

50376
1985
195

N° d'ordre : 628

50376
1985
195

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Bertrand DEHORTER



DETERMINISME ET PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION SEXUEE DU *NECTRIA GALLIGENA* BRES

Soutenu le 9 Décembre 1985 devant la Commission d'Examen

MM.	G.	BOMPEIX	Professeur à l'Université de Paris VI
	R.	JACQUES	Directeur de Recherches au C.N.R.S.
	L.	LACOSTE	Professeur à l'Université de Lille I
	G.	TURIAN	Professeur à l'Université de Genève
	P.	VERNET	Professeur à l'Université de Lille I

A Stéphanie, Claudine, Marceline et Jules

A Messieurs les Membres du Jury :

- Monsieur le Professeur Louis LACOSTE. Si je n'ai pas toujours suivi la voie que vous souhaitiez, ni répondu à vos espérances, je ne saurais oublier, Monsieur, tous les efforts que vous avez déployés pour me permettre une recherche sans souci des conditions matérielles. A cet égard, la réalisation expérimentale doit beaucoup à la qualité de l'équipement de votre laboratoire, qualité qui repose sur vos conceptions et vos innombrables démarches. En outre, je vous sais gré, Monsieur, de votre attachement à notre liberté de travail. Je vous prie donc, Monsieur LACOSTE, de croire à ma sincère reconnaissance.

- Monsieur le Professeur G. BOMPEIX. Certaines de vos recherches ont pour sujet le *Nectria galligena*, j'ose espérer que quelque résultat présenté ici vous paraisse digne d'intérêt. Vous avez bien voulu, Monsieur, lire et juger cette thèse, j'en suis très honoré.

- Monsieur R. JACQUES, Directeur de recherches au C.N.R.S.. La bienveillance de votre accueil, votre continuelle disponibilité, votre science de la lumière ont fait de mes séjours au Phytotron de Gif-sur-Yvette des souvenirs de grande qualité. Je vous suis très reconnaissant, Monsieur, de toutes vos suggestions et critiques qui n'ont pas manqué d'améliorer nos publications et cette thèse. Je suis fier, Monsieur, de votre collaboration et de votre participation à ce jury.

- Monsieur le Professeur G. TURIAN. Le perpétuel anxieux que je suis l'est encore davantage à l'idée que vous avez bien voulu, Monsieur, examiner cette étude de la différenciation sexuée du *Nectria galligena*. Seule, la naturelle simplicité qui est vôtre me rassure un peu. Je vous suis très obligé, Monsieur, de l'honneur que vous me faites.

- Monsieur le Professeur Ph. VERNET. Pour avoir, quasi-quotidiennement, l'occasion d'apprécier votre affabilité et de savoir vos multiples préoccupations, je suis très touché, Monsieur, que vous ayez accepté cette tâche supplémentaire de lire et de critiquer ce mémoire. Je vous prie de croire, Monsieur, en ma profonde gratitude.

Cette thèse est basée sur une dizaine de publications, aussi pour leur précieuse collaboration et leur grande courtoisie, je ne suis pas prêt d'oublier :

- Madame J. ALAIS, chargée de recherches CNRS, Mademoiselle M.F. BROCCQUET et Monsieur POLLET, maître-assistant, du laboratoire de chimie organique physique (USTL) du Professeur A. LABLACHE-COMBIER
- Madame A. PARGUEV-LEDUC, maître-assistante à l'Université Paris VI
- Monsieur le Professeur N. ARPIN et Monsieur J. BERNILLON, technicien CNRS, à l'Université Claude Bernard de Lyon
- Monsieur J. FAVRET, maître-assistant à l'Université Paul Sabatier de Toulouse
- Monsieur R. PERRIN, INRA de Dijon.

Mesdames, Mademoiselle, Messieurs, je ne puis que vous réitérer mes plus sincères remerciements : si ce mémoire est jugé de qualité, il est le vôtre ; sinon, je regrette de n'avoir pas su tirer parti de la valeur de vos travaux.

Je ne passerai pas sous silence, pour n'être jamais prises en défaut, l'aide que m'accorde Madame Th. DUBOIS, maître-assistante et l'amitié que me témoignent Messieurs R. BLONDEAU et J. GODIN, maître-assistants. Ces quelques mots me paraissent bien insuffisants pour leur exprimer ma gratitude.

Que les membres du laboratoire de Cryptogamie, ceux dans le passé ou ceux actuellement présents : mes collègues M.C. FABRE, G. BOUDART et G. VIDAL, Madame MAETIE, Mesdemoiselles B. BACLE et N. CHAUDORGE, Messieurs M. DUCOUSSO, D. TAVERNIER, P. VANACKER veuillent bien me pardonner de ne pas avoir su manifester la compréhension qu'ils attendaient de moi. Je leur sais gré pour leur contribution à ce travail.

Depuis quinze ans, j'ai sollicité bien souvent tous mes collègues de Biologie Végétale, ils ont toujours eu l'art et la manière de répondre favorablement à ma demande. Je les en remercie très chaleureusement.

En me souvenant de Madame M. LECOQ-AGUS, Mademoiselle G. MILLET et de Monsieur LECLERCQ, je me fais un devoir de reconnaître l'amabilité et les services rendus par les différentes personnes : agents techniques, de service ou de secrétariat du SN2.

Enfin, j'adresse mes plus vifs remerciements, à Mesdames DALHEM et MAETIE, à Mesdemoiselles DELECOURT et MIELE qui ont participé à la dactylographie de ce mémoire.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES	5
PREMIERE PARTIE . LE <u>NECTRIA GALLIGENA</u> Bres.....	25
DEUXIEME PARTIE. INFLUENCE DES FACTEURS TROPHIQUES ET THERMIQUES SUR LA REPRODUCTION SEXUEE DU <u>N. GALLIGENA</u>	53
CHAPITRE I. CONDITIONS NUTRITIONNELLES DE LA PRODUCTION PERITHECIALE DU <u>N. GALLIGENA</u>	55
CHAPITRE II. CONDITIONS THERMIQUES DE LA REPRODUCTION SEXUEE DU <u>N. GALLIGENA</u>	91
TROISIEME PARTIE. INFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LA REPRODUCTION SEXUEE DU <u>N. GALLIGENA</u>	105
CHAPITRE I. EFFETS DE LA LUMIERE CHEZ LES ASCOMYCETES. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	107
CHAPITRE II. CONDITIONS LUMINEUSES DE LA REPRODUCTION SEXUEE DU <u>N. GALLIGENA</u>	119
QUATRIEME PARTIE. REPRODUCTION SEXUEE ET METABOLISME DU <u>N. GALLIGENA</u>	141
CHAPITRE I. MYCOSPORINE (P310) et PHOTOINDUCTION SEXUEE DU <u>N. GALLIGENA</u>	145
A. MYCOSPORINE (310) : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	146
B. PRESENCE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE DU P310 CHEZ LE <u>N.GALLIGENA</u>	157
CHAPITRE II. METABOLISME DU <u>N. GALLIGENA</u> EN FONCTION DU DETERMINISME DE SA REPRODUCTION SEXUEE. ROLE DE LA MYCOSPORINE	187
A. ETUDE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES, <u>in vitro</u> ,	189
B. VARIATIONS DES STEROLS LIBRES EN FONCTION DES EFFETS DE L'ECLAIREMENT ET DE LA MYCOSPORINE SUR L'INDUCTION SEXUEE DU <u>N. GALLIGENA</u>	202
CONCLUSIONS GENERALES	213
BIBLIOGRAPHIE	215

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

Les raisons générales du déterminisme sexué des champignons sont établies depuis longtemps (KLEBS, 1900). Elles guident de nombreuses recherches qui tentent de les expliciter et, par là même, d'élucider les mécanismes physiologiques et orientations métaboliques de la sexualisation fongique, thème de notre travail.

Ainsi la reconstitution, *in vitro*, du cycle biologique d'un mycète oblige à une maîtrise des conditions génétiques, nutritionnelles, physico-chimiques (température, lumière, pH, teneurs en CO₂ et O₂, ...). Cette réussite, essentielle pour le systématicien, le phytopathologiste, l'industriel (production d'espèces comestibles), définit les rapports entre croissance végétative, sporulation asexuée et morphogenèse sexuée. La réalisation de ce dernier stade exige, plus que tout autre, une combinaison optimale de nombreux éléments où la fécondité sexuée relève d'une orientation métabolique spécifique dépendante d'une compétence génétique et d'un environnement externe totalement propice. L'influence de ce dernier a fait l'objet de nombreuses expériences qui démontrent successivement l'importance de la composition chimique du milieu, des facteurs externes (température, lumière, ...) Diverses revues (TURIAN, 1978, MANACHERE, 1980, ...) résument les résultats acquis à ce jour. Elles témoignent, d'une part, de la diversité des réactions fongiques aux modifications de ces paramètres et de la difficulté d'établir, à ce niveau, des lois générales régissant la

reproduction des champignons. D'autre part, elles mettent, souvent, en évidence la sensibilité de la réponse sexuée dont l'inhibition -ou l'induction- peut être le fait de variations paraissant aussi mineures que l'absence d'un microélément du milieu nutritif, un écart thermique d'un seul degré (°C), une irradiation lumineuse de quelques secondes.

L'étonnante précision de ces derniers résultats suscite de nombreuses interrogations quant aux mécanismes physiologiques et bouleversements biochimiques, ainsi impliqués, qui conditionnent favorablement - ou non - la reproduction sexuée.

Aussi ces mêmes questions se posent-elles pour appréhender le rôle de la lumière facteur indispensable de la fructification parfaite de certains champignons. Dans ce cas, le contrôle des paramètres lumineux apparaît fondamental puisqu'il permet, *in vitro*, la sexualisation fongique alors que celle-ci peut-être rare ou aléatoire dans la nature. De fait, la photoinduction sexuée soulève de nombreux problèmes principalement ceux relatifs à la nature du système photorécepteur, aux réactions biosynthétiques primaires et secondaires consécutives à l'absorption lumineuse, à l'existence de métabolites capables de transférer l'énergie photonique ou de se substituer à celle-ci.

Notre étude du déterminisme de la sexualisation chez l'Ascomycète *Nectria galligena* Bres. illustre les propos énoncés ci-dessus et tente d'apporter quelques éléments de réponse aux nombreuses questions posées.

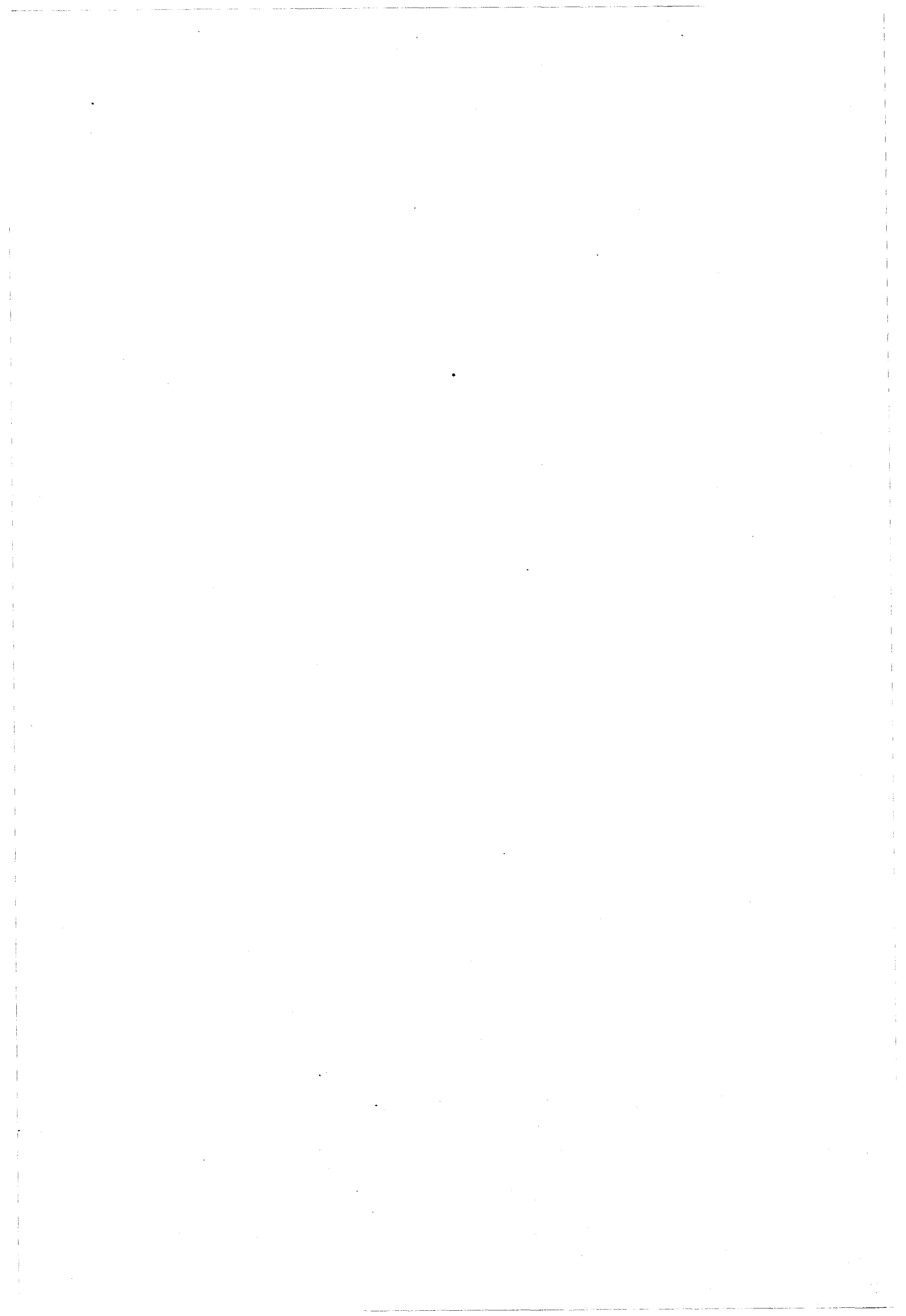
- Si la stricte photodépendance de la reproduction sexuée du *N. galligena* nous a plus particulièrement préoccupé (3ème et 4ème parties), cette analyse suppose une maîtrise préalable des conditions génétiques (1ère partie nutritives et thermiques (2ème partie) de la fructification parfaite de ce Pyrénomycète.

- La troisième partie est donc consacrée à l'étude qualitative et quantitative des exigences lumineuses de la morphogenèse périthéciale. A la suite des résultats acquis et, conformément aux hypothèses généralement émises sur ce sujet, nous avons recherché la présence de substances mycéliennes

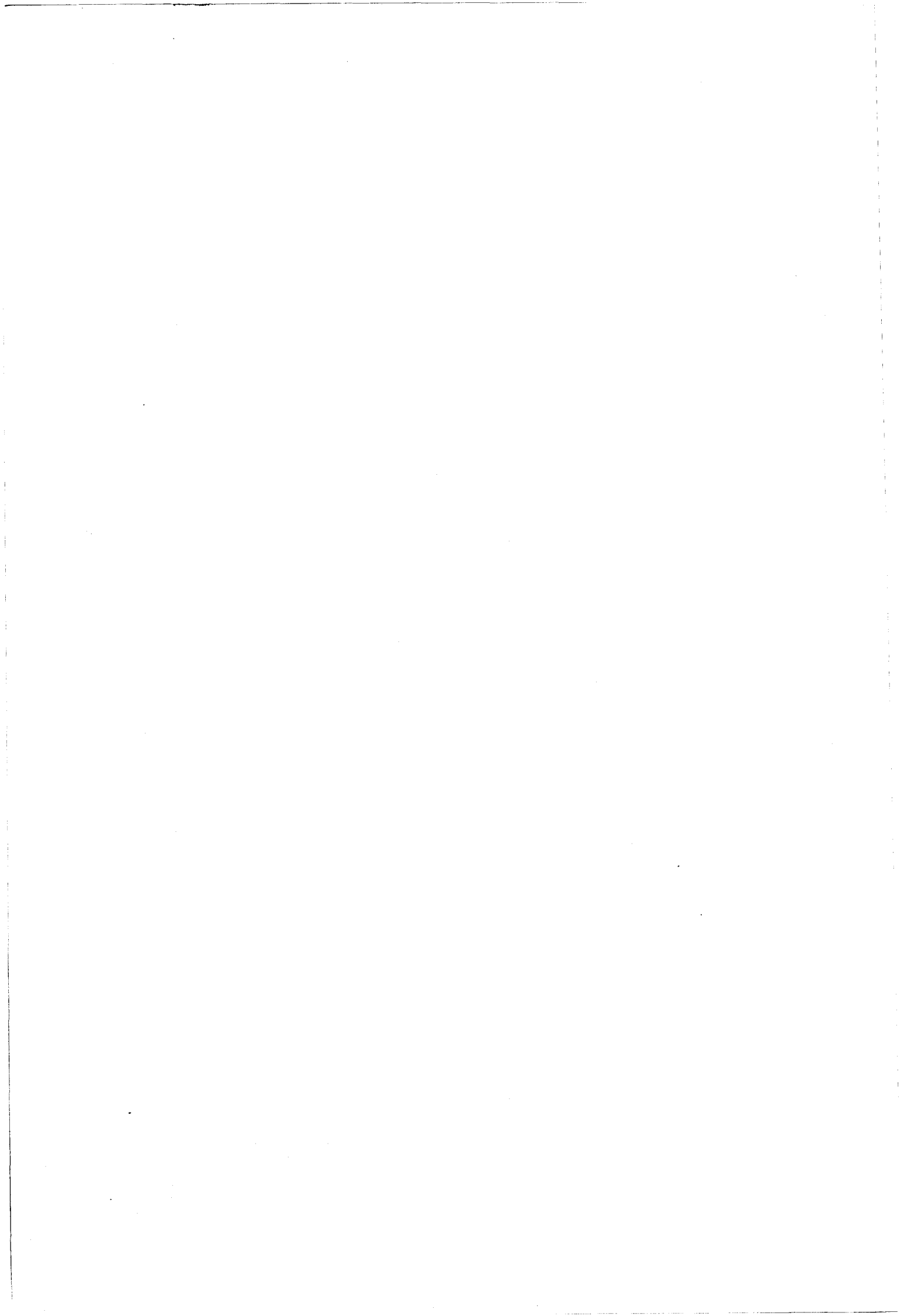
éventuellement photoréceptrices sinon photosensibles.

Dans ce cas, il apparaît que seuls les mycéliums irradiés forment spécifiquement un composé appelé "P310" ou mycosporine, l'activité et la signification biologique de cette substance, les conséquences métaboliques au plan enzymatique et stérolique de l'incorporation de "P310" au substrat nutritif sont les principaux sujets d'expérimentation qui composent la quatrième partie.

Au cours de ce mémoire, nous avons souvent confronté les résultats obtenus chez le *Nectria galligena* avec ceux qui, intéressant le *Nectria ditissima*, sont explicités par ailleurs (DEHORTER et PERRIN, 1983a,b). L'éventualité que ces deux espèces de *Nectria*, agents de chancres arboricoles, puissent sexualiser dans des conditions lumineuses très différentes comme le laissaient supposer des expériences préliminaires a motivé cette étude. En fait, les caractéristiques très similaires de la photoinduction sexuée de ces deux champignons n'ont pas permis les comparaisons escomptées, ni justifié, ici, une relation plus développée de ces travaux.



MATERIEL ET METHODES



TECHNIQUES CULTURALES

I.- LES SOUCHES DU N. GALLIGENA BRES.

1.- OBTENTION

Les souches proviennent d'isolements d'asques entiers ou d'ascospores obtenus de périthèces prélevés à partir de plaies chancreuses sur pommiers (*Malus communis* Poir.) localisés dans l'Aveyron et le Pas-de-Calais. Nos expériences initiales (DEHORTER, 1972) concernent un isolat homothallique provenant du premier site géographique cité. Par la suite, la perte des potentialités reproductrices de cette souche, dénommée dans nos expériences ultérieures "souche Ab", nous a contraints à de nouveaux prélèvements (Pas-de-Calais). Toute notre étude est basée sur le développement, à caractère hétérothallique, de ces derniers dont les cultures monoascales présentent, *in vitro*, comme nous l'avons rigoureusement contrôlé, un comportement morphogénétique très comparable à celui primitivement décrit.

Les isolements d'asques sont toujours réalisés dans des chambres à huile à l'aide d'un micromanipulateur de De Fonbrune, ceux des ascospores sont pratiqués selon cette même technique (LACOSTE, 1965) ou selon la méthode des dilutions.

2.- CONSERVATION

La conservation des souches est assurée par la culture de celles-ci dans un environnement externe favorable à la sexualisation : température constante de 18°C, éclaircissement (750 μWcm^{-2}) journalier de 12 heures de lumière blanche et substrats solides divers : fragments de racine de carotte ou de branche de pommier, milieux naturels (eau d'avoine 40g/l) ou synthétique (M23).

3.- ENSEMENCEMENTS

Les souches, servant aux inoculations, issues des cultures fertiles précitées, sont repiquées tous les 10 jours, successivement sur fragment de racine de carotte et milieux liquides : eau de pomme de terre (40g/l) et synthétique (M23). Durant ces 30 jours, une température de 18°C et l'obscurité sont constantes.

Dans tous les cas, les inoculums sont formés de petits fragments prélevés de mycéliums maintenus donc 10 jours à l'obscurité, sur milieu synthétique liquide (M23), ceux considérés comme références pour toute notre expérimentation sont d'origine monoascale.

II.- LES MILIEUX CULTURAUX

Pour obtenir la sexualisation du *N. galligena*, *in vitro*, nous avons essayé des milieux cultureux très variés dont les caractéristiques essentielles sont décrites par ailleurs (tableau 4 page 53). Nous détaillons ci-après les substrats les plus usités lors de notre étude.

1. MILIEU HÔTE

Il est composé de fragments de branche (longueur 10cm, diamètre 1cm) de pommier (*Malus communis* Poiret) introduits soit :

- dans un erlenmeyer de 300 ml contenant 50 ml d'eau distillée où ils sont disposés quasi verticalement
- dans des tubes Pyrex (25 x 200 mm) renfermant de l'eau distillée gelosée

2.- MILIEUX NATURELS

a) Fragments de racine de carotte

Des tranches de racine de carotte, découpées à l'emporte-pièce, sont placées dans des tubes de Roux (20 x 200 mm) contenant 10 ml d'eau distillée

b) Milieu eau de pomme de terre

Des tubercules de pomme de terre (variété Bintje), soigneusement épluchés puis pesés (50 g), sont broyés à l'ultra-turrax et mis en suspension dans 1 litre d'eau distillée. Après ébullition durant 15 minutes le milieu refroidi est filtré (verre fritté, porosité 1). Le filtrat est ramené au volume initial et ajusté à pH 5,5.

c) Mélange de farine d'avoine (20 g/l) et de blé (20 g/l)

Un mélange, à parts égales, de farine d'avoine (20 g/l) et de blé (20 g/l) est mis en suspension dans 1 litre d'eau distillée. Après agitation 15 minutes, ce milieu est placé, durant 15 heures, dans une étuve à 65°C. La décoction est alors centrifugée puis le surnageant, filtré (verre fritté porosité 1), ramené au volume initial, est ajusté à pH 5,5. Ce milieu est employé sous forme gélosée (15 g de gélose par litre).

3.- MILIEU SYNTHETIQUE "M23"

Ce substrat synthétique "M23" sert de milieu de référence à toute notre étude. Sa composition pour 1000 ml d'eau distillée est la suivante :

éléments minéraux

KH_2PO_4	: 800 mg	$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}/\text{EDTA Na}_2$: 15/10 mg
$\text{Mg SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 250 mg	$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$: 5 mg
$\text{Na H}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$: 100 mg	BO_3H_3	: 3 mg
CaCl_2	: 50 mg	$\text{Cu SO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$: 1 mg
$\text{Zn SO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 15 mg	$\text{Mo Na}_2\text{O}_4, 2\text{H}_2\text{O}$: 1 mg

- vitamines

Thiamine (bichlorure) : 0,2 mg
 Pyridoxine (hydrochlorure) : 0,2 mg
 Biotine (D+) : 0,01 mg

- sources azotées

acide L glutamique : 352 mg)
 L - alanine : 212 mg) 100 mg d'azote par litre
 L - asparagine H₂O : 162 mg)

- source carbonée

maltose (D+) : 4800 mg) 2 g de carbone par lit

Ce milieu dont le pH est ajusté à 5,5 par addition de soude (Na OH, N), est employé liquide ou gélosé (15 g de gélose/l)

4.- STERILISATION

Les divers milieux sont répartis, sous forme gélosée, à raison de 20 ml/tube Pyrex (25 x 200 mm) et de 10 ml/tube en quartz (18 x 180 mm) alors que, liquides, ils sont dispensés à raison de 16 ml/tube Pyrex (25 x 200mm) et de 100 ml/boîte de Roux de 1 litre où les divers récipients sont bouchés au coton hydrophile. Après leur répartition, les substrats sont stérilisés par passage dans l'autoclave durant 20 minutes sous une pression de 0,5 atmosphère. La filtration sur membrane Millipore (porosité 0,4 μ) assure la stérilisation des substances thermolabiles. Après leur autoclavage, les tubes de substrat gélosé sont refroidis en position inclinée afin de présenter une plage de culture avoisinant 35 cm².

III.- CONDITIONS THERMIQUES ET LUMINEUSES DE CULTURE1.- TEMPERATURE

L'incubation des cultures s'effectue dans des enceintes climatisées et thermorégulées à \pm 0,5 °C.

2.- LUMIERE

a) Lumière blanche

D'une façon générale et pour des raisons matérielles, nous entendons par le terme "cultures éclairées 12H L/12H O" que le champignon se développe sous un éclairage moyen égal à $750 \mu\text{Wcm}^{-2}$ qui est dispensé sous un régime photopériodique journalier de 12 heures de lumière blanche alternant avec 12 heures d'obscurité. La lumière blanche est ainsi fournie par des tubes fluorescents (Sylvania-Lifeline Daylight F 40 T 12 D et F 20 T 12 D). Ces tubes sont utilisés selon les normes définies par le fabricant et l'énergie lumineuse fournie est régulièrement contrôlée. Des compteurs horaires nous assurent de la durée des photopériodes.

b) Influence de la qualité de la lumière

Afin de préciser l'influence biologique que la lumière exerce de par sa qualité, trois systèmes lumineux ont été successivement employés qui assurent progressivement une meilleure définition du spectre lumineux.

- *tubes fluorescents*

Des lumières colorées sont émises par des tubes fluorescents :

- Mazdafluor TFW 20 - lumière noire de Wood-pour les radiations proches ultraviolettes : $300 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} : 360 \text{ nm}$.
- Sylvania F 20 T 12, "blue, green red" pour respectivement les zones : bleue, $400 \text{ nm} < \lambda < 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} : 530 \text{ nm}$; verte, $490 \text{ nm} < \lambda < 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} : 530 \text{ nm}$; rouge, $600 \text{ nm} < \lambda < 750 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} : 660 \text{ nm}$.

- *filtres interférentiels*

Par l'emploi combiné de lampes à arc au xénon et chlorure de césium haute pression (Philips-CS x 450 W) et de filtres interférentiels (MTO-Intervex A, DA et M), il nous a été possible de définir les 16 intervalles spectraux qui figurent dans le tableau 15 page 131.

- *monochromateur*

Ce système lumineux est basé sur l'emploi d'une lampe à arc au xénon haute pression (Osram-X B0,900 W) et d'un monochromateur (Schoeffel-GM 250). Le réglage de la fente d'ouverture de ce dernier permet d'obtenir une bande spectrale passante de 5 nm. De cette façon, nous avons pu étudier, par intervalle de 10 nm, l'influence de toutes les longueurs d'onde du spectre de 260 nm à 560 nm.

c) Mesure des éclairagements (μWcm^{-2})

Pour évaluer le flux énergétique des éclairagements au niveau des cultures, nous avons disposé d'une thermopile modèle solarimétrique (Kipp-Zonen). Pour les faibles éclairagements, nous avons utilisé un luxmètre et un photomètre (Alphametrics Ltd, modèle n°1010) préalablement étalonnés par confrontation avec la thermopile.

Toutes les mesures effectuées à l'aide de ces trois instruments ont été exprimées en microwatts par centimètre carré (μWcm^{-2}).

d) Cultures à l'obscurité continue

Dans ce cas, les flacons de culture sont recouverts de papier noir et incubés dans des enceintes obscures. Les manipulations ou observations nécessaires sont alors réalisées sous un éclairage faible de couleur rouge ($\lambda > 600 \text{ nm}$) qui est sans effet sur les réactions sexuées du champignon comme nous le verrons ultérieurement.

