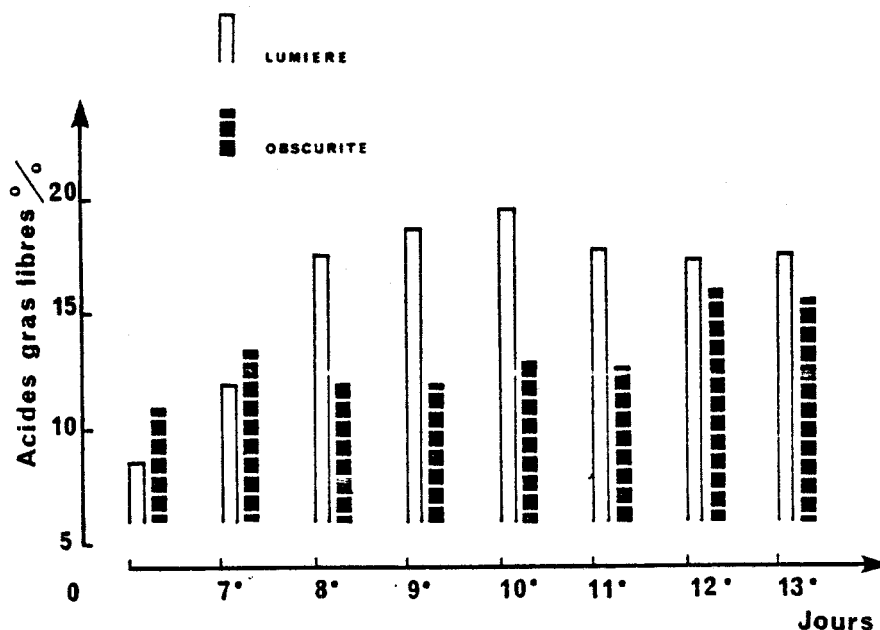
TABLEAU 20

EVOLUTION DE LA COMPOSITION DE LA FRACTION 1 (LIPIDES NEUTRES).
POURCENTAGE RELATIF DE CHACUNE DES SOUS-FRACTIONS (MOYENNE DE 3 MESURES).

Sous-Fraction	6ème JOUR		7ème JOUR		8ème JOUR		9ème JOUR		10ème JOUR		11ème JOUR		12ème JOUR		13ème JOUR	
	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
Hydrocarbures	8,2	9,1	7,9	7,6	8,6	8,2	6,1	10,3	9,3	9,85	9,2	9,0	8,9	8,0	9,7	8,2
Esters de stérols et d'acides gras	14,8	12,7	13,0	13,5	8,4	11,1	9,3	12,2	9,3	11,85	10,4	12,7	8,5	11,9	9,0	10,1
Triglycérides	39,9	40,3	39,1	41,7	41,5	40,3	43,2	42,4	39,2	42,1	39,9	42,9	37,8	40,7	37,1	41,9
Stérols libres	15,5	13,8	11,1	10,4	11,8	11,7	11,3	13,2	12,9	12,2	12,1	11,9	13,6	12,6	12,1	13,4
Diglycérides	7,5	8,0	11,9	9,2	8,9	9,6	7,6	7,3	6,1	7,5	7,1	7,2	8,4	7,8	8,3	6,7
Monoglycérides	5,6	5,0	5,0	4,1	3,2	7,1	3,8	4,6	3,5	4,5	3,5	3,7	5,5	3,9	6,2	3,0
Acides gras libres	8,5	11,1	12,0	13,5	17,6	12,0	18,7	12,0	19,7	13,0	17,8	12,6	17,3	15,1	17,6	15,7



EVOLUTION DU POURCENTAGE DE TRIGLYCÉRIDES



EVOLUTION DU POURCENTAGE D'ACIDES GRAS LIBRES

(Représentation graphique des résultats les plus importants du Tableau)



toires obtenus par les divers chercheurs : il est possible en particulier que les conditions de culture (milieu, température, etc...) influent sur la synthèse des monoglycérides par les Champignons. Le *Leptosphaeria typhae*, au cours de nos expériences, en contient toujours une faible proportion, d'ailleurs, en général inférieure à celle qui apparaît dans le tableau 20 ; en effet, la chromatographie sur couche mince montre que cette "sous-fraction" est souvent polluée par de petites traces de diglycérides, stérois et triglycérides qui ne sont séparés du Florisil que par le solvant n° 6.

Les triglycérides constituent toujours la sous-fraction la plus abondante des lipides neutres, résultat tout à fait classique (WEETE, 1974). Les différences entre les cultures fertiles et stériles sont toujours faibles, mais le Champignon semble accumuler une plus grande proportion de ces corps lorsqu'il forme des périthèces (8ème-9ème jours) puis il les utilise partiellement lors de la maturation des ascospores (10ème-12ème jours). Les diglycérides, qui jouent essentiellement le rôle d'intermédiaire dans le métabolisme des triglycérides, évoluent de manière grossièrement parallèle à ces derniers.

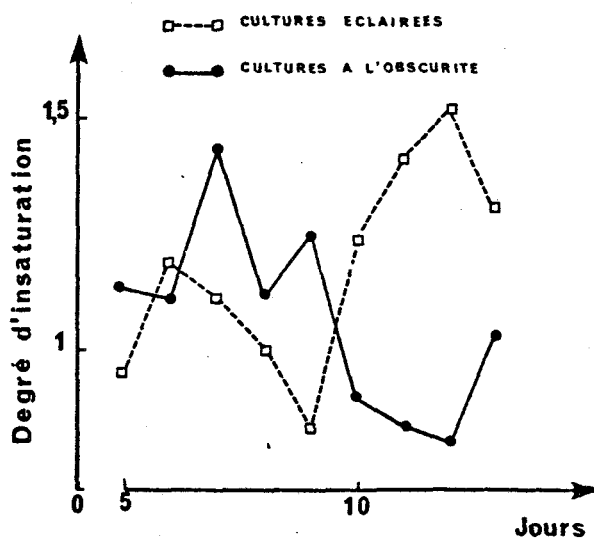
Le tableau 20 confirme l'idée très prudemment avancée par VANDEWALLE (1973) : les cultures stériles contiennent plus de stérois que les mycéliums fertiles et chez elles la portion estérifiée est plus importante. Le Champignon utilise donc plus rapidement ses stérois lorsqu'il se reproduit : ceux-ci serviraient-ils à la synthèse d'hormones sexuelles ? C'est une des questions que nos travaux actuels et à venir s'efforceront de résoudre.

La sous-fraction qui permet les conclusions les plus nettes est celle des acides gras libres (tableau 21). Ces corps sont à la fois les précurseurs des glycérides et esters et les produits de leur dégradation. Ils peuvent donc indiquer le degré d'activité du métabolisme lipidique de l'organisme. Jusqu'au 7ème jour de culture, ils sont plus abondants lorsque le Champignon végète à l'obscurité. Mais, après l'apparition des premiers périthèces, c'est au contraire dans les mycéliums fertiles qu'on en trouve la plus grande quantité. Cette augmentation coïncide avec la phase de stimulation de l'"acide-gras synthétase" (fig. 19) et était donc prévisible. Il se pourrait que ces acides gras jouent un rôle de réserve dans les ascospores du *Leptosphaeria typhae*, comme ils le font dans les spores de l'*Achlya*, où ils constituent 50 % des lipides (LAW et BURTON, 1976).

Dans les mycéliums stériles, la plus faible proportion d'acides gras libres est à rapprocher de l'activité plus intense du cycle glyoxylique, responsable de leur dégradation.

TABLEAU 21
EVOLUTION DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS LIBRES.
POURCENTAGE RELATIF DE CHACUN DES ACIDES DETECTES (MOYENNE DE 3 MESURES).
D.I. : Degré d'Insaturation moyen

Acide	5 ^{ème} JOUR		6 ^{ème} JOUR		7 ^{ème} JOUR		8 ^{ème} JOUR		9 ^{ème} JOUR		10 ^{ème} JOUR		11 ^{ème} JOUR		12 ^{ème} JOUR		13 ^{ème} JOUR	
	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
C ₁₂	2,00	1,80	2,10	1,95	2,53	2,14	3,15	3,18	1,00	t	t	1,01	t	t	t	t	t	t
C _{12:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₄	1,10	0,72	t	1,02	1,17	t	1,50	1,10	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C _{14:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₆	17,00	17,80	19,47	21,10	21,00	17,55	23,15	22,10	27,57	23,14	19,86	24,51	14,05	27,10	15,74	25,19	18,40	19,30
C _{16:1}	1,27	2,07	5,69	5,34	3,07	3,20	2,61	4,99	3,57	7,17	2,41	2,32	3,63	3,02	5,37	4,96	4,29	5,38
C ₁₈	7,30	8,05	5,56	6,00	7,50	3,34	7,30	7,70	9,57	3,99	4,39	8,74	4,52	8,98	4,63	12,60	6,13	6,61
C _{18:1}	38,36	37,44	32,02	32,34	32,61	24,95	34,97	25,89	39,05	24,56	33,53	43,71	29,40	42,12	18,89	39,31	27,60	29,08
C _{18:2}	22,35	22,62	24,58	23,64	23,40	30,84	16,95	24,19	16,86	30,34	31,74	15,40	35,80	17,00	37,96	17,94	31,90	30,69
C _{18:3}	10,60	9,50	10,57	8,60	9,72	17,98	10,00	10,84	2,38	10,79	8,07	4,30	12,60	1,77	17,40	t	11,66	8,92
D.I.	0,95	1,13	1,19	1,11	1,12	1,44	1,01	1,12	0,83	1,25	1,24	0,90	1,42	0,84	1,52	0,80	1,31	1,23



DEGRÉ D'INSATURATION DES ACIDES GRAS LIBRES

(Représentation graphique de la dernière ligne du Tableau)



Aux 5ème et 6ème jours de culture, la répartition des différentes longueurs de chaîne varie peu, que le Champignon reçoive un éclaircissement ou demeure à l'obscurité. Par contre, lorsque les périthèces commencent à se former (7ème-8ème-9ème jours), on peut remarquer que la richesse en acide palmitique (C_{16}) libre est plus grande dans les mycéliums fertiles : cet acide, que l'on peut qualifier de "juvénile", est le précurseur de tout le groupe des C_{18} (LEDERER, 1967 ; MAZLIAK, 1968) et sa présence est donc l'indice d'une activité de synthèse intense. De tous les acides libres insaturés, seul l'oléique ($C_{18:1}$) se trouve en plus forte proportion dans les cultures à périthèces, les pluri-insaturés étant plus abondants dans les colonies stériles ; il en résulte que l'indice d'insaturation des acides gras libres est alors plus faible dans les mycéliums cultivés sous photopériode : les désaturations et dégradations sont partiellement masquées par la forte élévation de l'activité "acides-gras synthétasique". Mais, après le 9ème jour, lorsque s'accroît rapidement le nombre des appareils sexuels, la tendance est inversée : c'est dans les cultures stériles qu'on trouve les proportions les plus élevées d'acides palmitique et oléique, alors que les poly-insaturés se rencontrent en plus grande quantité dans les mycéliums porteurs d'ascocarpes ; cela coïncide chez ces derniers avec une stabilisation de l'activité de synthèse qui redémarre au contraire dans les cultures végétant à l'obscurité (fig. 19, p. 97) et une accélération de la dégradation des lipides (fig. 17, p. 92). L'indice d'insaturation de ces acides gras libres tend à augmenter jusqu'au 12ème jour, alors qu'il diminue si le Champignon ne produit pas de périthèce. L'ensemble de ces observations confirme donc nos résultats antérieurs et montre clairement l'exactitude de notre conclusion : le "turn-over" des lipides est plus rapide chez le *Leptosphaeria typhae* lorsque celui-ci se reproduit.

II.2.3 - LA "FRACTION II"

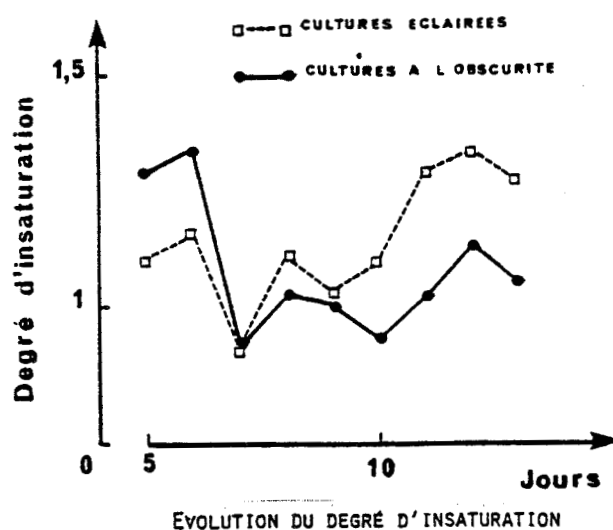
Cette fraction contient toujours une faible proportion du phosphore lipidique total (entre 4 et 8 %). En C.C.M. on observe trois groupes de substances, correspondant aux sous-fractions (1) (2) et (4) obtenues par chromatographie sur colonne de DEAE-Cellulose :

(1) 3 spots peu importants aux Rf : 0,60 - 0,65 et 0,70. Difficilement décelables à la vapeur d'iode, ces corps réagissent faiblement à l'orcinol et à l' α -naphthol, pas du tout au réactif de DITTMER et LESTER. Présents en faibles quantités, ils semblent donc contenir une petite proportion de glucides et pas du tout de phosphore, ou très peu.

1 spot très net à Rf:0,54. Ce corps, ou ce groupe de corps, est fortement coloré par l'orcinol et l' α -naphthol. Son Rf, comparé à celui des produits "purs" du commerce, l'assimile aux monoglycosyl-diglycérides.

TABLEAU 22
 EVOLUTION DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE LA FRACTION 2 (GLYCOLIPIDES).
 POURCENTAGES RELATIFS DE CHACUN DES ACIDES GRAS DÉTECTÉS (MOYENNE DE 3 MESURES).
 D.I. = Degré d'Insaturation moyen

Acide	5ème JOUR		6ème JOUR		7ème JOUR		8ème JOUR		9ème JOUR		10ème JOUR		11ème JOUR		12ème JOUR		13ème JOUR	
	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
C ₁₂			t	t			t	t										
C _{12:1}																		
C ₁₄			t	1,03			t	t										
C _{14:1}																		
C ₁₆	22,94	17,01	22,58	16,07	25,86	30,11	33,60	20,59	23,50	22,97	23,91	25,13	20,30	22,72	19,28	20,29	20,33	25,55
C _{16:1}	6,72	4,76	6,27	3,12	6,13	5,42	5,14	7,00	6,14	4,85	3,44	4,81	3,84	9,34	4,89	5,95	4,78	6,02
C ₁₈	8,20	8,84	7,03	8,63	13,03	12,71	8,31	7,25	12,63	14,99	11,08	12,45	8,24	8,80	8,31	9,03	9,44	9,48
C _{18:1}	31,26	28,13	30,50	27,76	31,94	27,15	13,98	43,22	28,91	29,61	25,81	35,38	22,96	34,41	21,12	32,82	21,16	28,34
C _{18:2}	20,98	28,10	21,26	27,05	16,57	15,10	25,06	13,93	18,38	17,19	27,26	13,97	31,44	16,27	32,29	21,90	32,15	20,78
C _{18:3}	9,90	13,16	12,36	16,34	6,46	8,50	13,91	8,00	10,42	10,39	8,50	8,24	13,21	8,45	14,11	10,01	12,14	9,83
D.I.	1,10	1,29	1,16	1,34	0,91	0,91	1,11	1,02	1,03	1,00	1,09	0,93	1,29	1,02	1,33	1,13	1,27	1,05



(Représentation graphique de la dernière ligne du Tableau)



(2) 1 seul spot très net de Rf 0,33, réagissant à l'orcinol et à l' α -naphthol. Nous l'avons assimilé aux diglycosyl-diglycérides.

(4) suivant le cas, cette sous-fraction comprend de 2 à 5 spots de très faible intensité ; plus ou moins décelables par la vapeur d'iode, ils sont situés à des Rf assez bas : 0,05 à 0,15. Parmi eux, se trouvent des corps réagissant au réactif de DITTMER et LESTER : il s'agit vraisemblablement de cardiolipides (CL, ou DPG). Il se pourrait aussi que cette sous-fraction recèle des sulfolipides. Mais, comme nous l'ont montré nos pesées et nos dosages à l'acide sulfurique-bi chromate de potassium (AMENTA, 1964) elle ne représente qu'une faible partie de la "fraction II" (moins de 10 %) et par conséquent environ 1 % des lipides totaux. Nous l'avons considérée comme négligeable, d'autant qu'elle peut être polluée par divers sels (KATES, 1971).

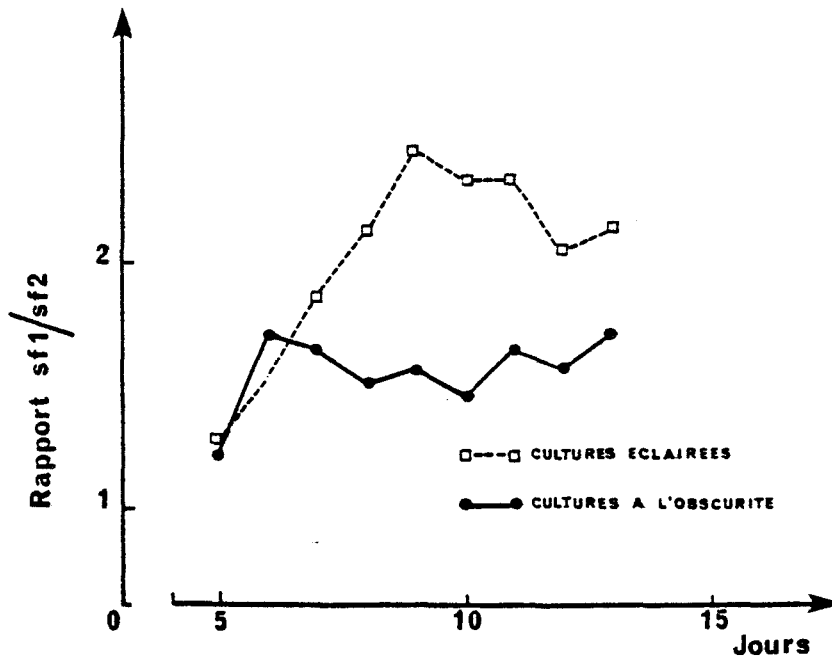
Il est évident que notre détermination des glycolipides est discutable, puisque nous nous sommes uniquement basé sur leur Rf dans notre solvant ; nous avons aussi négligé une partie de ces corps situés à un Rf élevé. Mais, étant donné la très grande variété de glycolipides mis en évidence chez les Champignons : stéryl-glycosides, mannanolipides, cerebrosides, etc... dont l'analyse peut être longue et complexe, nous n'avons pas jugé utile d'aller plus loin dans notre étude. En effet, leur importance quantitative ne permet pas a priori de leur attribuer un grand rôle dans la différenciation sexuée du Champignon. Nous pensons malgré tout d'ores et déjà que ce problème est à revoir lors d'études ultérieures. En particulier, nous estimons que la "Fraction II" est polluée par des traces de lipides neutres et phospholipides.

Nous avons résumé dans le tableau 23 les résultats de nos dosages des sous-fractions (1) et (2) par la méthode de GALANOS et KAPOULAS (1965), qui met en évidence la teneur en glucides. Assimilant la "sous-fraction (2)" aux diglycosyl-glycérides, nous avons considéré que chaque molécule de ces corps contenait deux fois plus de glucides que ceux de la "sous-fraction (1)" et nous avons corrigé nos chiffres en conséquence afin de les ramener à la proportion de lipides la plus proche possible de la réalité. Nous constatons que le Champignon contient toujours une plus grande quantité de "monoglycosyl-diglycérides", qu'il soit fertile ou stérile. Par contre, il apparaît que la "sous-fraction (1)" devient plus importante quantitativement dans les mycéliums producteurs de périthèces ; si l'on considère que les "monoglycosyl-diglycérides" sont des précurseurs des "diglycosyl-glycérides", nous avons ici encore une preuve de l'accélération du métabolisme lipidique lors de la reproduction sexuée ; si l'on admet que les "diglycosyl-glycérides" constituent les glycolipides "adultes", leur disparition relative au cours de la formation des ascocarpes est en parfait accord avec notre observation : les glycolipides sont remétabolisés par le Champignon lorsqu'il différencie ses organes reproducteurs. La diminution de l'importance quantitative de la

TABLEAU 23

EVOLUTION DE LA COMPOSITION DE LA FRACTION 2.
POURCENTAGE RELATIF DE CHACUNE DES DEUX SOUS-FRACTIONS ÉTUDIÉES (MOYENNE DE 3 MESURES)

Sous-Fraction	5ème JOUR		6ème JOUR		7ème JOUR		8ème JOUR		9ème JOUR		10ème JOUR		11ème JOUR		12ème JOUR		13ème JOUR	
	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
1	56	55	61	63	65	62	68	60	71	61	70	59	70	62	67	61	68	63
2	44	45	39	37	35	38	32	40	29	39	30	41	30	38	33	39	32	37
Rapport 1/2	1,27	1,22	1,56	1,70	1,86	1,63	2,12	1,50	2,45	1,56	2,33	1,44	2,33	1,63	2,03	1,56	2,12	1,70



EVOLUTION DU RAPPORT SOUS-FRACTION 1/SOUS-FRACTION 2

(Représentation graphique de la dernière ligne du Tableau)



"Fraction II" entre les 8ème et 9ème jours dans les mycéliums stériles affecte également les deux sous-fractions et ne se traduit par aucune modification qualitative.

La composition en acides gras de la "Fraction II" (tableau 22) montre que celle-ci contient une proportion d'acides insaturés souvent plus faible que les lipides neutres. Ce résultat diffère de celui qui a été obtenu par la plupart des auteurs (in WEETE, 1974 ; FAYRET, 1975 ; CHAVANT, 1979). Ceux-ci constatent en effet que les lipides polaires ont un indice d'insaturation toujours plus élevé que les neutres. Mais, pour la plupart, ils analysent un groupe complexe de lipides comportant une forte quantité de phospholipides et où les glycolipides sont minoritaires. Notre observation n'infirme donc pas les leurs. Nous constatons encore une fois que l'indice d'insaturation des lipides des mycéliums producteurs d'ascocarpes est plus élevé, lors de l'apparition des périthèces, que dans les cultures stériles.

II.2.4 - LA "FRACTION III"

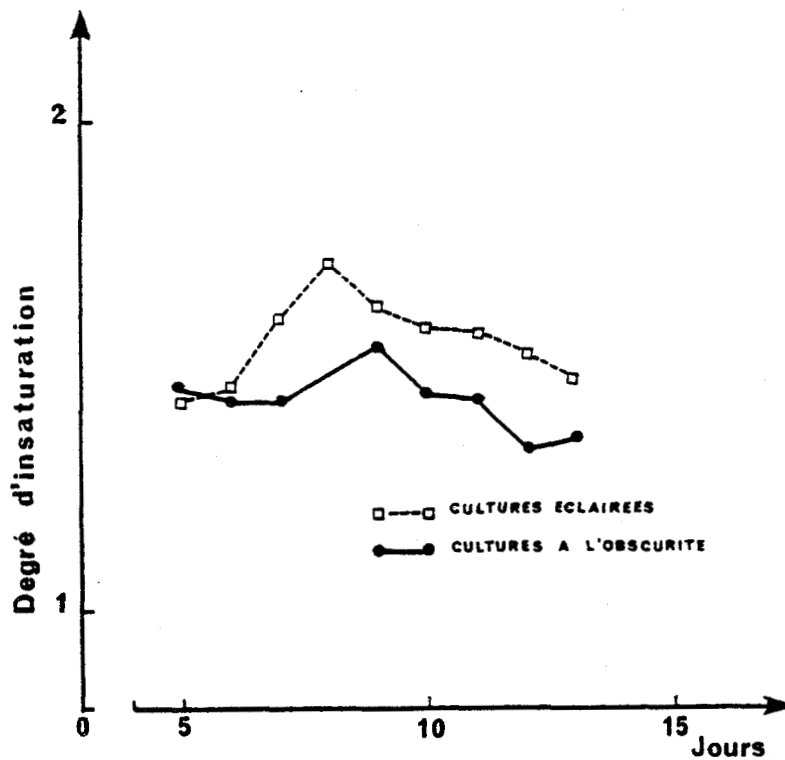
Cette fraction est la plus riche en acides gras poly-insaturés, en particulier linoléique (C_{18:2}) (tableau 24). L'évolution générale de sa composition en acides gras est semblable à celle des autres groupes : la formation des périthèces s'accompagne d'une élévation de l'indice d'insaturation.

Nos analyses en C.C.M. nous ont permis de mettre en évidence, dans la plupart des extraits :

- (1) un spot de Rf = 0,85-0,90 peu net en général, représentant toujours moins de 2 % du phosphore total et pouvant être assimilé aux cardiolipides (CL ou DPG) ;
- (2) un spot très net de Rf = 0,77-0,82 égal à celui des phosphatidyl-éthanolamines (PE) du commerce, positif au réactif à la ninhydrine. Il s'agit bien des P.E.
- (3) toujours présent, ce spot, de Rf = 0,66-0,72 est souvent difficile à déceler. Il correspond au phosphatidyl-inositol (PI) très courant chez les Champignons, tels les levures (KANeko et al., 1976) ; le *Fusarium culmorum* (NOMBELA-CANO et PEBERDY, 1971), l'*Aspergillus ochraceus*, le *Mucor mucedo* (CHAVANT, 1979), etc... ;
- (4) un spot de Rf = 0,62-0,68, très réactif à la ninhydrine : il s'agit de phosphatidyl-sérine (PS) peut-être polluée par une faible part de PI, car les deux tâches (3) et (4) sont souvent presque confondues. Nous n'avons pas cherché à séparer ces deux corps, car l'ensemble ne contient que 10 % au plus du phosphore total, ne varie que faiblement au cours du développement du *Leptosphaeria typhale* et ne présente donc pas un très grand intérêt pour notre étude ;
- (5) un spot très visible, de Rf = 0,47-0,54 semblable à celui des lécithines, ou phosphatidyl-cholines (PC) ;
- (6) et (7) deux spots de Rf = 0,30 et Rf=0,12 correspondant aux lyso-PE et

TABLEAU 24
COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE LA FRACTION III (PHOSPHOLIPIDES).
POURCENTAGES RELATIFS DE CHACUN DES ACIDES GRAS DÉTECTÉS (MOYENNE DE 4 MESURES).
 D.I. : Degré d'Insaturation moyen

Acide	5ème JOUR		6ème JOUR		7ème JOUR		8ème JOUR		9ème JOUR		10ème JOUR		11ème JOUR		12ème JOUR		13ème JOUR	
	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
C ₁₂	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C _{12:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₄	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C _{14:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₆	12,87	13,38	13,40	15,66	15,60	11,40	9,12	13,00	10,53	14,67	11,64	13,72	12,35	10,90	12,28	12,86	13,00	13,10
C _{16:1}	3,29	2,87	2,57	2,88	4,46	3,20	3,82	3,14	2,81	2,12	3,21	4,29	3,82	5,88	4,10	4,19	3,68	4,79
C ₁₈	9,11	10,00	8,57	8,78	6,63	12,41	5,00	8,90	4,88	5,78	6,71	6,20	7,57	6,75	8,31	7,14	9,70	7,80
C _{18:1}	25,02	23,00	24,92	22,73	20,97	21,32	19,62	20,96	21,55	21,03	22,18	26,29	21,53	29,72	20,84	32,75	21,34	29,67
C _{18:2}	34,28	32,73	33,82	32,68	29,97	36,28	39,28	37,37	43,21	38,77	36,14	35,46	33,18	32,49	35,20	32,85	34,12	33,20
C _{18:3}	15,43	18,02	16,72	17,27	22,37	15,38	23,16	16,63	17,01	17,62	20,12	14,04	21,77	14,24	19,27	10,21	18,16	11,44
D.I.	1,43	1,45	1,45	1,43	1,60	1,43	1,71	1,49	1,62	1,54	1,58	1,44	1,57	1,43	1,53	1,33	1,48	1,35



EVOLUTION DU DEGRÉ D'INSATURATION

(Représentation graphique de la dernière ligne du Tableau)



lyso-PC. Etant données les précautions dont nous nous sommes entouré au moment de l'extraction des lipides, puis pendant tout le temps de conservation des extraits, nous pensons que ces corps existaient réellement dans le mycélium vivant du Champignon et ne proviennent pas d'artefacts-dégradation enzymatique des PE et PC au cours des manipulations. Leur faible teneur vient étayer cette opinion.

Nous n'avons trouvé aucun corps positif au réactif de la sphingosine (KATES, 1971). Nous pensons que le Champignon ne contient pas de sphingolipides ou tout au moins que ceux-ci sont très peu représentés dans son mycélium.