IV.- MESURE DE LA CROISSANCE

Uniquement appréciée en milieu liquide, la croissance est définie par la valeur moyenne des poids de matière sèche obtenus pour chaque jour de mesure, à partir de trois à cinq boîtes de Roux. Ainsi, pour chaque récipient, le mycélium est recueilli sur papier filtre sans cendre par filtration sous vide (verre fritté porosité 1) et lavé abondamment à l'eau distillée, il est finalement pesé après dessiccation à l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant.

Lorsque le mycélium est destiné à des analyses biochimiques, son poids est déterminé par pesée après congélation et lyophilisation. Dans les deux cas, toute réhydratation du matériel végétal est soigneusement évitée.

Les résultats pondéraux, quoique très similaires, issus de ces deux méthodes n'ont cependant pas été confondus..

V.- ETUDE DE LA REPRODUCTION SEXUEE

L'observation du déroulement *in vitro* de la reproduction sexuée du *N. galligena* se fonde sur deux types de critère: .

1- critères qualitatifs

Ils prennent en considération la chronologie des principales étapes morphogénétiques comme en témoignent l'étude ontogénique des ascocarpes : date et apparition des premières ébauches, formation des périthèces adultes puis des asques, émission des ascospores.

Ils se basent sur des éléments descriptifs (dimensions, couleur ...) des fructifications qui assurent de leur parfaite ressemblance avec celles observées dans la nature.

2- critères quantitatifs

Ils font référence à la production périthéciale qui est déterminée, en fin de culture, souvent au 30^e jour, en fonction du nombre de périthèces comptés et de leur fertilité constatée. Dans leur ensemble, nos résultats ne rendent compte que de ce seul critère.

. Le comptage des périthèces, au niveau des cultures réalisées en tube, est effectué de manière précise sous la loupe binoculaire. Lorsque le champignon se développe en boîte de Roux, l'importance de la reproduction sexuée est évaluée approximativement au moyen d'un indice périthécial qui est fonction d'un comptage effectué au niveau d'un secteur de la culture.

. La fertilité des périthèces est établie, soit par examen microscopique après dissection des ascocarpes, soit par constatation à la loupe binoculaire, de la présence d'ascospores agglomérées en une masse jaunâtre à l'ostiole périthéciale.

3- expression des résultats

Chaque étude répétée plusieurs fois comporte deux lots, l'un sujet et l'autre témoin, composé chacun d'un minimum de 5 tubes ou de 3 boîtes de Roux.

La série culturale témoin résulte, invariablement, du développement d'un inoculum d'origine monoascale, sur milieu synthétique M23 liquide ou gélosé, à la température constante de 18°C et sous un éclairage (750 μ Wcm⁻²) journalier de 12 heures de lumière blanche (12H L/12H O).

Les valeurs de la production périthéciale (ou nombre de périthèces) apparaissant dans les tableaux ou figures, expriment le rapport, multiplié par 100, entre les nombres moyens d'ascocarpes fertiles comptés par tube dans les deux cas, respectivement pour le lot traité et le lot témoin soit :

$$\text{PRODUCTION PERITHECIALE} = \frac{\text{Nbre de périthèces fertiles/tube du lot sujet}}{\text{Nbre de périthèces fertiles/tube du lot témoin}} \times 100$$

. En outre, sont souvent indiquées les variations minimale (min.) et maximale (max.) de cette valeur qui, par son mode de calcul, assure une certaine homogénéité à l'ensemble de nos résultats.

. Lorsque le champignon est cultivé en boîte de Roux, le nombre de périthèces fertiles/boîte est apprécié par un indice périthéciale de type 0, +, ++, +++, où chaque croix (+) correspond à environ 1000 ascocarpes.

TECHNIQUES CYTOLOGIQUES

Certains caractères cytologiques et anatomiques relatifs aux mycélium et structures morphogénétiques du *N. galligena* sont établis, à la suite de prélèvements régulièrement effectués dans les cultures fongiques, par des observations microscopiques.

I.- OBSERVATIONS IN TOTO

Les primordiums périthéciaux et les jeunes ébauches des ascocarpes ont été étudiés après simple écrasement et coloration par le bleu-coton C₄B. L'étude des asques a été faite après montage dans divers colorants spécifiques, tels que le réactif iodo-ioduré, le bleu C₄B, le rouge Congo et l'encre Waterman.

II.- COUPES AU MICROTOME

L'étude des stades ultérieurs aux ébauches périthéciales nécessite des coupes sériées (5 μ d'épaisseur) au microtome, obtenues selon les méthodes classiques : fixation au mélange de Westbrook et coloration à l'hématoxyline ferrique-éosine.

TECHNIQUES D'ANALYSE

I.- SPECTRES D'ABSORPTION DU *N. GALLIGENA*

1.- SPECTRES D'ABSORPTION IN VIVO

Ils sont établis à l'aide d'un spectrophotomètre (Safas, Spectralux 1800) qui a été modifié pour permettre l'étude de l'absorption du matériel biologique de forte densité optique. Dans ce cas, le mycélium prélevé est déposé sur un support de papier Joseph imbibé d'eau, l'ensemble est placé sur l'une des faces d'une cuve du spectrophotomètre, la cuve étant très rapprochée du photomultiplicateur de l'appareil. L'enregistrement des spectres d'absorption des thalles *in vivo* a été réalisé de 330 nm à 570 nm.

2.- SPECTRES D'ABSORPTION D'EXTRAITS ACELLULAIRES

D'une manière générale, les mycéliums récupérés par filtration sous vide sur verre fritté (porosité 1) sont soumis à diverses extractions-broyages (ultra-turrax) et centrifugations (SORVALL RC-55, 10 minutes, 20 000 g, 5°C). Finalement, les surnageants aqueux ou éthéro-pétroliques constituent les extraits dont on mesure l'absorption à l'aide d'un spectrophotomètre (Philips-Unicam SP 800 B ou Beckman DU-8B).

II.- DOSAGE DES FLAVINES TOTALES

Le contenu en flavines totales (Riboflavine, FMN, FAD) des thalles du *N. galligena* est déterminé de la façon suivante où toutes les opérations sont conduites à l'abri de la lumière ou sous un faible éclairage rouge.

1.- EXTRACTION AQUEUSE

Les mycéliums recueillis après filtration sont broyés à l'ultra-turrax (2 minutes), mis en suspension durant 10 minutes dans l'eau distillée à 80°C et centrifugés (SORVALL RC-55, 20000 g 10 minutes 5°C). Puis trois extractions successives à l'eau (80°C, 5 minutes) et centrifugations sont encore pratiquées sur les culots

mycéliens. Finalement, tous les surnageants, réunis, délipidés par extraction chloroformique et ajustés au volume désiré, constituent chacun des échantillons.

2.- DOSAGE

Selon une méthode adaptée de YAGI (1962), ces dosages se fondent sur la phototransformation, spécifique et quantitative, en milieu basique des principales flavines (Riboflavine, FMN, FAD) en lumiflavine. Ce dernier composé, soluble dans le chloroforme, est dosée par spectrofluorimétrie.

A chacun des échantillons (1ml), préalablement ajusté à pH 7, est ajouté 1 ml de soude (Na OH, N). Ces solutions alcalines sont irradiées 30 minutes en lumière blanche ($1000 \mu\text{Wcm}^{-2}$) puis additionnées d'acide acétique 20% (1ml).

La lumiflavine, produite après irradiation, est extraite par 5ml de chloroforme.

La fluorescence des échantillons est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre différentiel absolu FICA 55 MKII. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission employées sont égales respectivement à 455 nm et 510 nm ($\Delta\lambda = 7,5$ nm dans les 2 cas).

Des solutions de riboflavine de concentration connue, traitées de la même manière que les extraits aqueux mycéliens, servent de référence aux mesures. Celles-ci sont rapportées en équivalent (μg) de riboflavine par gramme de mycélium sec ($\mu\text{g/g}$).

III.- OBTENTION D'EXTRAITS MYCELIENS ETHER DE PETROLE SOLUBLES

Pour cette expérimentation, nous avons adopté un protocole très généralement suivi pour l'extraction des caroténoïdes (FIASSON et al, 1969).

Dans ce sens, les thalles recueillis de cultures liquides sont lyophilisés, pesés puis broyés plusieurs fois dans un mélange acétone-méthanol (80 : 20, v/v) jusqu'à obtention de filtrats finalement incolores. Ceux-ci, réunis pour un même échantillon, sont additionnés d'éther de pétrole (Eb 35-60°C). L'épiphase éthéropétrolique, lavée à l'eau distillée, séchée sur sulfate de sodium anhydre, concentrée à un volume défini, est employée pour les analyses.

IV.- EXTRACTION, DOSAGE ET PURIFICATION DE LA MYCOSPORINE I

1.- EXTRACTION

Nous avons pu extraire, exhaustivement, le "P310" présent chez le *N. galligena* par divers procédés d'égale efficacité.

Les thalles du champignon, congelés ou lyophilisés, sont maintenus, après broyage, dans divers solvants soit :

- l'eau distillée à 4°C ou bouillante
- l'éthanol absolu
- un mélange hydroalcoolique (eau-éthanol : 80 : 20, v/v).

Cette opération, renouvelée deux fois, présente une durée variable de 1 heure à 12 heures suivant les quantités de matériel végétal traitées. Par la suite, les suspensions sont centrifugées et les surnageants recueillis sont soumis à une évaporation complète sous vide à 40°C (évaporateur rotatif Buchii) puis réhydratés à un faible volume.

Ces solutions sont soumises à plusieurs extractions successivement acétoniques et chloroformiques suivies de centrifugations.

Le dernier surnageant minimal d'eau distillée à pH 5, est purifié ou dosé.

2.- DOSAGE

Les dosages du P310 ont été effectués selon deux méthodes différentes qui conduisent à des résultats très comparables.

- dans le premier cas, la mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 310 nm des extraits, préalablement filtrés sur membrane Millipore (porosité 0,45 μ), permet de calculer, en utilisant un $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ égal à 1020 (ARPIN et al, 1977), la quantité de P310.
- dans le second cas, la teneur en mycosporine I de ces extraits filtrés est déterminée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) à l'aide d'un appareil Waters 6000 A. Celui-ci est équipé :

- soit d'une colonne à phase réversée microbondapak C18 (Waters Associates, USA) de dimensions (30 x 0,4 cm) éluée, à 20°C, par un solvant hydrométhanolique (H₂O-méthanol : 95 : 5, v/v) sous un débit de 1ml/min. (pompe 6000A Waters).

- soit d'une colonne NH₂ (30 x 0,4 cm) éluée, à 20°C, par un solvant eau-acide acétique (H₂O-CH₃COOH : 99,9-0,1, v/v) sous un débit de 2 ml/min.

3.- PURIFICATION

L'extrait aqueux (pH : 5) est purifié par passages successifs sur des colonnes (hauteur 200 mm, diamètre 20 mm) de résines échangeuses d'ions de type Dowex (200-400 mesh) respectivement :

anionique : Dowex 1 x 8, forme Cl⁻

cationique : Dowex 50W, forme H⁺

anionique : Dowex 1 x 8, forme HCO₃⁻

Après chaque chromatographie, sont effectuées des mesures spectrophotométriques de l'absorption de toutes les fractions éluées (volume de 5 ml ou de 10 ml, collecteur de fractions LKB). Ces dernières, qui présentent une absorption maximale à 310 nm, sont réunies puis concentrées à un faible volume.

Ce protocole expérimental s'inspire de ceux suivis par LEACH (1965) , ARPIN et al (1977).

V. RECHERCHE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES IN VITRO

1.- PREPARATION DE L'EXTRAIT ACELLULAIRE

Les thalles, récupérés par filtration de cultures en milieu synthétique liquide, sont abondamment rincés à l'eau distillée froide (4°C) puis centrifugés (à 6000 g, 10 minutes, 4°C/centrifugeuse SORVALL RC-55, rotor SS 35) en présence d'un tampon TRIS-HCL (0,1M, pH 7,4). Le culot mycélien est alors transféré dans un milieu, à 4°C, composé de tampon TRIS-HCL (0,2M, pH 7,4) additionné d'ETDA (1mM), de MgCl₂ (5mM)

et de cystéine (2mM). L'ensemble mycélium-tampon (rapport 1g/4ml), toujours maintenu à une température proche de 4°C, est broyé durant 90 secondes à l'aide d'un ultra-turrax dont le plongeur a préalablement séjourné au congélateur.

Après une centrifugation (5000 g, 20 minutes, 4°C) du broyat qui permet l'élimination des débris cellulaires, le surnageant obtenu, toujours conservé dans la glace fondante, constitue l'extrait enzymatique immédiatement utilisé pour les dosages.

REMARQUE : En raison de la multiplicité de nos essais, il nous a semblé difficile de poursuivre la purification des extraits acellulaires totaux comme nous l'aurions souhaité et telle qu'elle s'avère indispensable pour préciser certains résultats obtenus. Aussi les valeurs des activités enzymatiques que nous avons mesurées ne sont-elles que relatives, toutefois elles nous apparaissent comme un moyen très intéressant de comparer, toute condition identique par ailleurs, des extraits acellulaires d'origine différente.

2.- TECHNIQUE DES DOSAGES ENZYMATIQUES IN VITRO

Afin d'en augmenter l'efficacité chez le *N. galligena*, les modes opératoires comportent des variantes par rapport aux protocoles initiaux des auteurs cités.

Toutes les activités enzymatiques ont été déterminées à la température de 30°C à l'aide d'un spectrophotomètre UNICAM SP 800 B ou Beckman DU-8 B. Elles sont exprimées en nanomoles de substrats transformés par milligramme de protéines durant une minute (nm/mg/min.).

a) *Isocitrate lyase* (EC 4.1.3.1. -HOCHBERG et SARGENT. 197

0,4 ml tampon TRIS-HCL 0,2M pH 6,5
 0,1 ml MgCl₂ 0,1M
 0,1 ml cystéine 0,1M
 0,1 ml phénylhydrazine 0,1M
 0,1 ml isocitrate 0,2M
 0,1 à 0,2 ml d'extrait
 QSP 1 ml

$\Sigma 1.7.10^4$

D.O. 324 nm

Blanc : remplacer 0,1ml isocitrate par 0,1ml d'eau disti

Ce dosage est basé (DIXON et KORNBERG, 1959) sur l'augmentation de D.O. à 324 nm due à la formation d'acide glyoxylique-phenylhydrazone à partir du glyoxylate issu de la transformation de l'isocitrate.

b) *Isocitrate deshydrogénase NADP⁺ dépendante* (EC 1.1.1.42 - NG et DAWES, 1973)

0,4 ml	tampon TRIS-HCL	0,2M	pH 6,5	
0,05 ml	Mg Cl ₂	0,1M		
0,05 ml	KCN	0,1M		
0,2 ml	NADP	0,01M		
0,1 ml	isocitrate	0,2M		
0,1 à 0,2 ml	d'extrait			Σ 6,22.10 ³
QSP	1 ml			D.O. = 340 nm

Blanc : remplacer l'isocitrate par 0,1ml d'eau distillée.

La réduction du NADP⁺ en NADPH en présence d'isocitrate est suivie par l'augmentation de la D.O. à 340 nm.

c) *Succinate deshydrogénase* (EC 1.3.9.91 - TOKUNAGA et al, 1969)

0,4 ml	tampon TRIS-HCL	0,2M	pH 7,4	
0,05 ml	2-6 dichlorophénol	indophénol	0,001M	
0,1 ml	phénazine méthosulfate	0,005M		
0,1 ml	succinate de sodium	0,2M		
0,1 à 0,3 ml	d'extrait			Σ 1,61 x 10 ³
QSP	1ml			D.O. = 600 nm

Blanc : remplacer 0,1 ml de succinate par 0,1 ml d'eau distillée.

La diminution de la D.O. à 600 nm témoigne de la décoloration du dichlorophénol-indophénol couplée à la réduction du succinate en présence de phénazine méthosulfate.

d) *Fumarase* (EC 4.2.1.2. - TOKUNAGA et al, 1969)

0,5 ml	tampon TRIS-HCL	0,2M	pH 7,4	
0,2 ml	malate de sodium	0,1M		
0,1 à 0,3 ml	d'extrait			Σ 2,44 x 10 ³
QSP	1 ml			D.O. = 240 nm

Blanc : remplacer 0,1 ml de malate par 0,1ml d'eau distillée

La formation du fumarate à partir du malate est suivie par une augmentation de la D.O. à 240 nm.

3.- DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines des extraits acellulaires sont dosées selon la méthode de LOWRY et al (1951).

a) Réactifs

1- Réactif A : solution de Folin et Ciocalteu (Merk) diluée de moitié dans l'eau distillée

2- Réactif B : il est composé de :

- Cu SO₄ à 1% dans l'eau : 1 ml
- tartrate de sodium et potassium à 2% dans l'eau : 1 ml
- Na₂CO₃ à 2% dans Na OH (0,1N) qsp 1000 ml

b) Protocole expérimental

- 1 ml de solution à doser
- 3 ml du réactif B
- attendre 10 minutes
- ajouter 0,3 ml du réactif A
- attendre 30 minutes
- lecture des d.o. à λ : 500 nm



Les dosages sont rapportés à ceux effectués à partir d'une gamme étalon de serum albumine bovine de 0 à 80 µg/ml.

VI.- EXTRACTION ET IDENTIFICATION DES STEROLS

Les lipides du matériel fongique lyophilisé sont extraits au Soxhlet sous atmosphère d'azote, à l'aide d'acétone et du mélange chloroforme-méthanol (CHCl₃-MeOH, 2 : 1, v/v). Après évaporation les stérols libres sont précipités par la digitonine, le complexe ainsi formé est coupé par la pyridine et les stérols libérés sont recueillis et pesés.

La purification des stérols s'effectue sur silice G (épaisseur : 2 mm) en utilisant le mélange solvant benzène-acétate d'éthyle (C_6H_6 -Et-oAc, 5 : 1, v/v). Ils sont ensuite fractionnés par chromatographie sur couche mince d'alumine (Al_2O_3) imprégnée de nitrate d'argent et emploi du mélange solvant chloroforme-éther de pétrole-acétone (6 : 3 : 1, v/v). Les stérols peuvent être ainsi séparés, en fonction de leur degré d'insaturation, en 4 zones principales correspondant notamment à l'ergostérol (Rf : 0,08), au lichestérol (Rf : 0,20), aux stérols en Δ^5 (Rf : 0,50) et à ceux en Δ^7 (Rf : 0,65).

Chaque groupe de stérols est ensuite analysé par spectrométrie de masse à l'aide d'un spectromètre de masse à géométrie inversée de type Varian Mat 311 A, les constituants étant caractérisés par leurs spectres MIKE (mass analyzed ion Kinetic energy spectre). Cette technique qui permet l'analyse des mélanges complexes de composés organiques évite la séparation physique par chromatographie en phase vapeur nécessitant la préparation de dérivés silylés. En résumé, la méthode consiste à comparer le spectre MIKE de l'ion moléculaire à identifier à ceux de substances de référence. Lorsque ces dernières ne sont pas accessibles, il est possible de dégager les principales caractéristiques structurales des produits à analyser en se basant sur les fragmentations observées dans les spectres d'énergie cinétique. En effet, ces fragmentations sont, dans la plupart des cas, comparables à celles décrites dans la littérature, en spectrométrie de masse conventionnelle. Ces diverses techniques ont permis l'isolement et l'identification des stérols du *N. galligena*.



PREMIERE PARTIE

LE NECTRIA GALLIGENA BRES.

Du champignon ascomycète *Nectria galligena*, matériel biologique et fondement de notre travail, nous évoquerons successivement :

- la biologie naturelle,
- les conditions culturelles primaires du développement *in vitro*,
- l'ontogenèse,
- la position systématique,
- le problème d'hétérothallisme.

I. - BIOLOGIE NATURELLE

1.- AGENT PHYTOPARASITAIRE

Classiquement, les qualificatifs "chancre commun du pommier ou chancre européen du pommier" rappellent la vie phytoparasitaire du *N. galligena* soit :

- son fréquent développement sur les rameaux du pommier (*Malus communis* Poiret) où il engendre, à terme, une corrosion profonde des tissus sous forme de chancres fusiformes aux rides concentriques très caractéristiques,
- le caractère endémique de cette maladie.

Pourtant, cet ascomycète se révèle très polyphage où FLACK et SWINBURNE (1977) font référence à de nombreuses publications qui signalent le *N. galligena* sur plus de 60 espèces d'arbres ou arbustes, réparties, non seulement en Europe, mais également, en Amérique du Nord. Ainsi, la maladie du chancre du pommier peut également affecter les vergers nord-américains (ZELLER, 1926 ; WILSON, 1966 ; Mc CARTNEY, 1967).

2.- LA MALADIE DU CHANCRE COMMUN DU POMMIER

Elle a été précisément décrite (VIENNOT-BOURGIN, 1967 ; GEOFFRION, 1980... notamment :

- les divers symptômes : nécroses des rameaux, dessèchement des fleurs, tâches et pourriture des fruits,
- les voies et facteurs de contamination : cicatrices foliaires, débourrement des bourgeons, sensibilité variétale de l'hôte, temps pluvieux,
- les méthodes de lutte prophylactique (fumure, taille, drainage) et chimique (produits cupriques).

3.- ASPECTS MORPHOLOGIQUES DU PARASITE

La progression du champignon dans les tissus de l'hôte sous forme de filaments mycéliens, grêles, hyalins et cloisonnés, suggère que la nutrition des hyphes s'effectue aux dépens des courants de sève, des composants amylières (GOETHE, 1880) et pectiques (LORTIE, 1964).

Au niveau des chancres, l'infection du pommier se traduit par la différenciation de structures reproductrices :

- a) les premières asexuées sont formées de coussinets hémisphériques blanchâtres ou sporodochies du *Cylindrocarpon mali* (All.) W. (Deutéromycète, Melanconiale) qui produisent des conidies hyalines, droites ou arquées, arrondies à leurs extrémités :
- les unes unicellulaires ou microconidies (5-7 x 1-3 μ)
 - les autres pluricellulaires ou macroconidies (10-65 x 4-7 μ)
- b) les secondes sexuées, rouge vif, sont des périthèces du *Nectria galligena* Bres. (Ascomycète, Pyrénomycète), visibles à l'oeil nu sous forme de petites sphères (diamètre : 350 μ), isolées ou groupées en amas. Elles renferment des ascues cylindriques (75-20 x 12-15 μ) qui contiennent chacun 8 ascospores (15-20 x 6-7 μ) hyalines et bicellulaires. Ces dernières sont alors, selon la pluviosité, projetées hors de l'ascocarpe ou agglutinées en une masse blanchâtre à l'ostiole périthéciale.

4.- CYCLE BIOLOGIQUE

Le tableau 1 résume les observations qui, effectuées dans les vergers, définissent les principales étapes du développement du *N. galligena* sur pommier

Tableau 1. Chronologie des phases essentielles du développement parasitaire du *N. galligena* sur pommier.

OBSERVATIONS sur POMMIER	HIVER		PRINTEMPS			ETE		AUTOMNE		HIVER			
	Janv.	Févr.	Mars	Avr.	Mai	Juin	Juil.	Août	Sept.	Oct.	Nov.	Déc.	Janv.
NECROSES - CHANCRES ¹						■	■	■	■	■	■	■	■
SPORODOCHIES - CONIDIES ¹						■	■	■	■	■	■	■	■
PERITHECES - ASCOSPORES ¹													
- VIENNOT - BOURGIN (1967) ^a	■	■	■	■	■								■
- CAYLEY (1921) ^b						■	■	■	■	■	■	■	■
- MUNSON (1939) ^b	■	■	■	■	■								■
- BULIT (1957) ^b			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
- DUMONT (1968) ^b			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Légende :

- 1- Périodes ■ d'observation des nécroses ou chancres, des sporodochies, des conidies, des périthèces et des ascospores sur pommier (VIENNOT-BOURGIN, 1966) ^a
- b- Les époques de formation des périthèces et de la projection maximale des ascospores font référence à des relevés effectués par les auteurs en Angleterre (CAYLEY, MUNSON) et en France, à Versailles (BULIT) et dans la région NORD/PAS-DE-CALAIS (DUMONT).

La lecture du tableau 1 nous laisse supposer que les températures saisonnières les plus élevées (printemps, été) et la période de pleine végétation du pommier stimulent la conidiogenèse du champignon qui cesse à l'hiver.

D'une façon différente, durant les mois d'automne et d'hiver, l'évolution du *N. galligena*, au sein des tissus nécrosés de l'arbre, se traduit, à la fin de l'époque hivernale, par la formation d'ascocarpes qui, à maturité, émettent des ascospores. Ces observations (VIENNOT-BOURGIN, 1967) sont confirmées par MUNSON (1939) et DUMONT (1968). Ce dernier auteur précise que, dans les vergers du Nord de la France, la projection d'ascospores, maximale en mars et avril, diminue et cesse parallèlement à l'augmentation des températures pour finalement reprendre en automne. Toutefois, cette évolution chronologique de la fructification parfaite du *N. galligena* est infirmée par CAYLEY (1921) et BULIT (1957) qui notent la présence estivale de périthèces fertiles. Certains facteurs climatiques notamment des moyennes thermiques saisonnières (été) anormalement faibles et une hétérogénéité physiologique des chancres pourraient, selon les auteurs, expliquer ce phénomène.

En conclusion, le parasitisme du *N. galligena* sur pommier nous suggère que des conditions souvent différentes stimulent la conidiogenèse ou la fructification parfaite. Ainsi, des températures peu élevées et une nutrition restreinte (dormance de l'hôte) privilégieraient la forme sexuée du champignon.

II. DEVELOPPEMENT, IN VITRO, DU N. GALLIGENA

Cette expérimentation préliminaire tente de définir des conditions culturales simples qui permettent, *in vitro*, la réalisation du cycle biologique complet du *N. galligena* afin d'en étudier, au plan cytologique, les principales phases.

Ainsi, en nous basant sur la biologie naturelle du parasite et sur certains essais de laboratoire (CAYLEY, 1921 ; LORTIE, 1964), nous avons éprouvé diverses combinaisons soit :

- nutritives : en variant la nature et la concentration de quelques substrats naturels à base de tubercules de pomme de terre, de racines de carotte ou de farine d'avoine,
- thermiques : les cultures fongiques sont incubées à 10 °C, 14 °C, 18 °C ou 25 °C,
- lumineuses : l'éclairement ($750 \mu\text{Wcm}^{-2}$) journalier est constant, alterné (12hL/12hO) ou nul.

L'influence de cet environnement contrôlé sur le devenir, *in vitro*, de souches du *N. galligena* a été détaillée (DEHORTER, 1972, LACOSTE et DEHORTER, 1973). Ces expériences initiales, décrites ultérieurement (tableau 4) peuvent être résumées par deux définitions des modalités d'induction ou d'inhibition périthéciale :

a) La première se rapporte aux facteurs qui, réunis, déterminent la reproduction sexuée *in vitro* du *N. galligena* soit :

- un milieu nutritif liquide ou gélosé composé d'eau de pomme de terre (50g/l)
- une température constante égale à 18 °C
- un éclairement quotidien de 12 heures de lumière blanche (12hL/12hO)

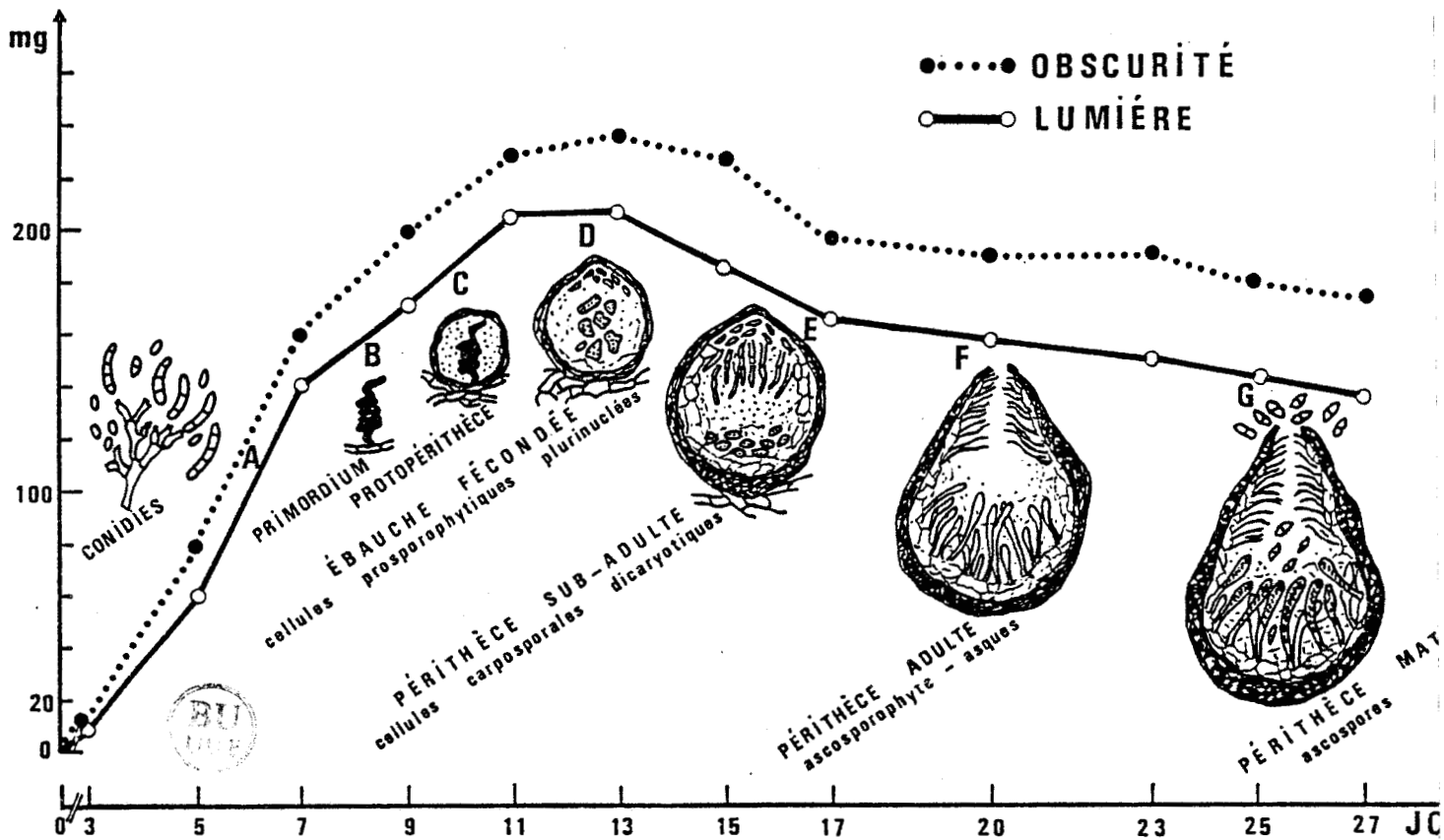
Placé dans cet environnement favorable, le champignon accomplit un cycle biologique complet tout à fait comparable à celui observé dans la nature, exception faite de sa durée qui semble écourtée (30 jours) au laboratoire.