Dans le tableau 25 nous avons résumé l'ensemble de nos dosages. On peut tout de suite remarquer que la plus grande part du phosphore lipidique se trouve dans les PE et les PC. Ce résultat n'a rien de surprenant, puisque ces deux groupes de corps dominent chez tous les organismes, les Champignons en particulier (WEETE, 1974). MANGNALL et GETZ (1973), CHAVANT (1979) ont constaté que plus la morphologie d'un Champignon est évoluée, plus le rapport PC/PE est élevé : celui des Phycomycètes et Zygomycètes est toujours inférieur à celui des Ascomycètes. RAMI (1976) a même montré que les structures filamenteuses d'un Ascomycète contenaient plus de PE et moins de PC que ses organes de multiplication. Nous avons donc calculé le rapport PC/PE du *Leptosphaeria typhae* et suivi son évolution au cours du développement du Champignon : il correspond aux chiffres habituellement trouvés chez les Ascomycètes (CHAVANT, 1979) ; le tableau 25 permet aussi d'observer qu'il change au cours de la croissance. Il est toujours plus élevé dans les cultures éclairées et il augmente encore notablement au moment de l'apparition des périthèces. La différenciation morphologique correspond donc à une différenciation au niveau cellulaire : la composition des membranes cytoplasmiques, dont les phospholipides constituent la majeure partie (MAZLIAK, 1967), se modifie lors de la formation des organes sexués. L'augmentation de la teneur en PC de ces membranes a vraisemblablement une relation avec l'élévation de l'indice d'insaturation et de la teneur en acide linoléique de l'ensemble des lipides du Champignon : il est en effet prouvé que les PC sont impliquées dans la biosynthèse du linoléate chez l'*Aspergillus ochraceus* (CHAVANT et al., 1979) comme chez le *Mucor racemosus* (CHAVANT et al., 1979), le Tournesol (STYMNE, 1978) ou le Soja (KATES et al., 1978). BEN ABDELKADER et al. (1973), GURR et al. (1969) avaient déjà montré que les PC exercent un rôle important dans l'activité des désaturases microsomales.



TABLEAU 25
EVOLUTION DE LA COMPOSITION DE LA FRACTION 3 (PHOSPHOLIPIDES) - (MOYENNE DE 5 MESURES)

C.L. : Cardiolipides P.E. : Phosphatidyl-éthanolamines P.S. : Phosphatidylsérine
P.I. : Phosphatidyl-inositol P.C. : Phosphatidyl-cholines L.P.E. : Lyso-phosphatidyléthanolamines
L.P.C. : Lysophosphatidyl-cholines.

Sous-Fraction	5 ^{ème} JOUR		6 ^{ème} JOUR		7 ^{ème} JOUR		8 ^{ème} JOUR		9 ^{ème} JOUR		10 ^{ème} JOUR		11 ^{ème} JOUR		12 ^{ème} JOUR		13 ^{ème} JOUR	
	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O	L	O
C.L.	t	t	1,0	t	0,6	0,9	1,3	0,7	1,1	0,8	t	1,3	t	t	0,9	t	1,0	1,2
P.E.	30,5	31,6	32,1	35,7	30,9	33,8	30,1	34,2	28,7	34,1	27,8	33,9	28,0	33,1	27,9	33,2	28,3	32,9
PS + PI	9,2	10,5	7,1	4,0	7,3	6,2	5,2	8,7	6,1	8,8	6,7	8,6	7,4	8,1	6,9	7,1	7,2	7,5
P.C.	49,8	49,3	51,8	52,5	52,4	48,4	54,2	46,1	55,1	46,2	56,7	47,1	57,1	48,0	54,7	48,8	52,1	49,7
L.P.E.	3,7	3,3	3,9	3,3	3,9	5,7	4,2	5,9	4,0	5,5	3,8	4,2	3,9	5,0	4,6	5,4	6,1	4,3
L.P.C.	6,8	5,2	4,1	4,5	4,9	5,0	5,0	3,5	5,0	4,6	5,0	4,9	3,6	5,8	5,0	5,5	5,3	4,4
Rapport PC/PE	1,64	1,58	1,61	1,47	1,69	1,43	1,82	1,35	1,92	1,35	2,04	1,39	2,04	1,45	1,96	1,47	1,87	1,51



EVOLUTION DU RAPPORT PC/PE

(Représentation graphique de la dernière ligne du Tableau)

II.3 CONCLUSION

La reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae* ne provoque apparemment que de médiocres changements dans le développement du Champignon : la masse de matière sèche varie fort peu. Mais notre étude montre à l'évidence que le métabolisme des lipides est profondément modifié lors de l'induction morphogénétique : malgré une forte stimulation de la biosynthèse de ces corps, leur teneur mycélienne diminue nettement ; corrélativement, leur indice d'insaturation s'élève, ce qui prouve qu'ils sont oxydés et catabolysés encore plus vite qu'ils sont synthétisés. Une analyse plus fine de leur composition montre que les lipides de réserve (glycérides) continuent à s'accumuler, mais que par contre les lipides membranaires : stérols, lipides polaires, sont profondément modifiés. La teneur mycélienne en lipides polaires s'abaisse, leur composition se modifie : cela confirme un changement du métabolisme cellulaire que la première partie de notre Thèse laissait entrevoir. Il est certain que ce travail doit maintenant être approfondi par l'utilisation des techniques de la Biologie cellulaire (éléments marqués, microscopie électronique, etc...) afin de préciser les mécanismes de ces changements et d'essayer de comprendre quel est le processus physiologique qui les déclenche. Il faudrait en particulier situer la zone du mycélium où se produisent ces modifications : sont-elles le fait des filaments végétatifs gamétophytiques, de l'enveloppe périthéciale, elle aussi gamétophytique, ou du sporophyte ascogène ? Ou bien l'apparition de ce dernier provoque-t-elle un remaniement physiologique général de tout l'organisme ?

CHAPITRE III : MODIFICATION DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE DU CHAMPIGNON SOUS L'ACTION D'AGENTS STIMULANT OU RÉDUISANT SA REPRODUCTION SEXUÉE.

Les chapitres précédents ont montré que la reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae* s'accompagne de profondes modifications de son métabolisme lipidique. Mais ce résultat n'a été obtenu qu'en comparant les mycéliums obtenus dans deux conditions de culture seulement. Il n'est donc nullement prouvé que les variations observées aient une relation directe avec la fertilité du Champignon : elles peuvent être purement et simplement liées au fait qu'il végète dans un environnement différent. Afin de mettre en évidence une éventuelle connexion entre le métabolisme lipidique et la stérilité ou la production d'ascocarpes, il est indispensable d'étudier l'effet que divers agents stérilisants ou fertilisants exercent sur la composition en lipides du Champignon. Dans ce but, nous avons entrepris l'étude de l'action qu'exercent sur le métabolisme lipidique du *Leptosphaeria typhae* la lumière constante et l'acétate de sodium, agents stérilisants, et l'aération du mycélium par culture sur baguettes de verre, stimulant la reproduction sexuée.

III.1 RESULTATS

Pour des raisons techniques -encombrement des fioles, volume des enceintes de culture- nous avons dû scinder notre travail en deux séries d'expériences :

- 1) influence de la lumière constante, comparée à la photopériode 12/12 et à l'obscurité ;
- 2) influence de l'acétate et de l'aération, sous photopériode 12/12 et sous obscurité constante.

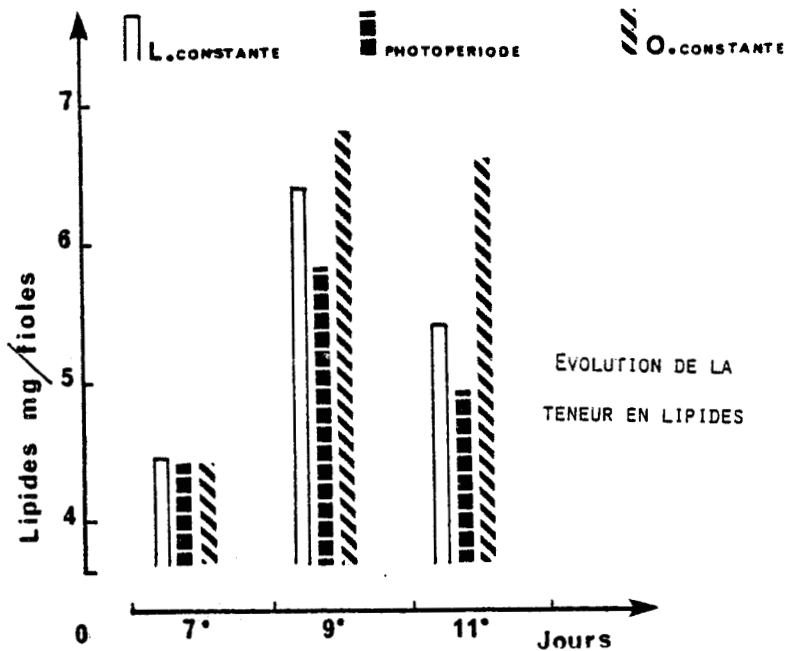
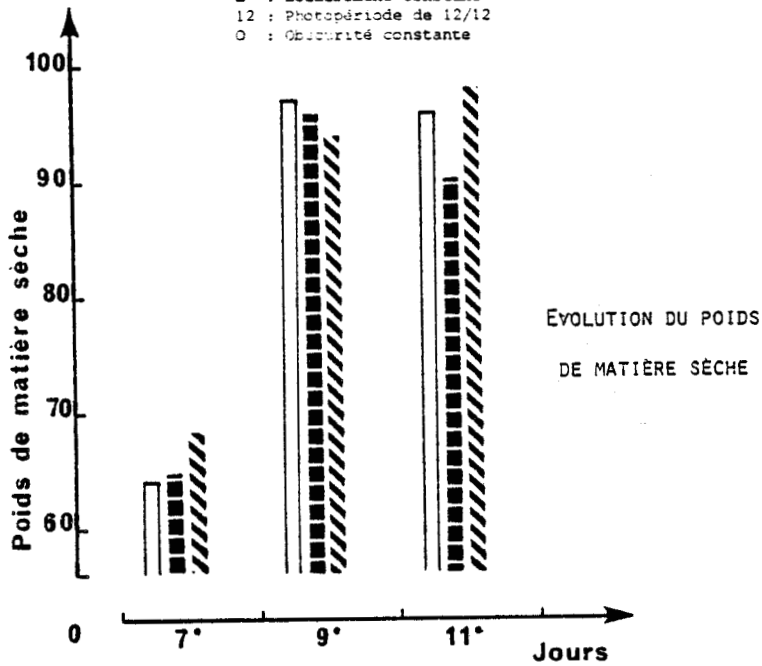
Nous avons procédé à des prélèvements aux 7ème, 9ème et 11ème jours de développement afin de situer nos analyses peu avant -7ème jour-, pendant -9ème jour- et après -11ème jour- le "virage" du métabolisme lipidique que nous avons décrit au cours des chapitres I et II.

TABLEAU 26

INFLUENCE DE LA LUMIÈRE CONSTANTE SUR LA CROISSANCE ET LA TENEUR EN LIPIDES DU "LEPTOSPHAERIA TYPHAE".- (MOYENNE DE 4 MESURES).

	7ème JOUR			9ème JOUR			11ème JOUR		
	L	12	O	L	12	O	L	12	O
Poids de matière sèche par fiole	64,0	64,8	68,2	97	96	94	96	90	98
Lipides p. 100 mg	7,0	6,8	6,4	6,5	6,0	7,2	5,6	5,4	6,7
Lipides mg / Fiole	4,45	4,4	4,4	6,3	5,8	6,8	5,4	4,9	6,6
Fraction 1 (Neutres)	53,5	52,2	54,6	52,5	55,8	52,0	55,8	57,7	51,5
Fraction 2 (Glycolipides)	15,6	14,4	12,1	12,0	11,0	11,0	16,0	10,5	15,1
Fraction 3 (Phospholipides)	30,9	33,4	33,3	35,5	33,2	37,0	28,2	31,8	33,4

L : Eclairage constant
 12 : Photopériode de 12/12
 O : Obscurité constante



(Représentation graphique des résultats les plus importants du Tableau)



III.1.1 INFLUENCE DE L'ECLAIREMENT CONSTANT

Nous avons résumé les résultats obtenus dans les tableaux 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 et 33.

Le tableau 26 montre que le Champignon se développe mal dans les enceintes de faible volume que nous sommes contraint d'utiliser pour ce genre de travail, ainsi que nous l'avons déjà constaté (p.57) au cours du chapitre II de la première partie de cette Thèse. Néanmoins, les périthèces apparaissent normalement au 7ème jour de culture dans les boîtes de Roux soumises à photopériode, alors qu'il ne s'en forme qu'une très faible quantité, très tardivement, sous éclairage constant. La teneur en lipides des cultures végétant à l'obscurité tend à s'élever après le 7ème jour ; les mycéliums éclairés, au contraire, perdent leurs lipides et cette perte est plus nette sous photopériode. C'est surtout aux dépens des fractions 2 et 3 que s'effectue ce changement.

La composition en acides gras de l'ensemble des lipides est elle aussi modifiée (tableau 27). Le degré d'insaturation de ces corps dans les cultures sous photopériode s'élève notablement entre les 7ème et 9ème jours, passant de 1,25 à 1,36, alors que, dans les mycéliums maintenus à l'obscurité, il ne varie pratiquement pas tout au long du développement. Sous éclairage constant, ce chiffre s'élève très légèrement. Ces changements sont surtout dus aux variations de la proportion d'acide linoléique ($C_{18:2}$).

Les lipides neutres (tableau 28) montrent aussi des différences entre les 3 types de cultures : sous photopériode, les proportions d'acides gras libres et de diglycérides s'élèvent entre les 7ème et 11ème jours, alors que les triglycérides tendent à perdre de leur importance par rapport aux autres composants de la Fraction 1. L'évolution générale apparaît inversée dans les autres mycéliums, surtout en ce qui concerne les acides gras libres. Malgré une proportion élevée d'acide linoléique ($C_{18:3}$), les acides gras totaux de la Fraction 1 ont un degré d'insaturation plus faible que ceux des lipides totaux (tableau 29). A partir du 9ème jour, il est toujours plus élevé sous éclairage qu'à l'obscurité : il semble que l'éclairage continu favorise la désaturation de ce type de lipides.

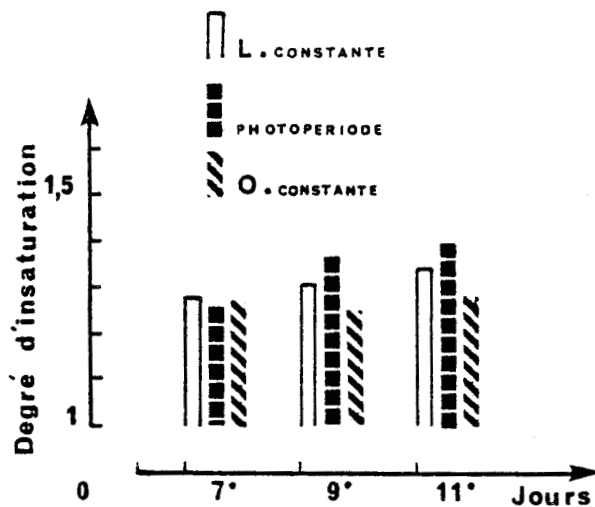
Dans la Fraction 2, le rapport "sous-fraction 1/sous-fraction 2" s'élève brutalement dans les mycéliums développés sous photopériode entre les 7ème et 9ème jours, c'est-à-dire au moment où apparaissent les premiers périthèces ; il se maintient ensuite à un niveau plus élevé que dans les cultures stériles. Chez ces dernières, on peut noter que celles qui reçoivent un éclai-

TABLEAU 27

INFLUENCE DE LA LUMIÈRE CONSTANTE SUR LA
COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES LIPIDES TOTAUX
(MOYENNE DE 4 MESURES).

Acide	7ème JOUR			9ème JOUR			11ème JOUR		
	L	12	O	L	12	O	L	12	O
C ₁₂	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C _{12:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₄	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C _{14:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₆	22,4	18,6	21,1	22,0	19,0	22,7	19,8	20,6	21,0
C _{16:1}	2,1	1,3	3,0	2,1	2,8	3,7	2,9	3,9	3,2
C ₁₈	6,7	8,9	9,2	5,4	6,7	8,2	5,7	4,6	7,3
C _{18:1}	28,3	29,9	27,2	27,4	25,0	26,3	27,8	23,1	27,8
C _{18:2}	24,4	26,0	25,0	27,7	30,8	24,4	28,6	31,2	25,4
C _{18:3}	16,1	14,3	15,5	15,4	15,7	15,3	15,2	16,6	15,3
D.I.	1,28	1,25	1,27	1,31	1,36	1,25	1,34	1,39	1,28

L : Lumière constante
12 : Photopériode
O : Obscurité constante
DI : Degré d'insaturation



EVOLUTION DU DEGRÉ D'INSATURATION

(Représentation graphique de la dernière ligne du Tableau)



TABLEAU 28

INFLUENCE DE LA LUMIÈRE CONSTANTE SUR LA COMPOSITION
DE LA FRACTION 1 (LIPIDES NEUTRES).- (MOYENNE DE 3 MESURES).

Sous-Fraction	7ème JOUR			9ème JOUR			11ème JOUR		
	L	12	O	L	12	O	L	12	O
Hydrocarbures	5,3	8,5	4,6	4,5	5,3	4,2	4,5	5,5	1,8
Esters de stérols	12,4	12,2	13,4	9,2	8,7	12,8	11,1	6,7	11,5
Triglycérides	40,2	33,0	33,9	42,0	37,0	38,4	38,6	29,6	45,9
Stérols	15,1	14,8	16,8	14,1	12,4	16,9	14,2	13,1	14,2
Diglycérides	8,4	10,6	9,1	8,3	11,4	7,4	12,0	12,3	3,9
Monoglycérides	4,0	6,1	7,3	8,7	8,0	8,2	10,6	9,5	8,5
Acides gras libres	14,6	14,8	14,9	13,2	17,2	12,1	9,0	23,3	14,2

L : Lumière constante
12 : Photopériode
O : Obscurité constante

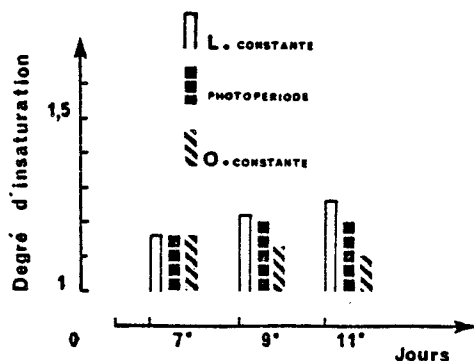
TABLEAU 29

VARIATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DE LA
FRACTION 1 (LIPIDES NEUTRES) SOUS L'ACTION DE LA
LUMIÈRE CONSTANTE.- (MOYENNE DE 3 MESURES).

Acide	7ème JOUR			9ème JOUR			11ème JOUR		
	L	12	O	L	12	O	L	12	O
C ₁₂	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C _{12:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₄	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C _{14:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₆	25,2	25,5	25,0	23,4	24,9	28,9	21,7	23,6	27,8
C _{16:1}	1,8	1,6	2,1	1,6	3,2	4,5	2,2	4,3	3,1
C ₁₈	10,0	9,3	10,1	8,6	8,8	10,2	8,7	9,5	8,3
C _{18:1}	27,9	28,8	28,1	27,3	26,0	26,1	27,1	25,2	28,3
C _{18:2}	18,8	19,0	18,5	23,8	21,0	19,0	24,3	21,1	20,4
C _{18:3}	16,3	15,8	16,2	15,3	16,1	11,3	16,0	16,3	18,1
D.I.	1,16	1,16	1,16	1,22	1,20	1,03	1,26	1,21	1,10

(Représentation graphique

de la dernière ligne du Tableau)



EVOLUTION DU DEGRÉ D'INSATURATION

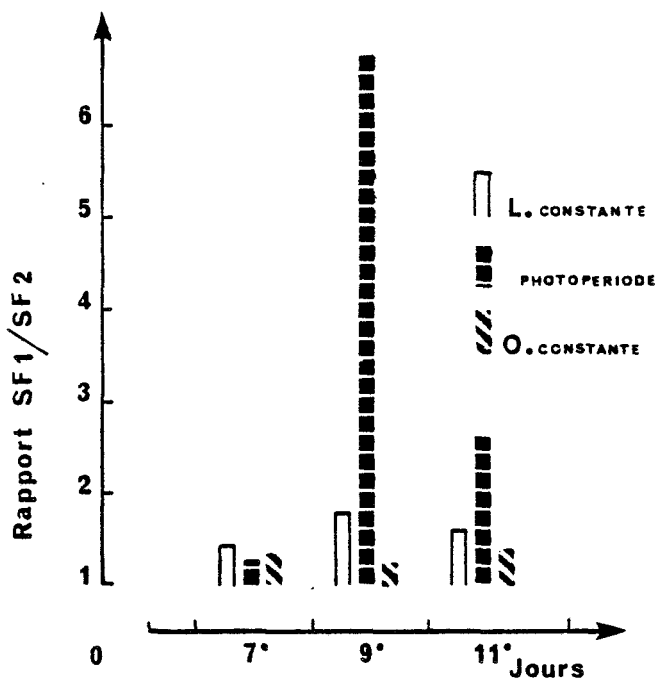
L : Lumière constante
12 : Photopériode
O : Obscurité constante
DI : Degré d'Insaturation

AUS
LILLE

TABLEAU 30
 VARIATIONS DE LA FRACTION 2 (GLYCOLIPIDES) SOUS
 L'INFLUENCE DE LA LUMIÈRE CONSTANTE.
 POURCENTAGE DES SOUS-FRACTIONS 1 ET 2
 (MOYENNE DE 3 MESURES).

Sous-Fraction	7 ^{ème} JOUR			9 ^{ème} JOUR			11 ^{ème} JOUR		
	L	12	O	L	12	O	L	12	O
1	59,3	56,4	57,4	64,2	87,1	55,6	61,3	71,9	58,0
2	40,7	43,6	42,6	35,8	12,9	44,4	38,7	28,1	42,0
Rapport 1/2	1,46	1,29	1,35	1,79	6,75	1,25	1,58	2,56	1,38

L : Lumière constante
 12 : Photopériode
 O : Obscurité constante



EVOLUTION DU RAPPORT SOUS-FRACTION 1/SOUS-FRACTION 2

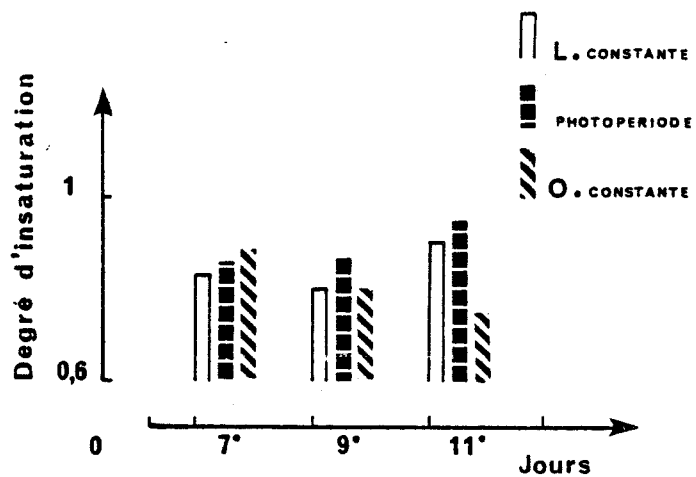
(Représentation graphique de la dernière ligne du Tableau)



TABLEAU 31
ACIDES GRAS DE LA FRACTION 2 (GLYCOLIPIDES)
POURCENTAGE RELATIF DE CHACUN DES ACIDES DÉTECTÉS
(MOYENNE DE 3 MESURES).

Longueur de chaîne	7ème JOUR			9ème JOUR			11ème JOUR		
	L	12	O	L	12	O	L	12	O
C ₁₂	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C _{12:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₄	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C _{14:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₆	34,9	33,2	31,9	39,0	35,1	38,2	34,8	33,7	37,9
C _{16:1}	3,2	2,8	1,5	3,3	3,0	3,2	3,2	3,4	2,9
C ₁₈	12,5	12,9	10,5	10,3	10,4	10,2	11,5	10,2	11,6
C _{18:1}	26,1	27,1	33,0	25,9	24,6	26,7	23,7	24,2	27,3
C _{18:2}	16,2	16,1	16,3	13,8	16,3	15,4	17,7	18,1	16,3
C _{18:3}	7,1	7,9	6,8	7,7	8,9	6,3	9,1	10,4	4,0
D.I.	0,83	0,86	0,88	0,80	0,87	0,80	0,90	0,95	0,75

L : Lumière constante
 12 : Photopériode
 O : Obscurité constante
 DI : Degré d'insaturation



EVOLUTION DU DEGRÉ D'INSATURATION

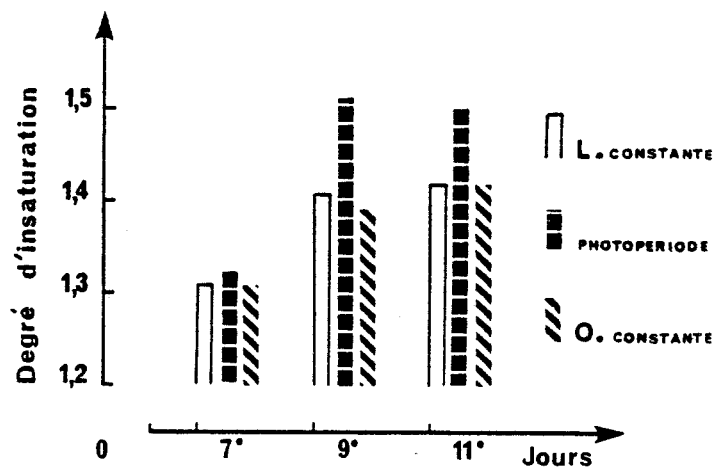
(Représentation graphique de la dernière ligne du Tableau)



TABLEAU 33
INFLUENCE DE LA LUMIÈRE CONSTANTE SUR LA COMPOSITION
EN ACIDES GRAS DE LA FRACTION 3 (PHOSPHOLIPIDES).

Acide	7ème JOUR			9ème JOUR			11ème JOUR		
	L	12	O	L	12	O	L	12	O
C ₁₂	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C _{12:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₄	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C _{14:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₆	19,6	19,0	17,1	19,5	13,2	16,1	18,7	14,7	15,8
C _{16:1}	2,2	1,0	3,2	2,1	2,2	3,1	3,3	2,0	3,4
C ₁₈	6,5	7,0	8,0	3,2	5,8	7,3	4,0	5,3	6,8
C _{18:1}	28,8	29,1	28,0	27,5	23,1	28,2	26,4	21,8	27,4
C _{18:2}	29,9	29,6	31,0	31,6	41,9	28,3	31,0	42,1	29,1
C _{18:3}	14,0	14,3	12,7	16,1	13,8	17,0	16,6	14,1	17,5
D.I.	1,31	1,32	1,31	1,41	1,51	1,39	1,42	1,50	1,42

L : Lumière constante
 12 : Photopériode
 O : Obscurité constante



EVOLUTION DU DEGRÉ D'INSATURATION

(Représentation graphique de la dernière ligne du Tableau)



rement constant recèlent une proportion de "sous-fraction 1" légèrement plus forte. La composition en acides gras de la Fraction 2 est indiquée dans le tableau 31 : on constate dès l'abord que le degré d'insaturation de ces lipides est très faible comparé à celui des lipides totaux, comme nous l'avons déjà constaté au cours du chapitre II ; on remarque aussi qu'il est plus élevé dans les cultures fertiles après le 7ème jour.

On peut observer dans le tableau 32 que, dans la Fraction 3, le rapport PC/PE augmente dans les cultures fertiles au moment de l'apparition des périthèces ; sous lumière constante, il semble peut-être y avoir une légère stimulation de la synthèse de PC, mais en tout cas très inférieure à celle qui est visible sous photopériode. Les phospholipides sont toujours très riches en acide linoléique ($C_{18:2}$) et il en résulte que leur degré d'insaturation est très élevé, surtout dans les mycéliums fertiles après le 7ème jour ; on ne note pratiquement pas de différence entre les cultures sous éclairage constant ou à l'obscurité.

III.1.2 INFLUENCE DE L'ACETATE ET DE L'AERATION

Nous avons stérilisé complètement le *Leptosphaeria typhae* en le faisant développer sur une décoction d'avoine contenant 1 % d'acétate de sodium. Inversement, nous avons stimulé sa fructification en introduisant dans un autre lot de boîtes de Roux des baguettes de verre de 6 mm de diamètre qui facilitaient le contact du mycélium avec l'air. Nous avons comparé les lipides du Champignon ainsi cultivé à ceux du même microorganisme ayant végété dans des conditions "normales" sur décoction d'avoine, sous photopériode et à l'obscurité constante (voir le chapitre I de la première partie de cette Thèse). Les résultats sont résumés dans les tableaux 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 et 41.

On constate (tableau 34) comme dans le premier chapitre de notre travail, que dans un premier temps l'acétate ralentit la croissance du Champignon, puis l'accélère ; il inhibe complètement la production de périthèces, au moins jusqu'au 11ème jour de culture ; il induit enfin une élévation de la teneur mycélienne en lipides, ce qui était tout à fait prévisible, étant donné le rôle qu'il joue dans la synthèse de tous ces corps (LEDERER, 1967 ; MAZLIAK, 1968 ; WEETE, 1974). L'aération réduit légèrement le rendement en masse sèche ; par contre, les premières périthèces apparaissent sur le mycélium dès le 6ème jour de culture, soit 24 heures plus tôt que dans les fioles-témoins, et leur nombre est nettement plus élevé. Nous remarquons que, cultivé

TABLEAU 34

INFLUENCE DE L'AÉRATION ET DE L'ACÉTATE SUR LA CROISSANCE ET
LA TENEUR EN LIPIDES DU "LEPTOSPHAERIA TYPHAE"

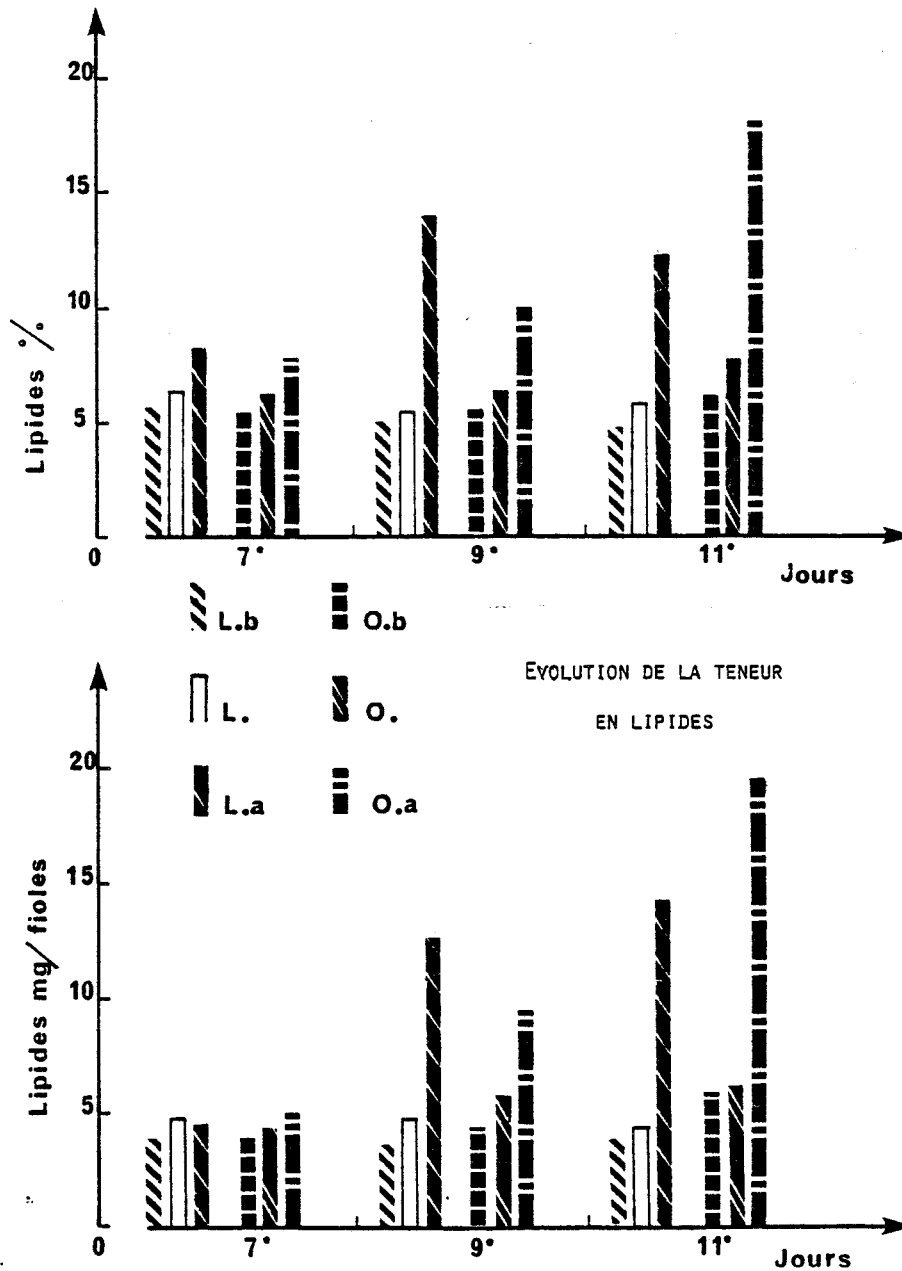
(Poids de matière sèche en mg/ fiole de culture. Pourcentage relatif de
chacune des 3 fractions de lipides séparées sur Acide Silicique).
Chaque chiffre est la moyenne de 4 Mesures.

	7ème JOUR						9ème JOUR						11ème JOUR					
	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA
Poids de matière sèche	68,6	72,8	54,2	70,7	69,8	63,2	74,1	87,5	89,5	75,4	89,8	94,3	81,0	88,3	107,5	81,4	90,5	106,5
P.100mg LIPIDES mg/Fiole	5,6	6,4	8,2	5,3	6,2	7,9	4,9	5,4	14,0	5,5	6,3	10,0	4,7	4,9	13,1	6,1	6,7	18,3
Fraction 1	54,5	51,5	64,3	52,5	62,0	86,5	57,8	52,4	68,0	48,6	45,1	90,1	63,3	60,0	75,0	65,9	51,8	90,0
Fraction 2	12,3	13,6	11,0	10,9	9,9	4,9	12,0	11,9	13,1	11,8	15,3	3,0	12,5	14,5	10,7	6,3	16,7	3,6
Fraction 3	33,2	34,9	24,7	36,6	28,1	8,5	30,2	35,7	18,9	39,6	39,6	6,9	24,2	25,5	14,3	27,8	31,5	6,4

LB : Lumière avec baguettes
OB : Obscurité avec baguettes

L : Lumière
O : Obscurité

LA : Lumière avec Acétate
OA : Obscurité avec Acétate



(Représentation graphique des résultats les plus importants du Tableau)



sur baguettes, le Champignon est pauvre en lipides dès le 7ème jour sous éclairage, alors que les mycéliums-témoins en contiennent encore 6,4 %. Chez ces derniers, la teneur lipidique s'abaisse au 9ème jour et devient inférieure à celle des cultures maintenues à l'obscurité, phénomène déjà décrit au cours du chapitre I de cette deuxième partie.

La présence d'acétate dans le milieu induit une élévation de la proportion de lipides neutres, celle-ci pouvant atteindre 90 % du total à l'obscurité. Sous photopériode, ce phénomène est un peu moins net. Le développement sur baguettes de verre entraîne aussi chez le Champignon une légère augmentation du pourcentage de lipides neutres. Sur milieu-témoin, les résultats reproduisent dans leurs grandes lignes ceux qui ont été décrits dans les chapitres précédents.

Dans les lipides totaux, l'acétate provoque un abaissement du degré d'insaturation concomitant à une augmentation de la proportion en acide palmitique (C_{16}), résultat plus net après le 7ème jour de culture, lorsque le Champignon s'adapte à cette source de carbone. L'aération, au contraire, élève le degré d'insaturation avec une augmentation de teneurs en acides linoléique et linoléinique (tableau 35). Ces observations sont valables aussi bien à l'obscurité que sous photopériode. Dans les mycéliums-témoins, l'évolution des acides gras est conforme à celle que nous avons constatée au cours des chapitres précédents : la formation des périthèces, après le 7ème jour, s'accompagne dans les mycéliums fertiles (éclairés) d'une élévation du degré d'insaturation des acides gras totaux.

Dans le tableau 36, on observe que la culture sur acétate augmente la proportion de triglycérides dans les lipides neutres du Champignon, alors que l'aération ne semble pas exercer un effet très net sur ces chiffres. Ces derniers s'abaissent aux 9ème et 11ème jours sous l'effet de l'éclairage dans tous les types de mycéliums. La lumière et l'aération provoquent une augmentation du pourcentage d'acides gras libres, alors que l'acétate réduit cette proportion. Les acides gras des lipides neutres (tableau 37) ont en général un degré d'insaturation plus faible que celui des lipides totaux, mais évoluant parallèlement à ce dernier. On constate dans les mycéliums cultivés sur acétate la présence de traces d'acides à plus longue chaîne :

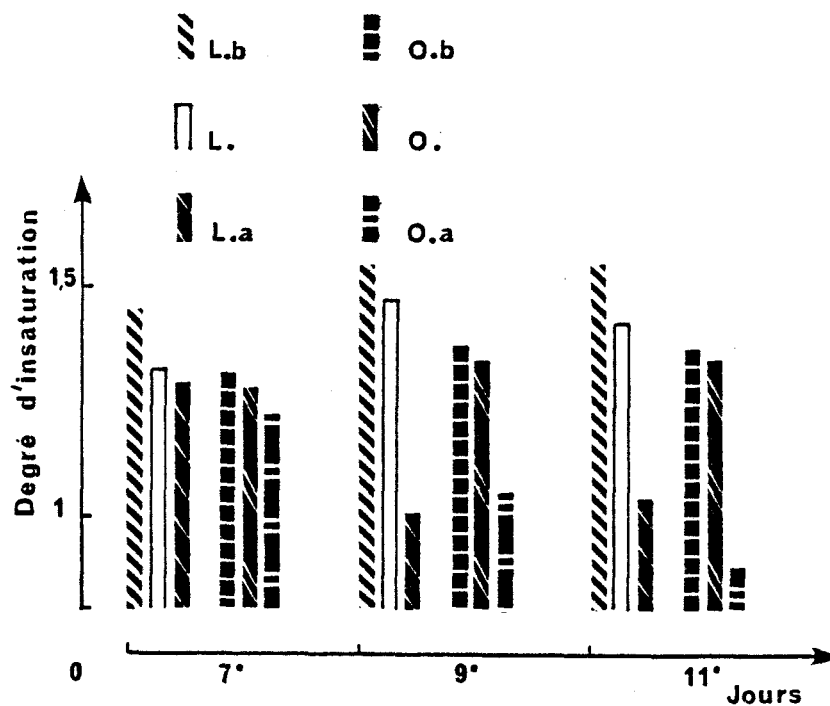
C_{20} , C_{22} , C_{24} ...

Le rapport "sous-fraction 1/sous-fraction 2" de la "Fraction 2" ("glycolipides") est toujours plus élevé dans les cultures sous photopériode ;

TABLEAU 35
 INFLUENCE DE L'AERATION ET DE L'ACETATE SUR LA COMPOSITION
 EN ACIDES GRAS DES LIPIDES TOTAUX.
 POURCENTAGE RELATIF DE CHACUN DES ACIDES GRAS DETECTES (MOYENNE DE 3 MESURES).

Longueur de chaîne	7ème JOUR						9ème JOUR						11ème JOUR					
	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA
C ₁₂	1,7	0,7	t	t	1,0	t	0,7	t	1,0	1,0	1,0	1,0	t	t	1,0	1,5	t	t
C _{12:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₄	1,9	0,6	1,0	1,2	1,9	t	0,7	t	1,0	1,0	1,0	1,3	t	1,2	1,7	0,5	t	t
C _{14:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₆	15,5	12,8	18,6	16,8	15,6	16,7	12,7	12,0	21,1	14,8	15,6	22,2	13,6	12,9	24,8	14,2	14,3	27,3
C _{16:1}	2,5	3,5	2,6	2,6	3,2	2,5	2,5	3,5	2,4	2,5	3,1	3,1	3,4	4,2	2,5	3,9	3,5	3,5
C ₁₈	6,7	12,2	8,3	8,3	8,1	7,9	6,7	8,9	11,8	9,9	10,2	10,7	5,8	6,3	10,2	6,5	8,7	11,6
C _{18:1}	21,6	27,0	28,0	22,7	23,5	32,0	23,5	29,1	33,9	23,0	22,5	31,5	23,7	26,6	28,2	26,7	27,1	34,8
C _{18:2}	29,7	28,0	26,4	29,5	29,1	25,5	30,9	30,1	19,0	30,5	31,1	20,6	32,3	34,9	21,7	33,8	34,4	17,3
C _{18:3}	20,4	15,2	15,1	18,9	17,6	15,4	22,3	16,4	8,8	17,3	15,5	9,6	21,2	13,9	9,9	12,9	12,0	5,5
D.I.	1,45	1,32	1,29	1,41	1,38	1,32	1,55	1,42	1,01	1,38	1,34	1,05	1,55	1,42	1,04	1,37	1,35	0,89

LB : Lumière avec baguettes L : Lumière LA : Lumière avec Acétate OB : Obscurité avec baguettes O : Obscurité
 OA : Obscurité avec Acétate D.I. : Degré moyen d'Insaturation



EVOLUTION DU DEGRÉ D'INSATURATION

(Représentation graphique de la dernière ligne du Tableau)



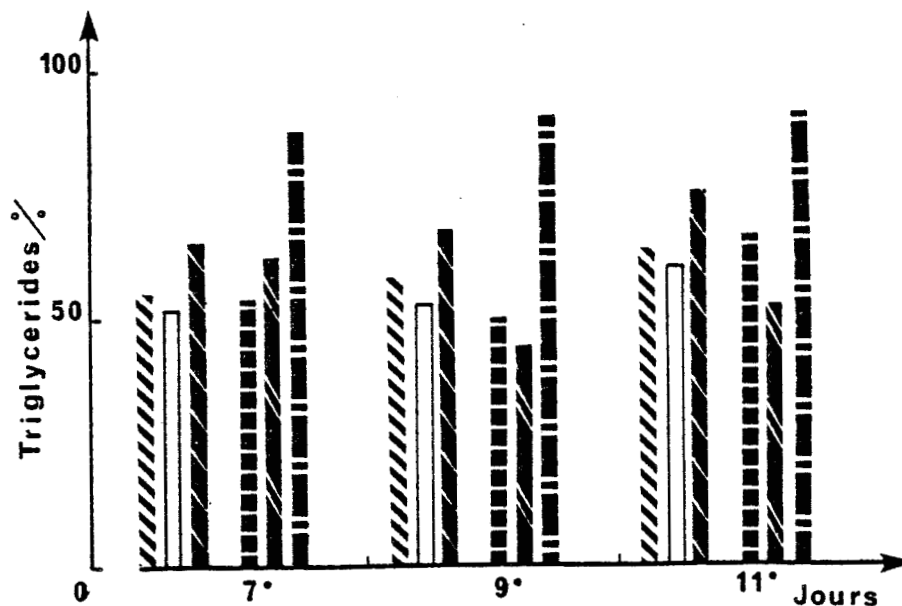
TABLEAU 36
INFLUENCE DE L'AÉRATION ET DE L'ACÉTATE SUR LA COMPOSITION
DE LA FRACTION 1 (LIPIDES NEUTRES).
POURCENTAGE RELATIF DE CHAQUE GROUPE DE LIPIDES DÉTECTÉ. (MOYENNE DE 3 MESURES).







Sous-Fraction	7ème JOUR						9ème JOUR						11ème JOUR					
	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA
Hydrocarbures	3,9	t	3,0	3,5	1,0	1,1	4,0	7,2	0,5	2,5	t	7,8	6,1	5,9	0,9	5,0	3,0	5,9
Esters de stérols	6,4	12,1	9,2	13,2	11,8	8,0	6,1	2,9	3,5	8,5	8,9	6,3	7,9	10,2	17,0	6,8	13,7	10,7
Triglycérides	46,3	57,2	60,8	48,7	51,1	64,2	47,3	46,9	65,7	55,9	57,7	66,7	34,4	31,1	57,8	55,5	54,8	66,7
Stérols	11,9	13,9	6,4	12,8	13,9	5,3	14,2	15,3	3,4	16,9	16,8	5,4	14,1	14,8	6,5	8,1	15,4	3,9
Diglycérides	6,8	1,5	4,5	5,5	3,2	6,1	6,8	5,9	7,1	4,1	4,1	4,8	8,3	8,8	3,6	6,4	3,1	7,6
Monoglycérides	3,6	t	2,0	3,5	4,1	5,7	6,0	2,1	5,9	2,6	3,8	3,9	6,5	8,1	2,4	4,9	t	2,0
Acides gras libres	21,1	15,3	14,1	12,8	14,9	9,6	15,6	18,7	13,9	9,5	8,7	6,1	22,7	21,1	11,8	16,3	10,0	3,2

LB : Lumière avec baguettes
 OB : Obscurité avec baguettes

L : Lumière
 O : Obscurité

LA : Lumière avec Acétate
 OA : Obscurité avec Acétate



 L.b  O.b
 L.  O.
 La  Oa

EVOLUTION DU POURCENTAGE DE TRIGLYCÉRIDES

(Représentation graphique des

résultats les plus importants du Tableau)



TABLEAU 37
INFLUENCE DE L'AÉRATION ET DE L'ACÉTATE SUR LA COMPOSITION
EN ACIDES GRAS DE LA FRACTION 1 (LIPIDES NEUTRES,
POURCENTAGE RELATIF DE CHACUN DES ACIDES DÉTECTÉS (MOYENNE DE 3 MESURES)

Acide	7ème JOUR						9ème JOUR						11ème JOUR					
	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA
C ₁₂	1,5	1,5	t	t	1,2	1,2	t	t	1,0	1,5	t	t	t	t	1,0	1,0	t	t
C _{12:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₄	2,3	1,2	1,4	t	1,4	1,1	t	t	1,0	1,5	t	t	t	1,0	1,0	1,0	t	t
C _{14:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₆	15,8	13,8	17,2	17,6	18,5	22,3	13,2	14,9	22,8	19,5	16,2	23,4	14,6	19,2	24,1	14,5	15,1	28,2
C _{16:1}	2,9	3,2	5,2	4,6	3,3	4,5	9,8	4,1	3,3	2,7	2,5	3,4	2,0	2,2	1,0	4,3	4,7	3,7
C ₁₈	7,0	13,3	7,4	6,9	9,3	11,5	5,6	10,9	13,1	10,3	12,2	10,9	7,3	8,4	11,4	7,2	9,6	12,6
C _{18:1}	26,5	28,1	37,1	31,8	26,4	31,3	26,2	29,5	34,4	24,1	29,9	34,2	27,9	28,9	32,2	28,4	28,9	32,3
C _{18:2}	22,4	23,0	23,1	20,0	21,2	17,2	22,3	22,9	16,3	21,9	23,1	17,8	24,7	24,3	20,1	29,7	28,6	17,4
C _{18:3}	21,6	15,9	8,6	19,1	18,7	15,9	22,9	17,7	8,1	18,5	16,1	10,3	23,5	16,1	9,2	13,9	13,1	5,8
+ de 18C	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	t	-	-	t	-	-	t
D. I.	1,39	1,25	1,14	1,34	1,28	1,18	1,49	1,33	0,95	1,26	1,27	1,04	1,50	1,28	1,01	1,34	1,30	0,88

LB : Lumière avec baguettes
 OB : Obscurité avec baguettes

L : Lumière
 O : Obscurité

LA : Lumière avec Acétate
 OA : Obscurité avec Acétate

DI : degré moyen d'Insaturation



TABLEAU 38

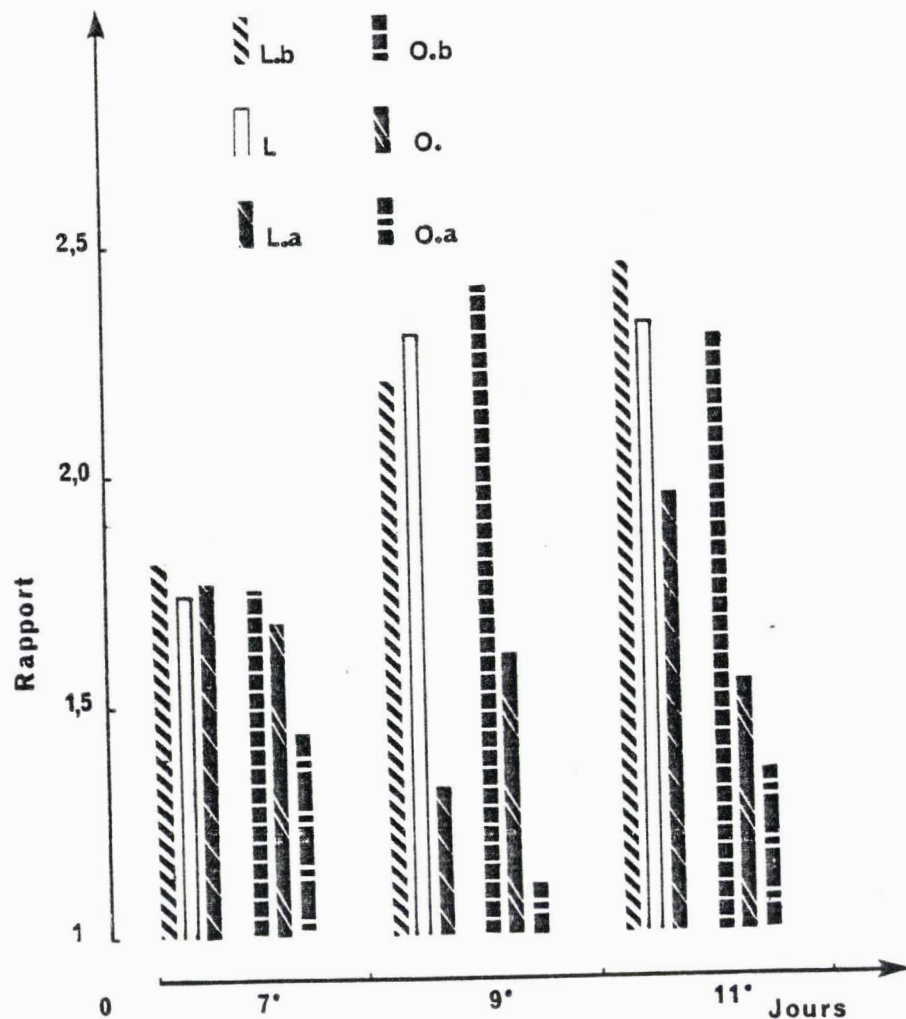
VARIATIONS DE LA FRACTION 2 (GLYCOLIPIDES) SOUS L'INFLUENCE
DE L'AÉRATION ET DE L'ACÉTATE.
POURCENTAGES RELATIFS DES DEUX SOUS-FRACTIONS.- (MOYENNE DE 2 MESURES).

	7ème JOUR						9ème JOUR						11ème JOUR					
	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA
Sous-Fraction 1	64,4	63,5	63,9	63,6	62,7	59,0	68,8	69,7	56,9	70,6	61,7	50,2	71,0	69,9	66,1	69,6	60,6	57,5
Sous-Fraction 2	35,6	36,5	36,1	36,4	37,3	41,0	31,2	30,3	43,1	29,4	38,3	49,8	29,0	30,1	33,9	30,4	39,4	42,5
Rapport 1/2	1,81	1,74	1,77	1,75	1,68	1,44	2,20	2,30	1,32	2,40	1,61	1,01	2,45	2,32	1,95	2,29	1,54	1,35

LB : Lumière avec baguettes
OB : Obscurité avec baguettes

L : Lumière
O : Obscurité

LA : Lumière avec Acétate
OA : Obscurité avec Acétate



ÉVOLUTION DU RAPPORT SOUS-FRACTION 1/SOUS-FRACTION 2

(Représentation graphique de la dernière ligne du Tableau)



TABLEAU 39
INFLUENCE DE L'AÉRATION ET DE L'ACÉTATE SUR LA COMPOSITION
EN ACIDES GRAS DE LA FRACTION 2 (GLYCOLIPIDES).
POURCENTAGE RELATIFS DES ACIDES DÉTECTÉS (MOYENNE DE 2 MESURES).

Acide	7ème JOUR						9ème JOUR						11ème JOUR					
	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA
C ₁₂	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C _{12:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₄	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C _{14:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₆	20,3	28,8	29,7	29,6	25,6	29,9	17,8	20,5	26,1	24,4	21,5	27,7	18,6	19,7	27,2	24,3	26,9	30,2
C _{16:1}	3,3	5,9	6,3	4,7	8,7	9,1	2,8	5,0	8,2	5,8	7,8	6,1	4,7	6,1	6,3	6,2	4,0	5,5
C ₁₈	4,9	7,5	7,0	13,2	15,3	12,3	12,4	11,1	6,3	13,1	14,8	7,8	10,0	9,3	4,0	11,5	16,1	7,9
C _{18:1}	25,3	22,0	22,0	28,2	29,7	30,1	26,1	25,0	37,2	27,3	31,4	38,1	26,0	25,6	39,6	23,3	22,5	31,4
C _{18:2}	31,2	21,1	22,6	15,1	13,9	11,2	25,3	23,6	17,7	17,3	16,1	17,0	27,1	24,2	19,7	20,0	19,3	20,7
C _{18:3}	15,0	14,7	12,4	9,2	6,8	7,4	15,6	14,8	4,5	12,1	8,4	3,3	13,6	15,1	3,2	14,7	11,2	4,3
D. I.	1,35	1,14	1,11	0,91	0,87	0,84	1,26	1,22	0,94	1,04	0,97	0,88	1,26	1,25	0,95	1,14	0,99	0,87

LB : Lumière avec baguettes
 OB : Obscurité avec baguettes

L : Lumière
 O : Obscurité

LA : Lumière avec Acétate
 OA : Obscurité avec Acétate

DI : Degré moyen d'Insaturation



il est plus fort que le témoin dans les mycéliums aérés, plus faible dans ceux ayant végété sur acétate (tableau 38). Dans la composition en acides gras de la Fraction 2, on constate (tableau 39) les mêmes variations que dans le chapitre II.

Les phospholipides de la Fraction 3 (tableau 40) contiennent les mêmes corps quelles que soient les conditions de culture, mais leur répartition quantitative est différente suivant les cas. En particulier, la proportion de PC et le rapport PC/PE sont plus élevés dans les mycéliums éclairés, l'aération augmente ces chiffres, l'acétate les diminue. La répartition des acides gras (tableau 41) montre une prédominance de l'acide linoléique entraînant un degré d'insaturation élevé, mais évoluant parallèlement à celui des lipides totaux.

III. 2 DISCUSSION

De tous les paramètres qui ont varié au cours de cette série d'expériences, celui qui exerce les contraintes les plus fortes sur le métabolisme lipidique du Champignon est l'acétate : il provoque une forte augmentation de la teneur en lipides, se traduisant surtout par une accumulation de lipides neutres et plus particulièrement de triglycérides, accompagnée d'une baisse du degré d'insaturation des acides gras. L'ensemble de ces faits est l'indice d'une stimulation anormale de la synthèse lipidique, aboutissant à un "engorgement lipidique" du mycélium (MORQUER, 1931) et à la suppression quasi-totale de la fertilité sexuelle du Champignon.

La comparaison des deux séries d'expériences permet de dégager quelques constatations :

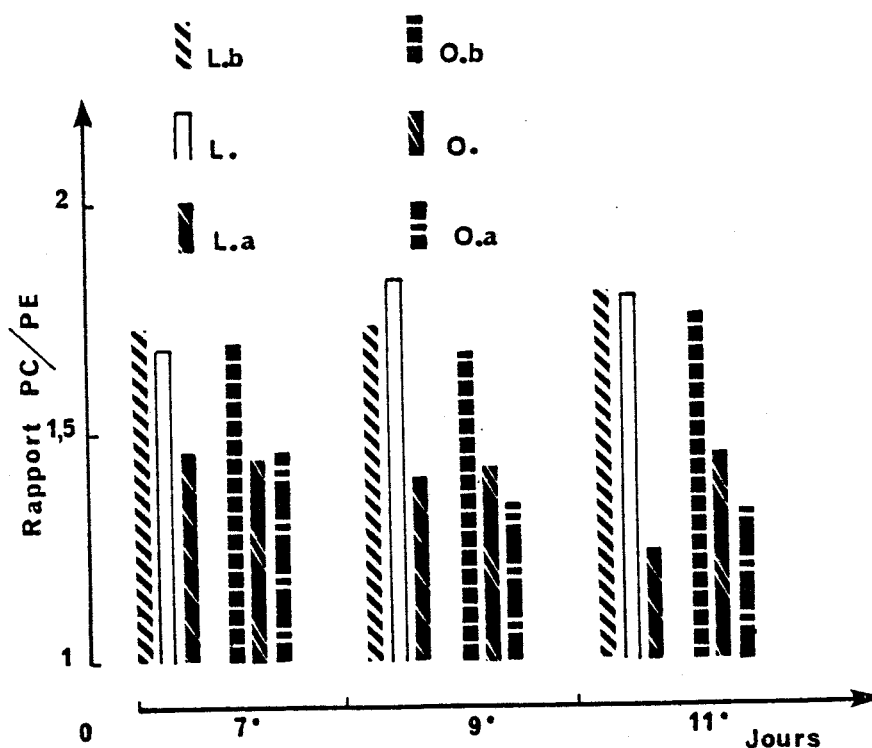
- dans tous les cas, l'éclairage, qu'il soit appliqué 12 heures sur 24 ou constamment, entraîne un abaissement de la teneur mycélienne en lipides, après le 7ème jour de végétation ;
- il augmente la proportion d'acides gras libres ;
- il élève le degré moyen d'insaturation ; il accélère donc le "turn-over" lipidique.