Ainsi, la figure 1 précise la chronologie des principales étapes de la morphogenèse du *N. galligena* et ses rapports avec la croissance pondérale du mycélium, cultivé sur substrat liquide.

b) La deuxième définition est celle de conditions qui, isolément, inhibent la différenciation sexuée soit :

- un déséquilibre du milieu nutritif par un apport carboné excessif,
- une température constante de 25 °C,
- une obscurité continuelle.

Chacun de ces facteurs qui s'oppose à la fructification parfaite et donc au devenir sporophytique du *N. galligena* favorise, sinon permet, la croissance mycélienne et la conidiogenèse, essentiellement, gamétophytiques.

Figure 1. : Croissance et reproduction, *in vitro*, du *N. galligena*

Légende :

- Conditions culturales : Durant 27 jours (axe des abscisses), le champignon se développe sur milieu eau de pomme de terre liquide (50g/l), à la température de 18 °C soit à l'obscurité constante, soit en présence de lumière blanche (12hL/12hO 750 μWcm^{-2})
- Croissance mycélienne (axe des ordonnées). Elle est définie par les mesures des poids de mycélium sec (mg)/boîte de Roux contenant 100 ml de milieu, effectuées au niveau des cultures maintenues à l'obscurité (●●●●●) ou à la lumière (○—○)
- Reproduction Les lettres de A à G situent le début de l'observation des principaux stades de la reproduction :
 - + asexuée : cultures à l'obscurité et à la lumière,
 - + sexuée : cultures uniquement éclairées.

Dans le cas de la première définition ci-dessus, le début de la différenciation périthéciale coïncide, quasiment, avec l'arrêt de l'augmentation pondérale du thalle (figure 1) aux dépens duquel seront édifiées les structures sexuées. Par contre, à l'obscurité continue (figure 1) le gamétophyte, sexuellement stérile et ainsi "non parasité" par des éléments sporophytiques, présente toujours une croissance supérieure aux mycéliums éclairés.

Cette étude indique donc, comme dans la nature, une nette divergence des modalités externes de la formation des structures asexuées et parfaites. Elle souligne que :

- les trois composantes (nutrition, température, lumière) de l'environnement contrôlent, d'une façon simultanée et interdépendante, la morphogenèse sexuée,
- la lumière constitue un facteur d'induction périthéciale.

III. - ONTOGENIE DES ASCOCARPES

L'ensemble de notre travail étant fondé essentiellement sur la formation, *in vitro*, des ascocarpes du *N. galligena*, il nous a semblé intéressant de décrire très précisément les diverses séquences de cet événement.

Si l'ontogénie des périthèces de certaines Nectriales a déjà fait l'objet d'études (PARGUEY-LEDUC, 1967), plus particulièrement celle du *N. galligena* n'est sommairement rapportée que par CAYLEY (1921) cet auteur n'observant que les ébauches périthéciales.

Le fait d'obtenir, au laboratoire, dans des conditions précédemment explicitées (figure 1), la reproduction sexuée du *N. galligena* nous a permis d'en suivre, cytologiquement et chronologiquement, les principales étapes :

- les primodiums périthéciaux (8^e, 9^e jour)
- les ébauches jeunes (= protopérithèces) et fécondées (11^e-13^e jour)
- les périthèces sub-adultes immatures (15^e, 17^e jour)
- les ascocarpes adultes (20^e, 25^e jour)
- les asques et les ascospores

Cette étude a été réalisée en pratiquant régulièrement des prélèvements dans les cultures effectuées sur milieu eau de pomme de terre (50g/l) gélosé et incubées à 18 °C, en présence de lumière blanche (12hL/12hO). Elle a fait l'objet d'une publication (PARGUEY-LEDUC et DEHORTER, 1973-1974) que nous résumons ci-dessous.

1.- LES PRIMORDIUMS DES PERITHECES

Chacun d'eux apparait sous la forme d'un enroulement mycélien hélicoïdal, plus ou moins régulier, dressé, dont la partie supérieure libre simule un trichogyne.

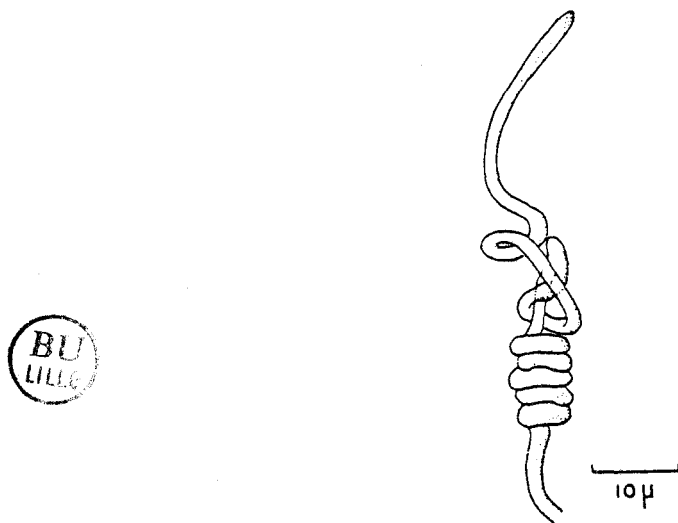
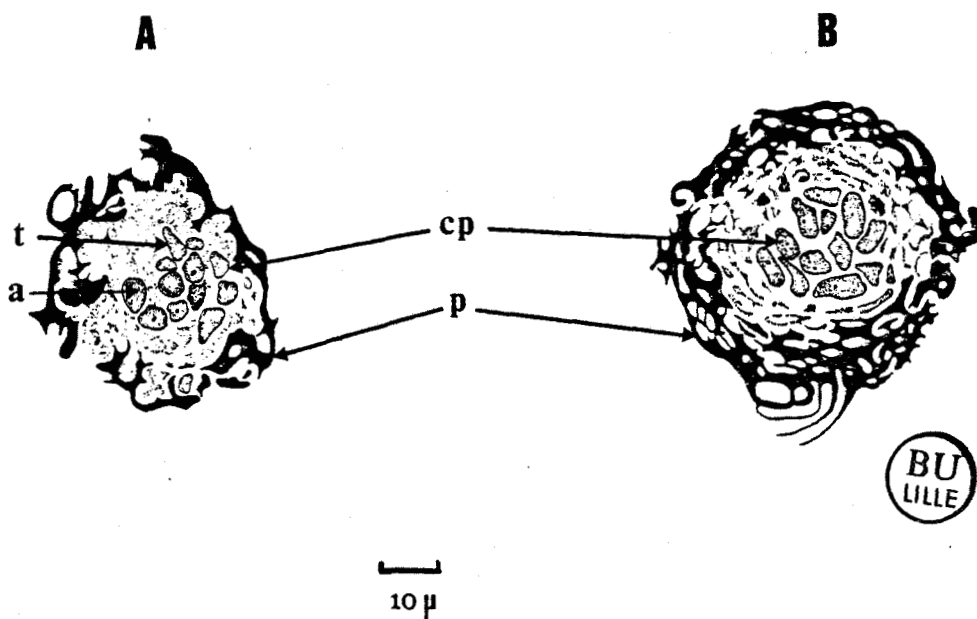


Figure 2 : Primordium de périthèce du *N. galligena*

Ce type de primordium rappelle les archicarpes spiralés décrits chez un grand nombre d'Ascohyméniaux. Pourtant, chez le *N. galligena*, il n'est qu'une simple formation mycélienne, ayant la valeur d'un embryon de pyrénosphère (sensu, CHADEFAUD, 1960) où plus tard se différencie l'archicarpe véritable ; de plus, à sa partie basale, ne se développent jamais des filaments recouvrants.

2.- LES EBAUCHES DES ASCOCARPESa) Protopérithèces (figure 3)

Après avoir évolué en un petit module plectenchymateux globuleux, le primordium se transforme en une ébauche (figure 3A) où l'on reconnaît deux zones : l'une externe carbonacée (la paroi = p) et l'autre interne, claire (= le centre fertile ou carpocentre : cp), au sein de laquelle apparaît bientôt l'appareil ascogonial (a). Celui-ci constitue l'archicارpe véritable. Il est en général légèrement enroulé et se compose d'une file de cellules, uninucléées, parmi lesquelles, celle de l'extrémité distale, de forme conique, fait peut-être fonction de trichogyne (t,?)



Figures 3 A et B : Protopérithèces

p = paroi ; cp = carpocentre ; a = appareil ascogonial
t = trichogyne (?)

Très rapidement, ces cellules se dissocient et deviennent indépendantes tandis que leur noyau se divise en deux (figure 3B).

Ce stade, bien que le mode de fécondation de l'ascogone et son moment exact restent indéterminés, marque le début de la phase sporophytique.

b) Ebauches périthéciales fécondées (figure 4)

Dans les ébauches plus âgées (figure 4A), entre la paroi (p) qui s'épaissit et les cellules ascogoniales libres demeurent quelques cellules carpocentrales qui s'organisent en une garniture périloculaire. Celles de la base de l'ébauche, disposées en une cupule, constituent le ménisque sous-hyménial (m). Elles se vacuolisent fortement puis se lysent progressivement, jouant ainsi un rôle trophique en faveur de l'appareil sporophytique. Celles de la partie supérieure, au contraire, deviennent actives ; de plus en plus chromophiles, elles s'applatissent et constituent le méristème apical de la cloche sus-hyméniale (cl).

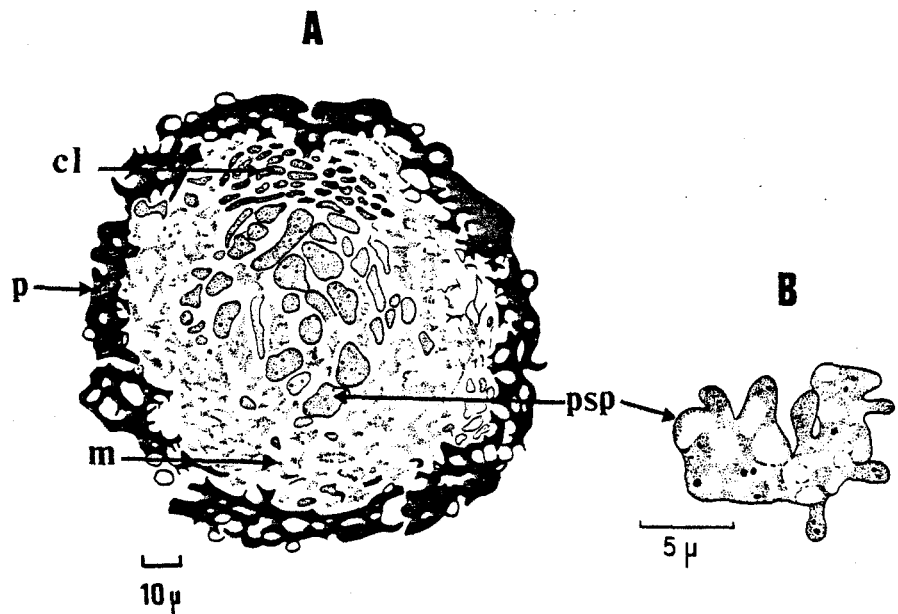


Figure 4 : A- Ebauche périthéciale âgée

B- Détail d'une cellule pro-sporophytique plurinucléée (psp)

p = paroi ; m = ménisque sous-hyménial ; cl = cloche sus-hyméniale

En même temps, à partir des cellules ascogoniales, débute la formation du sporophyte. Les deux noyaux de ces cellules se divisent plusieurs fois pour finalement constituer de grosses cellules plurinucléées (psp) qui composent le prosporophyte. Celles-ci (figure 4B), devenues très vésiculeuses, émettent sur leur pourtour de courts boyaux dans chacun desquels migrent du cytoplasme dense et un couple de noyaux.

En se détachant de la vésicule prosporophytique qui se lyse, les boyaux se transforment en cellules dicaryotiques. Ces dernières ou cellules carposporales n'évoluent plus durant plusieurs jours et se localisent à la surface ou à l'intérieur du ménisque sous-hyménial.

3.- LES PERITHECES SUB-ADULTES IMMATURES

a) Transformation des ébauches en périthèces sub-adultes (figure 5)

Au début de cette phase, les ébauches acquièrent une symétrie axiale qui s'accroît tandis qu'évoluent les structures de la paroi et de la garniture périloculaire :

Au niveau de la paroi, se différencient deux couches :

- une couche externe (pe) dont les cellules résorbent leur cytoplasme et épaississent leur membrane de plus en plus pigmentée,
- une couche interne (pi) où les cellules conservent une membrane mince et un cytoplasme bien visible quoique très vacuolisé.

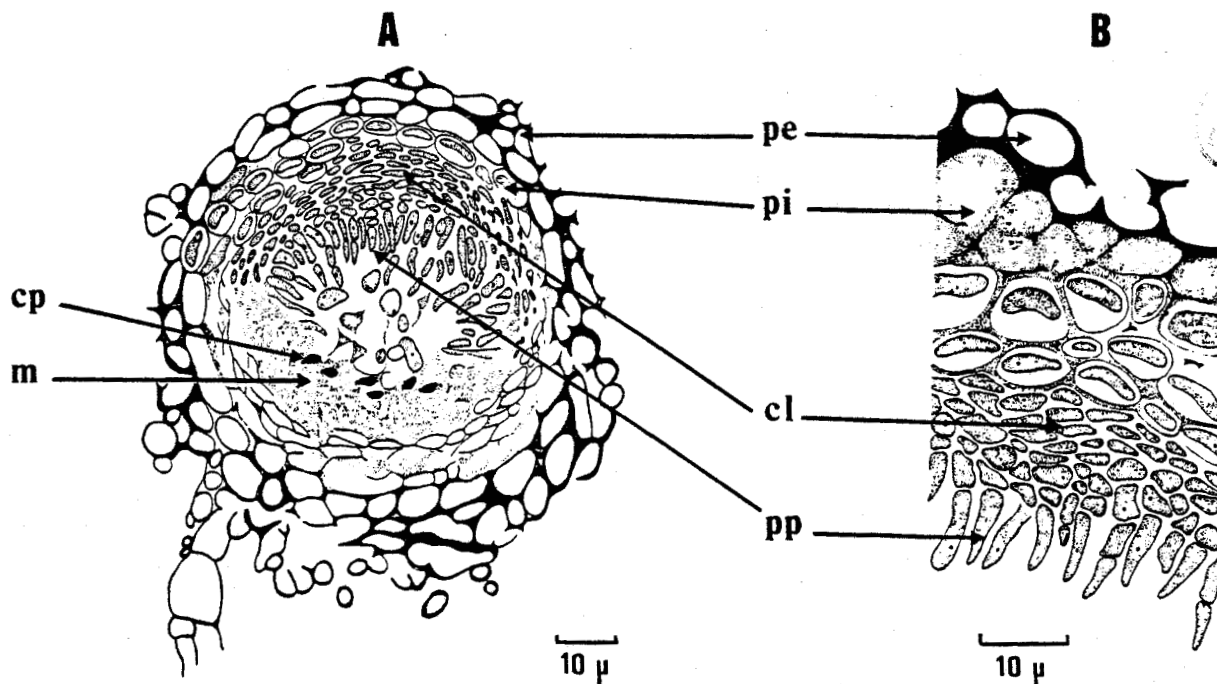


Figure 5 : A- Transformation d'une ébauche périthéciale en périthèce sub-adulte
B- Id. (détail)

cl = Cloche sus-hyméniale ; m = ménisque sous-hyménial ; pe = partie externe de la paroi ; pi = partie interne de la paroi ; pp = jeunes pseudo-paraphyses ; cp = cellules carposporales (localisation).

Au niveau de la garniture périloculaire :

- le ménisque sous-hyménial (m), en forme de cupule, se change en une masse cytoplasmatique d'allure syncytiale où reposent les cellules carposporales (cp),
- le méristème apical de la cloche sus-hyméniale (cl) s'organise par suite de divers réarrangements cellulaires originaux chez le *N. galligena*. Son fonctionnement donne naissance à des pseudoparaphyses descendantes (pp). Celles-ci sont d'abord unicellulaires, uninuclées et coniques, puis elles s'allongent et se cloisonnent transversalement plusieurs fois.

b) Périthèces sub-adultes (figure 6)

Dans un premier stade (figure 6A), la taille du périthèce augmente considérablement et sa paroi devient beaucoup plus épaisse. Le ménisque sous-hyménial (m) s'amenuïse et il supporte les cellules sporophytiques à dicaryon (cp). Les pseudoparaphyses (pp) occupent le centre du périthèce laissé vide par la lyse des cellules carpocentrales.

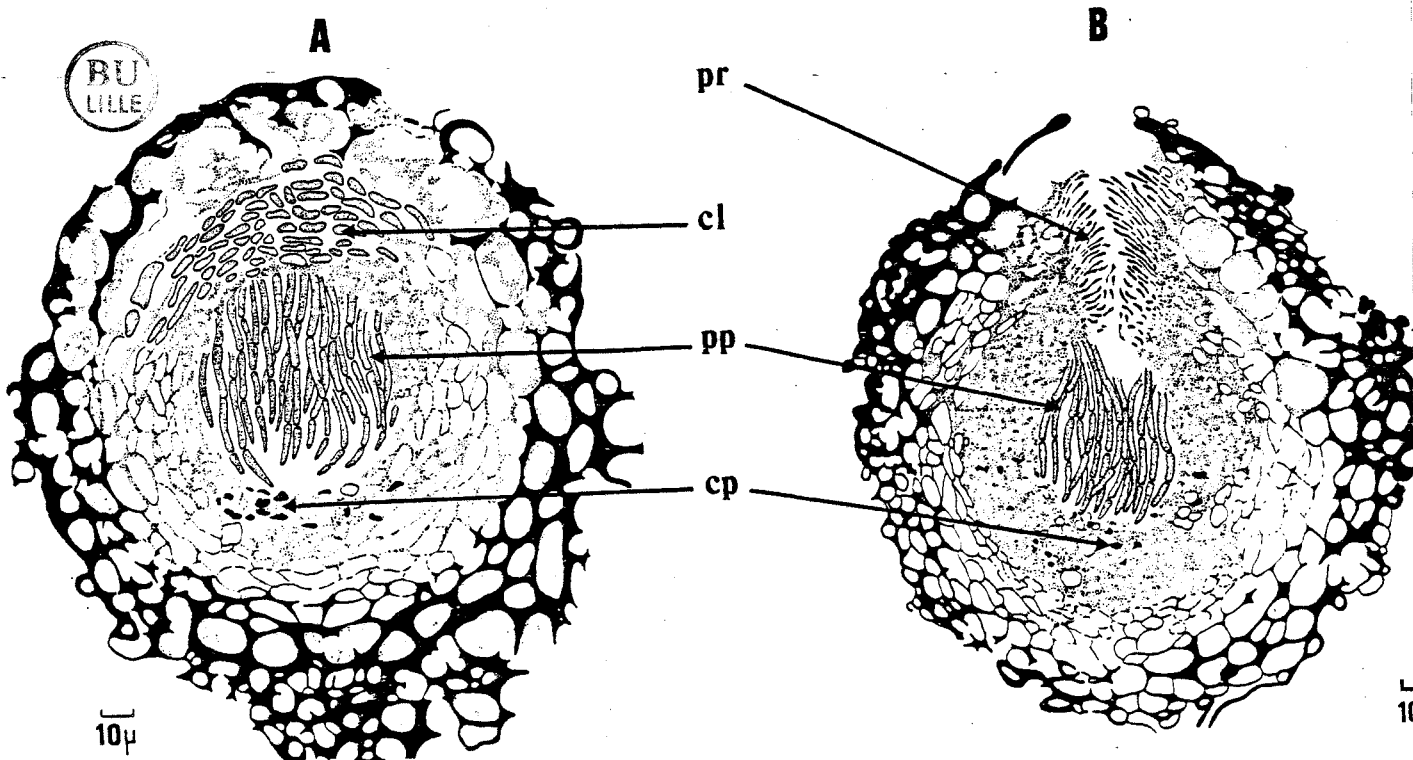


Figure 6 A et B : Périthèces sub-adultes

cl = cloche sus-hyméniale ; pp = pseudoparaphyses ; pr = périphyses ;
cp = cellules carposporales sporophytiques à dicaryon.

Au stade suivant (figure 6B), le méristème apical produit maintenant vers le haut, dans le canal du col périthécial qui s'est ouvert, des périphyses (pr), minces et dirigées obliquement vers l'ostiole. Puis, il cesse d'être fonctionnel et se lyse en son centre, mettant ainsi la locule en communication avec le canal du col et l'extérieur.

c) EVOLUTION DES PSEUDOPARAPHYSES. INTERET DE L'ETUDE ONTOGENIQUE

a) Dans le périthèce sub-adulte (figure 7A), les pseudo-paraphyses (pp) descendantes poursuivent leur croissance pour finalement se fixer, après avoir contourné les cellules sporophytiques (cp), dans le syncytium du ménisque sous-hyménial (m). Lorsque les pseudo-paraphyses sont ainsi toutes soudées par leurs extrémités apicales au ménisque (figure 7B), une rupture les sépare du méristème apical générateur. Elles simulent alors des paraphyses vraies, ascendantes.

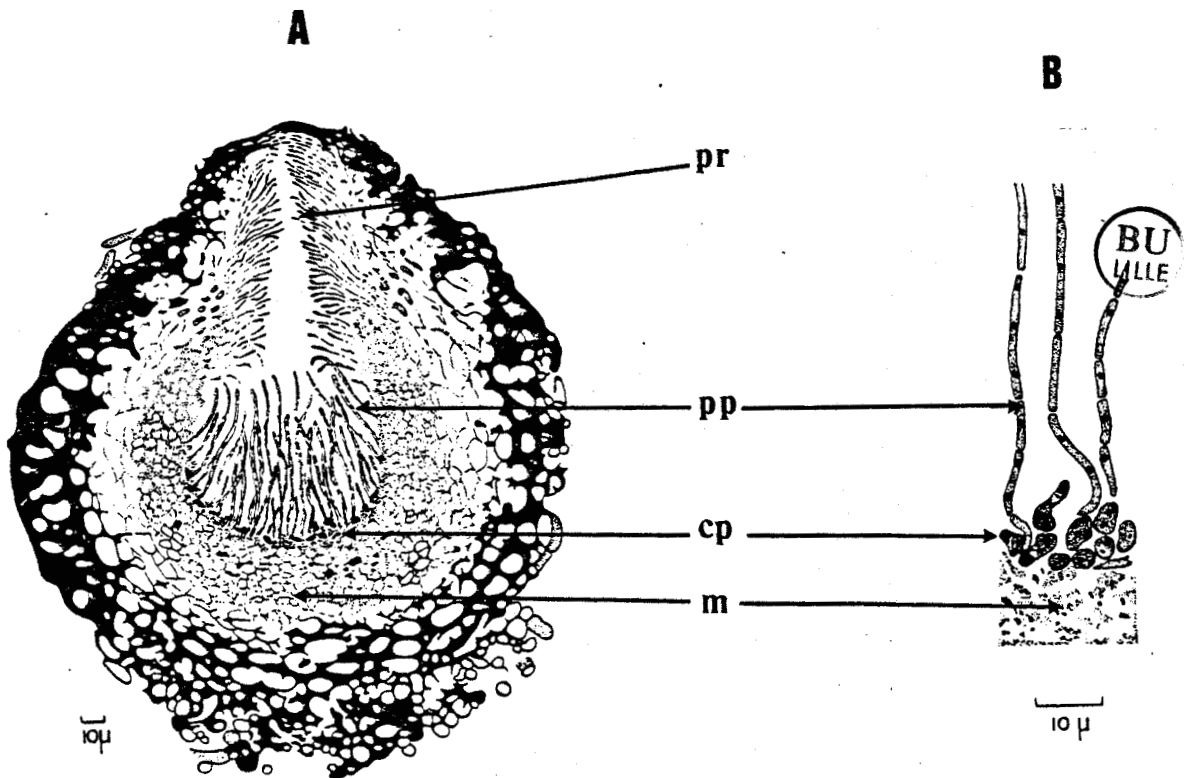


Figure 7 : Périthèce sub-adulte. Evolution des pseudo-paraphyses :

A- Dessin d'ensemble du périthèce -

B- Dessin de détail de l'extrémité de quelques pseudo-paraphyses (pp)

m = ménisque sous hyménial ; cp = cellule carposporale à dicaryon ; pr = périphyses.

Cette exemple démontre l'intérêt d'une étude ontogénique puisque, en l'absence de celle-ci, la distinction, dans un périthèce adulte, entre pseudo-paraphyses et paraphyses vraies semble très délicate et, de ce fait, elle peut rendre hasardeuse la classification d'un Pyrénomycète parmi les Ascoloculaires ou les Ascohyméniaux.

β) *Processus ascendant de vésiculisat*ion des pseudo-paraphyses (figure 8). L'évolution des pseudo-paraphyses, jusqu'alors comparable à celle décrite chez le *Nectria cinnabarina* (STRIKMANN et CHADEFAUD, 1961 ; PARGUEY-LEDUC, 1967) où elle s'achève à ce stade, se poursuit, au contraire et d'une manière spécifique, chez le *Nectria galligena*.

Ainsi, dans le périthèce sub-adulte (figure 8), la cellule terminale de chaque pseudo-paraphyse, après s'être effilée et ancrée dans le syncytium sous-hyménial (m) devient très chromophile. La cellule qui lui succède immédiatement, puis toutes les suivantes, progressivement, en allant du bas vers le haut, se vésiculisent fortement. Chacune des pseudo-paraphyses (pp) se transforme ainsi en un chapelet de cellules globuleuses occupées par une ou deux volumineuses vacuoles.

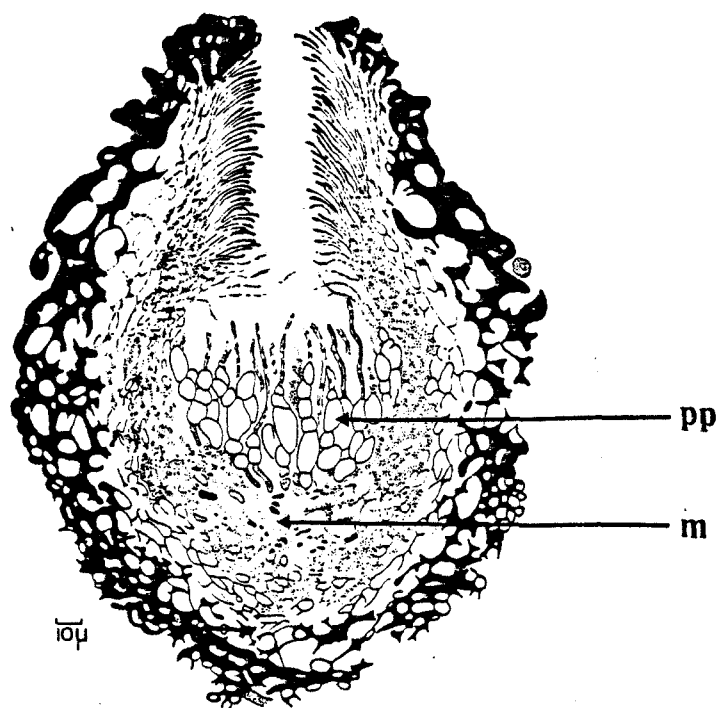


Figure 8 : Périthèce sub-adulte. Phénomène de vésiculisation des pseudo-paraphyses.
m = ménisque sous-hyménial ; pp = pseudo-paraphyses vésiculeuses.