Dans la Fraction 2, il accroît le rapport "sous-fraction 1/sous-fraction 2" après le 7ème jour de culture. De même, il provoque une hausse du rapport PC/PE.

TABLEAU 40
 INFLUENCE DE L'AÉRATION ET DE L'ACÉTATE SUR LA COMPOSITION
 DE LA FRACTION 3 (PHOSPHOLIPIDES).- (MOYENNE DE 3 MESURES).

	7ème JOUR						9ème JOUR						11ème JOUR					
	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA
CL	0,5	1,0	0,9	0,9	t	1,0	t	1,3	1,4	0,9	t	1,5	t	1,3	t	1,5	1,6	0,9
PE	31,9	31,7	33,3	31,4	34,6	33,9	31,9	29,9	33,7	30,6	35,2	34,1	31,7	30,1	35,6	30,1	35,2	35,0
PS + PI	7,7	7,2	7,5	5,6	8,3	7,3	8,6	7,4	8,6	8,2	7,9	8,7	7,5	8,9	9,8	8,3	7,4	8,0
PC	55,3	53,1	48,6	53,1	49,8	49,5	55,1	54,8	47,3	51,2	49,9	45,6	57,2	54,0	44,2	52,7	51,1	46,1
LPE	3,4	3,9	4,3	4,5	6,4	4,2	1,0	3,4	4,3	3,4	3,5	5,4	1,0	2,1	5,0	3,3	1,1	4,7
LPC	1,2	3,1	5,4	4,5	10,9	4,1	3,4	3,2	4,7	4,9	3,5	4,7	2,6	3,6	5,4	4,1	3,6	5,3
Rapport PL/PE	1,73	1,68	1,46	1,69	1,44	1,46	1,73	1,83	1,40	1,67	1,42	1,34	1,80	1,79	1,24	1,75	1,45	1,32

CL : Cardiolipides
 PE : Phosphatidyl-éthanolamines
 PS : Phosphatidyl-sérines
 PI : Phosphatidyl-Inositol
 PC : Phosphatidyl-Cholines
 LPE : Lyso-PE
 LPC : Lyso-PC
 LB : Lumière avec baguettes
 OB : Obscurité avec baguettes
 L : Lumière
 O : Obscurité
 LA : Lumière avec Acétate
 OA : Obscurité avec Acétate



EVOLUTION DU RAPPORT PC/PE

(Représentation graphique de la dernière ligne du Tableau)



TABLEAU 41
INFLUENCE DE L'AÉRATION ET DE L'ACÉTATE SUR LA COMPOSITION
EN ACIDES GRAS DE LA FRACTION 3 (PHOSPHOLIPIDES).- (Moyenne de 3 Mesures)

Acide	7ème JOUR						9ème JOUR						11ème JOUR					
	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA	LB	L	LA	OB	O	OA
C ₁₂	0,5	t	t	t	1,0	t	1,0	t	t	t	t	1,0	1,0	t	1,5	t	t	t
C _{12:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₄	0,5	t	1,0	2,0	2,3	t	0,5	t	t	0,6	1,1	1,0	t	t	1,3	t	t	t
C _{14:1}	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
C ₁₆	17,4	17,1	21,2	14,9	14,4	16,0	10,6	11,2	20,2	13,5	14,5	21,7	12,5	10,3	25,4	14,0	12,7	26,8
C _{16:1}	1,1	4,5	1,0	2,4	3,2	1,0	1,9	2,5	2,0	2,3	3,9	3,0	2,7	6,3	3,9	3,7	3,5	3,3
C ₁₈	5,4	11,5	9,2	9,1	7,4	6,4	5,0	7,9	10,0	9,4	9,7	10,1	5,3	6,1	8,2	5,4	7,8	8,6
C _{18:1}	20,5	20,0	21,9	21,0	20,8	32,3	21,6	28,0	33,6	22,6	21,3	28,9	19,6	25,4	24,3	25,8	24,3	36,7
C _{18:2}	35,3	31,0	28,5	33,2	35,1	29,3	41,9	35,3	27,4	35,1	34,8	24,9	39,1	39,9	24,5	39,9	40,2	19,2
C _{18:3}	19,3	15,9	17,2	17,4	15,8	15,0	17,5	15,1	6,8	16,5	14,7	9,4	19,8	12,0	10,3	11,2	10,9	5,4
D. I.	1,50	1,34	1,31	1,42	1,42	1,37	1,60	1,46	1,11	1,45	1,39	1,10	1,60	1,48	1,08	1,43	1,42	0,95

LB : Lumière avec baguettes
 OB : Obscurité avec baguettes

L : Lumière
 O : Obscurité

LA : Lumière avec Acétate
 OA : Obscurité avec Acétate

DI : Degré moyen d'Insaturation



Mais, au cours de la première expérience, ces modifications sont faibles dans les mycéliums recevant un éclairage constant, alors qu'elles sont beaucoup plus nettes dans les cultures végétant sous photopériode, qui, seules, portent des périthèces dès le 7ème jour de culture. Dans la deuxième série expérimentale, on peut remarquer que ces variations sont encore amplifiées lorsque le Champignon est cultivé sur baguettes et qu'il produit un nombre plus élevé d'ascocarpes. La relation entre la réorientation du métabolisme lipidique et la fertilité sexuelle du Champignon constatée au cours des chapitres précédents est donc confirmée. Mais le *Leptosphaeria typhae* ne produit de périthèces que lorsque ce remaniement métabolique atteint un seuil élevé, qui n'est obtenu que sous photopériode : la présence de baguettes dans le milieu de culture à l'obscurité, ou l'éclairage constant provoquent des changements insuffisants pour déclencher le processus de reproduction sexuée à eux seuls.



T R O I S I E M E P A R T I E

VARIATIONS DES STEROLS ET DES SUBSTANCES
PHOTOMIMETIQUES EN RELATION AVEC LA REPRODUCTION
SEXUEE DU "LEPTOSPHAERIA TYPHAE" EN FONCTION
DES CONDITIONS DU MILIEU

INTRODUCTION

Nous avons jusqu'à présent pu constater qu'un certain nombre de changements physiologiques liés aux variations du Milieu induisent chez notre Champignon l'état de fertilité sexuelle. Mais aucun de nos résultats ne nous permet d'expliquer quels sont les mécanismes biologiques qui provoquent chez le *Leptosphaeria typhae* la production d'appareils reproducteurs : comment le stimulus lumineux agit-il sur le métabolisme cellulaire ? Quel est le récepteur photosensible qui le reçoit ? Comment le message est-il transmis à la cellule et au mycélium tout entier ? Voilà quelques-unes des multiples questions demeurées sans réponse et que les travaux à venir devront élucider.

Dans l'ultime partie de notre ouvrage, nous allons exposer quelques recherches préliminaires menées dans le but d'apporter un début de réponse à ces interrogations.

En particulier, nous envisageons d'étudier les variations des stérols mycéliens, possibles précurseurs d'éventuelles hormones sexuelles, en fonction des modifications de la reproduction sexuée induites par les variations des paramètres externes.

Dans le même esprit, nous dirons quelques mots sur la présence chez le Champignon de mycosporine (P310) qui semble jouer un rôle de transporteur d'énergie.

CHAPITRE I : ETUDE DES STEROLS DU "LEPTOSPHERIA TYPHAE"

Il est maintenant bien établi que les stérols et leurs dérivés jouent un rôle primordial dans l'induction des phénomènes sexuels de beaucoup de Champignons. En effet, dès 1937, LEONIAN et LILLY obtenaient la reproduction sexuée de certains *Phytophthora* en ajoutant à leur milieu de culture des extraits alcooliques de pois ; ils pensaient déjà que les substances responsables de cette stimulation étaient de nature stérolique, ce qui a été confirmé depuis, notamment par HASKINS et al. (1964) ; ceux-ci observent qu'un *Pythium* parasite d'un *Fusarium* ne produit d'appareils sexués que lorsqu'il se développe aux dépens de son hôte. En culture pure, ils parviennent à restaurer sa fertilité sexuelle en incorporant à son milieu de culture des extraits lipidiques du *Fusarium* ou d'autres huiles végétales. Une analyse des mélanges ainsi étudiés leur montre que la fraction la plus active est un stérol : probablement le β -sitostérol. ELLIOTT et al., constatant en 1964 que le *Phytophthora cactorum* demeurait végétatif sur un milieu synthétique et produisait des oospores sur "oatmeal-agar", montrèrent que c'étaient les stérols provenant de la farine d'avoine qui induisaient la reproduction sexuée ; l'addition de stérols au milieu artificiel entraînait le même phénomène. De multiples travaux ont été consacrés aux *Pythium*, *Phytophthora*, *Plasmodiophora brassicae*, etc... (Mc COR-KINDALE et al., 1969 ; HENDRIX, 1970, 1975 ; ELLIOTT, 1977) avec des résultats identiques. JACQUET (1979) obtient ainsi des oospores du *Pythium tracheiphilum* sur un milieu enrichi en divers stérols, dont le cholestérol et le sitostérol. Ces Phycomycètes pathogènes de plantes semblent incapables de synthétiser des stérols, ne pouvant pas en particulier transformer le squalène ; dans la nature, ils utilisent ceux de leur hôte pour produire leurs oocystes et spermatocystes. Le rôle des stérols dans la reproduction sexuée des Champignons est mis en lumière de manière différente par NELSON (1967) qui bloque ce processus chez l'Ascomycète *Cochliobolus cactorum* en le traitant avec des inhibiteurs de la synthèse de ces corps ; il restaure un développement normal

des ascocarpes en rajoutant des stérols au milieu de culture.

Chez les Phycomycètes, ces composés seraient transformés en hormone stéroïde, comme l'ont montré ELLIOTT et SANSOME (1977) chez le *Phytophthora cactorum*. Dès 1939, RAPER démontre l'existence chez l'*Achlya bisexualis* de substances de nature hormonale agissant sur la différenciation et la maturation des spermatocystes et des oocystes. ARSENAULT et al. en 1968 identifient la substance A, émise par le siphon femelle et permettant la formation sur le siphon mâle de l'ébauche du spermatocyste, comme étant un dérivé du stigmastérol, qu'ils dénomment "anthéridiol". En 1975, l' "oogoniol" substance B de RAPER, produite par le siphon mâle porteur d'ébauches de spermatocystes et permettant au siphon femelle de différencier l'oocyste est identifié comme étant lui aussi de nature stérolique (Mc MORRIS et al.).

Les stérols sont donc bien impliqués dans la différenciation des appareils sexués et ont toutes les caractéristiques des phéromones. Mais chez les Ascomycètes, tel que le *Leptosphaeria typhae*, le problème est plus difficile à aborder car ces organismes, contrairement aux précédents, ont la faculté de synthétiser à partir de l'acétate les stérols utiles à la constitution de leurs membranes et à les reconvertir en phéromones en quantités très faibles, au-delà des possibilités de l'analyse.

Dans le fonctionnement général de la cellule, les stérols peuvent donc jouer trois rôles :

- précurseurs d'autres stéroïdes ;
 - hormones contrôlant les transports actifs d'ions ou de molécules ;
 - composants des membranes, réglant en partie la perméabilité de celles-ci.
- FINKELSTEIN et CASS (1967) prouvent en effet que le cholestérol réduit la perméabilité à l'eau de membranes artificielles, résultat confirmé sur du matériel naturel, en particulier par GRUNWALD (1971).

Ces diverses considérations ont incité notre laboratoire à étudier les stérols du *Leptosphaeria typhae*. A la suite des premiers travaux de LACOSTE (1965), VANDEWALLE (1973) puis ALAIS et al. (1974) ont analysé le mycélium développé sur décoction d'avoine à 20 g/l. Leurs résultats, exprimés par le tableau 42, montrent que les cultures ayant végété à l'obscurité contiennent une quantité de stérols légèrement plus forte que les mycéliums fertiles et surtout que chez elles la portion estérifiée est plus importante. Le mycélium végétatif et stérile contient une variété plus grande de stérols libres que les cultures soumises à éclaircissement chez lesquelles on trouve le seul ergostérol, la portion estérifiée ayant une composition plus voisine dans les deux cas.

TABLEAU 42 : MASSE ET POURCENTAGES RELATIFS DES STEROLS CONTENUS DANS LE MYCELIUM DU *Leptosphaeria typhae* (en mg pour 100 g de mycélium sec) CULTIVE SUR EAU D'AVOINE.

Stérols	Lumière		Obscurité	
	Libres	Estérifiés	Libres	Estérifiés
Total	16 (52 %)	15 (48 %)	14 (42 %)	19,2 (58 %)
Ergostérol	100 %	58 %	86 %	54 %
Lichestérol	-	20 %	-	-
Epistérol	-	21 %	9,8 %	21 %
24-éthyl-cholestène	-	1 %	0,2 %	-
Dihydro-5-6-ergostérol	-	4 %	-	-
Mélange de stérols en C29 et C30 mono et di-insaturés	-	-	-	25 %

Si on considère (MOOR, 1967 ; BARTLETT et MERCER, 1974 ; ELLIOTT et al., 1974 ; NES, 1974) que la fraction estérifiée est une forme de réserve, alors que les stérols libres sont les seuls actifs et incorporés aux membranes, ces résultats permettent de considérer que le *Leptosphaeria typhae* utilise plus vite ses stérols lorsqu'il est sexuellement actif. Le fait que l'ergostérol constitue alors 100 % de la portion libre peut être rapproché des résultats de JACQUET (1979) montrant que ce composé ne provoquait pas la formation d'appareils sexués chez le *Pythium tracheiphilum* ; il ne serait peut-être pas utilisé par le *Leptosphaeria typhae* pour synthétiser d'éventuelles hormones, qui proviendraient de stérols mineurs. Il ne s'agit bien entendu que d'hypothèses que des recherches ultérieures devront vérifier. On peut aussi comparer notre Champignon au *Mucor rouxii* (SAFE, 1973) : dans le mycélium aérobie de ce zygomycète, l'ergostérol constitue 90 % de la fraction stérols libres, alors que les cultures anaérobies contiennent une plus grande variété de ces corps. Cette comparaison confirme les résultats exprimés dans les premières parties de cette Thèse : lorsqu'il est cultivé sous photopériode, le *Leptosphaeria typhae* oriente son métabolisme dans un sens plus oxydatif ("aérobie").

On pourrait faire une grave objection aux travaux de VANDEWALLE et ALAIS et al. : le *Phytophthora cactorum* (ELLIOT, 1964) sexualise en présence d'extraits d'avoine ; on pourrait donc craindre que les résultats obtenus sur le *Leptosphaeria typhae* soient faussés par la composition du milieu de culture. L'analyse du lyophilisat de cette décoction n'a révélé la présence d'aucun stérol (VANDEWALLE, 1973 ; ALAIS et al., 1974) mais il n'est pas certain qu'elle ne contienne pas d'éventuels précurseurs. Nous avons donc mis au point un milieu synthétique chimiquement défini pour pallier à cette incertitude.

I. 1 MISE AU POINT D'UN MILIEU SYNTHÉTIQUE

Ce travail a été publié dans la "Revue de Mycologie" (1974-1975), 39, 43-52.

Nous reproduisons ci-dessous le texte de cette publication.

**ÉTUDE DES CONDITIONS DE DÉVELOPPEMENT
ET DE REPRODUCTION SEXUÉE DU LEPTOSPHAERIA TYPHAE
MISE AU POINT D'UN MILIEU DE CULTURE
CHIMIQUEMENT DÉFINI**

par Gérard VIDAL, Thérèse LEBBE et Louis LACOSTE*

INTRODUCTION

Le Leptosphaeria typhae (Ascomycète, Pyrénomycète, ordre des Pléosporales) constitue un matériel de choix pour l'étude des phénomènes physiologiques accompagnant la différenciation sexuelle chez les champignons. En effet, depuis les travaux de LACOSTE (1965), nous savons obtenir à volonté en milieu liquide la forme ascosporee ou la forme stérile en jouant uniquement sur les conditions d'éclairement des cultures. D'autre part, aucune forme spécialisée de multiplication asexuée n'apparaît, qui pourrait rendre difficile l'interprétation des résultats d'analyses biochimiques.

Jusqu'à présent, au cours de nos diverses études (VIALA, VIDAL) nous avons toujours cultivé ce Micromycète sur un milieu complexe semi-naturel : une décoction de farine d'avoine à 20 g/l. Ce substrat permet au champignon une croissance mycélienne suffisante accompagnée d'une abondante production de périthèces. Par contre, il présente deux inconvénients : nous ne sommes pas certains que sa composition soit rigoureusement constante d'une série expérimentale à l'autre et il nous interdit toute étude des excréments mycéliens. Pour la suite de nos travaux, nous avons donc cherché à mettre au point un milieu absolument synthétique. Celui-ci, de constitution parfaitement connue, devait assurer au champignon un développement comparable à celui que lui permet la décoction d'avoine, et ceci en phase liquide afin que l'on puisse facilement séparer le mycélium de son substrat nutritif.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous disposons d'une souche monoascosporale isolée au micromanipulateur de Fonbrune par LACOSTE (1965). Les cultures étaient placées dans les conditions optimales que celui-ci a définies pour l'obtention des périthèces : 18°C et éclairage de 12 heures par jour par tubes fluorescents «blanc brillant de luxe» (1500 ergs/cm²/sec.²). Les premiers essais étaient pratiqués sur milieu gélosé en tubes de 25 X 200 mm, les études plus approfondies en boîtes de Roux d'un litre contenant 100 ml de milieu liquide; dans ce dernier cas, la croissance

* Groupe de Mycologie Fondamentale et Appliquée, Laboratoire de Cryptogamie, U.E.R. de Biologie, Université des Sciences et Techniques de Lille, B.P. 36 - 59650 VILLENEUVE D'ASCQ.

G. VIDAL, T. LEBBE & L. LACOSTE

mycélienne était mesurée avec précision par la méthode des poids de matière sèche. Le point de départ de cette étude fut le milieu défini par l'un de nous (1965) à partir des travaux de MORQUER (1931).

- KH ₂ PO ₄	1,6 g
- Ca (PO ₄ H ₂) ₂ , 2 H ₂ O	0,8 g
- Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	0,5 g
- Mn SO ₄ , 5 H ₂ O	0,02 g
- Zn SO ₄ , 7 H ₂ O	0,02 g
- Cu SO ₄ , 5 H ₂ O	0,01 g
- Eau distillée	1 litre.

Cette solution est diluée de moitié au moment de l'emploi. On y ajoute alors 4 g/l de maltose, 0,360 g/l de KNO₃, 100 µg/l de Thiamine et 5 µg/l de biotine. La production mycélienne est, dans ces conditions, nettement plus forte que sur le milieu témoin. Il n'apparaît que peu de périthèces en fin de croissance.

Notre but était d'obtenir le plus grand nombre possible d'organes sexuels, à la date la plus précoce possible, sans trop réduire la croissance mycélienne. C'est en faisant varier successivement les divers paramètres de ce milieu initial que nous avons cherché à y parvenir. Les critères de jugement étaient les suivants : croissance mycélienne, pigmentation du mycélium, richesse en lipides, date d'apparition des premières ébauches périthéciales, date de maturité et quantité de périthèces.

La croissance mycélienne doit atteindre un certain seuil au dessous duquel le champignon est incapable de produire des fructifications. Mais, sur un milieu trop riche, elle devient exubérante et l'état de fertilité sexuelle n'est jamais atteint. Il convient donc d'obtenir un équilibre entre des limites qui sont d'ailleurs très proches l'une de l'autre. Cette obligation est aussi valable pour la pigmentation et la richesse en lipides du mycélium. Celui-ci est normalement pratiquement incolore. Mais, 24 heures environ avant l'apparition des périthèces, il se pigmente discrètement de taches verdâtres aux endroits où ceux-ci se formeront. Lorsqu'il y a surnutrition et installation progressive de la stérilité, cette coloration s'étend à tous les filaments et devient de plus en plus foncée. Nous avons symbolisé ce phénomène par trois chiffres : 0 : peu ou pas de pigment; 1 : pigmentation faible; 2 : pigmentation forte.

L'observation microscopique des filaments mycéliens montre que la reproduction sexuée n'apparaît que lorsque le champignon est suffisamment riche en réserves lipidiques. Par contre, un excès de graisses s'accompagne toujours de stérilité. Nous avons régulièrement observé le mycélium et nous exprimons les résultats de nos observations par les chiffres suivants : 1, lorsqu'on trouve un ou deux globules lipidiques par article mycélien; 2 pour 3 à 4 globules; 3 : nombreux globules.

Nous avons exprimé la richesse relative en périthèces par un nombre directement proportionnel à leur quantité, en prenant pour base 100 les fioles-témoins contenant la décoction d'avoine à 20 g/l.

LEPTOSPHAERIA TYPHAE

RÉSULTATS

Source d'azote

Nous avons essayé individuellement diverses sources d'azote en maintenant la concentration de cet élément à 50 mg/l. La solution de base était le milieu de LACOSTE.

L'azote minéral fut fourni sous différentes formes, plus ou moins oxydées ou réduites. Comme sources d'azote organique, nous avons retenu les 18 acides aminés que contient la décoction d'avoine (VIALA, 1972) et quelques bases puriques et pyrimidiques.

Nous avons pu classer ces différents corps en fonction de l'effet qu'ils exercent sur le champignon :

- *Croissance faible, pas de périthèces :*

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, cystéine, leucine, isoleucine, lysine, méthionine, phénylalanine, tryptophane.

- *Croissance presque normale, peu ou pas de périthèces :*

NaNO_3 , NaNO_2 , $\text{NH}_4 \text{NO}_3$, asparagine, glutamine, tyrosine, thymine, cytosine, uracile.

- *Bonne croissance, peu de périthèces, apparaissant tardivement :*

KNO_3 , arginine, acide aspartique, acide glutamique, proline, valine, adénine, guanine.

- *Bonne croissance, nombre de périthèces élevé :*

glycocolle, histidine, sérine.

En milieu liquide, les périthèces apparaissent plus précocement sur glycocolle et sérine (10ème jour) que sur histidine (11ème jour). Nous avons essayé les divers mélanges possibles, en parties égales, de ces trois corps, tous ensemble et deux par deux. Le mélange glycocolle-sérine a donné les meilleurs résultats. Nous l'avons donc considéré comme source d'azote optimale.

Concentration en azote

Cet élément était fourni sous la forme du mélange glycocolle-sérine à parties égales, à diverses concentrations. Les résultats sont résumés dans le tableau 1. La croissance est à peu près semblable pour toutes les concentrations. Les plus faibles d'entr'elles sont les plus favorables à la sexualisation du champignon. On peut aussi remarquer qu'elles provoquent une plus grande pigmentation et une plus forte accumulation lipidique dans les cellules. La concentration de 50 mg/l (glycocolle 134 mg/l + sérine 188 mg/l) assure l'apparition plus précoce d'un plus grand nombre de périthèces et constitue donc l'optimum.

G. VIDAL, T. LEBBE & L. LACOSTE

Tableau 1. — Étude de l'effet de la concentration en azote en milieu liquide.

Milieu	Croissance 10ème jour (mg / fiole)	Pigmentation	Lipides	Périthèces	
				Date d'apparition	Quantité relative
Sans N	—	0	?	0	0
N : 25 mg/l	175 mg	2	2	11	40
50 mg/l	214 mg	1	2	11	50
100 mg/l	239 mg	0	1	13	20
200 mg/l	251 mg	0	1	13	10
Avoine : 20 g/l	202 mg	0 - 1	1	6 - 7	100

Source de carbone

Le milieu semi-naturel témoin contient les glucides suivants (VIALA, 1972) : glucose, fructose, xylose, maltose, saccharose, raffinose, stachyose, dextrine, amidon. Nous les avons retenus pour notre étude et avons complété cette liste par : lévulose, mannose, galactose, lactose. Nous les avons essayés aux concentrations de 1,25 g/l, 2,5 g/l, 5 g/l, 10 g/l, et 20 g/l. La cellulose qui, en milieu gélosé, donne d'excellents résultats (LACOSTE, 1964), n'a pu être étudiée puisque notre but était la mise au point d'un milieu liquide.

Dans tous les cas, nous avons obtenu une bonne croissance. Nous avons donc classé les diverses sources de carbone en fonction de la date d'apparition et du nombre de périthèces. Ceux-ci se forment sur tous les milieux, mais les meilleurs métabolites se sont avérés être : le maltose, le glucose et le xylose. L'étude en milieu liquide nous a incités à utiliser le xylose à la concentration de 2,5 g/l (tableau 2).

Tableau 2. — Comparaison de diverses sources de carbone en milieu liquide.

	Croissance au 10ème jour (mg/fiole)	Pigmentation	Lipides	Périthèces	
				Date d'apparition	Quantité relative
Maltose					
1,25 g/l	80	0	1	13	15
2,5	100	0	1	12	30
5	230	1	2	11	40
10	470	2	3	11	40
20	430	2	3	11	15
Glucose					
1,25 g/l	99	0	1	14	10
2,5	151	0	1	12	20
5	195	1	2	11	30
10	250	2	3	11	30
20	246	2	3	11	30
Xylose					
1,25 g/l	114	0	1	9 - 10	40
2,5	125	0	1 - 2	9	60
5	129	1	2	9	50
10	154	2	3	10	40
20	180	2	3	10	40

LEPTOSPHAERIA TYPHAE

Vitamines

Sur un milieu strictement dépourvu de facteurs de croissance, le *Leptosphaeria typhae* donne un mycélium réduit et ne produit aucun périthèce. Le mélange biotine-thiamine utilisé par LACOSTE permet un bon développement.

Nous avons voulu vérifier si un apport d'autres facteurs de croissance ou si une modification des concentrations initiales pouvait améliorer la production de périthèces. Nous avons essayé dans le milieu considéré comme optimal jusque là (xylose, glyocolle, sérine) les vitamines qui sont le plus souvent nécessaires aux champignons (BARNETT, LILLY) : thiamine : 100 $\mu\text{g/l}$, pyridoxine : 100 $\mu\text{g/l}$, acide para-aminobenzoïque : 200 $\mu\text{g/l}$, acide folique : 20 $\mu\text{g/l}$, panthoténate de calcium : 200 $\mu\text{g/l}$, biotine : 5 $\mu\text{g/l}$, meso-inositol : 1 mg/l, nicotinamide : 100 $\mu\text{g/l}$, vitamine B₁₂ : traces. Seule la biotine s'est avérée indispensable au développement du microorganisme. Nous avons ensuite essayé des associations des trois vitamines qui étaient apparues les meilleures : biotine, thiamine, pyridoxine. L'association biotine-thiamine s'est montrée la plus efficace. La thiamine n'est pas absolument nécessaire au champignon, mais sa présence assure une amélioration des résultats par rapport à la biotine seule (tableau 3).

Tableau 3. — Étude de diverses associations de vitamines en miliet gélosé.

Milieu	Croissance	Périthèces	
		Date d'apparition	Quantité relative
Sans vitamine	+	15	rare
Thiamine	+	15	rare
Biotine	++	9	50
Pyridoxine	+	16	rare
Biotine + Thiamine	+++	9	60
Biotine + Pyridoxine	++	9	50
Thiamine + Pyridoxine	+	15	rare
Biotine + Thiamine + Pyridoxine	+++	9	60
Avoine 20 g/l	+++	6	100

Le nombre de croix exprime la valeur relative de la croissance par rapport à celle obtenue sur Avoine 20 g/l.

Des variations de la concentration de ces substances n'exercent que peu d'effets sur les résultats sitôt qu'un seuil minimum est dépassé. Après étude de ce paramètre, nous avons retenu les concentrations suivantes : Biotine 10 $\mu\text{g/l}$ + Thiamine 100 $\mu\text{g/l}$.

Éléments minéraux

LACOSTE avait déjà constaté qu'une dilution de moitié de la solution minérale de composition «classique» initiale améliorerait les résultats. Nous avons fourni au champignon des dilutions de plus en plus fortes du milieu initial

G. VIDAL, T. LEBBE & L. LACOSTE

contenant les sources de carbone et d'azote et les vitamines optimales. Les résultats résumés dans le tableau 4 indiquent qu'une dilution au 1/8 ou au 1/16 du milieu initial donnera le meilleur développement.

Tableau 4. — Étude de l'effet de la dilution de la solution minérale - Milieu gélosé

Dilution du milieu	Périthèces	
	Date d'apparition	Quantité relative
1/1	10	40
1/2	10	60
1/4	8	70
1/8	8	90
1/16	8	90
Avoine 20 g/l	6	100

Cas du fer

Si, pour un bon équilibre des constituants du milieu minéral de LACOSTE, on y ajoute 0,04 g/l de $\text{SO}_4 \text{F}_2$, il apparaît un précipité qui perturbe gravement la composition de la solution. Au cours des expériences qui précèdent, nous n'avons pas fourni ce composé au champignon, ce qui n'a apparemment entraîné pour lui aucun inconvénient, les autres sels apportant sans doute du fer sous forme d'impuretés. Nous avons malgré tout cherché à introduire un apport supplémentaire de cet élément dans la solution afin de savoir s'il s'y trouvait en quantité suffisante. Nous l'avons incorporé au milieu optimal sous forme chélatée en ajoutant 5 ml/l de la solution suivante : $\text{SO}_4 \text{Fe}$, 7 H_2O 1 g/l, EDTA Na_2 1,325 g/l. Nous avons constaté une légère augmentation du nombre des périthèces (tableau 5) qui nous a incités à maintenir cet apport dans notre milieu.

Tableau 5. — Influence d'un apport de fer chélaté - Milieu gélosé

Milieu	Croissance	Pigmentation	Périthèces	
			Date d'apparition	Quantité relative
Sans fer	+++	1	8	80
Avec fer	+++	1	7 - 8	90 - 100
Avoine 20 g/l	+++	1	6	100

Oligo-éléments

Les résultats obtenus avec le milieu complet ainsi constitué étaient très satisfaisants, mais nous avons pensé qu'ils pouvaient être améliorés par un apport d'éléments catalytiques. Nous avons donc ajouté à ce milieu 1 ml/l de la solution d'oligo-éléments conseillé par POCHON et TARDIEUX (1962). Le nombre des périthèces formé étant augmenté (tableau 6), nous avons étudié séparément

LEPTOSPHAERIA TYPHAE

l'action de chacun des corps contenus dans la solution : tous exerçaient une action favorable, à l'exception de l'iode et de l'aluminium. Nous avons donc éliminé ces deux ions de notre milieu.

Tableau 6. — Influence d'un apport d'oligo-éléments - Milieu liquide

Milieu	Croissance au 10 ^{ème} jour	Périthèces	
		Date d'apparition	Quantité relative
Sans oligo-éléments	202 mg	9	80 - 90
Avec	205 mg	9	100

Le pH

Au cours de toutes les expériences précédentes, nous ajustions le pH du milieu à 6,0 avant autoclavage. Cette valeur avait été choisie empiriquement. Une étude de l'influence sur le champignon de la variation du pH entre 3 et 9 nous a montré que l'optimum se situe entre 5 et 7, toutes les valeurs comprises entre ces deux limites donnant des résultats sensiblement égaux. Nous avons donc conservé le chiffre initial.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le milieu définitif est donc composé à partir de trois solutions minérales :

A : KH_2PO_4 : 1,6 g; $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2, 2\text{H}_2\text{O}$: 0,8 g; $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g, $\text{MnSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$: 0,02 g; $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,02 g; $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g, Eau : 1000 ml.

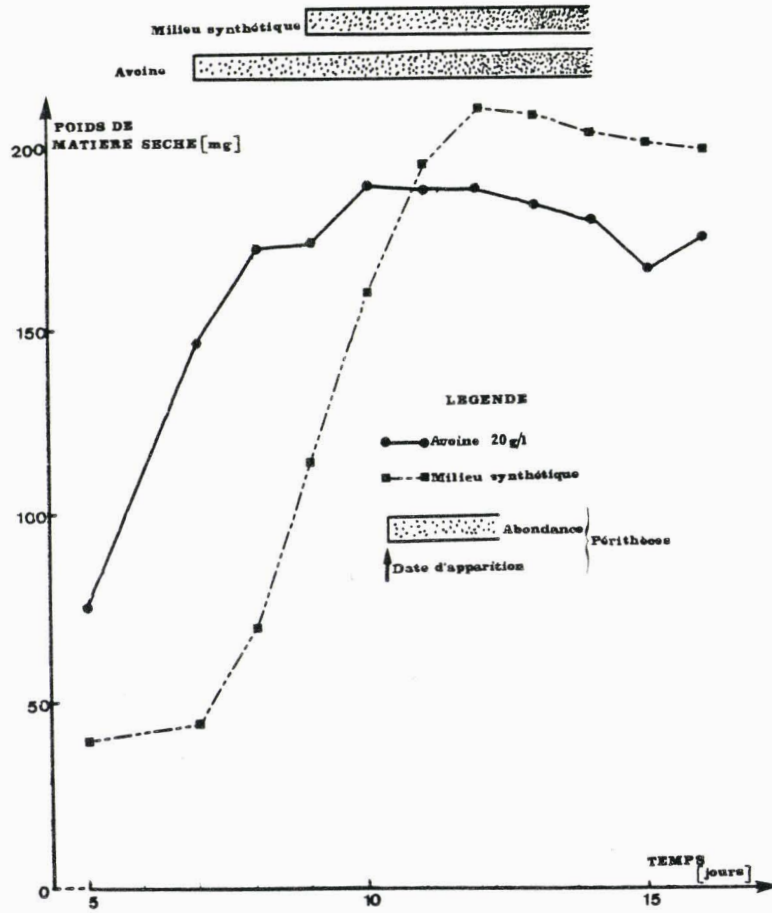
B : $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 1 g; EDTA Na_2 : 1,325 g; Eau : 1000 ml.

C : H_3BO_3 : 120 mg; $\text{NaMo}_7\text{O}_{27}$: 200 mg; $\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$: 200 mg; $3\text{CdSO}_4, 8\text{H}_2\text{O}$: 200 mg; $\text{NiCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$: 30 mg; Eau : 1000 ml.

Le milieu comprend : solution A : 125 ml; solution B : 5 ml; solution C : 1 ml; eau q.s.p. : 1000 ml; xylose : 2,5 g; glycocolle : 134 mg; sérine : 188 mg; biotine : 10 μg ; thiamine : 100 μg . Le pH est ajusté à 6.

Ce milieu, de constitution relativement complexe mais parfaitement connue, nous donne donc des résultats constants et reproductibles (Fig. 1). Tout au long de cette étude, nous avons remarqué la nécessité de diluer fortement notre solution par rapport aux milieux utilisés habituellement en Mycologie depuis RAULIN, en passant par MOLLIARD, MORQUER, BARNETT, etc... Ceci s'explique par le fait que le phénomène principalement recherché est la différenciation sexuelle, qui apparaît rarement sur des milieux concentrés favorisant plutôt un excès de croissance. Ainsi, DEHORTER (1972) obtient des périthèces du *Nectria galligena* sur un bouillon de pomme de terre non glucosé dilué au 1/4 de la quantité initiale de pomme de terre introduite habituellement dans le classique «P.D.A.», sur lequel le champignon est toujours stérile. Dans ce cas comme

G. VIDAL, T. LEBBE & L. LACOSTE



LEPTOSPHAERIA TYPHAE

dans celui du *Leptosphaeria typhae*, on ne peut pas parler de véritable «affaement» (TURIAN, 1969); nous pensons qu'il s'agit plutôt d'un retour à l'équilibre physiologique naturel du microorganisme, par suppression d'un excès d'éléments nutritifs.

On peut être aussi surpris, à première vue, que le glyocolle et la sérine soient les meilleures sources d'azote, alors que des corps plus couramment utilisés pour la culture des champignons, tels que les acides glutamiques et aspartiques par exemple, donnent de mauvais résultats. Ceci peut s'expliquer si on considère que le glyocolle et la sérine font tous deux partie du «pool» métabolique de la sérine; le champignon éprouve vraisemblablement quelques difficultés à synthétiser les acides aminés de ce groupe et il est indispensable de les lui fournir si on veut qu'il se développe normalement. On peut aussi noter que le glyocolle est pour la cellule une source d'acide succinique facilement utilisable; or, nous savons (VIALA, VIDAL) que la sexualisation du *Leptosphaeria typhae* s'accompagne d'une forte accélération du cycle citrique, provoquant ainsi une métabolisation très rapide du succinate. La sérine pourrait alors être considérée comme un précurseur du glyocolle. Des études de physiologie cellulaire permettraient vraisemblablement de vérifier ces hypothèses.

La figure 1 montre que, lorsque le champignon est cultivé sur notre milieu synthétique, son développement est retardé d'environ deux jours par rapport au milieu témoin. Ce retard apparent de croissance et de différenciation pourrait n'être en fait qu'un retard de la germination des ascospores qui servent à l'ensemencement; ceci serait dû à l'absence d'inducteurs de germination, efficaces à très faible dose et sans action sur la quantité de croissance du mycélium. Ce phénomène a déjà été étudié par HASHIMOTO et al. (1972) sur les microconidies du *Trichophyton mentagrophytes*. Le décalage de la courbe de croissance vers la droite peut aussi provenir de la phase d'adaptation du Micromycète à un milieu beaucoup moins complexe que la décoction d'avoine, et par conséquent plus difficile à assimiler.

Enfin, il est important de remarquer que, dans le cas du *Leptosphaeria typhae*, et dans nos conditions de culture, les périthèces se forment au cours de la phase de croissance active du mycélium, alors que généralement la forme de reproduction sexuée des Ascomycètes apparaît lorsque l'organisme entre en voie de sénescence. Cette apparition relativement précoce des périthèces témoigne toujours du bon équilibre du milieu et semble assez générale puisque ce résultat se retrouve chez le *Nectria galligena* (DEHORTER, 1972).



G. VIDAL, T. LEBBE & L. LACOSTE

BIBLIOGRAPHIE

- BARNETT H.L. & LILLY V.G., 1947 — The effect of biotin upon the formation and development of perithecia, asci and ascospores by *Sordaria fimicola*. *Amer. J. Bot.* 34 : 196-204.
- BARNETT H.L. & LILLY V.G., 1947 — The relation of thiamin to the production of perithecia by *Ceratostomella fimbriata*. *Mycologia* 39 : 699-708.
- BARNETT H.L. & LILLY V.G., 1950 — Influence of nutritional and environment factors upon asexual reproduction of *Choanephora cucurbitarum* in culture. *Phytopath.* 40 : 80-89.
- DEHORTER B., 1972 — Biologie et physiologie de la reproduction sexuée du *Nectria galligena* Bres. Thèse de 3ème Cycle, Lille, 149 p.
- HASHIMOTO T., WU C.D.R. & BLUMENTHAL H.J., 1972 — Characterization of l-leucine induced germination of *Trichophyton mentagrophytes* microconidia. *J. Bacteriol.* 112 : 967-976.
- LACOSTE L., 1964 — La reproduction sexuelle de divers *Leptosphaeria* sur un milieu semi-synthétique. *C.R. Acad. Sc.* 258 : 2877-2880.
- LACOSTE L., 1965 — Biologie naturelle et culturale du genre *Leptosphaeria* Cesati et De Notaris. Déterminisme de la reproduction sexuelle. Thèse, Toulouse, 234 p.
- LEBBE Th., 1968 — Croissance et développement du *Leptosphaeria typhae* sur milieu synthétique. D.E.S., Lille, 63 p.
- LILLY V.G. & BARNETT H.L., 1947 — The effect of thiamin, biotin, and food concentration on the formation of perithecia by *Chaetomium convolutum*. *Amer. J. Bot.* 34 : 594.
- MOLLIARD M., 1924 — Retentissement de la composition minérale du milieu nutritif sur la structure du *Sterigmatocystis nigra*. *C.R. Acad. Sc.* 178 : 1865-1867.
- MORQUER R., 1931 — Recherches morphogénétiques sur le *Dactylium macrosporium*. Thèse, Paris, 391 p.
- POCHON J. & TARDIEUX P., 1962 — *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. Ed. de la Tourelle, St Mandé, 108 p.
- TURIAN G., 1969 — *Différenciation fongique*, Paris, Masson éd., 144 p.
- VIALA G., 1972 — Développement du *Leptosphaeria typhae*. Métabolisme intermédiaire et reproduction sexuée. Thèse, Toulouse, 137 p.
- VIALA G. & VIDAL G., 1972 — Reproduction sexuée, croissance et métabolisme intermédiaire chez le *Leptosphaeria typhae*. *Physiol. Vég.* 10 : 481-494.
- VIDAL G. & VIALA G., 1973 — Influence de la date d'éclaircissement sur la fructification et le métabolisme du *Leptosphaeria typhae*. *Ann. Sc. Nat., Botanique*, 12ème série, 14 : 53-70.

I.2. INFLUENCE DU MILIEU DE CULTURE SUR LA COMPOSITION EN STÉROLS DU "LEPTOSPHAERIA TYPHAE".

Nous avons comparé la composition en stérols du Champignon développé sur eau d'avoine et sur notre milieu synthétique (Phytochemistry, 1976, 15, 49-51).

I.2.1 - MATERIEL ET METHODES

Le Champignon est cultivé en boîtes de Roux d'un litre contenant 100 ml de milieu liquide. Après 10 jours, soit 24 heures après l'apparition des premiers périthèces sur milieu synthétique, le mycélium est recueilli par centrifugation, lavé, puis stabilisé par lyophilisation. Il est extrait par l'éther de pétrole, l'éthanol et l'éther éthylique en extracteur de Soxhlet à l'abri de la lumière et sous atmosphère d'azote.

- Isolement et fractionnement des stérols :

Les stérols libres sont précipités à la digitonide. Les stérols estérifiés sont saponifiés par la potasse méthanolique à 10 % et précipités. Les stérols sont purifiés sur silice G (solvant : C_6H_6 -EtOAc, 5:1). Un premier fractionnement est obtenu par CCM Al_2O_3 - $AgNO_3$ (solvant 2 $CHCl_3$ -pétrole- Me_2CO , 6:3:1). Après propionylation, chaque famille de stérols est de nouveau séparée par CCM Al_2O_3 - $AgNO_3$ (solvant 3 hexane- C_6H_6 , 4:1) (13). La chromatographie gazeuse a été réalisée sur colonne de 3% SE 30 sur chromosorb W 100-120 traité HMDS à 225°, le débit d'azote étant de 40 ml/min. Les spectres de masse sont mesurés sur appareil MS 12 à basse résolution et sur MS 9 (14000) à haute résolution.

- Evaluation des pourcentages relatifs des différents stérols :

Les stérols sont séparés en quatre zones par chromatographie en couche mince préparative. Les poids des stérols ainsi isolés permettent d'évaluer les proportions relatives entre l'ergostérol (R 0.08), le mélange d'épistérol et de stérols monoinsaturés (R 0;53), le 5.6 déhydro ergostérol (R 0.62) et le 24 éthyl cholestane (R 0.68). La comparaison des hauteurs des pics de base de l'épistérol et des stérols Δ_5 dans le spectre de masse du mélange permet d'évaluer les proportions relatives entre les stérols mono et di insaturés. Nous prenons comme hypothèse que ces proportions relatives seraient égales si les intensités de ces pics de base étaient identiques.

Ces pourcentages sont confirmés par l'analyse pondérale des propionates de l'épistérol et des stérols Δ_5 mono insaturés. L'analyse de ce dernier mélange est conduite sur les propionates. La comparaison des hauteurs des pics des ions à m/c = M.74 (perte d'acide propionique) permet d'évaluer la composition du mélange en se basant sur la même hypothèse que précédemment. La chromatographie en phase gazeuse a vérifié cette évaluation.

Le travail d'isolement et d'analyses chimiques a été réalisé par Madame J. ALAIS, Chargée de Recherches au C.N.R.S. au Laboratoire de Chimie Organique Physique de notre Université (Professeur LABLACHE-COMBIER).

I.2.2 - RESULTATS

Les stérols isolés représentent 0,12 % du poids de mycélium lyophilisé obtenu sur milieu synthétique, soit une quantité quatre fois plus importante que celle recueillie dans les cultures sur eau d'avoine (0,03 %). Les poids et pourcentages relatifs des stérols libres et estérifiés sont donnés dans le tableau 43 en les comparant à ceux déterminés à partir des cultures effectuées sur eau d'avoine (VANDEWALLE, 1973 ; ALAIS et al., 1974). Le tableau 44 donne la nature des stérols isolés. On peut constater que le Champignon contient du cholestérol uniquement lorsqu'il est cultivé sur notre milieu synthétique (voir tableau 42).

TABLEAU 43 : POIDS ET POURCENTAGES RELATIFS DES STEROLS CONTENUS DANS LE MYCELIUM DU *Leptosphaeria typhae* (en mg pour 100 g de mycélium sec), sous photopériode.

Stérols	Libres	Estérifiés
Sur milieu synthétique	103 (91 %)	10 (9 %)
Sur eau d'avoine	16 (52 %)	15 (48 %)

TABLEAU 44 : NATURE DES STEROLS ISOLES CHEZ LE *Leptosphaeria typhae* CULTIVE SUR MILIEU SYNTHETIQUE (les pourcentages sont donnés entre parenthèses) ET SOUS PHOTOPERIODE.

Libres	Estérifiés
Ergostérol (62 %)	Ergostérol (12 %)
Epistérol (9 %)	Epistérol (32 %)
5,6 dihydroergostérol (25 %)	5,6 dihydroergostérol (25 %)
Cholestérol (1 %)	Cholestérol (1 %)
Sitostérol (1 %)	24 éthyl cholestène 5 ol 3B (6 %)
Sitostanol (1,75 %)	24 éthylcholestane ol 3B (18 %)
Campestérol (0,25 %)	

I.2.3 - DISCUSSION

La différence est très forte entre le mycélium cultivé sur notre milieu sous photopériode et celui qui a végété dans les mêmes conditions sur eau d'avoine : en présence du milieu synthétique, les stérols sont 4 fois plus abondants ; la répartition entre stérols libres (91 % au lieu de 52 %) et estérifiés (9 % contre 48 %) est également profondément modifiée.

Le composé en C₂₉ trouvé par VANDEWALLE (1973) et ALAIS et al. (1974) et assimilé au sitostérol est également présent et même en plus grande quantité sur le milieu synthétique. Il constitue donc bien un stérol d'origine fongique. Il faut aussi noter la présence de cholestérol, tant libre qu'estérifié. Ce stérol, longtemps considéré comme uniquement animal, a déjà été découvert dans les Algues rouges (FEREZOU et al., 1974), des plantes supérieures (DJERASSI et al., 1964) et des Champignons, comme le *Penicillium funiculosum* (CHEN et HASKINS, 1963), ou le *Nectria galligena* (DEHORTER et al., 1979). Mc CORKINDALE et al. (1969) pensent qu'il y a une relation entre la présence de cholestérol dans le mycélium et la composition des parois de celui-ci : les espèces à parois cellulosiques seules synthétiseraient ce corps, alors que les Champignons à parois chitineuses produiraient principalement de l'ergostérol. MERCER et BARTLETT (1974) émettent des doutes sur cette relation et pensent que le cholestérol est plus largement répandu chez les Champignons. Notre résultat tend à confirmer leur opinion et à prouver que la biosynthèse du cholestérol est davantage en rapport avec la nature du milieu de culture qu'avec la constitution chimique de la paroi cellulaire.

Les stérols libres sont essentiellement localisés dans les membranes (NES, 1974 ; GOTTLIEB, 1971) ; l'utilisation de substrats variés entraîne inévitablement une modification de la structure de celles-ci et par conséquent des différences dans la composition en stérols du mycélium. En fait, la composition stérolique qualitative du *Leptosphaeria typhae* après culture sur milieu synthétique en présence de lumière présente plus d'analogie avec celle obtenue après culture sur eau d'avoine, mais à l'obscurité. Donc, sur le milieu synthétique utilisé en présence de lumière -facteur indispensable à la sexualisation- le Champignon fructifie mais présente une biosynthèse stérolique très différente de celle qui intervient en culture sur eau d'avoine : il accumule une

quantité de stérols plus grande et ne semble en utiliser qu'une faible partie pour la synthèse des hormones sexuelles.

I.3 STÉROLS ET REPRODUCTION SEXUÉE DU "LEPTOSPHAERIA TYPHAE" EN FONCTION DE LA TENEUR DU MILIEU DE CULTURE EN XYLOSE.

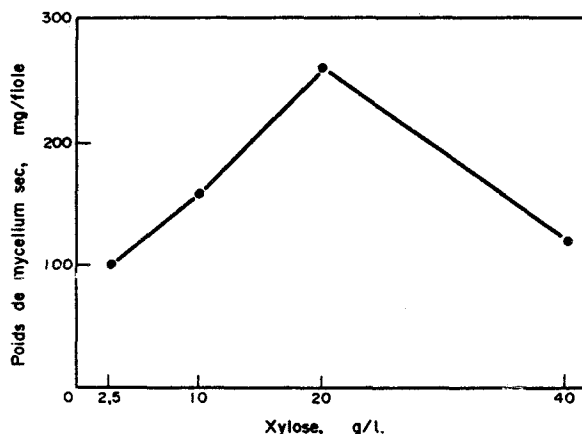
Nous avons, au cours de cette expérience, essayé de stériliser progressivement le *Leptosphaeria typhae* en le cultivant sur des milieux de plus en plus riches en xylose : 2,5-10-20-40 g/l. Le Champignon produit sur le milieu le plus dilué des quantités de périthèces comparables à celles qu'il forme sur eau d'avoine, alors qu'il est purement végétatif sur le plus concentré, sa fertilité évoluant régulièrement entre ces deux extrêmes : peu fertile à 10 g/l, presque stérile à 20 g/l (Phytochemistry, 1979, 18, 1405).

Nous voulions éviter ainsi une expérience de type "tout ou rien" de façon à pouvoir saisir une évolution de la composition stérolique du mycélium au fur et à mesure de sa stérilisation progressive.

I.3.1 - RESULTATS

Les cultures étaient arrêtées au 10ème jour. A ce moment-là le poids de matière sèche recueilli augmente presque proportionnellement à la teneur en xylose jusqu'à 20 g/l ; au-delà, la croissance est inhibée et la masse de mycélium réduite (figure 24).

FIGURE 24



Evolution du poids de mycélium sec obtenu en fonction de la teneur du milieu en xylose.

Les quantités de stérols extraites des cultures du *Leptosphaeria typhae* dans les différentes conditions sont données dans le tableau 45. On constate une diminution régulière de cette quantité jusqu'à 20 g/l de xylose, puis une forte augmentation lorsque le milieu contient une proportion élevée de glucide (40 g/l). La nature et les pourcentages respectifs des différents stérols isolés du *Leptosphaeria typhae* sont donnés dans le tableau 46. On constate une grande diversité

TABLEAU 45 : QUANTITES DE STEROLS TOTAUX, LIBRES ET ESTERIFIES
(en mg pour 100 g de mycélium lyophilisé) ISOLES DU
Leptosphaeria typhae AUX DIFFERENTES CONDITIONS
CULTURALES (les pourcentages relatifs des stérols
libres et estérifiés sont donnés entre parenthèses)

Conditions culturales	Stérols totaux	Stérols libres	Stérols estérifiés
2,5 g/l xylose	120	109 (91 %)	11 (9 %)
10 g/l xylose	62	60 (97,5 %)	2 (2,5 %)
20 g/l xylose	38	36,5 (96,5 %)	1,5 (3,5 %)
40 g/l xylose	160	149 (98 %)	11 (7 %)

de composés, aussi bien libres qu'estérifiés. Le stérol libre le plus abondant est l'ergostérol. Sa proportion par rapport aux autres corps s'élève lorsqu'on augmente la teneur en xylose puis diminue au-delà de 20 g/l pour devenir, à 40 g/l, inférieure à ce qu'elle est à 2,5 g/l. Le stigmastérol suit une courbe inverse ; le campestérol, autre précurseur de l'ergostérol, est à peu près constant. Le cholestérol seul voit sa proportion s'élever régulièrement quand augmente la concentration en xylose.

Le pourcentage de stérols estérifiés est toujours inférieur à 9 %. Ce sont les 5-6 dihydroergostérol et l'épistérol qui en constituent l'essentiel.

I.3.2 - DISCUSSION

La stérilisation progressive du *Leptosphaeria typhae*, par des doses croissantes de xylose, but de l'expérience, s'accompagne jusqu'à 20 g/l d'une stimulation de la croissance végétative. Un apport de glucide plus abondant entraîne une inhibition drastique du développement, qui pourrait être due à un "engorgement métabolique" des cellules ou à l'effet d'une pression osmotique trop élevée gênant les échanges entre les cellules et le milieu.

Le tableau 45 montre que la teneur en stérols du Champignon s'abaisse au fur et à mesure de sa stérilisation progressive : au contraire, chez le *Gnomonia leptostyla* (FAYRET et al., 1979) et le *Rhizopus arrhizus* (WEETE, 1974), à une orientation du développement dans le sens végétatif

correspond une augmentation du contenu stérolique. Cette opposition apparente pourrait être expliquée par le fait que le *Leptosphaeria typhae* a un développement végétatif strictement mycélien alors que les deux autres Champignons différencient des spores asexuelles ; mais, lors des premiers travaux de VANDEWALLE (1973) et ALAIS et al. (1974) la stérilisation du Champignon par culture à l'obscurité augmentait la richesse mycélienne en stérols : il semble donc que la concentration du milieu de culture influe sur la teneur en stérols plus fortement que la reproduction sexuée. Par contre, lorsque le milieu contient 40 g/l de xylose, le mycélium devient très riche en stérols : il pourrait s'agir d'une réaction cellulaire visant à réduire la perméabilité membranaire afin de diminuer les pertes d'eau, comme semble l'indiquer l'élévation de la proportion de cholestérol, qui est beaucoup plus efficace que le sitostérol, le stimastérol ou l'ergostérol pour rendre imperméables les membranes (FINKELSTEIN et CASS, 1967 ; GRUWALD, 1971). On peut considérer que, dans ce milieu, le Champignon rencontre des conditions pathologiques, ainsi que le montre l'abaissement des poids de matière sèche totale.

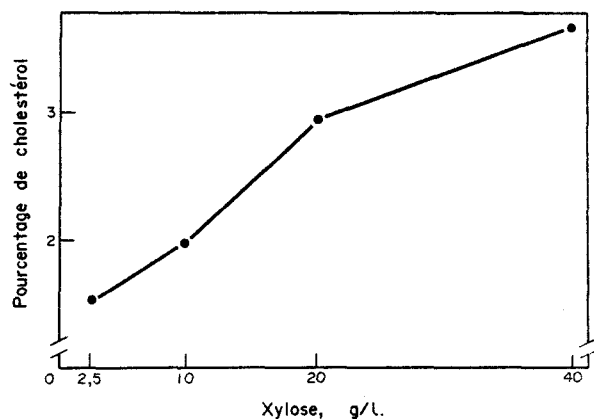
L'ergostérol est considéré chez le *Gnomonia leptostyla* (FAYRET et al., 1979) comme une sorte d'indicateur de l'état de sexualisation du Champignon : plus la proportion de corps est élevée dans l'ensemble des stérols, plus la différenciation sexuée est complète. Les résultats regroupés dans le tableau 46 paraissent exprimer que cette hypothèse n'est pas valable pour le *Leptosphaeria typhae*. Mais le tableau 45 montre que la teneur mycélienne globale en stérols s'abaisse quand croît la richesse du milieu en xylose et donc se réduit la fertilité sexuelle du Champignon, ce qui entraîne un appauvrissement des cellules en ergostérol. On remarque aussi une élévation de la proportion de cholestérol (fig.25). En effet, le cholestérol, que le Champignon ne synthétise pas sur eau d'avoine, apparaît ici en quantités de plus en plus élevées lorsque le taux de xylose augmente. La figure 26 indique que le rapport ergostérol/cholestérol semble être chez le *Leptosphaeria typhae* un indice de la stérilité, ce qui recoupe l'idée suggérée par les résultats obtenus chez le *Gnomonia leptostyla*, selon laquelle la sexualisation s'accompagnerait d'un ralentissement de la transformation des stérols $\Delta^{5,7}$, ici essentiellement représentés par l'ergostérol, en stérols Δ^5 dont le plus important est chez le *Leptosphaeria typhae* le cholestérol. Cette transformation semble accélérée chez notre Champignon lors du processus de stérilisation. Mais cette hypothèse est infirmée par les résultats obtenus sur le *Nectria galligena* par DEHORTER et al. (1980). Tous les Ascomycètes n'auraient-ils pas le même comportement sur ce plan-là ?