On remarque donc le changement de sens de la polarité des paraphyses qui, descendant lors de leur différenciation, devient ascendant lors de leur vésiculisation. Celle-ci pourrait permettre aux pseudoparaphyses de jouer un rôle trophique.

4. LES PERITHECES ADULTES FERTILES

Le périthèce ayant atteint sa taille définitive, seul son col s'élargit considérablement (figure 9). Ce stade est marqué par l'achèvement de la différenciation des pseudo-paraphyses et de l'évolution de l'appareil sporophytique.

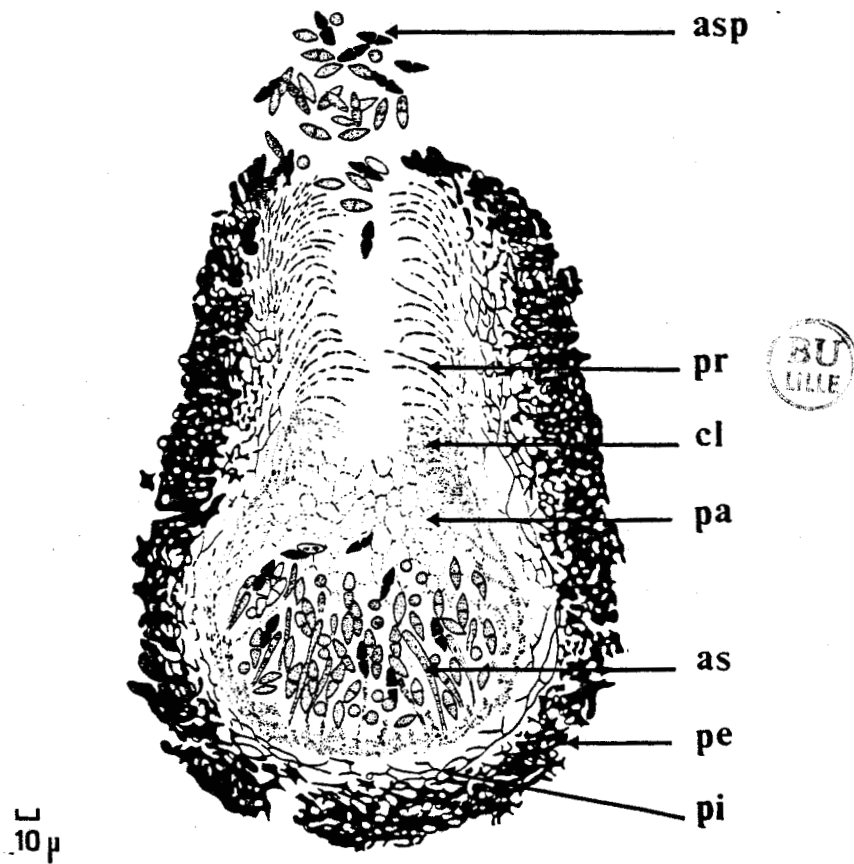


Figure 9 : Périthèce adulte

pr = périphyses ; *cl* = restes de la cloche sus-hyméniale ; *pa* = paraplectenchyme ; *as* = asques ; *asp* = ascospores ; *m* = restes du ménisque sous-hyménial ; *pe* = paroi externe ; *pi* = paroi interne.

Les pseudo-paraphyses se soudent latéralement entre elles et constituent un para-plectenchyme (pa) qui, assez fréquent chez les *Nectria*, est généralement considéré comme un tissu nourricier.

Avant la formation de ce faux tissu plectenchymateux, les cellules carposporales à dicaryon (cp), présentes et inchangées depuis la transformation des ébauches en périthèces sub-adultes, produisent des dangeardies ascogènes (crochets dangeardiens) caractéristiques du stade ascosporophytique à l'origine des asques (as).

La garniture périloculaire tend à disparaître mais la cloche sus-hyméniale (cl) est encore matérialisée par un anneau granuleux. La locule est occupée par le para-plectenchyme remplacé progressivement vers le bas par les asques adultes dont les ascospores (asp) commencent à être émises, à l'extérieur, par l'ostiole.

5.- LES ASQUES ET LES ASCOSPORES

Les asques sont cylindriques légèrement claviformes (75-95 x 12-15 μ). Bien que nés sur des dangeardies ascogènes en crochet (figure 10A), ils n'en gardent que très rarement trace sur leur pied, qui est le plus souvent arrondi. Ils sont parfois disposés en cymes composées de trois ou quatre asques (figure 10). A leur sommet, un anneau apical chitinoïde très petit est présent mais de façon non constante (figures 10A,B et E).

Dans chaque asque, se différencient, sans ordre, huit ascospores (fig. 10B). Elles sont d'abord ovoïdes, unicellulaires et uninuclées (fig. 10b et F,a), mais très tôt leur noyau se divise et elles deviennent bicellulaires, avec une constriction équatoriale, au niveau du septum séparant les deux cellules (fig. 10D). Les ascospores mûres (15-20 x 6-7 μ) sont hyalines et contiennent plusieurs globules lipidiques réfringents (fig. 10F, a et b). Leur paroi est finement verruqueuse (fig. 10, D et F,c).

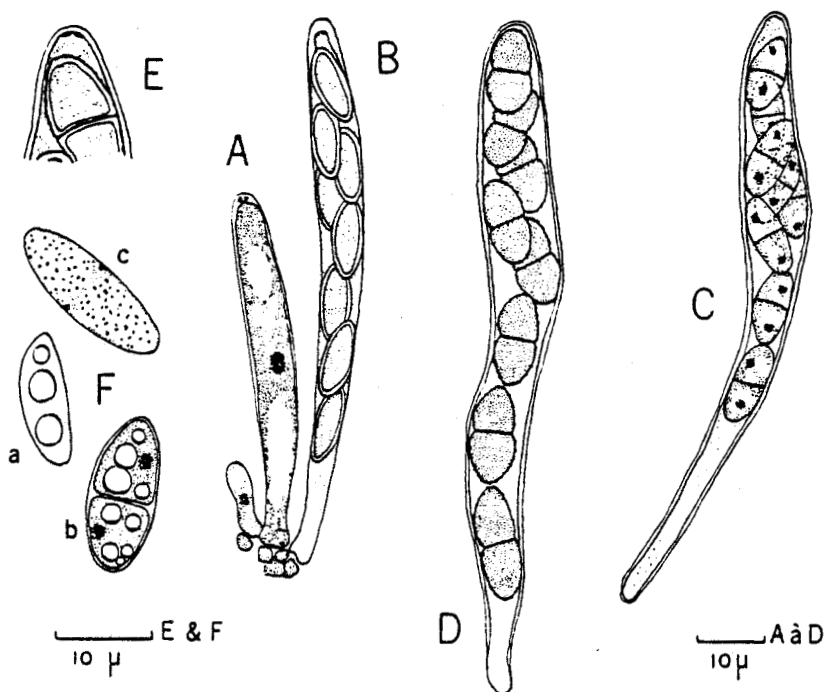


Figure 10 : Asques et ascospores

- A et B : Jeunes asques disposés en cyme ; en B, les huit ascospores, encore unicellulaires, se sont différenciées (coloration à l'encre Waterman)
- C : Asque contenant huit ascospores bicellulaires encore immatures (coloration au Bleu C₄B)
- D : Asque adulte contenant huit ascospores adultes (sans coloration)
- E : Sommet d'un asque montrant le petit anneau apical chitinoïde (coloration à l'encre Waterman)
- F : Ascospores jeunes encore unicellulaire (a), bicellulaire (b), en c ascospore plus âgée montrant la paroi verruqueuse.

6.- DISCUSSION-CONCLUSION

L'étude ontogénique des périthèces et des asques du *N. galligena* montre que ce champignon Pyrénomycète occupe, comme la plupart des Nectriales, une position intermédiaire entre :

- a) Les Ascoloculaires puisque, chez le *N. galligena* :
- les archicarpes engendrent uniquement l'appareil sporophytique et jamais de filaments recouvrants constitutifs d'une ascothécie. Celle-ci n'intervient

donc pas dans la structure périthéciale uniquement ascostromatique.

- les filaments stériles inter-ascaux sont des pseudo-paraphyses descendantes.

b) Les Ascohyméniaux car le *N. galligena* est un unituniqué de par ses asques. Ceux-ci, souvent annelascés, ne sont jamais déhiscent selon le mode "Jack in the box".

De part ses caractères mixtes d'Ascoloculaire Unituniqué, le *N. galligena* doit donc être classé parmi les Nectriales évoluées qui, d'une certaine manière, représentent un terme de passage entre les Ascoloculaires Bituniqués et les Ascohyméniaux Unituniqués.

Outre son intérêt sur le plan systématique, ce travail permet d'observer, chez le *N. galligena*, la formation précoce des cellules carposporales dicaryotiques. Ces dernières, en demeurant inchangées plusieurs jours dans le périthèce sub-adulte soumis, pourtant, à de nombreux remaniements, figurent un stade d'attente. Celui-ci est de nature différente chez le *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1975) où il est représenté par le syncitium sporophytique.

Par ailleurs, la nette séparation dans le temps de certaines séquences de la reproduction sexuée du *N. galligena* devrait permettre une étude de leur déterminisme respectif.

IV.- POSITION SYSTÉMATIQUE DU *N. GALLIGENA*

L'étude ontogénique des périthèces du *N. galligena*, nous a précédemment démontré la position systématique ambiguë de ce champignon. De ce fait, nous avons voulu préciser les critères de la classification fongique en fonction du problème que posent les Nectriales (STRIKMANN, 1961 ; STRIKMANN et CHADEFAUD, 1961). Ainsi, nous avons envisagé successivement la place systématique du genre *Nectria* et la distinction de ses espèces.

1.- POSITION SYSTEMATIQUE DU GENRE *NECTRIA*

Le terme *Nectria*, créé en 1825 par FRIES désigne une section des Sphaeriacéens puis un genre (DE NOTARIS, 1844 ; FRIES, 1849), dont SACCARDO (1878) précise la diagnose. Cet auteur reconnaît dans les *Nectria* des champignons aux périthèces superficiels, membraneux, aux couleurs vives, renfermant des asques cylindriques à 8 ascospores uniseptées, non filiformes hyalines. Ainsi de par leurs ascocarpes, les *Nectria* appartiennent plus précisément aux Pyrénomycètes (classe ou sous classe selon les auteurs) dont la sys-

tématique contemporaine repose principalement sur l'organisation des périthèces et la structure des asques (PARGUEY-LEDUC et JANEX-FAVRE, 1981).

Au niveau des ascocarpes, l'étude ontogénique permet, tout d'abord, à NANNFELDT (1932) de distinguer parmi les Carpoascomycètes: les Ascohyméniaux ascothéciens à paraphyses vraies et les Ascoloculaires ascotromatiques à pseudo-paraphyses. Dans ces deux ensembles, des analyses ultérieures (LUTTRELL, 1951 ; PARGUEY-LEDUC, 1967 ; HUANG, 1976) différencient dix types de centre périthécial (= noyau = centrum = carpocentre) selon la nature et l'évolution de leurs éléments constitutifs (archicarpes, paraphyses..). Parmi ceux-ci, existe le type Nectria très semblable à celui décrit précédemment chez le *N. galligena* (PARGUEY-LEDUC et DEHORTER, 1973-1974).

Au niveau de la structure des asques, LUTTRELL (1951), en se basant sur la nette séparation ou, au contraire, l'intime soudure des tuniques interne (endoascus) et externe (exoascus) de la paroi ascale, divise les Ascomycètes respectivement en Bituniqués et Unituniqués. Pour sa part, CHADEFAUD (1960) se fonde sur la nature de l'appareil apical de l'asque pour séparer les Ascomycètes en Anellascés pourvus d'un anneau apical chitinoïde ou amyloïde et Nassascés dont les asques, seuls capables d'une déhiscence type "Jack in the box", comportent une nasse apicale.

Finalement, la confrontation de ces travaux relatifs à l'organisation des périthèces et des asques aboutit à une répartition générale des Pyrénomycètes en deux catégories (sous-classes) soit :

- des Ascoloculaires Bituniqués Nassascés ou Loculoascomycètes,
- des Ascohyméniaux Unituniqués Anellascés ou Euascomycètes.

Cette distinction souffre quelques exceptions notamment au niveau des *Nectria*. Ceux-ci forment un groupe hétérogène d'espèces dont la plupart, à l'exemple du *N. galligena*, possède des structures intermédiaires. Celles-ci marquent une évolution conduisant des types Bituniqué et Ascoloculaire vers ceux Unituniqué et Ascohyménial (STRIKMANN, 1961) ; elles obligent à ne plus considérer ces deux ensembles systématiques comme radicalement distincts et indépendants dès l'origine (PARGUEY-LEDUC, 1967).

De fait, dans les traités modernes de systématique, les auteurs, en privilégiant le caractère unitoniqué-annellascé des asques des *Nectria* rangent ces champignons parmi les Ascohyméniaux : groupe des Sphaeriacéens (CHADEFAUD, 1960) ou sous-classe des Euascomycètes (WEHMEYER, 1975) ou Hyménoascomycétidae (ALEXOPOULOS et MIMS, 1979). Ils en soulignent les caractères ascoloculaires dont le centre périthécial de type *Nectria* ne se rapporte qu'au seul ordre des Hypocréales (AINSWORTH et BISBY, 1971 ; ALEXOPOULOS et MIMS, 1979) ou des Nectriales (CHADEFAUD, 1960). Cet ordre comporte la seule famille des Hypocreaceae dans laquelle ROGERSON (1970) classe quelque 104 genres, parmi ceux-ci : *Gibberella*, *Hypocrea*, *Hypomyces*, *Nectria*.

2.- DISTINCTION SYSTEMATIQUE DES ESPECES DU GENRE NECTRIA

Les classifications des espèces de *Nectria* proposées par BOOTH (1966) SAMUELS (1976) ou PERRIN (1976) considèrent, sur la base des travaux initiaux de SACCARDO (1878), WEESE (1918) et WOLLENWEBER (1924), les champignons dans leur biotope naturel comme des entités à étudier sous leurs formes sexuée et asexuée. Ainsi elles se fondent sur trois critères essentiels :

- le stade parfait sexué : sa structure et sa disposition sur l'hôte ou le substrat naturel.
- l'état imparfait asexué : les formes conidiennes (Deutéromycètes) les plus souvent associées aux *Nectria* appartiennent aux genres : *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Gliocladium*, *Verticillium*, *Tubercularia*, *Acremonium*.
- les relations du champignon avec l'hôte ou le substrat et la nature de ceux-ci offrent une possibilité très pratique de classement. Sur cette base (BOOTH, 1966), les espèces de *Nectria* se partagent en trois groupes: polyphage, peu spécifique et spécifique suivant le nombre important, peu élevé ou unique, d'hôtes qu'elles recouvrent. A ce niveau, tous les comportements biologiques peuvent être observés depuis le saprophytisme très commun (*N. cinnabarina*) jusqu'au parasitisme spécifique (*N. ditissima*).

En se référant à ces critères auxquels s'ajoutent des caractéristiques culturelles *in vitro*, BOOTH (1978) divise le genre *Nectria* en plusieurs groupes d'espèces étroitement apparentées parmi lesquels figure le groupe *Coccinea*. Au sein de ce dernier, les *N. galligena* Bres. et *N. ditissima* Tul., agents phytopathogènes de chancres, représentent, pour notre étude, un intérêt plus particulier. Ces deux espèces, souvent confondues dans le passé (HARTIG, 1878) ; GOETHE, 1880) peuvent être différenciées (WOLLENWEBER, 1924 ; RICHTER, 1928 ; BOOTH, 1959) sur la base des critères exposés ci-dessus. Le tableau 2 résume les caractères distinctifs de ces deux champignons.

Tableau 2 : Caractères distinctifs du *N. galligena* et du *N. ditissima* d'après BOOTH (1959).

	<i>Nectria galligena</i> Bres.	<i>Nectria ditissima</i> Tul.
1° Forme sexuée mature		
a) <u>Périthèce</u>		
. disposition	superficielle sur l'hôte, isolée ou par groupe de 2 à 5 unités.	erumptante sur l'hôte, en amas de 5 à 30 unités sur un stroma réduit
. diamètre	250-350 μ	250-300 μ
. paroi	lisse à 2-3 couches cellulaires épaisseur : 40-60 μ	rugueuse à 3 couches cellulaires épaisseur : 45-55 μ
b) <u>Asques</u>		
	cylindro-claviformes 75-95 x 12-15 μ à anneau chitinoïde et 8 ascospores/asque	claviformes 85-95 x 15-18 μ à 8 ascospores/asque
c) <u>Ascospores</u>		
	bicellulaires, hyalines, 14-22 x 6-9 μ	bicellulaires, hyalines, 14-21 x 5-8 μ
2° Forme asexuée		
a) <u>Genre espèce</u>		
	<i>Cylindrocarpon mali</i> Deutéromycète-Melanconiale	<i>Cylindrocarpon wilkomii</i> Deutéromycète-Melanconiale
b) <u>Microconidies</u>		
	unicellulaires, cylindriques 4-8 x 2-3 μ	unicellulaires, elliptiques 2-2,5 x 0,8-1 μ
c) <u>Macroconidies</u>		
	cylindriques, droites ou arquées 1- septées : 10-28 x 4-5 μ 2- septées : 28-30 x 4-5 μ 3- septées : 36-47 x 4-6,5 μ 4 et X septées : 47-65 x 5-7 μ	cylindriques, droites ou courbes 4- septées : 50-65 x 3-5 μ 5- septées : 68-80 x 4-5 μ 6- septées : 75-86 x 5-6 μ 7- septées : 82-90 x 5-6 μ
3° Relations avec l'hôte		
	Parasite polyphage, agent de chancre sur : pommier, poirier, bouleau, érable,....	Parasite spécifique, agent du chancre du hêtre



La culture, *in vitro*, de ces deux champignons nous a permis de constater que :

- le *N. galligena* produit des périthèces plus volumineux et des ascospores de plus grandes dimensions que le *N. ditissima*
- nos mesures personnelles de la taille des asques et des ascospores s'intègrent dans les intervalles dimensionnels définis dans le tableau 2.
- la nette projection des ascospores du *N. ditissima* sur les parois des récipients de culture ne s'observe pas chez le *N. galligena* où elles demeurent agglomérées à l'ostiole périthéciale.

V. - PROBLEME D'HÉTÉROTHALLISME

Ce problème réside dans la variabilité, selon les souches, du caractère homothallique ou hétérothallique d'une même espèce de *Nectria*.

Ainsi, existent-ils chez le *N. galligena*, comme chez le *N. haematococca* (CURTIS, 1964), des clones homothalliques (BOOTH, 1959 ; LORTIE, 1964) et hétérothalliques (KRUGER, 1974a).

Au cours de nos expériences, la souche du *N. galligena*, originellement employée, qui est issue de périthèces récoltés sur pommier localisé dans l'Aveyron (1965), apparait homothallique où les cultures monoascopores produisent, *in vitro*, des ascocarpes fertiles. La perte des potentialités reproductrices de ce clone, devenu uniquement végétatif (souche Ab), nous a obligés à de nouveaux isollements. Ceux-ci, monoascaux et monoascospores, sont pratiqués sur des fructifications parfaites prélevées sur chancres de pommier (Pas-de-Calais, 1973). Si, le développement, *in vitro*, de ces isolats monoascaux conduit au cycle biologique complet du champignon tel qu'il est décrit dans les expériences II et III précédentes, les cultures monoascospores présentent un comportement différent comme le souligne l'expérimentation suivante.

1.- CONDITIONS EXPERIMENTALES

A partir d'isolats monoascospores, obtenus au moyen de techniques de micromanipulation ou de dilutions, nous avons pratiqué deux types de culture :

- le premier se rapporte au développement de 25 ascospores isolées (série A)
- le second se compose de deux séries de 25 croisements binaires réalisés entre 23 souches monoascospores et respectivement deux ascospores a_1 (série B1) et a_2 (série B2) qui sont aussi confrontées entre elles. La compatibilité des clones a_1 et a_2 a été établie aux cours d'expériences préalables.

Toutes ces cultures, ainsi qu'un isolat monoascal de référence, sont incubées, en présence de lumière blanche (12hL/12hO) à 18 °C et sur milieu M23 gélosé ou liquide.

Après 30 jours, les résultats obtenus (tableau 3) indiquent :

- l'évolution sexuée (présence -ou non- d'ébauches périthéciales ou d'ascocarpes fertiles) dans tous les cas expérimentaux.
- le poids de mycélium lyophilisé recueilli des cultures monospores sur milieu liquide.

2.- RESULTATS

a) Cultures monoascospores (série A)

Si les 25 cultures monoascospores produisent des conidies, aucune ne différencie des ascocarpes fertiles même à l'issue d'une incubation prolongée à trois mois. L'uniformité de ces réponses ne se retrouve pas au niveau du développement végétatif et de l'évolution morphologique des 25 isolats qui peuvent être scindés en deux groupes.

Ainsi quatre souches (a1, a7, a10, a18) forment, sur le substrat gélosé, un mycélium ras blanchâtre indifférencié dont la valeur pondérale, mesurée en culture liquide, se révèle faible.

Dans le second groupe, les 21 isolats présentent, sur milieu solide, un mycélium aérien, important (cf poids de mycélium lyophilisé), pigmenté et parsemé, de nombreux petits glomerules rougeâtres. Ces derniers pourraient-ils correspondre à des ébauches périthéciales dont l'évolution serait bloquée avant même la fécondation ? Ces formations granulaires colorées s'observent encore dans des cultures monoascales qui, potentiellement fertiles, sont placées dans un environnement défavorable.

b) Cultures croisées biascospores (séries B, 1 et 2)

Le développement du champignon, issu des confrontations entre deux souches monoascoporées, revêt deux aspects. L'un, comme dans les cultures monospores ci-dessus, se caractérise par une production nulle d'ascocarpes fertiles. Le second, au contraire, est marqué par la formation significative de périthèces fertiles dont la morphogenèse s'accomplit pareillement à celle de la culture monoascale de référence (figure 1). Dans ce cas, le nombre d'ascocarpes matures varie selon les croisements, il est notablement peu élevé lorsque deux ascospores à faible croissance mycélienne (a1, a7, a10, a18) sont confrontées. Les résultats de ces deux séries (B1 et B2) de croisements sont parfaitement complémentaires où la compatibilité d'un isolat monospore avec l'ascospore a1 implique son incompatibilité avec le clone a2 et la stérilité sexuée de ce dernier croisement.

Tableau 3 : Cultures mono- et bi- ascospores du *N. galligena* cultivé sur milieu synthétique M23, à 18 °C, en présence de lumière blanche (12hL/12hO)

ASCOSPORE	CULTURES MONOASCOSPORES			CULTURES CROISEES BIASCOSPORES	
	SERIE A			SERIE B1	SERIE B2
a()	-----			a1 x a()	a2 x a()
	Mycélium ¹	Eb. ²	Per. ²	Production	Production
	mg/fiole			périthéciale ³	périthéciale ³
1	141	-	-	0	66
2	198	+	-	66	0
3	201	+	-	57	0
4	202	+	-	0	28
5	199	+	-	73	0
6	195	+	-	50	0
7	080	-	-	3	0
8	200	+	-	33	0
9	209	+	-	41	0
10	085	-	-	7	0
11	200	+	-	0	33
12	223	+	-	44	0
13	203	+	-	0	23
14	207	+	-	85	0
15	206	+	-	48	0
16	191	+	-	0	40
17	200	+	-	28	0
18	149	-	-	15	0
19	203	+	-	56	0
20	210	+	-	0	21
21	211	+	-	0	36
22	197	+	-	31	0
23	205	+	-	0	23
24	205	+	-	38	0
25	196	+	-	0	39
T ⁴	172	+	+	100	100

BU
LILLE

Légende

1. Poids de mycélium lyophilisé par fiole de ROUX (100 ml de milieu) après 30 jours de culture (moyenne de 5 mesures).
2. Les signes (+) et (-) indiquent respectivement la présence ou l'absence d'ébauches périthéciales (Eb.) et de périthèces fertiles (Per.) sur substrat gélosé et liqui
3. Rapport, multiplié par 100, entre les nombres de périthèces fertiles par tube des séries B1 ou B2 et de la culture monoascale de référence (moyenne de 10 mesure
4. Culture monoascale de référence.

3.- DISCUSSION

Les résultats ci-dessus corroborent pour l'essentiel ceux de KRUGER (1974) qui conclut à l'hétérothallisme du *N. galligena* sous forme de deux groupes de compatibilité ascosporelle intrastériles et interfertiles et, en outre, à une ségrégation morphologique des cultures monospores. En nous référant à nos premiers travaux (LACOSTE et DEHORTER, 1973) basés sur une souche homothallique, ces données nous font admettre l'existence, chez le *N. galligena* de clones homothalliques et hétérothalliques. Elles supposent une grande variabilité génétique naturelle au niveau d'une même espèce fongique et peuvent expliquer certains résultats expérimentaux divergents selon l'origine du champignon qui est cultivé par les auteurs.

. Cette complexité génétique apparaît chez le *Nectria coccinea* (THILLY, 1983) où, parmi les huit ascospores d'un même asque, l'une semble autofertile tandis que les sept autres sont autostériles et interfertiles. Ces dernières, cultivées isolément, forment toutes des ébauches périthéciales, à caractères plus ou moins évolués, contenant -ou non- soit des ascogones, des cellules sporophytiques. Ces types de formations abortives sont également observés dans toutes les cultures monoascosporees du *Nectria ditissima* (DEHORTER et PERRIN, 1983a) où seuls des croisements compatibles les transforment en ascocarpes matures. Ce champignon manifesterait donc un hétérothallisme physiologique (WHITEHOUSE, 1949) contrairement au *N. galligena* ou au *Nectria cosmariospora* (TAYEL et HASTIE, 1976) dont les clones monospores ségrégent en deux groupes producteurs -ou non- d'ébauches sexuées.

. Souvent, les démonstrations du caractère hétérothallique, comme nous les avons réalisées ou encore pour d'autres espèces de *Nectria* : *N. myxomyceticola* et *N. violacea* (SAMUELS, 1973), *N. coccinea* (PARKER, 1976)... se fondent uniquement sur les périthèces adultes fertiles qui, *in vitro*, sont :

- présents dans les cultures issues de croisements d'ascospores compatibles,
- absents du développement des ascospores isolées ou de leur confrontation si elles appartiennent au même groupe de compatibilité.

De ce fait, elles négligent l'existence des stades sexuels abortifs dont elles ignorent l'état cytologique et plus précisément la présence éventuelle d'éléments sporophytiques consécutifs d'une fécondation. Dans ce cas, l'hétérothallisme que CHADEFAUD (1960) assimile à une incompatibilité de fécondation deviendrait relatif chez ces espèces. Il serait plutôt le reflet d'un homothallisme imparfait où l'évolution du sporophyte serait bloquée, plus ou moins précocement, pour des raisons diverses : génétiques,

thermiques, nutritives, ... Ces dernières expliqueraient l'hétérothallisme du *Nectria coccinea* var. *faginata* en culture *in vitro* (COTTER et BLANCHARD, 1978) et son homothallisme, dans la nature, sur les chancres du hêtre (GOTWOLS et al, 1980).

. Finalement, notre expérimentation, quoique incomplète (échantillonnage, cytologie, ...) a permis de définir des conditions génétiques favorables -ou non- à l'obtention d'ascocarpes fertiles du *N. galligena*. Dans ce sens, elle représente, pour nous, un moyen d'étude supplémentaire du déterminisme sexué de ce champignon.

C O N C L U S I O N S

Les intérêts de cette première partie consacrée au déterminisme sexué du *N. galligena* résident dans :

- la définition de conditions culturelles simples qui autorisent, *in vitro*, le cycle biologique complet du champignon. Sont ainsi mises en évidence des différences entre les modalités externes de la conidiogenèse et de la fructification parfaite où cette dernière apparaît, notamment, photodépendante contrairement à la multiplication asexuée.
- l'étude ontogénique des périthèces produits en culture pure qui caractérise, au plan cytologique et structural, les principales séquences de la morphogenèse sexuée. Ce travail révèle donc les caractères originaux de la formation des ascocarpes dont l'organisation place le *N. galligena* dans une position intermédiaire entre les Pyrénomycètes Ascohyméniaux et les Pyrénomycètes Ascoloculaires, le *N. galligena* étant finalement classé parmi ces derniers.
- la prise en considération de la variabilité génétique des souches du *N. galligena* où le clone, utilisé pour toutes nos expériences ultérieures, présente un caractère hétérothallique défini en fonction de la production de périthèces fertiles.
- les expériences qu'il nous suggère afin de préciser, notamment :
 - . l'état cytologique des diverses structures abortives observées lorsque le champignon est cultivé dans des conditions néfastes à sa fructification. Ainsi, selon les facteurs limitants, l'action inhibitrice s'exerce-t-elle différemment sur le gamétophyte, la fécondation ou le sporophyte ?
 - . les relations, sur la base de leur inter-fécondité, entre les souches du *N. galligena*, selon l'espèce d'hôte parasité (formes spéciales ou caractère polyphage de ce champignon ?).



DEUXIÈME PARTIE

INFLUENCE DES FACTEURS TROPHIQUES ET THERMIQUES SUR LA REPRODUCTION SEXUÉE DU N. GALLIGENA

Les publications (HAWKER, 1957 ; COCHRANE, 1958 ; LILLY, 1965 ; HENDRIX, 1970 ; TURIAN, 1978 ; MANACHERE, 1980....) qui répertorient l'influence des facteurs de l'environnement sur le développement, *in vitro*, des champignons soulignent :

- l'hétérogénéité des réponses fongiques qu'accentue la disparité des dispositions expérimentales en fonction des buts recherchés,
- la plus grande difficulté d'obtenir l'état sexué qui dépend de modalités externes, nutritives et thermiques notamment, plus restrictives que celles favorisant la croissance végétative ou la multiplication asexuée.

Ainsi, chaque étude apparaît singulière en regard des acquis antérieurs et nécessite de nouvelles mises au point qui semblent d'autant plus délicates qu'elles visent le déterminisme sexué.

Dans cette perspective, cette deuxième partie de notre étude aborde la recherche des conditions nutritives et thermiques de la fructification parfaite du *N. galligena*. Au niveau du genre *Nectria*, selon les objectifs poursuivis ou les moyens techniques disponibles, ces deux aspects de la formation, *in vitro*, des ascocarpes ont été diversement appréciés sous forme soit :

- d'un simple constat où généralement les milieux hôtes, sans recherche de la température optimale, permettent la sexualisation des *N. lugdunensis* (ARCHER, 1971), *N. citrina* (SMYK, 1975), *N. coccinea* (PARKER, 1976), *N. sp.* (BOOTH, 1955; SAMUELS, 1973).
- de la mise en valeur de certains composants du substrat synthétique et de l'influence de différentes températures sur la différenciation sexuée des *N. gliocladioïdes* (HANLIN, 1961) et *N. ditissima* (DEHORTER et PERRIN, 1983a).
- d'une définition très complète, comme pour le *N. haematococea* (= *Hypomyces solani*) de toutes les modalités de son développement : nutritives (HIX et BAKER 1964; QURESHI et PAGE, 1972), thermiques (BAKER et WARE, 1962) mais aussi lumineuses (CURTIS, 1972), génétiques (BAKER, 1956 ; DABOUSSI-BAREYRE et al, 1979 ; BABAI-AHARY et al, 1982) et biochimiques (PARISOT, 1983). Ce champignon représente sans doute un modèle d'études à la manière des *Allomyces*, *Neurospora*, *Schizophyllum*, *Coprinus*,...

Quant au *N. galligena*, s'il fait l'objet de recherches variées (BERDUCOU, 1956) ; BELTRA et al, 1969 ; LAHOZ et al, 1970 ; TARIS et al, 1970 ; MARCHAL et al, 1970 ; BARTHE, 1971 ; BROWN et SWINBURNE, 1974), plus précisément sa sexualisation est obtenue dans des conditions de culture pure qui, selon les auteurs, peuvent être résumées ainsi :

- gélose au malt (WILTSHIRE, 1920),
- milieux amylicés solides glycélinés, à la température du laboratoire (CAYLEY, 1921 ; RICHTER, 1928),
- substrats hôtes ou farines de céréales gélosées, 21 °C (LORTIE, 1964),
- milieux naturels divers, solides ou liquides, 18 °C (LACOSTE et DEHORTER, 1973)
- milieux au malt ou semi-synthétiques gélosés, 25 °C (KRUGER, 1974b),
- substrats à base de malt ou d'extrait de levure gélosés, 20 °C (WESSEL, 1977).

D'autres essais (VINOGRADOVA, 1957 ; BERDUCOU, 1956) n'ont abouti qu'à la formation de périthèces stériles.

Globalement, la production, *in vitro*, des ascocarpes du *N. galligena* dépend donc de substrats solides de composition indéfinie, de températures fluctuantes et d'une longue période d'incubation en présence de lumière. Au flou de cet environnement, peut-on opposer les définitions d'un milieu synthétique liquide et d'une régulation thermique qui permettent de préciser, toutes conditions favorables par ailleurs, le déterminisme sexué du *N. galligena* en fonction de ses exigences nutritionnelles et thermiques : sujets, respectivement, des premier et second chapitres de cette deuxième partie de notre travail.

CHAPITRE I

CONDITIONS NUTRITIONNELLES DE LA PRODUCTION PÉRITHÉCIALE DU N. GALLIGENA.

Les réponses sexuées du *N. galligena*, étudiées en fonction, soit de nombreux substrats naturels, soit des variations de la composition minérale, vitaminique, carbonée, azotée et du pH d'un milieu synthétique, sont obtenues dans des conditions générales de culture où :

- les inoculums sont composés de fragments mycéliens issus d'une souche monoascale,
- l'incubation, d'une durée minimale de 30 jours, s'effectue constamment à la température de 18 °C,
- chaque expérience comporte deux lots : l'un placé à l'obscurité permanente, l'autre soumis à un éclaircissement ($750 \mu\text{Wcm}^{-2}$) nycthémeral en lumière blanche (12hL/12hO),
- les substrats sont employés sous les formes solide et -ou- liquide, dans ce dernier cas, peut être évaluée la croissance pondérale du mycélium par unité de culture (boîte de ROUX contenant 100 ml de milieu).

I. - EXPÉRIENCE PRÉLIMINAIRE : INFLUENCE GLOBALE DE LA NATURE DU SUBSTRAT

Ce travail rend compte de la production périthéciale du *N. galligena* ensemencé sur 23 milieux solides M1 à M23, il représente un critère de comparaison, au plan trophique, du *N. galligena* avec de nombreux Mycètes qui sont, le plus souvent, uniquement cultivés dans ces conditions.

Tous les substrats, naturels pour la plupart, sont choisis en fonction de la plante hôte, de leur utilisation classique en mycologie et de leur valeur éprouvée chez divers *Nectria*.

1.- CONDITIONS EXPERIMENTALES

Parmi les 23 milieux, tous sont gélosés et ajustés à pH 5,5, sauf deux (M10 et M11) qui, sous forme de fragments, sont introduits dans des tubes de Roux contenant 10 ml d'eau distillée.

Les décoctions (M2, M3, M12 à M19) sont obtenues de matières qui, après pesée, sont broyées au "Waring Blendor", mises en suspension dans l'eau distillée et placées à 65 °C pendant 15 heures. Elles sont gélosées dans cet état (décoctions : M2 et M12 à M17) ou après centrifugation puis filtration sur verre fritté (filtrats de décoction : M3, M18 et M19).

a) *Les trois premiers substrats font intervenir, sous trois formes, le pommier : hôte commun du champignon, soit :*

M1 : fragments de branche (longueur : 10 cm, diamètre : 1 cm) inclus dans de l'eau distillée gélosée

M2 : décoction (50g/l) de rameaux

M3 : filtrat de décoction (50g/l) de rameaux

b) *Les milieux suivants, très utilisés pour le développement fongique, contiennent pour :*

M4 : du jus de tomates et de légumes (V8-Juice Campbell Soup. Co.) dilué au quart dans l'eau distillée additionnée de 3g/l de carbonate de calcium

M5 : de la farine de maïs (17g/l, Corn Meal agar-Difcolabo)

M6 : de l'extrait de malt (10g/l, Bio-Mérieux)

M7 : de l'extrait de levure (20g/l, Bio-Mérieux)

M8 : de l'eau de pomme de terre (50g/l)

M9 : de l'eau de pomme de terre (50g/l) additionnée de glucose (10g/l)

M10: de fragments de racine de carotte

M11: des fragments de tubercule de pomme de terre au contact d'eau distillée glycérolisée à 1 % (CAYLEY, 1921)

c) Les substrats, ci-dessous, sont constitués de farine de céréales, soit en :

M12, 13 et 14 : des décoctions d'avoine, respectivement 20, 40 et 60g/l

M15 : une décoction d'un mélange d'avoine (10g/l) et d'orge (10g/l)

M16 et 17 : des décoctions de mélanges (20 et 40g/l) à parts égales d'avoine et de blé

M18 et 19 : des filtrats de décoctions (40g/l) M13 et M17

d) Les supports nutritifs M20 à M23, partiellement (M20) ou totalement synthétiques, favorisent la différenciation sexuée de divers *Nectria* :

M20 : *N. galligena* (KRUGER, 1974b)

M21 : *N. gliocladioides* (HANLIN, 1961)

M22 : *N. haematococca* (CURTIS, 1969)

M23 : *N. ditissima* (DEHORTER et PERRIN, 1983a)

D'une part, le glucose aux concentrations de 5, 10 et 15g/l et , d'autre part, l'extrait de levure (2g/l), le nitrate d'ammonium (1g/l) et le nitrate de sodium (5g/l) constituent respectivement les sources carbonées et azotées des milieux M20, 21 et 22. Leur composition minérale se rapproche, pour l'essentiel, de celle du substrat M23 qui est définie dans sa totalité par ailleurs (page 9).

2.- RESULTATS

Les réponses sexuées du *N. galligena*, à ces 23 conditions trophiques sont indiquées dans le tableau 4.

2. Résultats

Les réponses sexuées du *N. galligena*, à ces 23 conditions trophiques sont indiquées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Production périthéciale du *N. galligena* sur divers substrats solides.

NATURE DES MILIEUX	PRODUCTION PERITHECIALE		
	Min.	Max.	Moy.
<u>1. Milieux hôtes à base de pommier</u>			
M1 : fragments de branche	98	164	128
M2 : décoction de rameaux (50g/l)	98	164	125
M3 : filtrat de décoction de rameaux (50g/l)	7	16	11
<u>2. Milieux de culture fongique usuels</u>			
M4 : jus V8	81	92	86
M5 : farine de maïs (17g/l)	33	41	38
M6 : extrait de malt (10g/l)	0	0	0
M7 : extrait de levure (20g/l)	0	0	0
M8 : eau de pomme de terre (50g/l)	65	81	75
M9 : eau de pomme de terre (50g/l) glucosé 1%	16	20	19
M10 : fragments de racines de carotte	56	65	60
M11 : fragments de tubercules de pomme de terre glycérisés	26	28	27
<u>3. Milieux à base de céréales</u>			
M12 : décoction d'avoine (20g/l)	147	164	156
M13 : décoction d'avoine (40g/l)	164	197	179
M14 : décoction d'avoine (60g/l)	197	262	235
M15 : décoction (20g/l) d'avoine et d'orge	197	262	227
M16 : décoction (20g/l) d'avoine et de blé	115	147	131
M17 : décoction (40g/l) d'avoine et de blé	197	327	290
M18 : filtrat de décoction d'avoine (40g/l)	98	111	106
M19 : filtrat de décoction (40g/l) d'avoine et de blé	197	262	234
<u>4. Milieux synthétiques (ou partiellement définis)/ <i>Nectria</i> sp</u>			
M20 : milieu de KRUGER (1974b)	43	52	47
M21 : milieu de HANLIN (1961)	0	0	0
M22 : milieu de CURTIS (1969)	0	0	0
M23 : milieu de DEHORTER et PERRIN (1983a)	95	105	100

Légende : Les cultures, d'une durée de 30 jours, sont réalisées à 18 °C, en présence de lumière blanche (12hL/12hO, 750 μ Wcm⁻²)

a) A l'évidence, tous les milieux à base de farine de céréales (M12 à M19) multiplient le nombre d'ascocarpes fertiles du *N. galligena*. Ainsi, ces apports nutritionnels sont souvent retenus pour la sexualisation de nombreuses espèces de *Nectria* (SAMUELS, 1973 ; TAYEL et HASTIE, 1975) dont le *N. galligena* (LORTIE, 1964).

b) A un degré moindre, les milieux hôte (M1 et M2), jus "V8" (M4), eau de pomme de terre (M8) et synthétique (M23) représentent aussi des bases trophiques favorables à la fructification parfaite, *in vitro*, de l'agent de chancre du pommier.

Ces données prouvent l'intérêt d'emploi du milieu-hôte (LACOSTE, 1965) quand débute l'expérimentation au laboratoire. Dans ce cas, c'est uniquement la présence de la totalité des composants de la branche de pommier, pulvérisée (M2) ou non (M1) qui assure une importante sexualisation alors que les seules substances hydrosolubles (M3), extraites à 65 °C, n'y suffisent que très peu.

Le substrat "jus V8", optimal pour la fructification parfaite du *N. haematococca* (QURESHI et PAGE, 1972) favorise également celles des *N. ditissima* (DEHORTER et PERRIN, 1983a), *N. coccinea* (DEBRAY, 1982) et *N. galligena* dans le cas présent.

La production périthéciale du *N. galligena* constaté sur eau de pomme de terre (M8) regresse fortement après addition de glucose (M9) mais elle n'est pas totalement inhibée contrairement à des observations (LORTIE, 1964 ; LACOSTE et DEHORTER, 1973) réalisées sur des souches homothalliques de ce parasite. A l'inverse, cet apport glucosé (milieu P.D.A.) stimule le nombre d'ascocarpes fertiles du *N. ditissima*.

Le développement sexué des *N. galligena* et *N. ditissima* sur le milieu synthétique M23 offre d'excellentes possibilités d'études comparatives du rôle des divers composants de ce substrat .

c) Les conclusions de CAYLEY (1921) et KRUGER (1974b) sont ici corroborées par une formation, quoique très moyenne, d'ascocarpes du *N. galligena* sur les milieux M11 et M20.

d) Enfin, l'absence de structures sexuées du *N. galligena* sur les milieux aux extraits de malt (M6) ou de levure (M7) et synthétique (M21 et M22) le distingue d'autres espèces ou souches de *Nectria* : *N. gliocladioïdes* (HANLIN, 1961) *N. haematococca* (CURTIS, 1969), *N. coccinea* (PARKER, 1976) et *N. galligena* (WESSEL, 1977).

3.- CONCLUSION

En résumé, à la température de 18 °C et en présence de lumière, 19 parmi les 23 substrats nutritifs éprouvés autorisent la fructification parfaite du *N. galligena*. Celle-ci, à l'opposé des stades végétatif et asexué, est absente dans toutes les séries culturales maintenues à l'obscurité permanente.

Trois milieux, outre leur valeur pour la sexualisation du champignon, nous semble d'un intérêt plus particulier :

- le premier, formé de branches de pommier (M1) pour maintenir, à long terme, les potentialités du parasite ;
- le second, constitué d'un filtrat de décoction (40g/l) d'avoine et de blé pour induire une quantité maximale d'ascocarpes ;
- le troisième, synthétique (M23) en raison même de sa composition chimiquement définie.

Cette expérimentation représente une approche nutritionnelle du déterminisme sexué du *N. galligena* mais aussi d'une façon simple, un terme de comparaison des souches ou espèces du genre *Nectria*.

II. - CHOIX DU MILIEU SYNTHÉTIQUE DE BASE

Le milieu synthétique M23, choisi en fonction des résultats précédents (tableau 4) et d'essais antérieurs (DEHORTER, 1972) sert de base aux expérimentations suivantes. Sa composition, rappelée ci-dessous, qui satisfait à la morphogenèse du *N. galligena*, répond aux exigences fondamentales des organismes fongiques et aux principaux critères, énoncés dans ce sens, par de nombreux auteurs.

Composition du milieu M23. éléments minéraux :

KH_2PO_4	: 800 mg	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{EDTA Na}$: 15 mg/10 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 250 mg	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 5 mg
$\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 100 mg	BO_3H_3	: 3 mg
Ca Cl_2	: 50 mg	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 1 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 15 mg	$\text{MoNa}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1 mg

. vitamines :

Thiamine (bichlorure)	: 0, 2 mg
Pyridoxine (hydrochlorure)	: 0, 2 mg
Biotine (D+)	0,01 mg

. sources azotées :

Acide L-glutamique	: 352 mg	/ 100 mg d'azote /L
L-alanine	: 212 mg	
L-asparagine, H_2O	: 162 mg	

. source carbonée :

Maltose (D+)	: 4 800 mg	/ 2 g de carbone /L
--------------	------------	---------------------

. eau distillée :

1 000 ml ; pH : 5,5

En modifiant, successivement, la composition minérale, vitaminique, carbonée, azotée et le pH de cet ensemble M23, nous essaierons de préciser les effets des variations qualitatives et quantitatives de ces facteurs sur le développement du *N. galligena*.

De fait, plutôt que de rechercher à optimiser le milieu M23 déjà très favorable à la production périthéciale, nous tenterons de définir certaines particularités trophiques de la sexualisation comparativement aux développements mycélien et asexué du *N. galligena*.



III. - INFLUENCE DE LA COMPOSITION MINÉRALE ET VITAMINIQUE

Deux séries expérimentales composent cette étude.

1.- PREMIERE SERIE EXPERIMENTALE

Elle établit les effets des modifications du contenu minéral et vitaminique du milieu M23 sur la croissance mycélienne et la production périthéciale du *N. galligena*, en cultures, liquide et gélosée, réalisées à 18 °C et à la lumière.

a) Mode opératoire

Le substrat M23 de référence (T) subit huit modifications successives qui entraînent l'absence soit :

- du potassium : M23 - KH_2PO_4 / + NaH_2PO_4 , H_2O : 910 mg*
- des phosphates : M23 - (KH_2PO_4 + NaH_2PO_4 , H_2O) / + K_2SO_4 = 607 mg*
- du calcium : M23 - CaCl_2
- du fer : M23 - FeSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$
- du zinc : M23 - ZnSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$
- des microéléments : bore, cuivre, manganèse et molybdène
: M23 - (BO_3H_3 + CuSO_4 , $5\text{H}_2\text{O}$ + MnSO_4 , H_2O + MoNa_2O_4 , $2\text{H}_2\text{O}$)
- des vitamines : M23 - (bichlorure de thiamine + hydrochlorure de pyridoxine
biotine)

* Dans les 2 premiers cas, les pertes en potassium et en phosphate dues à l'absence de phosphate monopotassique (KH_2PO_4) sont exactement compensées par, respectivement l'addition de sulfate de potassium (K_2SO_4 : 610 mg) et par l'augmentation de la teneur en phosphate de sodium (NaH_2PO_4 , H_2O : 910 mg).

Les conséquences de ces huit omissions sont observées :

- au niveau de la valeur pondérale du mycélium qui est mesurée après 11 et 30 jours d'incubation sur milieu liquide
- au plan de la production de périthèces fertiles qui est obtenue sur les cultures gélosées et liquides, au 30^e jour.

REMARQUE :

Hormis les habituelles précautions d'usage, ces expériences n'ont pas donné lieu à un traitement particulier de la verrerie ou des produits chimiques employés, aussi l'absence d'un élément du milieu, par le fait de sa non-incorporation, après pesée dans le substrat, n'exclut-elle pas sa présence éventuelle sous forme d'impuretés

b) Résultats

Les résultats de cette première série expérimentale sont reportés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Influence de la composition minérale et vitaminique du milieu nutritif sur le développement du *N. galligena*.

MILIEUX ¹	CULTURE LIQUIDE				CULTURE GÉLOSÉE		
	Mycélium (mg/fiole) ²		pH ³	R. sexuée ⁴	Production Périthéciale ⁵		
	11è jour	30è jour	30è jour	Indice	Min.	Max.	Moy.
M23	265	178	6,4	+++	95	105	100
M23 potassium ⁻	43	66	8,1	0	0	0	0
M23 phosphates ⁻	49	74	6,8	0	0	0	0
M23 magnésium ⁻	27	35	5,7	0	0	0	0
M23 calcium ⁻	261	169	6,4	+	82	89	85
M23 fer ⁻	263	182	6,4	+	66	82	74
M23 zinc ⁻	159	175	6,8	0	28	44	38
M23 microéléments ⁻	221	177	6,5	0	61	93	71
M23 vitamines ⁻	261	169	6,4	++(+)	82	89	85



Légende : Tous les résultats sont obtenus de cultures effectuées à 18 °C, sous un éclairage de lumière blanche (12hL/12hO, 750 μWcm^{-2}).

1. le signe (-) indique que le(s) composé(s) considéré(s) ne figure(nt) pas dans le milieu synthétique M23.
2. poids de mycélium lyophilisé (mg/boîte de Roux) obtenu après 11 et 30 jours de culture
3. pH du milieu cultural mesuré après 30 jours d'incubation
4. le nombre d'ascocarpes/boîte de Roux, qui est relativement proportionnel au nombre de croix (+), est important (+++) moyen (++) ou faible (+).
5. production de périthèces fertiles par tube de milieu gélosé obtenue après 30 jours.

α) *Au niveau de la croissance mycélienne, nous pouvons*

remarquer :

- la quasi-nullité de tout développement sur les milieux dépourvus, soit de potassium, de phosphore et de magnésium, ainsi se confirme le rôle indispensable de ces éléments .
- la similitude des valeurs pondérales mycéliennes obtenues sur le milieu M23 complet ou incomplet par manque de fer, de calcium ou de vitamines.
- les modifications dues aux absences des microéléments et du sulfate de zinc :
 - . soit, dans le premier cas, une croissance au profil normal, optimale au 11^e jour, mais pondéralement plus faible,
 - . soit, par manque de zinc, une forte diminution de la masse fongique, mesurée le 11^e jour, qui traduit le retard du développement fongique.

Ces résultats ne mettent pas en cause le pH du milieu compris, finalement dans tous les essais, entre 6,4 et 6,8.

β) *Au plan de la production périthéciale, certains résultats diffèrent fondamentalement selon la nature solide ou liquide du milieu :*

- en culture gélosée, si toutes les carences éprouvées, qui autorisent une croissance végétative suffisante, diminuent le nombre d'ascocarpes fertiles ; aucune d'elles n'empêche cependant la différenciation sexuée. Nous pouvons déduire de ces résultats que l'incorporation dans le milieu nutritif, soit des vitamines ou du calcium, soit du fer ou des microéléments, soit, enfin, du zinc, stimule soit faiblement, moyennement ou fortement la production périthéciale.
 - en milieu aqueux, le manque de microéléments ou de zinc entraîne une inhibition de la production périthéciale. Ces résultats démontrent une spécificité des besoins nutritifs de la fructification parfaite comparés à ceux qui permettent les développements végétatif et asexué. En outre, ils indiquent l'influence de la formulation solide ou liquide du substrat sur les réponses sexuées du champignon. Ainsi la gélification du milieu masque l'effet d'induction sexuée observée en phase liquide et ne permet de conclure qu'à une stimulation de la production périthéciale provoquée par l'apport des microéléments ou du zinc.
- De même, la culture liquide accentue très fortement, par rapport au milieu gélosé, la diminution du nombre d'ascocarpes fertiles liée aux carences en fer ou en calcium.

2.- DEUXIEME SERIE EXPERIMENTALE

Du fait, constaté précédemment, de l'inexistence d'ascocarpes sur les milieux liquides où manquent, soit le groupe des microéléments, soit le zinc, nous avons, respectivement, recherché :

- si l'inhibition sexuée peut être provoquée par l'absence d'un seul des quatre microéléments : bore, manganèse, molybdène et cuivre (1ère expérience)
- la concentration en sulfate de zinc optimale pour la production périthéciale (2ème expérience).

Dans les deux cas, les cultures sont effectuées à 18 °C, à la lumière (12hL/12hO, 750 μ Wcm⁻²) et, uniquement, en milieu liquide.

a) Première expérience : influence des microéléments

Le champignon se développe sur quatre substrats qui, par rapport au milieu M23 complet, sont déficients soit en bore (BO₃H₃), soit en manganèse (MnSO₄, H₂O), en molybdène (MoNa₂O₄, 2H₂O), soit en cuivre (CuSO₄, H₂O).

Après 30 jours d'incubation, les productions mycéliennes et périthéciales sont comparables, dans les quatre essais, à celles du milieu de référence :

Ainsi, aucune des quatre carences n'empêche séparément la différenciation sexuée dont l'inhibition relève de l'absence simultanée du bore, du manganèse, du molybdène et du cuivre.

b) Deuxième expérience : influence du zinc

Cette expérimentation rapporte la production périthéciale du *N. galligena* en fonction de l'incorporation, au substrat M23, de différentes quantités de sulfate de zinc (ZnSO₄, 7H₂O) soit : 0, 1, 5, 10, 15, 30 et 60 mg/l.

Après un mois de culture, l'inhibition de la reproduction sexuée, qui est confirmée en l'absence de zinc est levée dans tous les cas d'addition de ce cation. Des apports de sulfate de zinc de 1 mg/l (minimum) et de 15 mg/l (optimum) entraînent la formation d'un nombre d'ascocarpes (/boîte de Roux) évaluée, respectivement, selon les indices + et +++.

3.- DISCUSSION

Chez le *N. galligena*, le fer, le calcium et les vitamines présents dans le milieu M23, qui n'interviennent aucunement sur la croissance pondérale du mycélium, représentent donc des stimulants propres à la reproduction sexuée. Des effets semblables leur sont attribués : pour le fer chez des *Leptosphaeria* sp. (LACOSTE, 1965) ; pour le calcium chez des *Chaetomium* sp. (BASU, 1951) ; pour les vitamines chez des *Ceratocystis* sp. (KAARIK, 1960).

L'autotrophie du *N. galligena* vis-à-vis des vitamines contraste avec les fréquentes hétérotrophies fongiques constatées pour ces facteurs de croissance (FRIES, 1965). Ces exigences en vitamines, B1 et H notamment, peuvent affecter des stades divers de la morphogénèse fongique. Ainsi, par exemple, elles concernent

- totalement, la croissance mycélienne et donc la reproduction du *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1975) hétérotrophe à la thiamine.
- uniquement, la différenciation périthéciale des *Leptosphaeria typhae* (VIDAL et 1975) et *Sporormiella minima* (ASINA et al, 1977) exigeants en biotine.
- spécifiquement, l'ascosporogénèse du *Sordaria macrospora* (HOCK et al, 1976) dépendant de la biotine.

Deux conditions trophiques spécifiques de l'induction sexuée du *N. galligena* sont réalisées par l'association de quatre microéléments (bore, molybdène, manganèse et cuivre) et par le zinc.

Pour les premiers, leur importance est souvent signalée pour les développements végétatif (COCHRANE, 1958) ou sexué (TURIAN, 1978) des champignons. Ils figurent, donc, dans de nombreux milieux artificiels.

Diverses recherches témoignent de l'effet du zinc sur la croissance mycélienne qui est fortement dépendante de ce cation chez : *Monoascus purpureus* (Mc HAW et JOHNSON, 1970), *Verticillium albo-atrum* (THRONEBERRY, 1973) ou *Helminthosporium cynodontis* (PUGLIESE et WHITE, 1973). Le zinc influence aussi directement la différenciation sexuée :

- soit en multipliant le nombre des périthèces des *Penicillium sp.* (BHATTACHARYYA et BASU, 1962), *Venturia inaequalis* (ROSS et HAMLIN, 1965), *Glomerella cingulata* (SINGH et SHANKAR, 1972) ou *Pyricularia sp.* (YAEGASHI et HEBERT, 1976).
- soit en favorisant, plus spécifiquement, l'ascosporogénèse : *Neurospora* (TURIAN, 1966), *Podosordaria leporina* (KOEHN, 1971), *Saccharomyces cerevisiae* (BILINSKI et MILLER, 1980).

Pour ces chercheurs, le zinc, incorporé au milieu de culture, peut provoquer des effets physiologiques multiples :

- d'ordre métabolique, ce cation favoriserait l'utilisation des sucres ou interviendrait dans la composition et l'activité de certaines enzymes (malate synthase, isocitrate lyase, glutamate déshydrogénase),
- au niveau de la division cellulaire, le zinc pourrait influencer sur la synthèse des acides nucléiques (ARN notamment) et sur la stabilité du fuseau chromosomique.

Chez le *N. galligena*, l'activité du zinc paraît remarquable dans la mesure où son absence du milieu M23 annule la différenciation sexuée malgré un développement végétatif conséquent. Elle constitue un exemple de spécificité nutritionnelle de la fructification parfaite par rapport à la croissance mycélienne et à la conidiogénèse de ce champignon.