TABLEAU 46

Nature et pourcentages relatifs des stérols libres et estérifiés isolés de *L. typhae* avec différentes conditions culturales

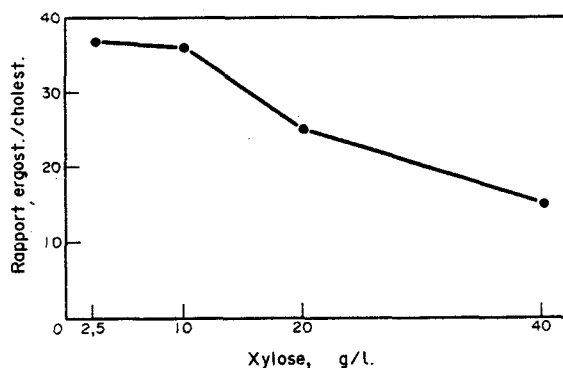
	2.5 g/l Xylose	10 g/l Xylose	20 g/l Xylose	40 g/l Xylose
Stérols libres				
Ergostérol	62	73	76	61
Méthyl-24 cholestadiène-7,22 ol-3 β	25	15	10	18
Méthylène-24 cholestène-7 ol-3 β	9	9	5	9
Ergostatriène ol-3 β			3	3
Cholestérol	1	2	2.75	3.5
Méthyl-24 cholestène-5 ol-3 β	0.25	0.25	0.25	1
Ethyl-24 cholestène-5 ol-3 β	1	0.75	1.5	1
Ethyl-24 cholestadiène-5,22 ol-3 β			1.5	1.5
Ethyl-24 cholestane ol-3 β	1.75			1
Stérols en C ₂₉ , C ₃₀ mono et diinsaturés 4 α -méthyl			1	1
Stérols estérifiés				
Ergostérol	12		26	
Méthyl-24 cholestadiène-7,22 ol-3 β	25	30	38	25
Méthylène-24 cholestène-7 ol-3 β	32	68	15	50
Cholestérol	7		8	6
Méthyl-24 cholestène-5 ol-3 β				3
Ethyl-24 cholestène-5 ol-3 β	6	1		6
Ethyl-24 cholestane ol-3 β	18			10
Ethyl-24 cholestadiène-5,22 ol-3 β			10	
Méthylène-24 lanostène-8 ol-3 β		1		
Stérol, en C ₂₉ et C ₃₀ mono et diinsaturés, 4 α -méthyl			3	
% D'ergostérol dans les stérols totaux (calculé en fonction des pourcentages dans les stérols libres et estérifiés)	57.5	71	74	56.5
% De cholestérol dans les stérols totaux	1.54	1.95	2.93	3.67
Rapport ergostérol/cholestérol	37.33	36.41	25.25	15.39

FIGURE 25



Proportion de cholestérol par rapport à l'ensemble des stérols.

FIGURE 26



Variation du rapport ergostérol/cholestérol dans le mycélium.

BUS
LILLE

CONCLUSION

Il est certain que les études préliminaires qui ont été faites des stérols des Ascomycètes dans notre laboratoire ou en liaison avec lui par LACOSTE, VANDEWALLE, ALAIS et al., FAYRET et al., DEHORTER et al. et nous-même posent plus de problèmes qu'elles n'en résolvent. D'importantes contradictions apparaissent entre les divers résultats, qu'il conviendrait d'élucider. En particulier, nous sommes dans l'impossibilité de dire quelle est la signification de l'ergostérol ou du cholestérol mycéliens. Ces premières approches permettent d'émettre l'hypothèse que l'ergostérol serait inutilisé lors de la sexualisation ; cela expliquerait son abondance dans les cultures fertiles et cette supposition est étayée par les observations de JACQUET (1979) qui montrent qu'une adjonction de cholestérol ou de sitostérol au milieu de culture provoque l'apparition des zygotes du *Pythium tracheiphilum*, alors que l'ergostérol est inefficace.

En ce qui concerne le *Leptosphaeria typhae* l'étude des stérols n'a été faite qu'en un seul moment de son développement, lors de l'apparition des premiers périthèces. Il semble donc évident qu'il convienne, pour une meilleure connaissance de la biosynthèse des stérols, d'envisager une étude cinétique de leur évolution au cours de la croissance et, si possible, dans les divers organes du Champignon : filaments mycéliens, périthèces, spores. Peut-être l'étude de l'incorporation de précurseurs radioactifs permettrait-elle de mieux suivre ce phénomène.

Enfin, aucun des résultats publiés jusqu'à ce jour ne permet d'affirmer ni d'infirmer avec certitude que les stérols jouent un rôle important dans la sexualisation du *Leptosphaeria typhae*. LACOSTE (1965) a fait des essais d'incorporation de stérols au milieu de culture ; ces résultats préliminaires, qui demandent confirmation, montrent que certains de ces composés exercent une action fertilisante sur le Champignon. Nous pensons que cette recherche devrait être menée parallèlement à une étude de l'effet d'inhibiteurs de la biosynthèse des stérols sur la croissance et la reproduction sexuée. Ce travail demandera des études longues et très aléatoires que nous envisageons d'entamer dans un proche avenir.

Nous tenons enfin à insister sur une constatation : la composition stérolique du *Leptosphaeria typhae* fertile est proche de celle du *Mucor rouxii* cultivé en aérobiose (SAFE, 1973) alors que celle de notre Ascomycète développé à l'obscurité est voisine de celle de ce Zygomycète végétant en anaérobiose. Ici encore la relation entre une stimulation du métabolisme oxydatif et la différenciation sexuée est frappante.

CHAPITRE II : RECHERCHE SUR LA MYCOSPORINE, SUBSTANCE PHOTO-MIMETIQUE, ACTIVATEUR DE LA DIFFERENCIATION

La lumière exerce sur les Champignons de nombreux effets dont la réponse est d'ordre morphogénétique. Cette action peut être stimulante de la multiplication asexuée : chez l'*Alternaria chrysantemi* (LEACH, 1964), le *Pyricularia oryzae* (OHMORI et NAKAJIMA, 1970) ou le *Phycomyces blakesleeanus* (BERGMAN, 1972). Chez le *Gnomonia leptostyla* elle stimule la conidiogénèse de type *Marsonina* et la différenciation des gamètes mâles (FAYRET, 1975). Elle induit la reproduction sexuée chez le *Leptosphaeria typhae*, le *Nectria galligena* (DEHORTER, 1972) le *Saccharomyces carlbergensis* (KELLY et GAY, 1969). Mais les effets de la lumière peuvent être de sens opposé : ainsi elle inhibe la sporulation de certains *Alternaria* (LUKENS, 1963, 1965 ; OHMORI et NAKAJIMA, 1970). Son action peut aussi être plus complexe, chez le *Gnomonia leptostyla* par exemple dont elle inhibe certaines étapes de la formation des ascocarpes après avoir stimulé la différenciation des gamètes mâles (FAYRET, 1975).

Ces effets peuvent varier en fonction de la quantité de lumière, de la durée d'éclairement, ainsi que le démontrent nos travaux ou ceux de DEHORTER sur le *Nectria galligena*, et aussi de la qualité de cette lumière. En effet, en fonction de la longueur d'onde appliquée, la réponse des Champignons peut être très différente (TAN, 1978) : ainsi la conidiogénèse du *Botrytis cinerea* peut être stimulée par l'ultra-violet et inhibée par le bleu (TAN et EPTON, 1974) Il existe par conséquent chez les Champignons des récepteurs de lumière, et ces récepteurs peuvent être étroitement spécialisés, en vertu de cette loi de la photochimie qui dit que seule la lumière absorbée par une molécule peut provoquer une modification photochimique de celle-ci : par conséquent, un corps présentant un seul "pic" d'absorption sera sensible à la seule longueur d'onde de ce "pic".

On considère que les caroténoïdes, les flavines peuvent jouer le rôle de récepteur dans certains cas (PREVOST, 1974) ; dans d'autres on invoque l'existence d'un composé mal connu : le mycochrome (TAN, 1978). On connaît par contre maintenant très bien un corps dont TAN (1978) pense que la synthèse est sous la dépendance du mycochrome : la mycosporine, ou P 310, caractérisé par son pic d'absorption à 310 nm. Ce composé a été mis en évidence par LEACH (1965) qui le désignait sous le terme de "substance sporogène" et sa structure a été élucidée par ARPIN et al. en 1976. La mycosporine peut être isolée du mycélium de nombreux Champignons soumis à l'action de la lumière : l'*Ascochyta pisi*, le *Pleospora herbarum* (LEACH, 1965), le *Sclerotinia fructicola*, l'*Alternaria tenuis* (VAN DEN ENDE et CORNELIUS, 1970), le *Nectria galligena* (DEHORTER, 1972), le *Stereum hirsutum* (ARPIN et al., 1976), le *Gnomonia leptostyla* (FAYRET et VITO, 1981). D'abord considérée comme photorécepteur, la mycosporine semble plus probablement jouer un rôle de transporteur d'énergie puisqu'on peut l'isoler de l'*Ascochyta pisi* (TRIONE et al., 1966) se développant à l'obscurité sur un milieu favorable à la sporulation ou du *Gnomonia leptostyla* croissant à l'abri de la lumière et par conséquent porteur de périthèces (FAYRET et VITO, 1981). Elle joue en tous cas ce rôle d'activateur du métabolisme chez plusieurs Ascomycètes et Basidiomycètes (TRIONE et al., 1966) et chez le *Nectria galligena* (DEHORTER, 1976).

Mais la mycosporine n'est pas présente chez tous les Champignons : le *Trichoderma viride*, le *Choanephora cucurbitarum*, tous deux photodépendants, semblent ne pas la synthétiser (VAN DEN ENDE et CORNELIUS, 1970), pas plus que l'*Aspergillus ornatus* (STALLINGS, 1970) ; peut-être le milieu de culture utilisé ne leur permettait-il pas cette synthèse ?

Dans une première approche du problème de la photosensibilité du *Leptosphaeria typhae* d'une part, et toujours à la recherche d'éventuels activateurs du métabolisme oxydatif d'autre part, nous avons pensé à mettre en évidence la présence ou l'absence de ce composé dans le mycélium développé sous photopériode (fertile) ou à l'obscurité constante (stérile).

II. 1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons cultivé le Champignon à 18°C en boîtes de Roux sur trois milieux différents :

- décoction d'avoine à 20 g/l ;
- milieu synthétique xylose-glycocolle-sérine (voir au chapitre I) ;

- milieu synthétique de DEHORTER (1972) : Maltose - acide glutamique, sur lequel ce dernier obtient de grandes quantités de mycosporine du *Nectria galligena*.

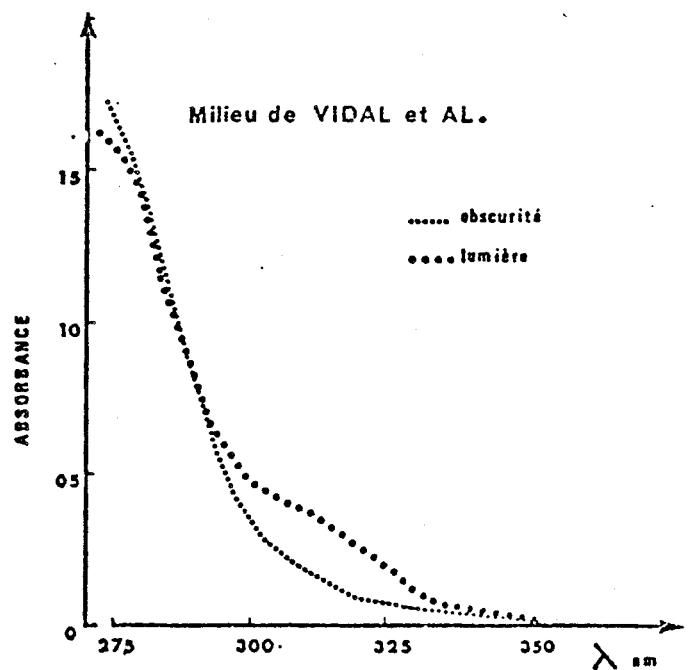
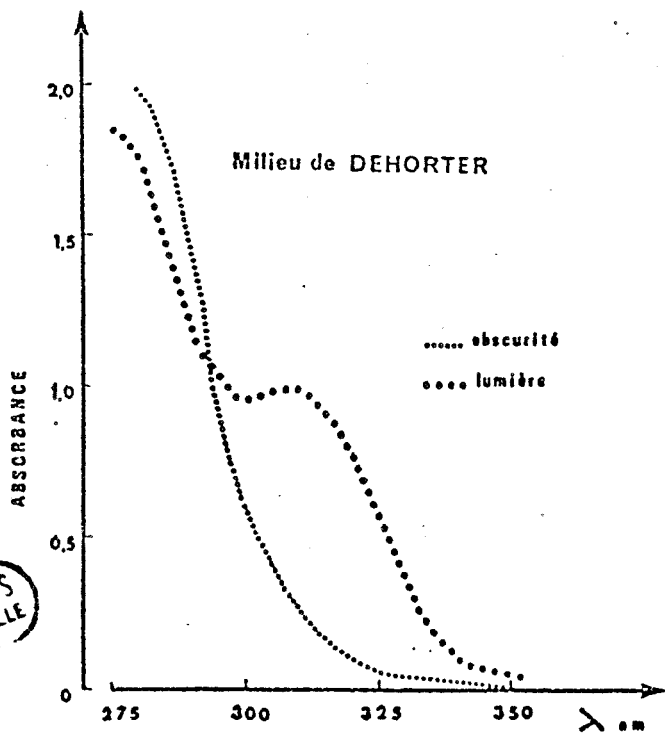
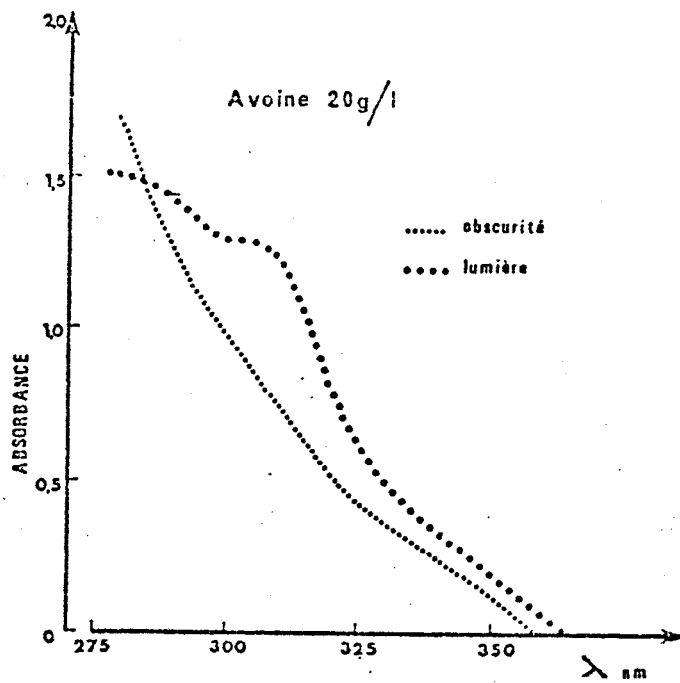
Le mycélium était recueilli par centrifugation, rincé à l'eau distillée, bloqué par le froid puis lyophilisé. L'extraction aqueuse était réalisée selon la technique de DEHORTER (communication personnelle) : 100 mg de lyophilisat sont broyés au mortier à 0°C en présence d'un peu de sable de Fontainebleau, puis extraits par 100 ml d'eau distillée. Après filtration sur verre fritté (porosité n° 2) l'extrait est délipidé par un volume égal de chloroforme, puis évaporé à sec sous vide. Le résidu est repris par 5 ml d'eau distillée, puis centrifugé, et on trace le spectre d'absorption du surnageant dans l'ultra-violet (spectrophotomètre Unicam SP 800 B). La purification de la mycosporine est ainsi très incomplète, mais suffisante pour permettre le repérage du pic à 310 nm caractéristique de cette substance.

II. 2 RÉSULTATS

Au 11ème jour, le Champignon développe une plus grande quantité de mycélium dans le milieu de DEHORTER (tableau 47). Les périthèces apparaissent plus tôt sur la décoction d'avoine, sur laquelle ils sont encore plus nombreux au jour du prélèvement (11ème). Sur le milieu de DEHORTER, la quantité de périthèces par fiole de culture est égale à celle que nous obtenons sur notre milieu synthétique, mais l'observation microscopique montre que la proportion de périthèces immatures est plus élevée (20 à 30 % au lieu de 5 à 10 % environ). La figure 27 montre les spectres d'absorption obtenus sur les trois milieux dans les deux conditions de culture : obscurité constante et éclairé alterné. Les cultures à l'obscurité ne semblent pas contenir de mycosporine. Par contre, en présence de lumière sur tous les milieux, le P 310 apparaît plus ou moins nettement. Abondant sur le milieu de DEHORTER, il est moins net sur la décoction d'avoine et très peu représenté sur notre milieu.

200 ml de milieu avoine délipidés, concentrés sous vide, repris par 5 ml d'eau distillée, puis centrifugés ne présentent aucun "pic" d'absorption entre 275 et 350 nm.

FIGURE 27 : SPECTRES D'ABSORPTION DES EXTRAITS MYCÉLIENS
(cuves Hellma 100 QS de 10 mm de trajet optique)



BUS
LILLE

TABLEAU 47

Milieu	Masse de mycélium sec au 11 ^e jour pour 100 ml de milieu		Périthèces (sous éclairement 12h/jour)	
	Lumière	Obscurité	Date d'apparition	Abondance
Avoine	111 mg	103 mg	7 ^e jour	100
Xylose + glyocolle + sérine (VIDAL et al.)	121 mg	130 mg	9 ^e jour	90
Maltose + ac. glutamique (DEHORTER)	350 mg	327 mg	9 ^e jour	90

III. 3 DISCUSSION

Notre champignon fait donc partie du groupe des producteurs de mycosporine. A l'image du *Nectria galligena* et à la différence du *Gnomonia leptostyla* (FAYRET et VITO, 1981) il ne produit de quantité décelable de P 310 que sous l'influence de la lumière. Le *Gnomonia leptostyla* en synthétise une plus grande quantité sous éclairement : il différencie dans ces conditions un grand nombre de spores asexuées. Le *Leptosphaeria typhae*, lui, ne produit sur le mycélium à l'obscurité aucun appareil de multiplication ou de reproduction. La comparaison des résultats de DEHORTER, de FAYRET et VITO, et des nôtres à ceux des auteurs antérieurs permet de penser que la mycosporine pourrait être un activateur du métabolisme intermédiaire ou du métabolisme oxydatif au sens large, mais ne serait pas un photorécepteur. Dans le cas du *Leptosphaeria typhae*, il est évident que son rôle n'est pas prouvé. Il faudrait faire agir la substance sur le mycélium croissant à l'obscurité pour juger de son effet sur la sexualisation. Elle serait alors un moyen supplémentaire d'action sur la différenciation sexuée, comme l'aération par exemple, et permettrait d'élargir nos investigations.

D'après ces premiers résultats, il ne semble pas que la quantité de mycosporine contenue par le mycélium soit proportionnelle au nombre de périthèces ; en effet, sur le milieu de DEHORTER, le *Leptosphaeria typhae* est plus riche en P 310 et sa croissance pondérale par unité culturale est plus grande : cela signifie que dans chaque fiole de culture on trouve une quantité

plus élevée de mycosporine, alors que le nombre d'ascocarpes formés est à peu près égal à ceux que l'on trouve sur les autres milieux. On peut aussi constater que la synthèse de P 310 varie suivant le milieu de culture.

Afin de préciser ces points, il conviendra de suivre l'évolution de la teneur mycélienne en P 310 au cours de la croissance en rapportant ces résultats au nombre de périthèces apparus. On pourra aussi faire en parallèle des dosages de photorécepteurs "classiques" : caroténoïdes, flavines...

La corrélation entre la synthèse de mycosporine, la différenciation d'appareils sexués et l'éclairement pourra être précisée en utilisant des artifices permettant de stériliser le Champignon sous photopériode : introduction d'acétate ou augmentation de l'apport de xylose dans le milieu de culture par exemple. Il sera aussi intéressant de rechercher le P 310 dans des cultures sous éclairement constant, ou subissant des illuminations de courte durée à divers stades de leur croissance.(1)

L'étude des résultats obtenus par les principaux auteurs (DEHORTER, FAYRET) permet d'esquisser une hypothèse sur le rôle de la mycosporine dans la différenciation. Sa synthèse ne serait pas sous la dépendance exclusive de la lumière (FAYRET et VITO, 1981) mais cette dernière la stimulerait, et le P 310 transférerait au niveau du métabolisme intermédiaire une partie de l'énergie captée par le, ou les photorécepteurs.

(1) Ce plan expérimental est en fait très proche d'une partie de celui que DEHORTER développe dans le cadre de son étude de la sexualisation des *Nectria*, et nous ne reprendrons notre expérimentation dans ce sens qu'après la soutenance de sa Thèse de Doctorat d'Etat et en collaboration avec lui.

CONCLUSIONS GENERALES

Le *Leptosphaeria typhae* qui a fait l'objet de cette Thèse présente plusieurs originalités qui en font un "modèle" particulièrement souple et intéressant. Contrairement à la plupart des Champignons grâce auxquels ont été effectuées les précédentes études sur la différenciation sexuelle, il est homothallique et monécique et même affecté de régression de l'appareil producteur des gamètes mâles. D'autre part, il ne possède aucune forme de multiplication végétative autre que la simple croissance mycélienne. Il en résulte qu'une fois le génotype de notre souche fixé par culture monoasporale, le développement du Champignon est sous la seule dépendance des conditions externes : milieu de culture, température, éclaircissement, aération, qui peuvent induire corrélativement des variations métaboliques et la différenciation sexuée.

Un milieu convenable de culture ayant été trouvé sous la forme d'une décoction de farine d'avoine à 20 g/l, la température optimale de différenciation étant connue : 18°C, l'éclaircissement et l'aération restent les seuls paramètres susceptibles d'influer sur le développement du Champignon. La lumière appliquée selon un rythme nycthéral s'est avérée le facteur indispensable à la différenciation des ascocarpes. En effet, si l'aération des cultures (par introduction de baguettes de verre dans le milieu liquide) accélère la formation des périthèces et augmente leur nombre, elle ne permet en aucun cas leur édification lorsque le Champignon est cultivé à l'obscurité constante.

L'étude du métabolisme intermédiaire montre que lorsque le *Leptosphaeria typhae* est cultivé dans des conditions favorables à sa reproduction sexuée les oxydations cellulaires sont plus actives ; en particulier, le cycle citrique "tourne" plus vite. L'aération active de manière concomitante les deux processus : oxydations cellulaires et différenciation sexuelle dans les cultures recevant un éclaircissement nycthéral, mais uniquement le métabolisme oxydatif dans les mycéliums développés à l'obscurité.

Le Champignon a été rendu stérile par divers artifices :

- culture sous obscurité constante,
- culture sous éclaircment constant,
- culture sur milieu enrichi en acétate de sodium.

Dans chacun de ces cas, quel que soit le paramètre qui ait varié, nous avons pu constater que le métabolisme cellulaire était orienté vers des voies plus réductrices : le cycle glyoxylique et la synthèse d'acide lactique plus actifs prenant le relai du cycle citrique plus ou moins inhibé.

La corrélation entre la différenciation sexuée et des oxydations cellulaires actives est donc clairement mise en évidence.

Cette même corrélation s'observe aussi au niveau du métabolisme lipidique : la différenciation s'accompagne toujours d'une élévation du degré d'insaturation de tous les lipides du Champignon. Concurrément, le turn-over de ces corps est activé : leur synthèse s'accélère, mais leur dégradation est encore plus rapide et la proportion d'acides gras libres s'élève. Ce catabolisme s'exprime surtout aux dépens des lipides polaires, glyco et phospholipides, qui jouent peut-être le rôle de donneur de glucides et de phosphore. Dans les phospholipides, l'importance quantitative des phosphatidyl-cholines s'élève lorsqu'apparaissent les périthèces. Ces substances étant impliquées dans la synthèse de l'acide gras polyinsaturé le plus abondant : l'acide linoléique, la simultanéité de ce fait et de l'élévation du degré d'insaturation des lipides est logique. La même observation a d'ailleurs été faite lors de la différenciation d'autres Champignons.

Si nous stérilisons le *Leptosphaeria typhae* par culture sous éclaircment constant ou sur milieu à l'acétate de sodium, nous constatons une augmentation de sa teneur en lipides, une baisse de leur degré d'insaturation ainsi qu'une diminution de leur teneur en phosphatidyl-cholines. Si nous favorisons la formation des appareils sexuels du Champignon en facilitant son aération, nous observons des variations inverses de ses lipides. Ces résultats confirment les observations initiales.

L'importance du rôle reconnu des stérols et des hormones stéroïdiques qui en dérivent dans la reproduction des Champignons, surtout Phycomycètes, nous a conduit à rechercher les variations induites dans les stérols du mycélium par les modifications des conditions de culture qui influent sur sa sexualisation. Nous avons pu constater que la fertilité sexuelle du *Leptosphaeria typhae* s'accompagnait d'une grande richesse en ergostérol qui peut même être le

seul stérol libre décelable dans les cellules. Cette constatation apparente le mycélium fertile aux Zygomycètes cultivés en aérobiose et met donc à nouveau en évidence la ligne constante de nos résultats : une relation permanente de la différenciation sexuée avec un métabolisme oxydatif plus actif.

Nous avons enfin mis en évidence dans le mycélium fertile de notre Champignon la présence de Mycosporine, ou P310. DEHORTER a montré qu'ajoutée en faible teneur au milieu de culture du *Nectria galligena*, cette substance peut remplacer l'éclairement pour induire la formation des ascocarpes. Nous pouvons supposer qu'elle jouerait le même rôle chez le *Leptosphaeria typhae*, bien que nous n'ayons encore fait aucune expérimentation dans ce sens. Il est probable que dans ce cas elle stimulerait les oxydations cellulaires.

En bref, nous pensons que toute action qui accélère le métabolisme oxydatif du mycélium facilite sa reproduction sexuée.

BIBLIOGRAPHIE

Les références sont classées selon l'ordre alphabétique de l'ensemble des auteurs.

- ALAIS, J., A. LABLACHE-COMBIER, L. LACOSTE et B. VANDEWALLE, 1974. -
Les stérols de l'Ascomycète *Leptosphaeria typhae*.
Phytochemistry 13 : 2833-2837.
- ALAIS, J., A. LABLACHE-COMBIER, L. LACOSTE et G. VIDAL, 1976 -
Influence du milieu de culture sur la composition en stérols de
Leptosphaeria typhae.
Phytochemistry 15 : 49-51.
- AMENTA, J.S., 1964 -
A rapid chemical method for quantification of lipids separated
by thin-layer chromatography.
J. Lipid Res. 5 - 270.
- ARPIN, N., R. CURT et J. FAVRE-BONVIN, 1979 -
Mycosporines : mise au point et données nouvelles concernant leurs
structures, leur distribution, leur localisation et leur biogénèse.
Rev. Mycol. 43 : 247-257.
- ARSENAULT, G.P., K. BIEMANN, A.W. BARKSDALE et T.C. MORRIS, 1968.
The structure of Antheridiol, a sex hormone in *Achlya bisexualis*.
J. Amer. Chem. Soc. 90 : 5635-5636.
- BARAUD, J., Mlle A. MAURICE et C. NAPIAS, 1970 -
Composition et répartition des lipides au sein des cellules de
Saccharomyces cerevisiae.
Bull. Soc. Chim. Biol. 52 : 421-432.
- BARKSDALE, A.W., 1969 -
Sexual hormones of *Achlya* and other fungi.
Science 66 : 831-837.