IV. - INFLUENCE DE LA NATURE DES SOURCES DE CARBONE

L'hétérotrophie au carbone des champignons soumet leur développement à la présence, dans leur environnement, d'une source carbonée organique. La nature, très diverse, de celle-ci qui, *in vitro*, est incorporée aux substrats reflète alors la variabilité des potentialités enzymatiques de ces organismes fongiques et rend aléatoire, toute généralisation.

La présente expérimentation recherche l'influence de la qualité de la nutrition carbonée sur la croissance mycélienne et la reproduction sexuée du *N. galligena*

1.- CONDITIONS EXPERIMENTALES

Le maltose du milieu M23 est remplacé, successivement, par 20 sources carbonées qui sont éprouvées, chacune, à la concentration de 2g de C/L. Sur les 21 substrats ainsi confectionnés, la croissance mycélienne du *N. galligena* est mesurée après 11 et 30 jours d'incubation en milieu liquide ; la reproduction sexuée est observée, au niveau des cultures gélosées et liquides, après 1 mois de développement.

2.- RESULTATS

Les résultats de ces essais, effectués à 18 °C sous éclairément (12hL/12hO, 750 μWcm^{-2}), sont reportés dans le tableau 6.

Dans l'ensemble, une grande majorité de substrats carbonés permet le développement végétatif mais également sexué du *N. galligena*.

a) Croissance mycélienne

Les mesures pondérales caractérisent trois formes de développement :

- *nulle ou faible*, en présence d'acétate de sodium et d'arabinose qui agissent d'une manière similaire, pour le premier chez : *Cercospora beticola* (Mc LEAN et al, 1976 a et b), *Sporormiella* sp. (ASINA et al, 1977) ; *Leptosphaeria typhae* (VIDAL, 1983) et pour le second chez *Podosordaria leporina* (KOEHN, 1971). Au contraire, l'acétate de sodium favorise la croissance d'*Ascobolus immersus* (YU-SUN, 1964) et le pentose celle du *Nectria haematococca* (QURESHI et PAGE, 1972).
- *moyenne*, au contact du rhamnose, fructose, lactose, tylose et des sels d'acides organiques autres que l'acétate où la métabolisation de ces derniers détermine une forte basicité du milieu.
- *optimale*, sur les milieux qui comprennent : des pentoses (xylose ou ribose), des hexoses (glucose ou galactose), des diholosides (maltose, saccharose ou cellobiose), des polyosides (raffinose, dextrines ou amidon), le mannitol. Ainsi, aucune classe particulière de glucides ne s'impose pour constituer le substrat idéal à la croissance du *N. galligena*.

Tableau 6 : Influence de la nature des sources de carbone sur le développement du *N. galligena*.

Sources de carbone ¹	CULTURE LIQUIDE				CULTURE GELOSEE		
	Mycélium (mg/fiole) ²		pH ³	R. sexuée ⁴	Production Périthéciale		
	11è jour	30è jour	30è jour	Indice	Min.	Max.	Moy.
D (+) Xylose	256	155	6,4	+++	85	87	86
D (-) Arabinose	46	59	7,3	0	7	12	9
D (-) Ribose	259	163	6,5	++	67	72	68
D (-) Rhamnose	119	189	6,4	++	65	90	76
D (+) Glucose	224	129	6,6	++	58	80	66
D (+) Galactose	225	144	6,4	+++	79	81	80
D (-) Fructose	182	175	6,3	++	50	75	60
D (+) Lactose	144	137	6,3	++	59	75	62
D (+) Maltose	265	178	6,4	+++	95	105	100
D (+) Saccharose	233	151	6,6	++	63	87	67
D (+) Cellobiose	223	155	6,5	++	75	90	87
Raffinose-H ₂ O	259	159	6,5	++	75	94	89
Dextrines	240	166	6,5	+++	80	98	95
Amidon soluble	249	180	6,5	+++	85	89	88
Tylose	140	48	7,7	0	3	10	5
D (-) Mannitol	238	268	6,7	++	65	86	72
Citrate	143	64	8,8	0	0	0	0
Malate	140	99	9,5	0	0	0	0
Succinate	127	72	9,2	0	0	0	0
Pyruvate	155	92	9,2	0	0	0	0
Acétate	0	0	5,5	0	0	0	0

Légende : tous les essais ont été réalisés à 18 °C sous un éclairage en lumière blanche (12hL/12hO, 750 μWcm^{-2})

1. Les sources de carbone, incorporées dans le milieu M23, fournissent 2g de C/l. Les acides organiques sont présents sous forme de leurs sels de sodium.

2-3-4-5- Voir légende du tableau 5.

b) Reproduction sexuée

Deux types de réponses, opposés sans terme moyen, caractérisent l'influence de la nutrition carbonée sur la production périthéciale qui peut donc être, selon les cas, nulle ou importante.

α) inhibition sexuée

L'absence de toute différenciation sexuée résulte de la substitution du maltose par l'arabinose, le tylose (méthylcellulose) et les sels d'acides organiques. Nous avons pu confirmer, ici, l'effet anti-périthécial de l'acétate (*Neurospora crassa*, TURIAN, 1970 ; *Leptosphaeria typhae* - VIDAL, 1983) où ce composé, additionné (5g/l) au milieu M23 complet, autorise alors la croissance mycélienne du *N. galligena* mais non sa sexualisation. Un semblable résultat est obtenu pour le *N. ditissima* (DEHORTER et PERRIN, 1983a) qui ne fructifie pas sur les substrats décrits. Par contre, ces derniers à base d'arabinose, de méthyl-cellulose ou d'acides organiques stimulent la formation des périthèces, respectivement, du *N. haematococca* (QURESHI et PAGE, 1972), des *Leptosphaeria* sp. (LACOSTE, 1965) et du *Ceratocystis fimbriata* (THUILLIER et NEUMANN, 1982).

β) Stimulation périthéciale

Indépendamment de la formulation liquide ou solide du milieu, les plus grands nombres d'ascocarpes fertiles différenciés par les cultures sur xylose et galactose corroborent les travaux qui reconnaissent aux pentoses et hexoses une efficacité supérieure aux autres glucides. Témoignent, de cette observation, les réponses sexuées des Pyrénomycètes suivants : *Neurospora crassa* (WESTERGAARD et MITCHELL, 1947), *Nectria gliocladioïdes* et *N. ipomaeae* (HANLIN, 1961), *Rosellinia limoniispora* (HAYMAN, 1963), *Podosordaria leporina* (KOEHN, 1971), *L. typhae* (VIDAL et al, 1975)...

Mais parallèlement, le niveau élevé de fructification du *N. galligena* mis en présence de maltose, des dextrines ou d'amidon, appuie les conclusions de COCHRANE (1958) qui font prévaloir le rôle sexué des di-et-poly-holosides. Confirme, ce fait, la formation optimale d'ascocarpes de divers Ascomycètes (HAWKER, 1939 ; HAWKER et CHAUDHURI, 1946), du *Ceratocystis variospora* (CAMPBELL, 1958) ou d'espèces d'*Anthracobia* (ECHTLER et SCHRANTZ, 1975).

En définitive, hormis le cas particulier de acides organiques, aucun groupe de composés carbonés n'exclut, globalement, la différenciation sexuée du *N. galligena* comme l'ensemble des pentoses qui inhibe la sexualisation des *Venturia inaequalis* (ROSS et HAMLIN, 1965) ou *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1975). Dans ce sens, apparait la multiplicité des potentialités enzymatiques du *N. galligena*.

3.- CONCLUSIONS

En se référant à l'ensemble de nos mesures, nous pouvons observer que la filière amidon soluble -dextrines- maltose favorise davantage tous les aspects de la morphogenèse du *N. galligena*. Dans ce cas, le maltose représente la meilleure solution au problème de la nutrition carbonée de ce champignon. Ce même choix du maltose s'impose à de nombreux auteurs qui étudient la sexualisation des Pyrénomycètes : *Sordaria fimicola* (HALL, 1971), *Arachniotus albicans* (LACOSTE et DUJARDIN, 1972), *N. haematococca* (QUERSHI et PAGE, 1972), *Calonectria camelliae* (SHIPTON, 1977), *N. ditissima* (DEHORTER et PERRIN, 1983a).....

A l'exception du lactose, toutes les sources carbonées qui stimulent la croissance mycélienne du *N. galligena* agissent de même sur sa différenciation sexuée. Au contraire, les composés qui réduisent le développement mycélien du champignon inhibent sa sexualisation sans compromettre, toutefois, sa conidiogénèse.

V. - INFLUENCE DE LA NATURE DE LA SOURCE D'AZOTE

L'auxotrophie des champignons pour l'azote impose la présence de cet élément dans les substrats nutritifs où il paraît exercer, sur la morphogenèse fongique, un rôle plus spécifique que la source carbonée (DAS GUPTA et NANDI, 1957).

L'influence de la qualité de la nutrition azotée sur le développement du *N. galligena* est appréciée au niveau de la croissance mycélienne et de la production périthéciale du champignon, en cultures liquide et gélosée, dans des conditions d'incubation définies précédemment.

1.- CONDITIONS NUTRITIVES

Trente sources d'azote minéral ou organique distinctes (tableau 7) sont introduites dans le milieu M23 et y remplacent, successivement, l'ensemble formé d'acide glutamique, d'alanine, et d'asparagine.

Dans tous les cas, la teneur en azote du milieu est égale à 100 mg/l où nous avons admis que l'hydrolysat de caseine (casamino acid Difco) renferme 16 % d'azote.

2. RESULTATS

Les résultats de ces essais, effectués à 18 °C et en présence de lumière (12hL/12h0, 750 μWcm^{-2}) sont reportés dans le tableau 7 qui illustre l'influence de la qualité de la nutrition azotée sur les productions mycélienne et périthéciale.

a) Croissance mycélienne

Hormis la cytosine, toutes les sources azotées éprouvées supportent la croissance mycélienne, qui, selon ses valeurs pondérales mesurées après 11 et 30 jours d'incubation, apparaît :

Tableau 7 : Influence de la nature des sources d'azote sur le développement du *N. galligena*.

Sources d'azote ¹ (100mg N ₂ /L)	CULTURE LIQUIDE				CULTURE GELOSEE		
	2		3	4	5		
	Mycélium (mg/fiole)		pH	R. sexuée	Production périthéciale ⁵		
	11è jour	30è jour	30è jour	Indice	Min.	Max.	Moy.
Sulfate d'ammonium	63	85	3,4	0	0	0	0
Chlorure d'ammonium	60	92	3	0	0	0	0
Glutamine	124	128	3,5	0	0	0	0
L-lysine	116	151	4	0	0	0	0
L-arginine	194	138	3,6	0	0	0	0
L-cystéine	86	204	3,2	0	0	0	0
L-cystine	99	101	3,3	0	0	0	0
L-méthionine	52	144	3,6	0	0	0	0
Cytosine	17	11	5,5	0	0	0	0
Nitrate d'ammonium	65	113	3,2	0	89	96	92
DL-valine	166	101	4,5	0	90	98	94
L-leucine	168	206	4,3	0	112	115	113
L-isoleucine	185	192	4,2	0	93	100	95
L-histidine	109	147	4,5	0	19	20	19
L-proline	233	197	4	0	87	100	91
L-phénylalanine	189	183	4,4	0	84	92	86
L-tyrosine	246	178	4,2	0	61	69	67
Adénine	15	181	5,6	0	51	56	53
Nitrate de potassium	236	151	7,6	++	88	89	88
Glycocolle	227	158	4,7	++	69	74	71
L-alanine	259	175	5,8	++	79	81	80
L-sérine	258	170	4,5	++	55	58	57
L-thréonine	248	163	5,4	++	76	79	77
L-acide aspartique	254	202	7,5	+++	73	81	76
L-acide glutamique	305	213	7,4	+++	84	90	88
Ac. β -amino-butyrique	265	193	6,6	+++	96	103	97
L-asparagine H ₂ O	274	170	4,8	+++	88	93	92
L-tryptophane	136	227	4,9	+	42	49	45
Urée	203	154	4,6	++	95	106	97
Hydrolysate de caséine	211	269	5	++	65	69	67
T = GLU + ALA + ASN	265	178	6,4	+++	95	105	100



Légende : tous les essais ont été réalisés à 18 °C sous un éclairage en lumière blanche (12hL/12h0, 750 μWcm^{-2}).

1. Les sources d'azote, incorporées dans le milieu M23, fournissent 100 mg d'azote/l.

2-3-4-5- Voir légende du tableau 5.

- réduite : sels d'ammonium, cystine
- moyenne : glutamine, lysine, histidine, cystine, méthionine et, en outre, lente : cysteine, tryptophane, adénine
- élevée : alanine, sérine, acide glutamique, asparine, etc...

Globalement, les sels d'ammonium et les acides aminés soufrés sont donc faiblement ou lentement métabolisés par le *N. galligena* où, dans ces cas, la régulation mycélienne et une acidification très prononcée du milieu vont de pair.

b) Production périthéciale

Selon la nature et la formulation gélosée ou liquide du substrat azoté, se distinguent trois formes de réponse. sexuée :

a) Inhibition sexuée

Indépendamment de la nature solide -ou non- du substrat, la glutamine, la lysine, l'arginine, la cystéine, la cystine, la méthionine, les chlorure et sulfate d'ammonium empêchent la fructification parfaite. La nette acidité du milieu provoquée par l'assimilation de ces composés, peut être responsable de cette inhibition périthéciale qui, dans le cas des sels d'ammonium, s'observe aussi pour *Ceratocystis variolorpora* (CABELL, 1958 ; *Hypomyces solani f. cucurbitae* (HIX et BAKER, 1964) et *Venturia inaequalis* (ROSS et HAMLIN, 1965) où, chez ce dernier, la neutralisation du milieu lève l'effet inhibiteur (ROSS et BREMMER, 1965).

Dans le cas du *N. galligena*, les résultats obtenus de l'addition du nitrate d'ammonium, qui se distinguent essentiellement de ceux décrits précédemment (glutamine,...), par une forte production périthéciale sur milieu gélosé, suggèrent que les cas d'inhibition sexuée totale, décrits ci-dessus, ne sont pas le fait d'une croissance mycélienne et d'un pH faibles mais relèvent directement de la nature même de la source azotée.

B) Induction périthéciale

Une production d'ascocarpes fertiles, souvent importante dont les proportions ne sont nullement altérées par la formulation, liquide ou non, du substrat caractérise les sources azotées suivantes :

- acides glutamique, aspartique ou γ -amino-butérique et asparagine (1er groupe),
- glyco-colle, alanine, sérine, thréonine, urée, hydrolysats de caséine et nitrate de potassium (2ème groupe),
- tryptophane.

Ces divers composés favorisent la formation des périthèces du *N. galligena* qui peut être :

- très élevée (1er groupe),
- élevée (2ème groupe),
- moyenne (tryptophane).

Ils assurent également de bons rendements en matière mycélienne et un maintien du pH final du milieu entre 4,5 et 7,5.

δ) Sexualisation induite (/substrat gélosé) ou inhibée (/milieu liquide)

Cette troisième forme de réponse sexuée du *N. galligena* met en cause la formulation liquide ou solide du substrat plus que sa nature azotée. Ainsi, le grand nombre d'ascocarpes fertiles comptés sur les milieux gélosés additionnés de valine, leucine, isoleucine, histidine, proline, phénylalanine, tyrosine, adénine ou nitrate d'ammonium contraste, totalement, avec la stérilité sexuée du champignon incubé sur ces mêmes milieux, exception faite de leur état liquide.

De telles discordances liées à la liquéfaction ou à la gélification du support trophique sont signalés au niveau des réactions sexuées du *Nectria haematococca* (QURESHI et PAGE, 1972) ou du *Chaetomium aureum* (GHORA et CHAUDHURI, 1975).

Chez le *N. galligena*, cette inhibition périthéciale, uniquement en phase aqueuse, ne correspond pas, sauf pour l'adénine et le nitrate d'ammonium, à une déficience de la croissance mycélienne qui atteint, dès le 11^e jour, un niveau satisfaisant. Ainsi, seule l'acidification des milieux ($\text{pH} < 4,5$) semble alors justifier, par ses effets non atténués en culture liquide, la stérilité sexuée du *N. galligena*.

c) Remarque : influence du pH initial du milieu nutritif

Précédemment, nous avons supposé que l'acidification accrue de certains milieux azotés, constatée après 30 jours de culture, serait :

- soit, sans incidence, sur l'inhibition sexuée notée, simultanément, sur les formes gélosée et aqueuse d'un substrat (1^{ère} forme de réponse sexuée),
- soit, au contraire, la cause directe de l'absence périthéciale lorsque celle-ci est observée, uniquement en culture liquide (3^{ème} forme de réponse sexuée).

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons réalisé l'expérience suivante où le pH initial du milieu nutritif est modifié.

a) Conditions expérimentales

Cette étude, effectuée uniquement en phase liquide, à la température de 18 °C et en présence de lumière (12hL/12hO, 750 μWcm^{-2}), comporte 3 séries expérimentales où, en avant l'ensemencement, le pH des milieux est ajusté respectivement à 5,5 ; 6,5 et 7,5.

Chaque série comprend 11 substrats qui diffèrent du milieu M23 par la nature de la source azotée incorporée (100 mg d'azote/L) soit :

- la glutamine, la lysine, la cystéine ou la chlorure d'ammonium (1^{er} groupe),
- la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la tyrosine, la phénylalanine ou le nitrate d'ammonium (2^{ème} groupe).

β) Résultats

. Au niveau de la première série culturale, au pH initial 5,5, se confirme, dans tous les cas, l'absence de différenciations sexuée.

. Au niveau des séries 2 et 3, les ajustements initiaux du pH à 6,5 et 7,5 amènent ce facteur, pour les 11 milieux éprouvés, à des valeurs finales (30^e jour) proches respectivement de 6 (5,9 < pH < 6,2) et de 7 (6,9 < pH < 7,4). Cette neutralisation du milieu ne lève pas l'inhibition périthéciale provoquée par les sources azotées du premier groupe. Par contre, elle autorise, surtout à pH initial 7,5, la reproduction sexuée (++ < indice périthécial < +++) sur tous les substrats à base de composés azotés du second groupe.

δ) Conclusion

Cette expérimentation corrobore nos hypothèses quant à la réelle influence du pH et de la nature de certaines sources azotées sur la production périthéciale du *N. galligena*.

3.- DISCUSSION

Les réactions du *N. galligena* à la qualité de la nutrition azotée opposent les sources d'azote qui, de par leur nature, sont respectivement inhibitrices ou favorables à la production périthéciale.

a) Sources d'azote inhibitrices

L'inhibition périthéciale provoquée par les ions ammonium, les acides aminés soufrés et basiques ou la glutamine constitue un fait de spécificité trophique du phénomène sexué par rapport au développement végétatif du *N. galligena*. Le rôle défavorable exercé par ces composés ne peut cependant être généralisé car certains d'entre eux entraînent la sexualisation de divers Ascomycètes ainsi :

- les ions ammonium : *Podosordaria leporina* (KOEHN, 1971), *Calonectria camelliae* (SHIPTON, 1977), ou *Sporormiella* sp. (ASINA et al, 1977).
- la cystéine : *Arthroderma benhamiae* (DAVIDSON et UNESTAM, 1974), *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1977)
- la glutamine : *Nectria haematococca* (QURESHI et PAGE, 1972)

b) Sources d'azote inductrices

Finalement, des substrats azotés de nature différente supportent la fructification parfaite du *N. galligena*.

L'azote minéral, uniquement sous forme de nitrates, multiplie le nombre de périthèces du *N. galligena* comme ceux des *Nectria* sp (HANLIN, 1961), *Neurospora crassa* (WESTERGAAD et MITCHELL, 1947), *Ascobolus immersus* (YUSON, 1964), *Leptosphaeria* sp. (LACOSTE, 1965), *Sordaria fimicola* (HALL, 1971).

Ces résultats distinguent les plus grandes potentialités enzymatiques de ces champignons vis à vis d'autres espèces qui ne métabolisent aucune forme d'azote minéral telles : *Glomerella cingulata* (SINGH et SHANKAR, 1972), *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1977), *Leptosphaeria* (= *Massarina*) *senegalensis* (ANDRIEU et al, 1980).

Au niveau des sources d'azote organique, la diversité des acides aminés "inducteurs sexués", ne permet pas de discerner, en fonction de leur structure ou origine biosynthétique, une orientation spécifique du métabolisme sexué du *N. galligena*. Dans ce sens, le mode de biosynthèse de: l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la thréonine et l'acide aspartique qui les relie d'une façon commune au "pool" de l'acide pyruvique peut expliquer les réactions sexuées uniformes et de grande qualité du *N. galligena* à la présence de ces acides aminés.

De tels résultats d'ensemble sont remarqués chez *Arthroderma benhamiae* (DAVIDSON et UNESTAM, 1974) ou, d'une manière plus singulière, pour la valine (*Venturia inaequalis* - ROSS et HAMLIN, 1965), la leucine (*Penicillium vermiculatum* - BHATTACHARYYA et BASU, 1962), l'alanine (*Sporormiella* sp. - ASINA et al, 1977, *Gnomonia leptostyla* - FAYRET, 1977).

Comme pour le *N. galligena*, de nombreux exemples témoignent de l'intervention positive de l'asparagine dans le métabolisme sexué des Ascomycètes: *Ceratocystis aureum* (GHORA et CHAUDURI, 1975),... Par ailleurs, BERNILLON (1982) rapporte, dans son étude sur l'évolution des acides aminés libres mycéliens du *N. galligena*, cultivé sur milieu M23, à 18 °C, que l'asparagine représente 30 à 40 % du total de cette fraction "azote-soluble" et que la teneur mycélienne de ce composé se situe entre 8 et 12 % du poids de matière sèche.

La fertilité sexué du *N. galligena*, constatée au contact de la sérine et des acides aspartique et glutamique, conforte nos résultats antérieurs obtenus sur décoction d'avoine où ce milieu est particulièrement riche de ces trois acides aminés (VIALA, 1972). Si les deux composés acides sont reconnus prépondérants dans le métabolisme azoté général, la sérine peut favoriser la fructification parfaite de champignons dermatophytes (LACOSTE et DUJARDIN, 1972 - DAVIDSON et UNESTAM, 1974) ou de *Leptosphaeria* : *L. typhae* (VIDAL et al, 1975), *L. senegalensis* (ANDRIEU et al, 1980).

Quoique très nette chez le *N. galligena*, l'action stimulatrice des acides aminés semble cependant moins spécifique que celle éprouvée chez le *Nectria haematococca* (HIX et BAKER, 1964 - CURTIS, 1969 - QURESHI et PAGE, 1972). Chez cet organisme, la formation périthéciale causée par la phénylalanine, la tyrosine ou leurs précurseurs (acide shikimique...) rend précisément compte de la voie métabolique impliquée dans la sexualisation (HARMAN, 1967)

Les développements sexués du *N. galligena*, en présence d'urée, ou ceux d'*Ascobolus immersus* (YU-SUN, 1964), de *Chaetomium aureum* (GHORA et CHAUDHURI, 1975) et de *Sporormiella* sp. (ASINA et al, 1977) évoquent les capacités uréolytiques de ces champignons.

Enfin, la production périthéciale du *N. galligena* sur les milieux M23 de référence ou contenant de l'hydrolysate de caséine démontre l'efficacité d'une composition azotée complexe comme elle existe dans de nombreux milieux naturels. De fait, l'association de différentes sources azotées stimule, par effet de synergie, la morphogénèse sexuée de nombreux organismes fongiques : *Gnomonia fructicola* (Mc CONIE et SNYDER, 1966), *Arthroderma* sp. (DAVIDSON et UNESTAM, 1974 ; DUJARDIN et al, 1975), *Leptosphaeria typhae* (VIDAL et al, 1975), *Sordaria macrospora* (HOCK, 1976)....

De telles associations ont été éprouvées chez le *N. galligena* où étaient combinés par 2,3,4 et 6 les composés suivants : alanine, asparagine, acide glutamique, acide γ -amino-butérique, sérine et nitrate de potassium. Les résultats, obtenus des 23 mélanges azotés essayés, révèlent que seules les associations comprenant 3 ou 4 éléments, notamment celle du milieu de base M23, exercent un effet légèrement plus favorable que celui dû à chacune des sources d'azote incorporée séparément.

4.- CONCLUSIONS

Cette étude, qui a permis d'apprécier, selon leur qualité, l'efficacité de sources azotées sur la différenciation sexuée du *N. galligena*, révèle :

- des cas de spécificité trophique de la formation périthéciale vis à vis du développement végétatif,
- les interférences possibles du pH sur l'activité de certaines sources azotées, notamment, lorsque le champignon est cultivé en milieu liquide,
- l'importante production périthéciale amenée par des sources azotées de classes différentes, ce résultat ne suggérant aucune voie métabolique particulière au phénomène sexué sinon la multiplication des potentialités biosynthétiques du champignon,
- pour toutes les séries culturales réalisées à l'obscurité permanente, l'absence d'ascocarpes fertiles quelque soit le substrat azoté éprouvé,
- la diversité des réponses sexuées fongiques à la qualité de la nutrition azotée comme le prouve la longue énumération des réactions observées chez les Ascomycètes.

Finalement, cette expérimentation confirme l'efficacité de l'association acide glutamique, alanine et asparagine du milieu de référence M23 qui justifie de son utilisation pour le *N. galligena*, au niveau de la croissance mycélienne, du pH du milieu maintenu à une valeur optimale et de la morphogénèse sexuée.

VI. - INFLUENCE DES CONCENTRATIONS EN CARBONE ET EN AZOTE DU MILIEU. ROLE DE L'ÉQUILIBRE C:N.

A l'exemple des Phycomycètes (CHILD et al, 1969) ou des Basidiomycètes (HORRIERE, 1976), le développement des Ascomycètes dépend des quantités carbonées et azotées présentes dans le substrat. Ces exigences, variables selon la nature des éléments carbonés et azotés (HAWKER, 1966), l'environnement thermique et lumineux ou les stades morphogénétiques (FAYRET, 1975), démontrent, l'activité due à des teneurs carbonées ou azotées particulières mais, aussi, le rôle du rapport carbone-azote (C:N).

Chez le *N. galligena*, l'influence des concentrations en carbone et en azote du milieu M23 et de leur rapport (C:N) sur les développements végétatif et sexué est déterminée dans des conditions culturales invariables au plan de la température, de l'éclairage et de la composition qualitative du milieu.

1. CONDITIONS EXPERIMENTALES

L'incorporation, au milieu M23 liquide ou gélosé, de quantités variables de maltose et du mélange, à parts égales, d'acide glutamique, d'alanine et d'asparagine permet d'obtenir des concentrations en :

- carbone, égales à 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 4 ; 5 et 10g/l,
- azote, équivalentes à 0, 25 ; 50 ; 75 ; 100 ; 125 ; 150 ; 200 ; 250 ; 300, 400 et 500 mg/l.

En fonction des variations concomitantes de ces teneurs carbonées ou azotées et de leur rapport ($2,8 < C:N < 100$), sont étudiées la croissance mycélienne et la production périthéciale du *N. galligena* cultivé, à 18 °C, sous un éclairage de lumière blanche (12hL/12hO, 750 μWcm^{-2}).

Le tableau 8 et les figures 11, 12 et 13 rapportent les résultats de ces essais.

Tableau 8 : Influence des variations des concentrations en carbone et en azote du milieu nutritif sur le développement du *N. galligena*.