- BARNETT, H.L. et V.G. LILLY, 1947 -
The regulation of thiamin to the production of perithecia by
Ceratostomella fimbriata.
Mycologia 39 : 699-708.
- BARNETT, H.L. et V.G. LILLY, 1947 -
The effect of biotin upon the formation and development of
perithecia, asci and ascospores by *Sordaria fimicola*.
Amer. J. Bot. 34 : 196-204.
- BARNETT, M.L. et V.G. LILLY, 1950 -
Influence of nutritional and environment factors upon asexual
reproduction of *Choanephora cucurbitarum* in culture.
Phytopath., 40 : 80-89.
- BARTLETT, K. et E.I. MERCER, 1974 -
Variation in the levels and composition of the sterols and sterol
esters of *Phycomyces blakesleeianus* with age et culture.
Phytochemistry 13 : 115-1121.
- BEN ABDELKADER, A., A. CHERIF, C. DEMANDRE et P. MAZLIAK, 1973 -
The oleyl CoA desaturase of potato tubers.
Eur. J. Biochem. 32 : 155-165.
- BERGMAN K., 1972 -
Blue-light control of sporangiophore initiation in *Phycomyces*.
Planta 107 : 53-67.
- BOWMAN R.D. et R.O. MUMMA, 1967 -
The lipids of *Pythium ultimum*.
Biochim. Biophys. Acta. 144 : 501-510.
- BRENNAN, P.J. et D.M. LÖSEL, 1978 -
Physiology of fungal lipids : selected topics.
Adv. Microbial Physiol. 17 : 47-179.
- BRENNAN, P.J., P.F.S. GRIFFIN, D.M. LÖSEL et D. TYRRELL, 1974
The lipids of fungi ; in Holman, R.T. "Progress in the Chemistry
of fats and other lipids".
Vol. XIV, Part 2, 89 p. Pergamon Press.
- BULLOCK, E. and C.J. DAWSON, 1976 -
Sterol content of the myxomycètes *Physarum polycephalum* and *P.*
flavicoccum.
J. Lipid Res. 17 (6) 565-571.
- BYRNE, P.F.S., P.J. BRENNAN, 1976 -
Isolation and characterization of inositol-containing glycosphin-
golipids from *Aspergillus niger*.
Biochem. Soc. Trans. 4 (5) 893-895.
- BOWMAN, R.D. et P.O. MUMMA, 1967 -
The lipids of *Pythium ultimum*.
Biochim. Biophys. Acta 144 : 501-510

- CAMPBELL, J.J.R., R.A. SMITH and B.A. EAGLES, 1953 -
A deviation from the conventional tricarboxylic acid cycle in
Pseudomonas aeruginosa.
Biochim. Biophys. Acta 11 : 594.
- CANTINO, E.C., 1952 -
The biochemical nature of morphogenetic patterns in *Blastocladiella*.
Amer. Naturalist 86 : 399-404.
- CANTINO, E.C., 1956 -
The relation between cellular metabolism and morphogenesis in
Blastocladiella.
Mycologia 48 : 225-240.
- CANTINO, E.C., 1961 -
The relations hip between biochemical and morphological differen-
tiation in non-filamentous aquatic fungi.
Sympos. Soc. Gen. Microbiol. 11 : 243-271.
- CANTINO, E.C., 1966
Morphogenesis in aquatic fungi ; in "The fungi", edited by
Ainsworth and Sussamar, Vol. II, 283-337.
- CANTINO, E.C. et G. TURIAN, 1959 -
Physiology and development of lower fungi (Phycomycètes)
Ann. Rev. Microbiol. 13 : 97-124.
- CANTINO, E.C. et A. GOLDSTEIN, 1967 -
Citrate induced citrate production and light induced growth of
Blastocladiella emersonii.
J. Gen. Microbiol. 46 : 347-354.
- CARLES J., 1968 -
Le dosage automatique des acides organiques.
J. Chromatogr. 35 : 158-167.
- CARLES, J. et G. ABRAVANEL, 1970 -
Dosage automatique et simultané des acides aminés et des
guanidines.
Bull. Soc. Chim. Biol. 52 : 453-454.
- CARLES, J. et G. ABRAVANEL, 1971 -
Etude théorique et expérimentale d'un gradient d'élution pour
la chromatographie de partage des acides organiques.
J. Chromatogr. 56 : 231-240.
- CARLES, J., M. VIAU, G. VIALA et P. CALMES, 1967 -
Dosage automatique des acides organiques par chromatographie.
Symposium Technicon, Brighton, 255-257.
- CARMACK, C.L., J.D. WEETE et W.D. KELLEY, 1976 -
Hydrocarbons, fatty acids and sterols of *Cronartium fusiforme*
aeciospores.
Physiol. Plant Pathol., 8 : 43-49.
- CASSELTON, P.J., M.O. FAWOLE et L.A. CASSELTON, 1969 -
Isocitrate lyase in *Coprinus lagopus*.
Can. J. Microbiol. 15 : 637-640.

- CHASSANG, A., M. ROGER, F. VEZINHET et P. GALZY, 1972 -
Variation of the lipid content of yeasts cells during sporulation.
Folia Microbiol. 17 : 241-247.
- CHAVANT, L., 1979
Biosynthèse des acides gras et des phospholipides chez
Mucor mucedo et *Aspergillus ochraceus*.
Thèse, Toulouse, 125 p.
- CHAVANT, L. et M. SANCHOLLE, 1977 -
Les lipides de deux moisissures : *Mucor mucedo* et *Aspergillus
ochraceus* se développant sur un même milieu.
Physiol. vég. 15 : 209-218.
- CHAVANT, L., J. LE BARS et M. SANCHOLLE, 1977 -
Métabolisme lipidique chez l'*Aspergillus versicolor* (Vuill.)
Tiraboschi. Relations avec la biogenèse de la stérigmatocystine.
Mycopathologia 60 : 151-155.
- CHAVANT, L., P. MAZLIAK et M. SANCHOLLE, 1978 -
Formation des acides gras insaturés chez un champignon filamenteux :
Aspergillus ochraceus Wilhelm.
Physiol. Vég. 16 : 607-616.
- CHAVANT, L., P. MAZLIAK et M. SANCHOLLE, 1979 -
Biosynthèse de l'acide linoléique chez un champignon filamenteux :
Aspergillus ochraceus. Vuillemin.
Physiol. Vég. 16 : 607-616.
- CHAVANT, L., P. MAZLIAK et M. SANCHOLLE, 1979 -
Biosynthèse de l'acide linoléique chez un champignon filamenteux
siphomycète : *Mucor mucedo*.
Ann. Pharm. Franç. 37 : 55-58.
- CHEN, P.S. Jr, T.I. TORIBARA et M. WARNER, 1956 -
Microdetermination of Phosphorus.
Anal. Chem. 28 : 1756-1758.
- CHENOUDA, M., 1970 -
Investigation on lipid content of *Phycomyces blakesleeanae*.
J. Gen. Appl. Microbiol. 16 : 501-509.
- CHEVAUGEON, J., 1959 -
Sur le déterminisme interne du rythme de croissance chez un
mutant "vague" de l'*Ascobolus immersus*.
C.R. Acad. Sci. 248 : 1841-1844.
- CHILD, J.J., G. DEFAGO et R.H. HASKINS, 1969 -
The effect of cholesterol and polyene antibiotics on the
permeability of the protoplasmic membrane of *Pythium* sp. PRL 2142.
Can. J. Microbiol. 15 : 599-603.
- CHILD, J.J. and R.H. HASKINS, 1976 -
Effect of inhibitors of sterol biosynthesis on growth and
sexuality of *Pythium* and *Zygorhynchus*.
Mycopathologia 59 (2) 91-94.

- CINO, P.M. et R.P. TEWARI, 1976 -
Chemical composition of *Oidiodendron*.
Mycopathologia 56 : 131-135.
- CLAUSZ, J.C., 1979 -
Factors affecting mycelial growth, lipid content and fatty-acid composition in *Achlya flagellata*.
Mycologia 71 : 293-304.
- COCHRANE, V.W., 1958 -
Physiology of fungi.
Wiley, New-York.
- COIC, Y., C. LESAIN, J.L. PAPIN et M. LELANDAIS, 1968 -
Les acides organiques et matières minérales des organes de l'oeillette (*Papaver somniferum*) leurs évolutions dans la partie reproductive au cours du développement des graines.
Ann. Physiol. Vég. 10 : 29-40.
- COMBEPINE, G., 1967 -
Quelques aspects du métabolisme glyoxylate-glycine chez le *Neurospora crassa* (type sauvage et mutants).
Thèse, Genève, texte condensé : 31 p.
- COMBEPINE, G. et G. TURIAN, 1970 -
Activités de quelques enzymes associées à la conidiogenèse du *Neurospora crassa*.
Arch. Microbiol. 72 : 36-47.
- COTTER, D.A., A.J. LA CLAVE, W.S. WEGENER et D.J. NIEDERPRUEM, 1970 -
CO₂ control of fruiting in *Schizophyllum commune* : noninvolvement of sustained isocitrate lyase derepression.
Can. J. Microbiol. 16 : 605-608.
- CURTIS, C.R., 1964 -
Physiology of sexual reproduction in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. II. - Effect of radiant energy on sexual reproduction.
Phytopath. 54 : 1141-1145.
- DALPE, Y. et P. NEUMANN, 1976 -
L'effet d'acides gras sur la stimulation des périthèces de *Ceratocystis ips*, *C. minor* et *C. capillifera*.
Eur. J. For. Path. 6 : 335-342.
- DARGENT, R., 1969 -
Mise en évidence des phénomènes de translocation à l'intérieur de l'hyphe jeune d'un Adélomycète : *Trichothecium roseum* Link.
Etudes autoradiographiques.
C.R. Acad. Sci., Sér. D., 269 : 1053-1055.
- DARNAUD, M., 1971 -
Etude de l'influence de quelques facteurs sur le développement et la biosynthèse des lipides chez le Champignon Siphomycète : *Achlya bisexualis* Coker.
Thèse Spécialité, Mycologie, Toulouse, 124 p.

- DAVIS, E.E. et S.C. JONG, 1976 -
Basidiocarp formation by *Laccaria laccata* in agar culture.
Mycologia 68, 1 : 211-214.
- DEBELL, R.M. and R.C. JACK, 1974 -
Mycelial and sporangial tri acyl glycerols of *Phycomyces blakesleeanus*.
J. Am. Dil. Chem. Soc. 51 : 530 A.
- DE BIEVRE, C., 1974 -
Lipides de quelques souches de *Entomophthora coronata* et de *Basidiobolus meristosporus*.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 125 A : 309-321.
- DE BIEVRE, C. et F. MARIAT, 1975 -
Composition en acides gras des lipides polaires et neutres de *Sporothrix Schenckii* et de *Ceratocystis stenoceras*.
Sabourandia 13 : 226-230.
- DEHORTER, B., 1972 -
Biologie et physiologie de la reproduction sexuée du *Nectria galligena* Bres.
Thèse 3ème cycle, Lille, 149 p.
- DEHORTER, B., 1976 -
Induction des périthèces de *Nectria galligena* Bres. par un photocomposé mycélien absorbant à 310 nm.
Can. J. Bot. 54 : 600-604.
- DEHORTER, B. et L. LACOSTE, 1980 -
Photoinduction des périthèces du *Nectria galligena*. I. Influence de la lumière blanche.
Can. J. Bot. 58 : 2206-2217 -
- DEHORTER, B., M.F. BROUQUET, L. LACOSTE, J. ALAIS, A. LABLACHE-COMBIER, A. MAQUESTIAU, Y. VAN HARVERBEKE, R. FLAMMARG et H. MISPREUVE, 1980 -
Influence de la lumière et de la mycosporine sur la composition stérolique du *Nectria galligena* au cours de la morphogenèse sexuée.
Phytochemistry 19 : 2311-2315.
- DEUEL, R.A. et B. DE KRUYFF, 1976 -
The function of sterols in membranes.
Biochim. Biophys. Acta 457 : 109-132.
- DEVYS, M., A. ALCAIDE et M. BARBIER, 1968 -
Conversion du stigmastène-7 ol-3B en B-sitostérol par le tabac *Nicotiana tabacum*.
Bull. Soc. Chim. biol. 50 : 1751-1757.
- DITTMER, S.C. et R.L. LESTER, 1964 -
A simple specific spray for detection of phospholipids on chromatograms.
J. Lipid Res. 5 : 126-128.
- DITTMER, J.C. et M.A. WELLS, 1969 -
Quantitative and qualitative analysis of lipids and lipid components ; in Colowick, S.P. et N.O. Kaplan, "Methods in Enzymology" Academic Press, New-York, Vol. 14 : 482-530.

- DIXON, G.H. et H.L. KORNBERG, 1959 -
Assay methods for the glyoxylate cycle.
Biochem. J. 72 : 3 P.
- DJERASSI, C., J.C. KNIGHT et H. BROCKMANN Jr, 1964 -
Neue Sterine aus dem Kaktus *Wilcoxia viperina*.
Chem. Ber. 97 : 3118-3130.
- DURAND, R., 1976 -
Influence des radiations lumineuses sur les processus de
reproduction des champignons. Hypothèses sur l'identité
des photorécepteurs. *Revue bibliographique.*
Mycopathologia 60 : 3-16.
- DURAND, R. et J.C. ROBERT, 1980 -
Interactions entre les facteurs lumière et température dans le
contrôle de la morphogenèse des carpophores du Champignon
basidiomycète *Coprinus congregatus*.
Physiol. Vég. 18 : 131-145.
- ELIAZYAN, A.A., E.A. MAROYAN et T.G. ARUTYNYAN, 1975-76 -
Biosynthesis of sterols by various yeasts.
Microbiology 44 : 566-70.
- ELLIOTT, C.G. et E. SANSOME, 1977 -
The influence of sterols on meiosis in *Phytophthora cactorum*
J. Gen. Microbiol. 98 : 141-145.
- ELLIOTT, C.G., 1977 -
Sterols in fungi : their functions in growth and reproduction
Adv. microbial Physiol. 15 : 121-173.
- ELLIOTT, C.G., B.A. KNIGHTS et J.A. FREELAND, 1974 -
Sterols of *Neurospora crassa* and the pattern of their binding
during the growth cycle.
Biochim. Biophys. Acta 360 : 339-347.
- ELLIOTT, C.G., M.E. HENDRIX, B.A. KNIGHTS et W. PARKER, 1964 -
A steroid growth factor required in a fungus.
Nature 203 : 427-428.
- ELLO, H.A., 1959 -
A colorimetric method for the assay of soluble succinic
deshydrogenase and pyridine-nucleotide linked deshydrogenases.
Arch. Biochem. Biophys. 85 : 561-562.
- ENDE, G. VAN DEN et J.J. CORNELIUS, 1970 -
The induction of sporulation in *Sclerotinia fructicola*
and some other fungi and the production of "P 310".
Netlur. J. Plant Pathol. 76 : 183-191.
- ENGLANDER, L. and L.F. ROTH, 1980 -
Interaction of light and sterol on sporangium and chlamyospore
production by *Phytophthora lateralis*.
Phytopath. 70 : 650-654.

- ERDOS, G.W., K.B. RAPER et L.K. VOGEN, 1976 -
Effect of light and temperature on macrocyst formation in paired mating types of *Dictyostelium discoideum*.
J. Bacteriol. 128 : 495-497.
- ERWIN, J.A., 1973 -
Lipids and biomembranes of eukaryotic microorganisms.
Academic Press, New-York and London, 354 p.
- FAYRET, J., 1975 -
Etude du cycle de reproduction du *Gnomonia leptostyla* (Fr) Ces. et de Not. Déterminisme et physiologie.
Thèse, Toulouse, 296 p.
- FAYRET, J. et J. VITO, 1981 -
Relations entre production et localisation de mycosporine et morphogénèses reproductrices chez le Pyrénomycète *Gnomonia leptostyla*.
Physiol. Plant. 51 : 299-303.
- FAYRET, J., J. BERNILLON, M-L. BOULLAUT, J. FAVRE-BONVIN et N. ARPIN, 1981 -
Open and ring forms et mycosporin 2 from the Ascomycete *Gnomonia leptostyla*.
Phytochemistry 20 : 2709-2710.
- FAYRET, J., L. LACOSTE, J. ALAIS, A. LABLACHE-COMBIER, A. MAQUESTIAU, Y. VAN HARVERBEKE, R. FLAMMANG et H. MISPREUVE, 1979 -
Composition stérolique et morphogénèses reproductrices chez *Gnomonia leptostyla*.
Phytochemistry 18 : 431-435.
- FEREZOU, J-P., M. DERVYS, J-P. ALLAIS et M. BARBIER, 1974 -
Sur le stérol à 26 atomes de carbone de l'algue rouge *Rhodomenia palmata*.
Phytochemistry 13 : 593-598.
- FINKELSTEIN, A. et A. CASS, 1967 -
Effect of cholesterol on the water permeability of thin lipid membranes.
Nature 216 : 717-718.
- FLAVELL, R.B. et J.R.S. FINCHAM, 1968 -
Acetate non-utilising mutants of *Neurospora crassa*. II. Biochemical deficiencies and the role of certain enzymes.
J. Bacteriol. 95 : 1063-1068.
- FLORKIN, M. et E.H. STOTZ, 1970 -
Lipid metabolism ; in Florkin, M. et E.M. Stotz "Comprehensive Biochemistry", Elsevier , Amsterdam, Vol. 18, 398 p.
- FOLCH, J., M. LEES et G.H. SLOANE-STANLEY, 1957 -
A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue.
J. Biol. Chem. 226 : 497-509.

- FOSTER, J.W. et S.A. WAKSMAN, 1939 -
The production of fumaric acid by molds belonging of the genus
Rhizopus.
J. Amer. Chem. Soc. 61 : 127-135.
- FRANKE-RINKER, D. und BEHRENS, U., 1979 -
Enzymatische Untersuchungen zur Citrat-Isocitrat-Akkumulation
bei Hefen.
Die Nabrung 23 : 891-897.
- FREEMAN, C.P. et D. WEST, 1966 -
Complete separation of lipid classes on a single thin-layer plate.
J. Lipid Res. 7 : 324-327.
- FURCH, B., J. POLTZ et M. RUDOLPH, 1976 -
Lipids of spores from *Phycomyces* in relation to heat-induced
germination.
Biochem. Physiol. Pflanzen. 169 : 249-256.
- GALANOS, D.S. et V.M. KAPOULAS, 1965 -
Preparation and Analysis of lipid extracts from milk and other
tissues.
Biochim. Biophys. Acta 98 : 278-292.
- GERASIMOVA, N.M., A.F. AIZINA, M.A. ZLATOUST, Zh.I. BALABANOVA, P.N. RAZUMOVOKII
et M.N. BEKHTEREVA, 1974 -
Fatty acid composition in lipids and triglycerides in fungi of the
genus *Alternaria* under various conditions of culturing.
Microbiology, Translation of "Mikrobiologiya" 43 : 375-377.
- GOODAY, G.W., 1974 -
Fungal sex hormones.
Ann. Rev. Biochem. 43 : 35-49.
- GORDON, P.A., P.R. STEWART et G.D. CLAK-WALKER, 1971 -
Fatty acid and sterol composition of *Mucor genevensis* in relation
to dimorphism and anaerobic growth.
J. Bacteriol. 107 : 114-120.
- GOTTLIEB, D. et S. RAMACHANDRAN, 1960 -
The nature of the glyoxylate pathway enzymes in germinating
spores of *Penicillium oxalicum*.
Mycologia 52 : 599-607.
- GUNASEKARAN, M., P.K. RAJU et S.D. LYDA, 1970 -
Effect of temperature on lipid composition of *Fomes annosus*.
Phytopath. 60 : 1027.
- GUNASEKARAN, M., D.J. WEBER et S.L. HESS, 1972 -
Total, polar and neutral lipids of *Rhizopus arrhizus* Fischer.
Lipids 7 : 430-434.
- GUNASEKARAN, M., W.M. HESS et D.J. WEBER, 1972 -
The fatty acid composition of conidia of *Aspergillus niger*
V. Tiegh.
Can. J. Microbiol. 18 : 1575-1576.

- GUNASEKARAN, M., W.M. HESS et D.J. WEBER, 1974 -
Lipids and ultrastructure of *Phymatotrichum omnivorum*.
Trans. Brit. Mycol. Soc. 63 : 519-525.
- GURR, M.I. et A.T. JAMES, 1980 -
Lipid Biochemistry, 3ème éd. ; Chapman Hill, New-York.
- GURR, M.J., M.P. ROBINSON et A.T. JAMES, 1969 -
The mechanism of formation et polyinsaturated fatty acids by
photosynthetic tissue.
Eur. J. Biochem. 9 : 70-78.
- HASHIMOTO, T., C.D.R. WU et H.J. BLUMENTHAL, 1972 -
Characterization of l-leucine induced germination of
Trichophyton mentagrophytes microconidia.
J. Bacteriol. 112 : 967-976.
- HASKINS, R.H., A.P. TULLOCH et R.G. MICETICH, 1964 -
Steroids and the stimulation of sexual reproduction of a species
of *Pythium*.
Can. J. Microbiol., 10 : 187-195.
- HENDRIX, J.W., 1970 -
Sterols in growth and reproduction of fungi.
Ann. Rev. Phytopath., 8 : 111-130.
- HENDRIX, J.W., 1975 -
Cholesterol uptake and metabolism by *Pythium* and *Phytophthora*
species.
Mycologia 67 : 663-666.
- HENRY, S.A. et H.O. HALVORSON, 1973 -
Lipid synthesis during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*.
J. Bacteriol. 114 : 1158-1163.
- HITCHCOCK, C. et B.W. NICHOLS, 1971 -
Plant lipid Biochemistry.
Academic Press, London and New-York, 387 p.
- HOLM, L., 1957 -
Etudes taxonomiques sur les Pléosporacées.
Symbol. Bot. Upsal. 14, 188 p.
- HOLTZ, R.B. et L.C. SCHISLER, 1971 -
Lipid metabolism of *Agaricus bisporus* (large) Sing. : I. Analysis
of sporophore and mycelial lipids.
Lipids 6 : 176-180.
- HOLTZ, B. et L.C. SCHISLER, 1972 -
Lipid metabolism of *Agaricus bisporus* (large) Sing. : II.
Biosynthesis of sporophore lipids.
Lipids 7 : 251-255.
- HOWARD, A.J., 1978 -
Translocation in fungi.
Trans. Br. Mycol. Soc. 70, 2 : 265-269.

- HUANG, Th and L.S. LEU, 1976 -
Production of sporangia by *Phytophthora palmivora* Butler
(en Chinois).
Pl. Prot. Bull. 18 (4) : 330-337.
- ILLINGWORTH, R.F., A.H. ROSE and A. BECKETT, 1973 -
Changes in the lipid composition and fine structure of
Saccharomyces cerevisiae during ascus formation.
J. Bacteriol. 113 : 373-386.
- ITOH, S., S. TAKAHASHI, M. TSUBOI, C. SHIMODA et M. HAYASHIBE, 1976 -
Effect of light on sexual flocculation in *Schizosaccharomyces*
japonicus.
Plant Cell Physiol. 17 : 1355-1358.
- JACK, R.C.M., 1964 -
Lipid metabolism in fungi. I Lipids of the conidia of
Glomerella cingulata.
Contr. Boyce Thompson Inst. 22 : 311-333.
- JACKSON, G.V.H. et B.E.J. WHEELER, 1974 -
Perennation of *Sphaerotheca morsuuae* as cleistocarps.
Trans. Br. Mycol. Soc. 62 : 73-87.
- JACQUET, M., 1979 -
Pythium tracheiphilum Matta, agent du flétrissement de la laitue
(*Lactuca sativa* L.). Etude biologique et épidémiologique.
Thèse 3ème cycle, Lille, 131 p.
- KANEKO, H., M. HOSOHARA, M. TANAKA et T. ITOH, 1976 -
Lipid composition of 30 Species of yeast.
Lipids 11 : 837-840.
- KATES, M., 1972 -
Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification
of lipids ; in Work, T.S. et E. Work, Laboratory techniques in
Biochemistry and molecular biology, Vol. 3, p. 274-610.
North-Holland Publishing Co.
- KATES, M., A.C. WILSON et A.I. DE LA ROCHE, 1978 -
Lipid biosynthesis in soy-bean cell suspension cultures. "Recent
advances in the biochemistry and physiology of plant lipids".
Symposium Göteborg, 28-30 August.
- KELLY, M.S. et J.L. GAY, 1969 -
The action of visible radiation on the formation and properties
of *Saccharomyces* ascospores.
Arch. Mikrobiol. 66 : 259-272.
- KELLY, P.J., KELLEHER, J.K. and WRIGHT B.E., 1979 -
The tricarboxylic acid cycle in *Dictyostelium discoideum*.
A model of the cycle at preculmisation and aggregation.
Biochem. J., 184 : 589-587.
- KISCLEVA, S.I. et N.M. GERASIMOVA, 1972 -
Lipid composition of some (+) and (-) strains of *Cunninghamella*
elegans and *Cunninghamella echinulata*.
Microbiology 41 : 231-233.

- KOBR, M.J. et G. TURIAN, 1967 -
Metabolic changes during sexual differentiation in *Allomyces*.
Arch. Mikrobiol. 57 : 271-279.
- KOBR, M.J., D.E. BIANCHI, N. OULEVEY et G. TURIAN, 1967 -
The effect of oxygen tension on growth, conidiation, and alcohol
production of *Neurospora crassa*.
Can. J. Microbiol. 13 : 805-809.
- KORNBERG H.L. et J.F. COLLINS, 1958 -
The glyoxylate cycle in *Aspergillus niger*.
Biochem. J. 68 : 3P-4P.
- KORNBERG H.L., A.M. GOTTO et P. LUND, 1958 -
Effect of growth-substrates on isocitritase formation by
Pseudomonas ovalis Chester.
Nature 182 : 1430-1431.
- KUSHWAHA, S.C. et M. KATES, 1977 -
Lipid composition of *Neurospora crassa*.
Lipids, 1977, 11 : 778-780.
- KUZNETSOV , L.V., V.F. KORNILOVA et I.V. AGIEVA, 1977 -
Composition des lipides des souches de *Verticillium dahliae*
de pouvoir pathogène différent. (en Russe).
Prikl. Biokhim. Mikrobiol. SSSR, 13, 4 : 527-530.
- KUZORNIKOVA, T.A. et al., 1978 -
Sexual and asexual reproduction of *Blakeslea trispora*
Thaxtu and the effects of different factors on it. (Russe).
Mikol. Fitopath. 12 (2) : 107-111.
- LACOSTE, L., 1964 -
La reproduction sexuelle de divers *Leptosphaeria* sur un milieu
semi-synthétique.
C.R. Acad. Sc. 258 : 2877-2880.
- LACOSTE, L., 1965 -
Biologie naturelle et culturale du genre *Leptosphaeria* Cesati
et de Notaris. Déterminisme de la reproduction sexuelle.
Thèse, Toulouse, 234 p.
- LANGEAKE, P., 1974 -
Sterols in potato leaves and their effects on growth and
sporulation of *Phytophthora infestans*.
Trans. Br. Mycol. Soc. 63 : 573-586.
- LARPENT, J.P., 1965 -
Caractères et déterminisme des corrélations d'inhibition dans
le mycélium jeune de quelques champignons.
Thèse Doc. Sci. Nat., Clermont-Ferrand, 130 p.
- LATGE, J.P. et C. DE BIEVRE, 1977 -
Variations quantitatives des principaux constituants cellulaires
d'*Entomophthora virulenta* lors de la sporogénèse.
Can. J. Microbiol. 23 (10) : 1340-5.

- LAW, S.W.T. et D.N. BURTON, 1976 -
Lipid metabolism in *Achlya* : Studies of lipid turnover during development.
Can. J. Microbiol. 22 : 1710-1715.
- LAW, S.W.T. and D.N. BURTON, 1976 -
Lipid metabolism in *Achlya* : changes in lipid composition during development.
Can. J. Microbiol. 22 : 1716-1719.
- LEACH, C.M., 1964 -
The relations hip of visible and ultraviolet light to sporulation of *Alternaria chrysantemi*.
Trans. Brit. Micol. Soc. 47 : 153-158.
- LEACH, C.M., 1965 -
Ultra-violet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi.
Can. J. Bot. 43 : 185-200.
- LEBBE, T., 1968 -
Croissance et développement du *Leptosphaeria typhae* Karsten sur milieu synthétique.
D.E.S., Fac. Sciences Lille, 63 p.
- LEHRIAN, D.W., L.C. SCHISLER et S. PATTON, 1976 -
The effects of linoleate and acetate on the growth and lipid composition of mycelium of *Agaricus bisporus*.
Mycologia 68 : 453-462.
- LEDERER, E., 1970 -
Cours de Biochimie : Lipides
Ediscience, 124 p.
- LEEGWATER, D.C., C.G. YOUNGS, J.F.T. SPENCER et B.M. CRAIG, 1962 -
Investigations into the production of lipids by submerged cultures of the mushroom *Tricholomia nudum*. I. Fatty acid composition of neutral lipids and phospholipids as a function of time. *Can. J. Biochem. Physiol.* 40 : 847-855.
- LEONIAN, L.H. et V.G. LILLY, 1937 -
Partial purification of a vitamin-like substance which stimulates sexual reproduction in certain fungi.
Am. J. Bot. 24 : 700-702.
- LE ROUX, P., 1962 -
Métabolisme des acides organiques dans les carpophores d'*Agaricus campestris*.
Ann. Physiol. Vég. 4 : 149-160.
- LE ROUX, P., 1966 -
Métabolisme de l'acétate 2^{14}C dans le carpophore du champignon de couche (*Agaricus campestris* Fr., var. *bisporus*).
Ann. Physiol. Vég. 8 : 197-208.