MILIEU NUTRITIF		CULTURE LIQUIDE		CULTURE GELOSEE					
Concentration (mg/L)		Rapport C:N	Matière sèche ² (mg/100ml)		pH ³	R. sexuées ⁴ l.périthécial	Production périthéciale ⁵		
Carbone ¹	Azote ¹		11 ^e jour	30 ^e jour			30 ^e jour	Min.	Max.
0	100	2,8	12	20	8	0	0	0	0
	200	2,8	33	40	8,6	0	0	0	0
	300	2,8	80	55	8,9	0	0	0	0
	400	2,8	105	70	8,9	0	0	0	0
	500	2,8	112	74	9	0	0	0	0
500	25	20	74	34	5,8	+	28	38	32
	<u>50</u>	<u>10</u>	<u>111</u>	<u>112</u>	<u>6</u>	<u>+</u>	<u>34</u>	<u>46</u>	<u>40</u>
	75	6,6	111	110	6,6	+	22	30	25
	100	5	70	57	7,1	+	21	25	22
	125	4	78	76	7,5	0	17	20	18
	150	3,4	78	57	7,7	0	8	10	10
1000	25	40	114	97	5,6	+	38	52	42
	50	20	136	104	6	+	48	52	50
	<u>75</u>	<u>13,3</u>	<u>139</u>	<u>167</u>	<u>6,2</u>	<u>++</u>	<u>50</u>	<u>55</u>	<u>51</u>
	100	10	150	165	6,7	+	43	55	49
	125	8	163	150	7,1	+	50	57	53
	150	6,7	184	158	7,7	0	41	50	43
	200	5	208	170	7,8	0	17	21	18
250	4	209	165	8	0	0	7	2	
1500	25	60	125	132	5,5	0	27	38	32
	50	30	165	145	5,9	++	62	68	66
	<u>75</u>	<u>20</u>	<u>201</u>	<u>148</u>	<u>6,2</u>	<u>++</u>	<u>66</u>	<u>93</u>	<u>80</u>
	100	15	204	150	6,4	++	69	81	75
	125	12	205	153	6,7	+	65	83	75
	150	10	224	167	7,6	+	67	79	71
	200	7,5	267	173	7,5	0	52	55	53
	250	6	268	165	7,8	0	22	27	24
300	5	282	174	8	0	5	12	8	
2000	25	80	169	157	5,3	0	9	13	11
	50	40	197	196	5,7	++	76	86	81
	75	26,6	264	205	6	+++	91	98	95
	<u>100</u>	<u>20</u>	<u>285</u>	<u>178</u>	<u>6,4</u>	<u>+++</u>	<u>95</u>	<u>105</u>	<u>100</u>
	125	16	269	179	6,5	+++	98	103	100
	150	13,3	299	183	7,2	+++	89	95	92
	200	10	328	262	7,2	++	89	95	92
	250	8	349	238	7,7	+	62	74	67
	300	6,6	362	250	7,8	0	52	54	53
	400	5	386	254	8,7	0	5	7	6
500	4	395	256	8,7	0	0	0	0	

BU
LILLE

Tableau 8 (suite) : Influence des variations des concentrations en carbone et en azote du milieu nutritif sur le développement du *N. galligena*.

MILIEU NUTRITIF			CULTURE LIQUIDE				CULTURE GELOSEE		
Concentration (mg/L)		Rapport	Matière sèche ² (mg/100ml)		pH ³	R. sexuee ⁴	Production périthéciale ⁵		
Carbone ¹	Azote ¹	C : N	11 ^e jour	30 ^e jour	30 ^e jour	l.périthécial	Min.	Max.	Moy.
2500	25	100	177	164	5,6	0	0	0	0
	50	50	220	221	5,5	++	55	62	58
	75	33	249	250	6	+++	107	120	111
	<u>100</u>	<u>25</u>	<u>294</u>	<u>252</u>	<u>6,3</u>	<u>+++</u>	<u>114</u>	<u>121</u>	<u>119</u>
	125	20	346	254	6,5	+++	103	117	115
	150	16,6	373	253	6,8	+++	103	120	114
	200	12,5	378	270	6,8	++	96	113	101
	250	10	414	295	7,4	++	92	108	95
	500	5	438	286	7,4	0	0	0	0
3000	50	60	242	251	5,5	+	24	34	28
	75	40	324	326	5,8	++	89	100	92
	100	30	320	325	6,2	+++	110	117	112
	<u>125</u>	<u>24</u>	<u>356</u>	<u>360</u>	<u>6,4</u>	<u>+++</u>	<u>119</u>	<u>127</u>	<u>123</u>
	150	20	403	258	6,6	+++	110	127	117
	200	15	435	280	7	+++	110	131	115
	250	12	449	337	8,3	+++	89	96	92
	300	10	466	300	8,5	+++	84	100	90
4000	50	80	248	300	5,5	0	0	0	0
	75	53,3	297	379	5,7	+	34	66	45
	100	40	373	400	6	+++	93	120	102
	<u>125</u>	<u>32</u>	<u>447</u>	<u>438</u>	<u>6,3</u>	<u>+++</u>	<u>138</u>	<u>145</u>	<u>142</u>
	<u>150</u>	<u>26,6</u>	<u>519</u>	<u>349</u>	<u>6,6</u>	<u>+++</u>	<u>121</u>	<u>141</u>	<u>131</u>
	200	20	546	350	7	+++	110	139	125
	250	16	554	430	8,2	++	86	128	109
	400	10	648	464	8,6	++	92	127	109
5000	50	100	249	251	6,8	0	0	0	0
	75	66,6	273	248	7,3	0	12	24	17
	100	50	442	254	7,6	+	83	85	84
	125	40	457	442	6,5	++	93	94	93
	150	33,3	563	403	6,9	++	124	151	143
	<u>200</u>	<u>25</u>	<u>621</u>	<u>435</u>	<u>7</u>	<u>+++</u>	<u>119</u>	<u>148</u>	<u>138</u>
	<u>250</u>	<u>20</u>	<u>628</u>	<u>489</u>	<u>7</u>	<u>+++</u>	<u>100</u>	<u>145</u>	<u>134</u>
	<u>300</u>	<u>16,6</u>	<u>680</u>	<u>520</u>	<u>7,1</u>	<u>+++</u>	<u>135</u>	<u>141</u>	<u>137</u>
	500	10	767	627	7,3	+++	128	141	137
10000	100	100	707	605	5,1	0	0	0	0
	200	50	890	786	6,2	(+)	69	77	74
	300	33,3	930	854	7,3	++(+)	100	122	112
	400	25	1065	960	7,8	++(+)	108	125	119
	<u>500</u>	<u>20</u>	<u>1121</u>	<u>995</u>	<u>8,2</u>	<u>+++</u>	<u>130</u>	<u>151</u>	<u>139</u>

BU
LILLE

Légende : tous les essais ont été réalisés à 18 °C, sous un éclairage en lumière blanche (12hL/12hN, 750 µWcm⁻²).

1. Le maltose et le mélange (acide glutamique, alanine et asparagine) constituent les sources de carbone et d'azote.

2-3-4-5- Voir légende du tableau 5.

2. RESULTATS

a) Analuse globale (tableau 8)

D'un point de vue général, l'examen des données du tableau 8 nous suggère les remarques suivantes :

α) au plan de la croissance mycélienne

Dans tous les cas, l'augmentation des concentrations en carbone de 0 à 10 g/l ou d'azote de 0 à 500 mg/l provoque, parallèlement une stimulation de la croissance mycélienne, mesurée après 11 jours de culture en milieu liquide. Les valeurs C:N les plus faibles caractérisent, alors, cette progression pondérale des thalles.

Le développement du *N. galligena* sur les substrats à contenu azoté de plus en plus élevé entraîne corrélativement l'alcalinisation du milieu, celle-ci n'étant cependant jamais excessive (pH < 9).

De tels faits se vérifient pour divers Ascomycètes (HAWKER, 1957) : *Arthroderma vanbreuseghemii* (DUJARDIN et al, 1975), *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1977) dont l'importance de la croissance végétative dépend de concentrations carbonées et azotées croissantes et d'une diminution du rapport C:N.

β) au niveau de la reproduction sexuée

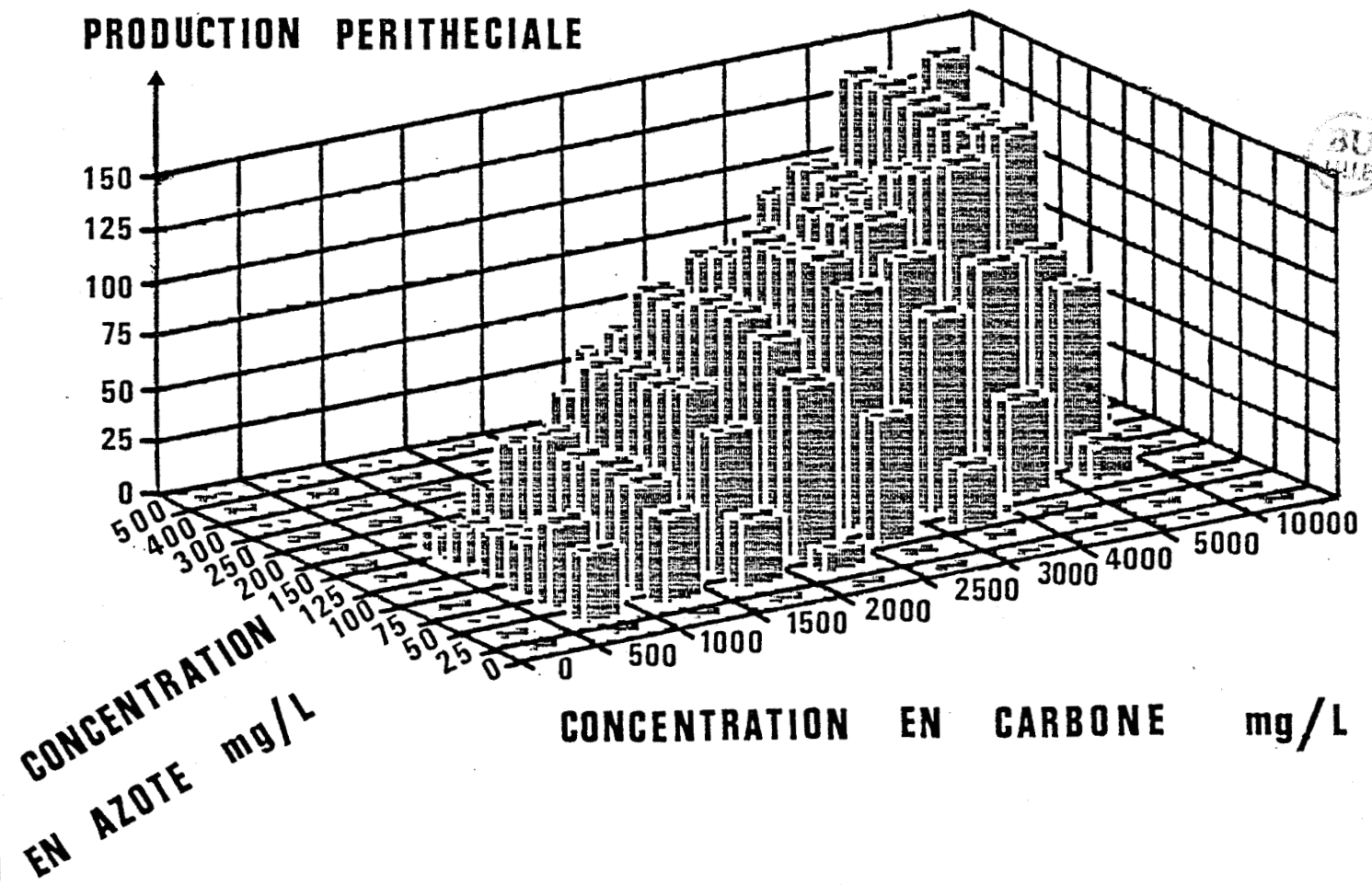
Parmi toutes les teneurs en carbone ou en azote éprouvées, aucune ne se révèle inhibitrice de la sexualisation du *N. galligena*. Cet effet répressif relève essentiellement de la valeur de l'équilibre C:N. Dans ce sens, nous pouvons considérer que :

- le rapport C:N contrôle l'induction sexuée
- les valeurs absolues des concentrations carbonées ou azotées règlent, au niveau d'un rapport C:N donné, le nombre d'ascocarpes formés.

b) INFLUENCE DE L'EQUILIBRE CARBONE : AZOTE SUR LA REPRODUCTION SEXUEE

Le diagramme (figure 11) symbolise l'évolution de la production périthéciale du *N. galligena*, en fonction des différentes teneurs carbonées (0 à 10g/l) et azotées (0 à 500 mg/l) éprouvées.

Figure 11. : Influence de la variation des teneurs carbonées et azotées sur la production périthéciale du *N. galligena*, cultivé à 18 °C, en présence de lumière blanche (12hL/12hD, 750 μWcm^{-2}).



Légende : Le maltose et le mélange (acide glutamique, alanine et asparagine) constituent les sources de carbone et d'azote.

Mis à part les cas de leur nullité, toutes les concentrations en carbone et en azote essayées provoquent la différenciation périthéciale à condition d'être combinées selon des rapports compris entre 5 et 60 ou entre 4 et 67 selon la nature respectivement liquide ou solide du milieu. Au contraire chacune des teneurs carbonées ou azotées devient inhibitrice si elle intervient dans des équilibres C:N inférieurs à 4 ou supérieurs à 67.

Le diagramme (figure 11) démontre le déplacement du nombre maximal d'ascocarpes produits et, corrélativement, l'évolution de la valeur C:N optimale, en fonction des quantités carbonées et azotées incorporées au milieu :

- soit de 10 à 20 lorsque les taux de carbone égalent respectivement 0,5 et 10 g/l,
- soit, inversement, de 40 à 10 lorsque les teneurs en azote augmentent de 25 à 500 mg/l.

Ainsi, les rapports C:N, compris entre 10 et 40, apparaissent, toutes concentrations en carbone et en azote confondues, très favorables à la production périthéciale du *N. galligena*. Plus précisément, nous pouvons retenir comme optimales les valeurs de l'équilibre C:N proches de 25 qui satisfont tous les aspects du développement du *N. galligena* cultivé sur milieu liquide ou gélosé.

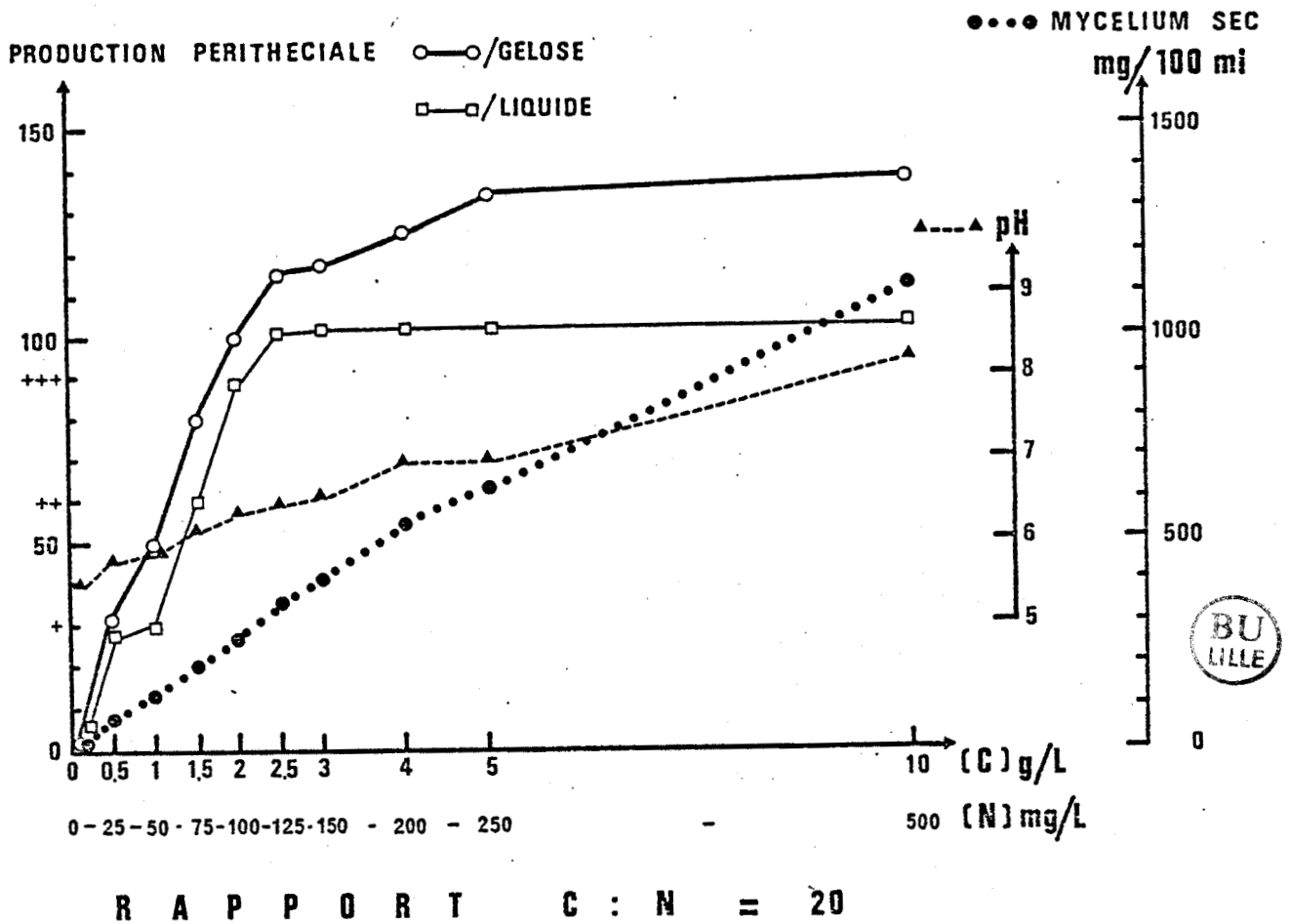
c) Influence des concentrations en carbone et en azote du milieu

Nous avons tenté d'interpréter les effets de la valeur absolue des teneurs carbonées et azotées du milieu selon trois exemples où, successivement, le rapport C:N, la concentration de carbone puis celle d'azote sont fixes.

a) rapport C:N constant

Lorsque les taux C:N autorisent la sexualisation, la production périthéciale varie selon les quantités de carbone et d'azote introduites dans le milieu. La figure 12 démontre cette relation pour un équilibre C:N constamment égal à 20.

Figure 12 : Influence des teneurs carbonées et azotées, définies par un rapport C:N constant, sur le développement du *N. galligena*.



Légende : les cultures du *N. galligena* se développent à 18 °C, en présence de lumière blanche (12hL/12h0).

La production périthéciale et le pH du milieu sont mesurés après 30 jours de culture, les poids de mycélium sec (/100 ml de milieu) sont obtenus après 11 jours d'incubation sur milieu liquide.

La figure 12 nous permet d'observer que l'augmentation simultanée (C:N:20) des concentrations carbonées et azotées conduit à :

- un accroissement proportionnel des rendements en matière mycélienne (11^e jour)
- à une progression du nombre d'ascocarpes. Celle-ci, initialement très accentuée, devient nettement moins significative au delà de 2,5 g/l de carbone. La culture en milieu liquide confirme ces données notamment la grande fertilité du *N. galligena* sur des substrats très riches en carbone (10g/l) et en azote (500 mg/l), où le doublement de ces dernières valeurs ne suffit pas à stériliser le champignon.

Ces résultats, reproductibles pour toutes les valeurs C:N comprises entre 10 et 40, indiquent qu'une large gamme de concentrations tant carbonées (0,5 à 10 g/l) qu'azotées (25 à 500 mg/l) autorise la reproduction sexuée du *N. galligena*. Ainsi ils ne semblent pas confirmer le rôle plus spécifique attribué aux composés azotés (DAS GUPTA et NANDI, 1957), notamment, l'effet limitant exercé par leurs concentrations élevées. Ces dernières, supérieures à 200 mg/l, empêchent la sexualisation d'*Hypomyces solani* (HIX et BAKER, 1964), d'*Arthroderma vanbreuseghemii* (DUJARDIN et al, 1975) ou réduisent considérablement la formation des ascocarpes du *Leptosphaeria typhae* (VIDAL et al, 1975). De même l'action favorable des fortes valeurs carbonées (10 g/l), constatée chez le *N. galligena* infirme les résultats de nombreux travaux où une telle addition d'hydrates de carbone, supérieure à 2 p 100, se révèle inhibitrice de la fructification parfaite.

Toutefois des conclusions similaires à celles des auteurs précités peuvent être proposées chez le *N. galligena* si l'on se réfère aux effets des variations de la teneur en azote en fonction d'une concentration constante en carbone et inversement.

B) Influence des concentrations azotées et carbonées

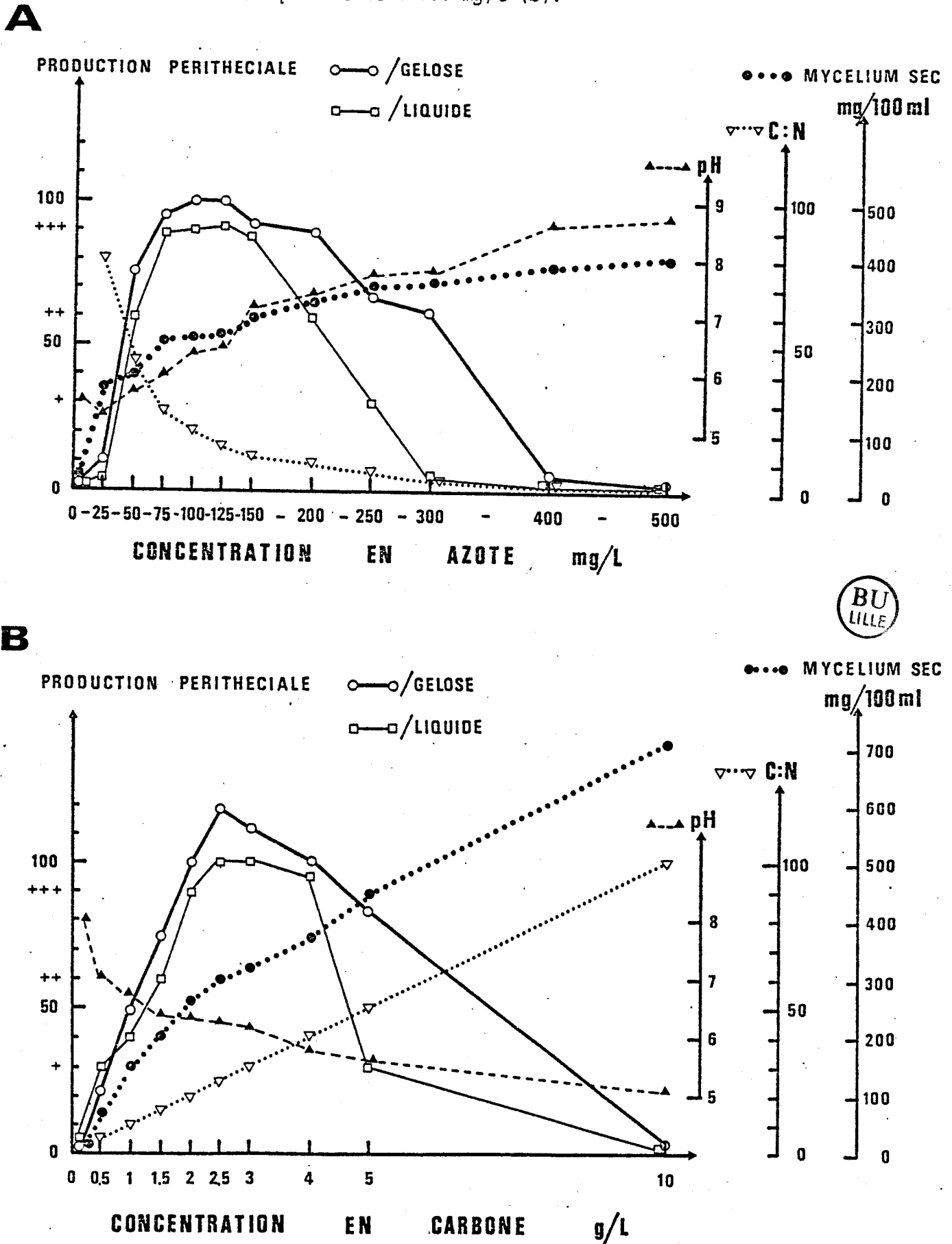
La figure 13 représente l'influence sur le développement du *N. galligena*.

- en A, des variations, de 25 à 500 mg, de la concentration en azote en fonction d'une seule teneur carbonée égale à 2g/l,
- en B, de différents taux carbonés, de 0,28 à 10 g/l, pour une valeur fixe d'azote équivalente à 100 mg/l

Dans les deux cas (A et B), l'augmentation des teneurs azotées ou carbonées conduit à :

- une progression corrélative de la croissance mycélienne dont l'importance pondérale dépend davantage de la nutrition carbonée,

Figure 13: Influence des variations de la concentration en azote (A) ou en carbone (B) sur le développement du *N. galligena* cultivé en présence respectivement d'une teneur constante en carbone égale à 2g/l (A) ou en azote équivalente à 100 mg/l (B).



Légende : Voir tableau 8.

- une évolution inverse du pH des milieux qui deviennent alcalins lorsque la teneur azotée excède 150 mg/l,
- des courbes de la production périthéciale d'allure très similaire caractérisée par :
 - . l'absence initiale de périthèces aux plus faibles concentrations éprouvées (25 mg d'azote/l, 0,28 g de carbone/l),
 - . une phase suivante où le nombre d'ascocarpes est proportionnel à l'élévation des teneurs azotées ou carbonées,
 - . une production périthéciale maximale induite par des concentrations d'azote égales à 100 ou 125 mg/l ou de carbone proches de 2,5-3g/l,
 - . une diminution de la fructification parfaite, et, finalement, son inhibition. Cette dernière, plus spécifiquement révélée par la culture en milieu liquide, est provoquée par des taux azotés supérieurs à 300 mg/l ou carboné égal à 10 g/l.

Cette analyse, à la différence de nos interprétations précédentes met plus singulièrement en évidence :

- l'effet d'inhibition sexuée dû à de plus nombreuses concentrations azotées (25, 300, 400 et 500 mg/l) que carbonées (0,28 et 10 g/l),
- les conditions optimales pour la production périthéciale sous forme de taux carboné et azoté respectivement égaux à 2,5 g/l et 100 mg/l qui déterminent ainsi un rapport C:N de 25.

3.- CONCLUSIONS

D'une façon essentielle, cette étude démontre le rôle de l'équilibre C:N qui, plus que les concentrations absolues de carbone ou d'azote, décide de la morphogenèse sexuée. Chez le *N. galligena*, dans l'intervalle des valeurs C:N optimales, comprises entre 10 et 40, des teneurs carbonées et azotées variant, respectivement, de 2 à 10 g/l ou de 100 à 500 mg/l, multiplient le nombre de périthèces. Des relations C:N analogues favorisent la formation des ascocarpes chez *Ophiobolus graminis* (WESTE, 1970a), *Ceratocystis ulmi* (HOLMES, 1970), *Sordaria fimicola* (HALL, 1971), *N. haematococca* (QURESHI et PAGE, 1972), *Calonectria camelliae* (SHIPTON, 1977), *N. ditissima* (DEHORTER et PERRIN, 1983b).

En outre, les valeurs optimales du rapport C:N très différentes telles que : 4 et 25 chez le *N. galligena*, 30 et 50 chez *Glomerella cingulata* (SINGH et SHANKAR, 1972), 13 et 23 à 43 chez *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1977), privilégient les voies, respectivement, végétative et sexuée. Ainsi, des proportions C:N supérieures, orientent vers le développement sporophytique du champignon.

Par ailleurs, si la production périthéciale du *N. galligena*, conditionnée par des rapports C:N adéquats, supporte des variations de concentration azotée ou carbonée de grande amplitude ; au contraire, la sexualisation de certaines espèces fongiques dépend strictement de faibles teneurs azotées. Dans ce dernier cas, des rapports C:N optima soit :

- moyens (C:N = 20), obligent à une réduction des teneurs en hydrates de carbone incorporées au milieu qui favorise la formation des apothécies d'*Anthraco-bia* sp (ECHTLER et SCHRANTZ, 1975). Une semblable diminution, au détriment de la stimulation mycélienne, conditionne la différenciation des ascocarpes du *Venturia inaequalis* (ROSS et HAMLIN, 1962) ou d'*Ophiobolus graminis* (WESTE, 1970a).
- élevés (50 < C:N < 170) sanctionnent les fortes exigences carbonées de la production périthéciale des : *Neurospora crassa* (WESTERGAAD et MITCHELL, 1947), *Penicillium vermiculatum* (DAS GUPTA et NANDI, 1957), *Podosordaria leporina* (KOEHN, 1971) ou *Glomerella cingulata* (SINGH et SHANKAR, 1972)...

En définitive, l'influence de la teneur en carbone ou en azote du milieu nutritif se traduit par des réactions sexuées fort diverses qui ne permettent, sur ce plan, aucune généralisation qui rapporterait la fructification parfaite des Ascomycètes à une formule carbone-azote précise.

L'exemple du *N. galligena* concrétise cette relativité :

- où sa morphogenèse sexuée, produite sur des milieux à faible contenu carboné et azoté, accrédite les principes généraux de KLEBS (1900) ou les travaux de HAWKER (1939, 1951), de BRETZLOFF (1954)... selon lesquels une croissance végétative restreinte représente un facteur du déterminisme sexué,
- où sa différenciation périthéciale sur des milieux riches en carbone ou en azote corroborent d'autres travaux : *Nectria gliocladioïdes* (HANLIN, 1961), *N. haematococca* (CURTIS, 1969), *N. ditissima* (DEHORTER et PERRIN, 1983a)... selon lesquels un apport trophique accentué n'est pas significatif d'inhibition sexuée.

VII. - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN IONS HYDROGENE

Des résultats précédents (page 73) démontrent l'influence du pH du milieu cultural sur le développement du *N. galligena* ou encore, chez certains champignons, comme *Venturia inaequalis* (ROSS et HAMLIN, 1965), cultivés en présence de sels d'ammonium...

Présentement, la croissance mycélienne et la reproduction sexuée du *N. galligena* sont étudiées en fonction de différents pH initiaux du milieu M23.