- LEROUX P. et M. GREDT, 1978 -
Effect of imazalil on ergosterol biosynthesis in *Penicillium expansum* (Link).
C.R. Acad. Sci. Sér. D. 286 (5) : 427-430.
- LEVY, M.R. et A.M. ELLIOTT, 1968 -
Biochemical and ultrastructural changes in *Tetrahymena pyriformis* during starvation.
J. Protozool. 15 : 208-222.
- LILLY, V.G. et H.L. BARNETT, 1947 -
The effect of thiamin, biotin and food concentration on the formation of perithecia by *Chaetonnium convolutum*.
Amer. J. Bot. 34 : 594.
- LINGAPPA, Y. et A.S. SUSSMAN, 1959 -
Amer. J. Bot. 46 : 671.
- LONG, C., 1968 -
Biochemist's Handbook. Spon Ltd, London, 1192 p.
- LONG, B.H. et E.L. COE, 1974 -
Changes in neutral lipid constituents during differentiation of the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*.
J. Biol. Chem. 249 : 521-529.
- LONG, B.H. et E.L. COE, 1977 -
Fatty acid compositions of lipid fractions from vegetative cells and mature sorocarps of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*.
Lipids 12, 5 : 414-417.
- LOPEZ A. et J. BURGOS, 1976 -
Lipid composition of *Sporendenoma epizoum*.
Phytochemistry 15 : 971-975.
- LÖSEL, D.M. et D.H. LERVIS, 1974 -
New Phytologist 73 : 1157.
- LOWENSTEIN, J.M., 1969 -
Lipids ; in Colowick, S.P. et N.O. Kaplan, "Methods in Enzymology", Vol. 14, 771 p.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL, 1951 -
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193 : 265-275.
- LUKENS, R.J., 1963 -
Photoinhibition of sporulation in *Alternaria solani*.
Amer. J. Bot. 50 : 720-724.
- LUKENS, R.J., 1965 -
Reversal by red light of blue light inhibition of sporulation in *Alternaria solani*.
Phytopath. 55 : 1031.

- LYNEN, F., 1969 -
Yeast fatty-acid synthase ; in Colowick, S.P. et N.O. Kaplan,
"Methods in Enzymology", Academic Press, New-York, Vol. 14, 17-33.
- LYNEN, F., 1980 -
On the structure of fatty-acid synthetase of yeast.
Eur. J. Biochem. 112 : 431-442.
- LYNEN, F., I. HOPPER-KESSEL et H. EGGERER, 1964 -
Zur Biosynthese der Fettsäuren. III. Die Fettsäuresynthetase
der Hefe und die Bildung enzymgebundener Autessigsäure.
Biochem. Z. 340 : 95-124.
- LYSEK, G., 1976 -
Formation of perithecia in colonies of *Podospora anserina*.
Planta 133 (1) : 81-83.
- MC CORKINDALE, N.J., S.A. HUTCHINSON, B.A. PUSSEY, W.T. SCOTT et
R. WHEELER, 1969 -
A comparaisón of the types of sterol found in species of the
Saproleniales and Leptomitales with those found in some other
Phycomycetes.
Phytochemistry 8 : 861-867.
- MC CURDY Jr, H.D. et E.C. CANTINO, 1960 -
Isocitritase, glycine-alanine transaminase and development
in *Blastocladiella emersonii*.
Plant. Physiol. 35 : 463-476.
- MC MORRIS, T.C., R. SESHADRI, G.R. WEIHE, G.P. ARSENAULT et A.W. BARKSDALE,
1975 -
Structures of oogoniol -1, -2 et -3, steroidal sex hormones of
the water mould *Achlya*.
J. Am. Chem. Soc. 97 : 2544-2545.
- MAHLER, H.R. et E.H. CORDES, 1966 -
Biological chemistry.
Harper et Row, Naw-York, 872 p.
- MAIELLO, J.M., 1977 -
The influence of ultraviolet light and carbohydrate nutrition
on pycnidium formation in *Phyllosticta antirrhini*.
Mycologia 69 (2) : 349-354.
- MAIELLO, J.M., 1978 -
The diurnal effects of ultravioletlight on pycnidium production
in *Phyllosticta antirrhini*.
Mycologia 70, 1 : 184-187.
- MANACHERE, G., 1970 -
Recherches physiologiques sur la fructification de *Coprinus*
congregatus Bull. ex Fr. Action de la lumière. Rythme de
production de carpophores.
Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. Vég. 11 : 1-95.
- MANDAL, S.B., P.C.SEN et P. CHAKRABARTI, 1978 -
Effect of respiratory deficiency and temperature on the
mitochondrial lipid metabolism of *Aspergillus niger*.
Can. J. Microbiol. 24 (5) : 586-92.

- MANGNALL, D. et G.S. GETZ, 1973 -
Phospholipids ; in J.A. Erwin, *Lipids and biomembranes of eukaryotic microorganismes*, Academic Press, p. 145-195.
- MARINETTI, G.V., J. ERBLAND et J. KOCHEN, 1957 -
Quantitative chromatography of phosphatides.
Fed. Proc. 16 : 837-844.
- MAROUF, B.A. et S.K. MALHOTRA, 1976 -
Alteration in lipid composition during the germination and growth of spores of *Phycomyces blakesleeanus*.
Microbios Lettres 1 : 117-123.
- MARTIN, H.F. et J.L. DRISCOLL, 1966 -
Gas chromatographic identification and determination of barbiturates.
Anal. Chem. 38 : 345-346.
- MATSUURA, S., H. TAKAHASHI, M. MANABE, 1975 -
Biomass production of baker's yeast from acetate as a sole carbon source.
J. Ferment. Technol. 53, 9 : 658-63.
- MAZLIAK, P., 1968 -
Le métabolisme des lipides dans les plantes supérieures.
Masson et Cie, Paris, 223 p.
- MERCER, E.I. et K. BARTLETT, 1974 -
Sterol esters of *Phycomyces blakesleeanus*.
Phytochemistry 13 : 1099-1105.
- MILLS, G.L., R.B. MYERS et E.C. CANTINO, 1974 -
Lipid changes during development of *Blastocladiella emersonii*.
Phytochemistry 13 : 2653-2657.
- MILLS, G.L. et E.C. CANTINO, 1974 -
Lipid composition of the zoospores of *Blastocladiella emersonii*.
J. Bacteriol. 118 : 192-201.
- MILLS, G.L. and E.C. CANTINO, 1977 -
Isolation and characterization of lipid globules from the zoospores of *Blastocladiella emersonii*.
Archs. Microbiol. 112 (1) : 195-200.
- MILLS, G.L. et E.C. CANTINO, 1978 -
The lipid composition of the *Blastocladiella emersonii* γ -particle and the function of γ -particle lipid in chitin formation.
Exp. Mycol. 2 : 99-109.
- MILLS, G.L. et E.C. CANTINO, 1980 -
The glycolipid involved in chitin synthesis by zoospores of *Blastocladiella emersonii* is a monoglucosyl-diacylglycerol.
Exp. Mycol. 4 : 175-180.
- MOLLIARD, M., 1924 -
Retentissement de la composition minérale du milieu nutritif sur la structure du *Sterigmatocystis nigra*.
C.R. Acad. Sc. 178 : 1865-1867.

- MONOD, J., 1942 -
Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.
Réédition, Hermann, Paris, 1958, 210 p.
- MOOR, H., 1967 -
Endoplasmic reticulum as the initiator of bud formation in yeast.
Arch. Mikrobiol. 57 : 135-146.
- MORQUER, R., 1931 -
Recherches morphogénétiques sur le *Dactylium macrosporium*.
Thèse, Paris, 391 p.
- MUMMA, R.O., R.D. SEKURA et C.L. FERGUS, 1971 -
Thermophilic Fungi : II. Fatty acid composition of polar and
neutral lipids of thermophilic and mesophilic fungi.
Lipids 6 : 584-588.
- MUMMA, R.O., R.D. SEKURA et C.L. FERGUS, 1971 -
Thermophilic Fungi : III. The lipids of *Humicola grisea* var.
thermoidea.
Lipids 6 : 589-594.
- NERUD, F. et V. MUSILEK, 1974 -
Lipids in fruiting bodies of the Basidiomycete *Oudemansiella*
mucida.
Folia Microbiol. 20 : 24-28.
- NES, W.R., 1974 -
Role of sterols in membranes.
Lipids 9 : 596-612.
- NES, W.R., J.H. ADLER, B.C. SEKULA et K. KREVITZ, 1976 -
Discrimination between cholesterol and ergosterol by yeast
membranes.
Biochem. Biophys. Res. Communic. 71 : 1296-1302.
- NG, M.L., J.E. SMITH et A.F. MC INTOSH, 1973 -
Changes in activity of tricarboxylic acid cycle and glyoxylate
cycle enzymes during synchronous development of *Aspergillus niger*.
Trans. Brit. mycol. Soc. 61 : 13-20.
- NG, K.H. et M.A. LANEELLE, 1977 -
Lipids of the yeast *Hansenula anomala*.
Biochimie 59 : 97-104.
- NGUYEN VAN H., 1967 -
Etude des rythmes internes de croissance chez le *Podospora anserina*.
Ann. Sci. Nat. Bot. 9 : 257-360.
- NISHI, A., 1961 -
Role of polyphosphate and phospholipid in germinating spores of
Aspergillus niger.
J. Bacteriol. 81 : 10-19.
- NISHIKAWA, Y., I. NAKAMURA, T. KAMHARA et S. FUKUI, 1974 -
Effects of thiamine and pyridoxine on the composition of fatty
acids in *Saccharomyces carlsbergensis* 4228.
Biochem. Biophys. Res. Com. 59 : 777-780.



- NISHIKAWA, Y., I. NAKAMURA, T. KAMIHARA and S. FUKUI, 1977 -
Effects of thiamine and pyridoxine on the lipid composition of
Saccharomyces carlsbergensis 4228.
Biochem. biophys. Acta 486 (3) : 483-489.
- NOMBELA-CANO, C. et J.F. PEBERDY, 1971 -
The lipid composition of *Fusarium culmorum* mycelium.
Trans. Br. mycol. Soc. 57 : 342-344.
- OHMONI, K. et M. NAKAJIMA, 1970 -
Effect of light on sporulation of *Pyricularia oryzae* Cavara.
Ann. Phytop. Soc. Japan 36 : 11-16.
- OLSON, J.A., 1954 -
The d-isocitric lyase system : the formation of glyoxylic and
succinic acids from d-isocitric acid.
Nature 174 : 695-696.
- OLSON, J.A., 1959 -
The purification and properties of yeast isocitric lyase.
J. biol. Chem., 234 : 5-10.
- OULEVAY-MATIKIAN, N. et G. TURIAN, 1968 -
Contrôle métabolique et aspects structuraux de la conidiation
(macro-microconidies) de *Neurospora crassa*.
Arch. Mikrobiol. 75 : 323-327.
- PARGUEY, A., 1966 -
Recherches sur l'ontogénèse et l'anatomie comparée des ascocarpes
des Pyrénomycètes ascoloculaires.
Thèse Doct. Sci. Nat., Paris, 289 p.
- PATRICK, M.A., V.K. SANGAR et P.R. DUGAN, 1973 -
Lipids of *Smittium culisetae*.
Mycologia 65 : 122-127.
- PEBERDY, J.F. et D.K. TOOMER, 1976 -
Effect of nutrient starvation on the utilization of storage
lipids in *Mortierella ramanniana*.
Microbios 13 : 123-131.
- PENNAM, C.S. et J.H. DUFFUS, 1976 -
Accumulation of ergosterol during the cell cycle of the budding
yeast *Kluyveromyces fragilis*.
Z. Allg. Mikrobiol. 16 : 483-485.
- PITRYUCK, I.A., I.S. ZVYAGINTSEVA et I.P. BAB'EVA, 1976 -
Fractional composition of the lipids of certain species of yeasts.
Microbiology 44 : 734-739.
- POCHON, J. et P. TARDIEUX, 1962 -
Techniques d'analyse en microbiologie du sol.
Ed. de la Tourelle, St Mandé, 108 p.
- PREVOST-MONNOT, F., 1974 -
Recherches sur la sporulation de *Pilobolus Kleinii* Van Tiegh.
(Mucorale) et sa photoinduction.
Thèse, Paris-Sud (Orsay).

- QUAIN, D. and J.M. HASLAM, 1977 -
The effects of catabolite repression on the biosynthesis of sterols
in *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc. Soc. Gen. Microbiol. 5 (1) : 15.
- RAJIR, K.S., R. MAHISHWARI et P.S. SASTRI, 1976 -
Lipids of some thermophilic fungi.
Lipids 11 (10) : 741-746.
- RAMAKRISHNAN, C.W. et S.M. MARTIN, 1955 -
Isocitric dehydrogenase in *Aspergillus niger*.
Arch. Biochem. 55 : 403.
- RAPER, J.R., 1952 -
Chemical regulation of sexual processes in the Thallophytes.
Botan. Rev. 18 : 447-545.
- RATTRAY, J.B.M. and HAMBLETON J.E., 1977 -
The lipid compounds of two methanol-assimilating yeasts.
Proc. Soc. gen. Microbiol. 5 (1) : 16.
- REDDY, S. et G. TURIAN, 1968 -
Inédit. in G. Turian, Différenciation fongique, 1969,
Masson et Cie, Paris, 1969.
- REISS, J., 1967 -
Der cytochemische Nachweis von Cytochromoxydase und Peroxydasen
bei Pilzen.
Histochemie 9 : 281-299.
- RENKONEN, O. et P. VARS, 1967 -
Thin-layer chromatography of Phosphatides and Glycolipids ;
in Marinetti, G.V., "Lipid chromatographic analysis",
T. 1, p. 41-98.
- ROBERT, J.C. et R. DURAND, 1978 -
Light and temperature requirements during fruit-body development
of a Basidiomycete Mushroom, *Coprinus congregatus*.
Physiol. Plant 46 : 174-178.
- RÖSSELER, H., W. PEUCKERT et H.J. RISSE, 1978 -
The biosynthesis of glycolipids during the differentiation of
the slime mold *Dictyostelium discoideum*.
Molec. Cell. Biochem. 20 : 3-15.
- ROUSER, G., G. KRITCHEVSKY et A. YAMAMOTO, 1967 -
Column chromatographic and associated procedures for separation
and determination of phosphatides and glycolipids ; in Marinetti,
G.V., "Lipid chromatographic analysis", T. 1, p. 99-162.
- RUSSELL, N.J., D. KERRIDGE and J.T. BOKOR, 1977 -
Sterol metabolism during germination of conidia of *Aspergillus*
fumigatus.
J. gen. Microbiol. 101 (2) : 197-206.
- SAFE, S., 1973 -
The effect of environment on the free and hydrosoluble sterols
of *Mucor rouxii*.
Biochim. Biophys. Acta 326 : 471-475.

- SAFE, S. and D. BREWER, 1973 -
Lipid composition of *Chaetomium cochlioides* : effect of media.
Lipids 8 : 311-314.
- SAFE, S. et J. DUNCAN, 1974 -
Effect of oxygen levels on the fatty acids and lipids of
Mucor rouxii.
Lipids 9 : 285-289.
- SANCHOLLE, M. et L. CHAVANT, 1976 -
Production lipidique comparée de l'*Aspergillus ochraceus* et de
Mucor mucedo cultivés sur un même milieu.
C.R. Acad. Sc., Sér. D, 282 : 2071.
- SANTRA, S. et B. NANDI, 1976 -
Introduction of basidiocarp formation of three strains of
Fomes durissimus Lloyd in culture.
Curr. Sci. 45, n° 8 : 308-309.
- SAZ, H.J. et E.P. HILLANY, 1956 -
The formation of glyoxylate and succinate from tricarboxylic
acid by *Pseudomonas aeruginosa*.
Biochem. J. 62 : 563-569.
- SCHOCH, H., 1959 -
Über geschlechtsbedingte Unterschiede in Wachstum und
Fumarsäure-Stoffwechsel von *Rhizopus*.
Arten. Ber. Schweiz. Botan. Ges. 69 : 112-150.
- SKIPSKI, V.P., R.F. PETERSON et M. BARCLAY, 1964 -
Quantitative analysis of Phospholipids by thin-layer chromatography.
Biochem. J. 90 : 374-378.
- SMITH, J.D. et P.M. SILVERMAN, 1973 -
Lipid turnover during morphogenesis in the water mold
Blastocladiella emersonii.
Biochem. Biophys. Res. Com. 54 : 1191-1197.
- SMITH, R.A. et I.C. GUNSALUS, 1954 -
Isocitratase : a new tricarboxylic acid cleavage system.
J. Amer. Chem. Soc. 76 : 5002-5003.
- SMITH, R.A. et I.C. GUNSALUS, 1955 -
Distribution and formation of isocitritase.
Nature 175 : 774-775.
- SOBUS, M.T. et C.E. HOLMLUND, 1976 -
Extraction of lipids from yeast.
Lipids 11 (4) : 341-8.
- SOBUS, M.T., C.E. HOLMLUND and N.F. WHITTAKER, 1977 -
Effects of the hypocholesteremic agent trifluperidol on the
sterol, steryl ester, and fatty acid metabolism of *Saccharomyces*
cerevisiae.
J. Bacteriol. 130 (3) : 1310-1316.

- STALLINGS, F.O., 1970 -
The physiological control of light-induced conidiation in
Aspergillus ornatus.
Ph. D. Thesis, University of Wisconsin, U.S.A.
- STARRATT, A.N., 1976 -
Sterols of *Alternaria Kikuchiana*.
Phytochemistry 15 (12) : 2002-2003.
- STEPANICHENKO, N.N. et al., 1976 -
Metabolites du champignon pathogène *Verticillium dahliae*. 3.
Composition des lipides du *Verticillium dahliae*. (Russe).
Khim. Prir. Soedin. (4) : 431-434.
- STOOPS, J.K. et S.J. WAKIL, 1981 -
Animal fatty-acid synthetase. A novel arrangement of the
B-Ketsacyl synthetase sites comprising domains of the two
subunits.
J. biol. Chem. 256 : 5128-5133.
- STYMNE, S., 1978 -
Linoleate synthesis in cell-free preparations of developing
oil seeds. Recent advances in the Biochemistry and Physiology
of plant lipids.
Symposium, Götetorg, 28-30 August.
- TAN, K.K., 1978 -
Light-induced fungal development ; in Smith, J.E. et D.R. Berry,
The Filamentous Fungi, T. 3, p. 334-357, Edward Arnold, édit.
- TAN, K.K. et H.A.S. EPTON, 1974 -
Further studies on light and sporulation in *Botrytis cinerea*.
Trans. Brit. Mycol. Soc. 62 : 105-112.
- THIMMICK, M.B., V.G. LILLY et H.L. BARNETT, 1951 -
Factors affecting sporulation of *Diaporthe phascolorum* var. *baratis*
from soybean.
Phytopath. 41 : 327-336.
- THORN, M.B., 1953 -
Inhibition by malonate of succinic dehydrogenase in heart-muscle
preparations.
Biochem. J. 54 : 540-547.
- TOKUNAGA, J.T., J.J. MALCA, D.C. ERWIN et N.T. KEEN, 1969 -
Respiratory enzymes in the spores of *Verticillium albo-atrum*.
Phytopath. 59 : 1829-1832.
- TRIONE, E.J. et T.M. CHING, 1971 -
Fatty acids in teliospores and mycelium of the dwarf bunt fungus,
Tilletia controversa.
Phytochemistry 10 : 227-229.
- TRIONE, E.J., C.M. LEACH et J.J. MUTCH, 1966 -
Sporogenic substance isolated from fungi.
Nature 212 : 153-164.

- TURIAN, G., 1958 -
Recherches sur les bases cytochimiques et cytophysiologiques de la morphogenèse chez le Champignon aquatique *Allomyces*.
Rev. Cytol. Biol. Vég. 19 : 241-272.
- TURIAN, G., 1960 -
Prédominance de la glycolyse aérobie et déficience oxydative lors de la différenciation gamétangiale mâle chez *Allomyces*.
C.R. Acad. Sci. 250 : 2412-2414.
- TURIAN, G., 1960 -
Indices d'un fonctionnement compensatoire du cycle glyoxylique lors de la différenciation mâle chez *Allomyces* et *Neurospora*.
Bull. Soc. Bot. Suisse, 70 : 451-458.
- TURIAN, G., 1960 -
Déficiences du métabolisme oxydatif et différenciation sexuelle chez *Allomyces* et *Neurospora*. Activité d'une DPN-déshydrogénase lactique chez *Allomyces*.
Path. Microbiol. 23 : 687-699.
- TURIAN, G., 1961 -
L'acétate et son double effet d'induction isocitratasique et de différenciation conidienne chez les *Neurospora*.
C.R. Acad. Sci. 252 : 1374-1376.
- TURIAN, G., 1963 -
Sur le mécanisme de l'induction isocitratasique chez *Allomyces* et *Neurospora*.
Path. et Microbiol. (Basel) 26 : 553-563.
- TURIAN, G., 1969 -
Différenciation fongique.
Ed. Masson, Paris, 144 p.
- TURIAN, G., 1978 -
Sexual morphogenesis in the Ascomycetes ; in Smith, J.E. et D.R. Berry, *The filamentous fungi*, Vol. III, p. 315-333, Edward Arnold édit.
- TURIAN, G. et N. MATIKIAN, 1966 -
Conidiation of *Neurospora crassa*.
Nature 212 : 1067.
- TURIAN, G. et J. SEYDOUX, 1962 -
Déficience de l'activité de la déshydrogénase succinique dans les mitochondries isolées du *Neurospora* en condition d'induction isocitratasique par culture sur acétate.
C.R. Acad. Sci. 259 : 755-757.
- TURIAN, G., J. SEYDOUX et D. VOLKMANN, 1962 -
Activité isocitratasique et type de sporulation chez *Neurospora tetrasperma* et chez *N. sitophila*, souche normale et mutant microconidien.
Path. et Microbiol. (Basel) 25 : 737-741.

- VAN DEN ENDE, H., 1976 -
Sexual interactions in plants.
Academic Press, London, 186 p.
- VANDEWALLE, B., 1973 -
Les stérols du *Leptosphaeria typhae* (Karsten).
Thèse 3^e cycle, Lille, 87 p.
- VIALA, G., 1969 -
La synthèse des acides aminés au cours du développement du
Leptosphaeria typhae (Auersw.) Karsten.
C.R. Acad. Sci. 268 : 298-301.
- VIALA, G., 1972 -
Développement du *Leptosphaeria typhae*.
Métabolisme intermédiaire et reproduction sexuée.
Thèse, Toulouse, 137 p.
- VIALA, G. et L. LACOSTE, 1971 -
Action de la lumière sur le métabolisme des acides organiques
chez le *Leptosphaeria typhae* (Auersw.) Karsten.
Bull. Soc. Mycol. France 87 : 629-645.
- VIALA, G., L. LACOSTE et J. CARLES, 1968 -
Evolution des acides organiques mycéliens chez le *Leptosphaeria
typhae* (Auersw.) Karsten, cultivé à la lumière et à l'obscurité.
C.R. Acad. Sci., Sér. D, 267 : 1230-1232.
- VIALA, G. et J. CARLES, 1969 -
Influence de la lumière sur les variations de l'acide glutamique
libre durant la croissance du *Leptosphaeria typhae* (Auersw.) Karsten.
C.R. Soc. Biol. 163 : 2750-2754.
- VIALA, G. et G. VIDAL, 1972 -
Reproduction sexuée, croissance et métabolisme intermédiaire chez
le *Leptosphaeria typhae*.
Physiol. Vég. 10 : 481-491.
- VIDAL, G., 1971 -
Relation entre le métabolisme des acides organiques et la repro-
duction sexuée du *Leptosphaeria typhae* (Auersw.) Karsten.
Thèse Spécialité, Mycologie, Toulouse, 120 p.
- VIDAL, G., 1979 -
Evolution de la teneur en lipides du *Leptosphaeria typhae*
en fonction de sa croissance et de sa reproduction sexuée.
Can. J. Bot. 57 : 1701-1705.
- VIDAL, G. et G. VIALA, 1973 -
Influence de la date d'éclairement sur la fructification et le
métabolisme du *Leptosphaeria typhae*.
Ann. Sc. Nat. Botanique, 12^{ème} série, 14 : 53-70.
- VIDAL, G. et G. VIALA, 1979 -
Influence de l'éclairement continu sur la croissance, la repro-
duction sexuée et le métabolisme du *Leptosphaeria typhae*.
Ann. Sc. Nat. Botanique, 13^{ème} série, 1 : 283-288.

- VIDAL, G., L. LACOSTE, J. ALAIS, A. LABLACHE-COMBIER, A. MAQUESTIAU, Y. VAN HARVERBECKE, R. FLAMMARGE et H. MISPREUVE, 1979 -
Stérols et reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae*
en fonction de la teneur du milieu de culture en xylose.
Phytochemistry 18 : 1405-1408.
- VIDAL, G., T. LEBBE et L. LACOSTE, 1974-1975 -
Etude des conditions de développement et de reproduction
sexuée du *Leptosphaeria typhae*. Mise au point d'un milieu
de culture chimiquement défini.
Rev. Mycol. 39 : 43-52.
- VORBECK, M.L. and G.V. MARINETTI, 1965 -
Separation of glycosyl diglycerides from phosphatides using
silicic acid column chromatography.
J. Lip. Res. 6 : 3.
- WAKIL, S.J., 1961 -
Mechanism of fatty acid synthesis.
J. Lipid Res. 2 : 1-24.
- WEBER, D.J. et W.M. HESS, 1974 -
Lipid metabolism and ultrastructure during spore germination ;
in Weete, J.D., "Fungal lipid biochemistry", P. 289-329
Plenum Press, New-York.
- WEETE, J.D., 1973 -
Sterols of the fungi : distribution and biosynthesis.
Phytochemistry 12 : 1843-1864.
- WEETE, J.D., 1974 -
Fungal lipid biochemistry.
Plenum Press, New-York, 393 p.
- WEETE, J.D., 1980 -
Lipid Biochemistry of fungi and other organisms.
Plenum Press, New-York.
- WEETE, J.D. et W.D. KELLEY, 1977 -
Fatty acids and sterols of *Cronartium fusiforme* basidiospores.
Lipids 12 : 398-401.
- WEETE, J.D., D.J. WEBER et J.L. LASETER, 1970 -
Lipids of *Rhizopus arrhizus* Fischer.
J. Bacteriol. 103 : 536-540.
- WERKMAN, B.A., H.L. SMITS et H. VAN DEN ENDE, 1977 -
Lipid content during sexual development in the homothallic mucor
Zygorhynchus moelleri.
Phytochemistry 16 : 1511.
- WESTERGAARD, M. et H.K. MITCHELL, 1947 -
Neurospora. V. A synthetic medium favoring sexual reproduction.
Amer. J. Bot. 34 : 573-577.
- WONG, D.T.O. et S.J. AJL, 1956 -
Conversion of acetate and glyoxylate to malate.
J. Amer. Chem. Soc. 78 : 3230.

YAEGASHI, H. et HEBERT T.T., 1976 -
Effect of temperature, light and nutrients on production of
perithecia by *Pyricularia*.
Ann. Phytopath. Soc. Japan 42 : 556-562.



R É S U M É

Le *Leptosphaeria typhae* (Auersw.) Karsten (Ascomycètes, Pléosporales, Pléosporacées) produit de très abondants fruits à asques en culture *in vitro* quand les conditions de milieu, d'éclairement et de température sont réglées à leur optimum. Le passage de l'état végétatif à l'état sexué s'accompagne chez lui d'une stimulation des activités oxydatives du métabolisme intermédiaire. Une activation de celles-ci par aération du mycélium augmente le nombre des ascocarpes. A l'inverse, tout facteur inhibant la reproduction sexuée (culture à l'obscurité ou sous éclairement constant, addition d'acétate de sodium) ralentit le cycle citrique et stimule le cycle glyoxylique et la synthèse d'acide lactique.

Lors de l'apparition des périthèces, le "turn-over" des lipides est accéléré, ce qui se traduit par une baisse de la teneur mycélienne en ces corps malgré une forte intensification des activités de synthèse. Concurrément, le degré d'insaturation des acides gras totaux s'élève : on observe donc ici aussi une activation des oxydations. La disparition des lipides affecte surtout les lipides polaires (phospholipides et glycolipides) alors que les lipides neutres, à rôle de réserve, continuent à s'accumuler. La stimulation de la reproduction sexuée par aération du mycélium accélère ces modifications; son blocage, qu'il soit obtenu par culture à l'obscurité, sous éclairement constant ou sur milieu à l'acétate de sodium, les réprime.

L'étude des stérols du mycélium montre qu'une fertilité élevée du champignon coïncide avec une forte teneur en ergostérol, alors que le cholestérol est d'autant plus abondant que la reproduction sexuée est plus inhibée. Ce résultat, par comparaison avec ceux obtenus sur d'autres micromycètes, confirme à nouveau l'activation des oxydations cellulaires lors de la formation des appareils reproducteurs.

MOTS-CLEFS

LEPTOSPHERIA - REPRODUCTION SEXUEE - METABOLISME INTERMEDIAIRE -

LIPIDES - METABOLISME