1.- CONDITIONS EXPERIMENTALES


Le pH du milieu M23, liquide ou gélosé, est amené aux valeurs de 4 ; 5 ; 5,5 ; 6 ; 7 ; 8 et 9 par addition d'acide chlorhydrique (HCl, N) ou de soude (Na OH, N). Après stérilisation des milieux, les pH sont réajustés, si nécessaire.

L'incubation des cultures se réalise à 18 °C, en présence de lumière (12hL/12hL, 750 μWcm^{-2}) ou à l'obscurité permanente.

2.- RESULTATS

Les résultats des essais, effectués à la lumière, apparaissent dans le tableau 9

Tableau 9 : Influence de la concentration initiale en ions hydrogène du milieu nutritif sur le développement in vitro du *N. galligena*.

pH initial		CULTURE LIQUIDE					CULTURE GELOSEE		
		Mycélium ¹ (mg/fiole)		pH ²		R. sexuée ³	Production périthéciale ⁴		
		11è j.	30è j.	11è j.	30è j.	indice	Min.	Max.	Moy.
4		224	174	5	4,8	+	42	44	43
5		263	181	6,3	6,2	++	70	81	77
5,5		265	178	6,4	6,4	+++	95	105	100
6		249	179	6,6	6,6	+++	103	108	105
7		218	164	7,3	7,5	++	71	96	81
8		208	139	7,7	8,1	+	63	67	64
9		205	137	7,7	8,2	+	43	48	45

Légende : Les résultats sont obtenus de cultures pratiquées à 18 °C, à la lumière M23, 1-2-3-4 : voir tableau 5.

Dans tous les cas, le développement végétatif du *N. galligena* demeure important et, finalement, optimal aux pH initiaux 5 et 5,5. Toutefois, peut-on remarquer que l'alcalinité initiale des milieux affaiblit, plus que les pH acides, les poids de mycélium mesurés au 11^e jour et surtout au 30^e jour de culture.

La production périthéciale, qui est effective pour toutes les concentrations en ions hydrogène éprouvées, atteint son niveau le plus élevé aux pH 5,5 et 6. On remarque donc, le léger décalage entre les concentrations optimales en ions H⁺ qui, de 5 à 5,5 stimulent les rendements mycéliens et de 5,5 à 6 favorisent la sexualisation. Ce résultat, quoique de très faible amplitude, comparé à ceux obtenus par TINLINE et DICKSON (1958) pour *Cochliobolus sativus* ou décrits par HAWKER (1966), suggère que le pH optimal varie selon les phases du développement fongique.

De fait, chez le *N. galligena*, la croissance mycélienne, antérieure à la morphogénèse sexuée, modifie les pH initiaux qui varient de 4 à 5, de 9 à 7,7, comme en témoignent les mesures au 11^e jour. Cet ajustement "biologique" autorise, alors la différenciation sexuée qui, sinon, serait inhibée par des pH initiaux maintenus constants à 4 ou 9.

En outre, les fortes acidité (pH = 4) ou basicité (pH = 9) du milieu perturbent la qualité de la fructification parfaite du *N. galligena*. Dans ces conditions, les ascocarpes, de petites dimensions, de couleur carbonacée, contiennent peu d'ascospores qui ne sont jamais exudées au niveau de l'ostiole périthéciale. Ces observations semblent corroborer les diverses conclusions (LOCKWOOD, 1937 ; WESTERGAARD, 1947 ; TINLINE et DICKSON, 1958) selon lesquelles la formation des périthèces s'accomode d'une plus large gamme de pH que celle des asques et des ascospores.

En conclusion, les concentrations en ions hydrogène, comprises entre 5 et 7 et choisies pour favoriser le développement *in vitro* du *N. galligena*, conviennent également à de nombreuses espèces fongiques. Toutefois, certains champignons, en raison de leur écologie comme les espèces coprophiles, sont basophiles et des valeurs de pH plus élevées (de 7 à 9) stimulent alors leur reproduction (ASINA et al, 1977).

VIII. - CONCLUSIONS

A l'issue de cette étude des conditions nutritives du développement *in vitro* du *N. galligena*, nous pouvons principalement retenir :

- l'absence de périthèces fertiles sur toutes les cultures incubées à l'obscurité permanente. Ainsi, aucun des environnements trophiques éprouvés, aussi favorable soit-il, ne supplée au défaut de lumière, pour induire la sexualisation tandis qu'il favorise la croissance mycélienne ou autorise la conidiogénèse.
- le taux maximal de fructifications parfaites obtenu sur les substrats naturels composés d'un mélange (40g/l) de farines d'avoine et de blé dont la qualité demeure sans égale
- les éléments du milieu synthétique qui semblent, comme le zinc ($Zn SO_4, 5H_2O$) la nature de certaines sources carbonées ou azotées ou le rapport C:N ($10 < C:N < 40$), être des facteurs importants du déterminisme sexué. Ils permettent d'opposer les conditions nutritives excessives (teneurs carbonée et azotée) stimulatrices du développement végétatif gamétophytique aux paramètres trophiques favorables à la morphogénèse périthéciale. Cette dernière, essentiellement sporophytique, exige un équilibre nutritionnel (C : N = 25 par exemple qui, différant de l'affamement nécessaire aux levures et propre à chaque espèce, provoquera un état mycélien harmonieux aux dépens duquel s'édifient les structures sexuées.
- les modifications du milieu M23 qui, stimulant les rendements mycéliens et surtout la production périthéciale, sont :
 - . un ajustement du pH initial à 6.
 - . une augmentation des quantités incorporées de maltose, d'acide glutamique, d'alanine et d'asparagine telle que les concentrations en carbone et en azote égalent respectivement 4g/l et 150 mg/l, soit un équilibre C : N proche de 25.

Pour nous permettre une meilleure comparaison de l'ensemble de nos résultats, nous avons maintenu, au cours des expériences ultérieures, l'utilisation du milieu M23 non modifié. De fait, ce dernier sans être la solution trophique optimale, satisfait néanmoins, très valablement, aux exigences nutritives de la fructification parfaite du *N. galligena*. Enfin, le maintien des concentrations carbonée et azotée, respectivement à 2g et 100 mg/L, évite, sur milieu gélosé notamment, une excessive prolifération mycélienne gênante pour le comptage des ascocarpes et source, à plus haut risque, de pleiomorphisme

CHAPITRE II

CONDITIONS THERMIQUES DE LA REPRODUCTION SEXUÉE DU N. GALLIGENA.

Les avertissements phytosanitaires émis par les stations de la protection des végétaux préviennent souvent de l'évolution des maladies cryptogamiques en fonction des températures saisonnières enregistrées. De même, les publications (LILLY et BARNETT, 1951 ; COCHRANE, 1958 ; HAWKER, 1966 ; TURIAN, 1978) démontrent que les orientations végétatives ou reproductrices du développement fongique, *in vitro*, dépendent de conditions thermiques particulières. L'influence de ces dernières sur les voies métaboliques peut procéder d'une étonnante précision où, chez le *Sordaria macrospora* (ESSER, 1980), l'inhibition sexuée de souches sauvage et mutante relève de températures respectivement égales à 31 °C et 30 °C.

Au laboratoire, le contrôle aisé du paramètre thermique conduit à des résultats précis et nombreux. L'analyse de ces derniers, proposée ci-dessous, révèle que les effets thermiques peuvent être :

- rapportés à l'écologie du champignon,
- différents selon les étapes de son développement,
- particuliers, pour un même stade évolutif, aux espèces et parfois aux souches fongiques,
- spécifiques des principales phases d'un même évènement morphogénétique comme la reproduction sexuée.

I. - INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LE DÉVELOPPEMENT FONGIQUE, IN VITRO : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.- ASPECT ECOLOGIQUE

Les températures d'incubation, *in vitro*, employées rappellent souvent l'écologie des champignons, à l'exemple de ceux qui, au laboratoire, sexualisent à 0 °C comme *Thelebolus sp* (WICKLOW et MALLOCH, 1971) qui forme des apothécies sous la neige ou, à 35 °C, comme *Leptosphaeria senegalensis* (ANDRIEU et al, 1980) qui parasite l'être humain. Il peut en être de même des organismes phytopathogènes tel le cas remarquable du *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1977) où les conditions thermiques de sa morphogénèse, *in vitro*, calquent celles de son cycle biologique sur Noyer.

Pourtant, cette analogie des cryosensibilités fongiques en milieux naturel et artificiel n'est pas toujours respectée. De fait, l'influence thermique dépend des autres éléments de l'environnement qui, dans la nature, sont très complexes, et où les fluctuations nutritives, lumineuses, mais aussi thermiques, sont difficiles à recréer en laboratoire. Parfois, ces interférences ont été démontrées, *in vitro*, où les températures optimales de la différenciation sexuée sont modifiées en fonction :

- des variations de la composition chimique du milieu cultural, soit qualitatives chez *Sordoria fimicola* (HAWKER, 1947), soit quantitatives chez *Nectria gliocladioides* (HANLIN, 1961),
- des conditions lumineuses telles que *Pyricularia oryzae* (KATO et al, 1976) forme des périthèces à 28 °C à l'obscurité et à 20 °C en présence de lumière.

2.- CRYOSENSIBILITE DES PRINCIPAUX STADES DU DEVELOPPEMENT

Au laboratoire, des températures optimales différentes conditionnent la croissance mycélienne, la conidiogénèse ou la reproduction sexuée d'un champignon. Le tableau 10 fait état, au plan bibliographique, des cryosensibilités de la croissance mycélienne et de la fructification parfaite de divers Ascomycètes.

Tableau 10: Influence de la température sur les développements végétatif et sexué de divers Ascomycètes. (Bibliographie)

CHAMPIGNONS	CROISSANCE MYCELIENNE			REPRODUCTION		SEXUEE
	Température °C			Température °C		
	Min.	Max.	Moy.	Min.	Max.	Moy.
<i>Gnomonia vulgaris</i> (HENRIKSSON et MORGAN-JONES, 1951)	5°C	30°C	17°C	10°C	19-25°C	15°C
<i>Gnomonia intermedia</i> (HENRIKSSON et MORGAN-JONES, 1951)	5°C	35°C	19°C	5°C	19°C	15-19°C
<i>Gnomonia leptostyla</i> (FAYRET, 1975 ; MATTEONI et NEELY, 1979)	6°C	30°C	22°C	7°C	10°C	10°C
<i>Cochliobolus sativus</i> (TINLINE et DICKSON, 1958)	4°C	36°C	28°C	16°C	24°C	20°C
<i>Cochliobolus kusanoi</i> (WAKI et al, 1979)	12°C	34°C	-	20°C	28°C	24°C
<i>Gelasinospora calospora var. autosteria</i> (TYLUTKI, 1958)	12°C	37°C	30°C	12°C	30°C	16°C
<i>Nectria</i> sp. (HANLIN, 1961)						
<i>N. ipomeae</i>	6°C	33°C	-	17°C	24°C	24°C
<i>N. peziza</i>	6°C	24°C	-	17°C	24°C	24°C
<i>N. gliocladioides</i>	6°C	33°C	28°C	15°C	28°C	26°C
<i>Leptosphaerulina briosiana</i> (MARTINEZ et HANSON, 1963)	8°C	32°C	20-24°C	16°C	32°C	24-28°C
<i>Mycosphaerella ligulicola</i> (Mc COY et al, 1972)	3°C	30°C	26°C	-	24°C	21°C
<i>Anthracobia</i> sp. (ECHTLER et SCHRANTZ, 1975)	15°C	37°C	-	15°C	30°C	25°C
<i>Pyronema domesticum</i> (MOORE-LANDECKER, 1975, et SHROPSHIRE, 1982)	5°C	34°C	28°C	20°C	25°C	-
<i>Gibberella zeae</i> (TSCHANZ et al, 1976)	15°C	32°C	28°C	15°C	28°C	26°C
<i>Sporormiella intermedia</i> et <i>S. isomera</i> (ASINA et al, 1977)	5°C	35°C	15-25°C	15°C	30°C	20-25°C
<i>Sporormiella minima</i> (ASINA et al, 1977)	5°C	45°C	15-35°C	15°C	35°C	20-30°C
<i>Leptosphaeria senegalensis</i> (ANDRIEU et al, 1980)	15°C	40°C	-	20°C	35°C	-
<i>Magnaporthe salvinii</i> (TSUDA et al, 1982)	10°C	30°C	30°C	15°C	28°C	24-26°C

BU
LILLE

La lecture du tableau 10 met en évidence que des intervalles thermiques, plus étroits régissent la sexualisation en comparaison de ceux qui favorisent le développement mycélien. La formation des ascocarpes est surtout limitée par l'élévation des températures. De fait, l'action bénéfique du froid sur la sexualisation fongique est souvent remarquée : *Venturia inaequalis* (ROSS, 1961 ; ROSS et HAMLIN, 1962), *Hypomyces solani f.sp. cucurbitae* (BAKER et WARE, 1962 ; WILSON, 1968 ; WILSON et BAKER, 1969), *Leptosphaeria sp* (LACOSTE, 1965), *Monilinia sp* (TERVI et HARADA, 1967)...

Si, d'une manière générale, les optima thermiques de la fructification parfaite sont inférieurs à ceux de la croissance mycélienne, les températures favorables à la multiplication asexuée peuvent être :

- identiques à celles, élevées, qui facilitent la croissance mycélienne : *Mycosphaerella ligulicola* (Mc COY et al, 1972), *Gibberella zeae* (TSCHANZ et al, 1976).
- intermédiaires entre celles importantes du développement végétatif et basses de la différenciation sexuée : *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1975),
- inférieures à celles qui prévalent pour les autres événements morphologiques. Ainsi, chez diverses Eurotiales cultivées au laboratoire, des températures proches de 28 °C favorisent la conidiogenèse tandis que, supérieures à 40 °C, elles provoquent la fructification parfaite. Plus précisément, la présence de structures asexuées du *Ceratostomella fimbriata* (BARNETT et LILLY, 1947), d'*Eurotium herbarum* (HAWKER, 1957) et du *Leptosphaeria eustomoïdes* (HUBERT, 1967) dépend de températures qui, respectivement égales à 18 °C, 20 °C et 10 °C, sont plus faibles que celles, respectivement : 25 °C, 25 °C et 30 °C, requises pour leur sexualisation.

Ces données définissent donc une évolution de la cryodépendance du champignon en fonction de son développement dont, semble-t-il, croissance mycélienne et reproduction sexuée optimales sont souvent antagonistes.

3.- INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LA REPRODUCTION SEXUEE EN FONCTION DE L'ESPECE FONGIQUE

Pour certains Ascomycètes, la différenciation des ascocarpes se réalise sous des conditions thermiques optimales qui diffèrent selon les espèces d'un même genre. Le tableau 10 fait apparaître de telles distinctions chez trois espèces du genre *Gnomonia*. De même, on peut observer, au niveau des *Leptosphaeria*, que *L. acuta* (LACOSTE, 1965), *L. typhae* (VIDAL et al, 1975) et *L. senegalensis* (ANDRIEU et al, 1980) forment des périthèces respectivement à 10 °C, 18 °C et 34 °C. Illustrent encore ce propos, les résultats obtenus dans les cas du *Sporormiella* (ASINA et al, 1977) ou du *Nectria* (HANLIN, 1961 - DEHORTER et PERRIN, 1983a)...

Ces fluctuations de la température optimale de sexualisation atteignent également les souches d'une même espèce : *Pyricularia oryzae* (YAEGASHI et HEBERT, 1976), *Nectria galligena* (18 °C : LACOSTE et DEHORTER, 1973 ; 21 °C : LORTIE, 1964 ; 25 °C : KRUGER, 1974b).

Nous pouvons supposer que les variations ainsi constatées mettent en cause dans tous les cas et plus particulièrement :

- au niveau des espèces : une écologie particulière et des potentialités enzymatiques différentes, celles-ci reflétant un patrimoine génétique expressément spécifique,
- au niveau des souches : une origine géographique propre à chacune d'elles et des conditions culturelles (nutritives, lumineuses...) distinctes selon les auteurs.

4.- CONDITIONNEMENT THERMIQUE DES PRINCIPALES PHASES DE LA DIFFERENCIATION SEXUEE

Les résultats expérimentaux, publiés par divers auteurs référenciés dans le tableau 11, tendent à prouver une différence de cryosensibilité des phases initiale et finale de la morphogenèse périthéciale que sont respectivement :

- l'initiation, caractérisée par des protopérithèces sous forme de stromas enveloppant l'appareil ascogonial non fécondé,
- la maturation, révélée par la présence d'asques pourvus d'ascocarpes.

Tableau 17 : Influence de la température sur l'initiation et la maturation des ascocarpes chez divers Ascomycètes (Bibliographie)

CHAMPIGNONS	TEMPERATURE °C	
	initiation (Protopérithèces)	maturation (Périthèces fertiles)
<i>Neurospora crassa</i> (HIRSCH, 1954)	30°C	25°C
<i>Gelasinospora calospora</i> (TYLUTKI, 1958)	16°C	20°C
<i>Leptosphaerulina briosiana</i> (MARTINEZ et HANSON, 1963)	16°-32°C	24°C
<i>Gnomonia leptosytla</i> (FAYRET, 1967)	14°-18°C	7-10°C
<i>Polystigma ochraceum</i> (GHAZANFARI et BANIHASHEMI, 1976)	10°C	5°C
<i>Gibberella zeae</i> (TSCHANZ et al, 1976).	27-31°C opt. 26°C	16-26°C opt. 16°C
<i>Pleospora herbarum</i> (LEACH, 1971)	24-27°C	10°C
<i>Leptosphaeria senegalensis</i> (ANDRIEU et al, 1980)	20-35°C	22-24°C



Des températures souvent plus élevées, sauf pour *Gelasinospora calospora* (TYLUTKI, 1958), multiplient les protopérithèces alors que, plus basses, elles assurent la fertilité des ascocarpes.

D'une manière générale, un traitement par le froid qui correspond à la période naturellement hivernale, accentue, au laboratoire, la maturation des ascocarpes et améliore leur qualité (dimensions, nombre d'asques).

Parfois même, des chocs "froid" peuvent provoquer des changements métaboliques à l'origine d'une fructification parfaite normalement photoinduite. Ainsi, dans le cas du *Pleospora herbarum* (LEACH, 1971), la thermo-induction se substitue à la photoinduction périthéciale.

En définitive, des exigences thermiques, de plus en plus restrictives, concourent à l'évolution de la différenciation sexuée des Ascomycètes à l'exemple du *Neurospora* (TURIAN, 1966 ; TURIAN et VISWANATH-REDDY, 1971).

Ces données bibliographiques ont orienté notre étude de la cryodépendance du *N. galligena* où nous avons distingué l'effet des températures :

- sur la croissance végétative et la production périthéciale,
- sur l'initiation et la maturation des ascocarpes,
- sur le déclenchement de la reproduction sexuée à l'obscurité : thermo-induction sexuée ?

Tous les essais sont pratiqués sur le milieu synthétique M23 liquide et -ou- gélosé.

II. - INFLUENCE DE TEMPÉRATURES CONSTANTES SUR LE DÉVELOPPEMENT DU N. GALLIGENA

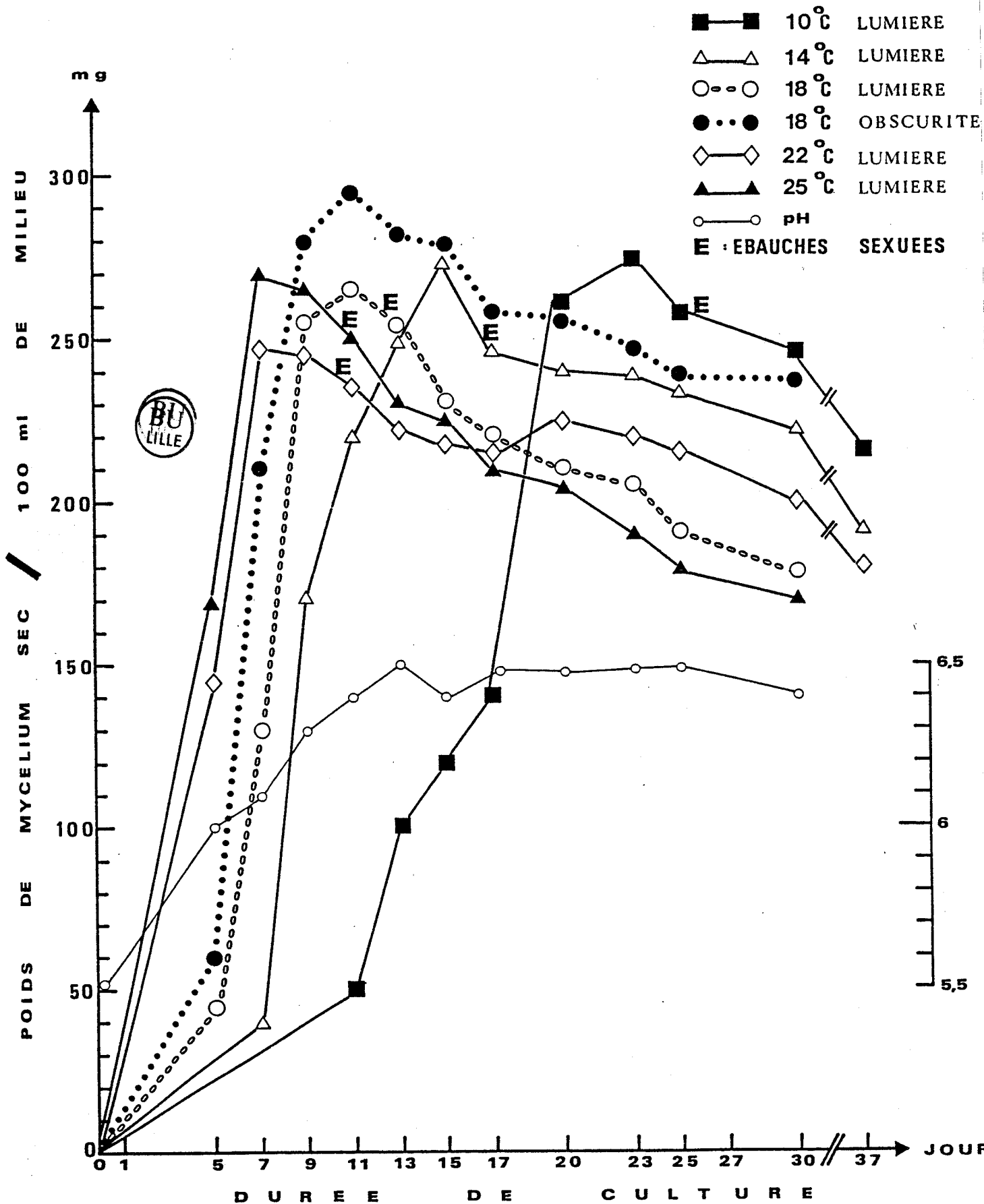
1.- CONDITIONS EXPERIMENTALES

Le champignon est incubé aux températures de 10 °C, 14 °C, 18 °C, 22 °C et 25 °C qui sont maintenues constantes à $\pm 0^{\circ}5C$ pendant toute la durée, 30 à 50 jours, des expériences. Ces dernières sont effectuées sous lumière blanche (12hL/12hO, $750 \mu Wcm^{-2}$) ; en outre, à 18 °C, une série culturale supplémentaire se développe à l'obscurité permanente.

2.- RESULTATS

La figure 11 et le tableau 12 représentent les résultats obtenus de l'évolution pondérale du mycélium (milieu liquide) et de la reproduction sexuée (cultures liquide et gélosée) sous l'effet des différentes températures d'incubation.

Figure 14 : Influence des températures sur la croissance mycélienne et la date d'apparition des ébauches périthéciales (Eb.) du *N. galligena* cultivé sur milieu synthétique M23 liquide



a) Croissance mycélienne

Au niveau des cultures éclairées, l'élévation thermique, de 10 °C à 25 °C, réduit fortement la durée de la phase initiale de latence. Cette accélération de la croissance mycélienne se traduit par des rendements maxima en matière sèche qui sont plus rapidement atteints à 25 °C, dès le 7ème jour, qu'à 10 °C, après 23 jours de culture. Cependant, cette évolution différente ne modifie guère les valeurs pondérales des thalles qui sont très semblables aux 5 températures éprouvées.

Pour la série culturale incubée à 18 °C et à l'obscurité continue, cette dernière, comparativement à la lumière (12hL/12hO) stimule considérablement le développement végétatif : vitesse de croissance, valeur pondérale maximale et maintien temporel de rendements mycéliens élevés. Ces résultats traduisent, d'une part, l'interférence des effets dûs aux facteurs de l'environnement et d'autre part, l'antagonisme entre le développement végétatif photoinhibé et la reproduction sexuée photostimulée du *N. galligena*. Des relations inverses qui sont notées pour le *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1975) posent le problème des rapports nécessaires entre croissance mycélienne et reproduction sexuée.

b) Reproduction sexuée (figure 11 et tableau 12)

Tableau 12 : Influence de la température sur la production périthéciale du *N. galligena*.

REPRODUCTION SEXUEE	TEMPERATURE °C				
Production périthéciale ●	10 °C	14 °C	18 °C	22 °C	25 °C
Minimum	46	73	95	29	0
Maximum	69	81	105	58	0
Moyenne	57	78	100	49	0

Légende : tous les essais sont pratiqués sur milieu synthétique M23 gélifié, en présence de lumière blanche (12hL/12hO, 750 μWcm^{-2})

● Nombre de périthèces fertiles par tube : voir précédemment pour le mode de calcul.

En présence de lumière, la production d'ascocarpes fertiles progresse de 10 °C à 18 °C qui constitue l'optimum thermique au delà duquel, le nombre de périthèces décroît (22 °C) et devient nul (25 °C). Aux températures les plus basses éprouvées (10 °C et 14 °C), le déclenchement tardif de la sexualisation et le ralentissement de la croissance mycélienne sont concomitants. Ainsi les dates du développement végétatif maximal et d'apparition des premières ébauches périthéciales sont constatées, respectivement les 23ème et 25ème jours à 10 °C, le 15ème jour à 14 °C, les 11è et 12è jours à 18 °C, les 7è et 11è jours à 22 °C et 25 °C. La période d'initiation sexuée semble donc souvent coïncider avec le moment, ou immédiatement après celui-ci, qui marque le sommet pondéral de la croissance.

D'une manière générale, ces observations laissent supposer que la sexualisation fongique est liée à l'épuisement du milieu ou dépend d'une période d'affaiblissement (TURIAN, 1978). A ce stade particulier d'achèvement de la croissance des éléments gamétophytiques, les facteurs d'induction sexuée provoquent, aux dépens des métabolites du mycélium végétatif, les biosynthèses nécessaires à l'initiation sexuée sporophytique.

A 22 °C et 25 °C, les nombres, respectivement faible et nul, d'ascocarpes fertiles sont sans rapport avec la multitude de protopérithèces stériles observés, notamment, sur milieu gélosé. Ce fait semble témoigner d'exigences thermiques différentes propres à l'initiation et à la maturation des ascocarpes du *N. galligena*.

Enfin, l'inhibition de la reproduction sexuée du *N. galligena*, provoquée par la température constante de 25 °C, confirme que :

- la fructification parfaite, en comparaison des développements végétatif et asexué nettement stimulés à 25 °C, est conditionnée par un intervalle thermique plus étroit au niveau de ses valeurs supérieures.
- les réactions sexuées à l'effet thermique sont propres aux espèces, voire aux souches fongiques. Ainsi, la stérilité sexuée du *N. galligena* constatée à 25 °C l'oppose à de nombreux *Nectria* capables de fructifier à ce niveau thermique : *N. gliocladioïdes* (HANLIN, 1961), *N. haematococca* (CURTIS, 1969), *N. cosmariospora* (TAYEL et HASTIE, 1975), *N. coccinea* (PARKER, 1976). De même, elle permet de distinguer les divers clones du *N. galligena* expérimentés puisque KRUGER (1974b) obtient, à 25 °C, un nombre optimal d'ascocarpes. Enfin, pouvons-nous rappeler que la première souche, étudiée par nous-mêmes (DEHORTER, 1972 - LACOSTE et DEHORTER, 1973) ne fructifiait pas au delà de 20 °C.
- la période estivale est, normalement, peu propice à l'observation de périthèces fertiles dans les vergers.

3.- CONCLUSION

Cette étude nous fait admettre que la fructification parfaite du *N.galligena* dépend, globalement, d'une température constante égale à 18 °C et de conditions thermiques plus restrictives que celles favorables à la croissance végétative. En outre, elle nous permet de supposer que certaines phases de la morphogenèse sexuée sont de cryosensibilité différente.

III. - EFFETS THERMIQUES SUR L'INITIATION ET LA MATURATION PÉRITHÉCIALE DU N. GALLIGENA.

1.- CONDITIONS EXPERIMENTALES

Les cultures du *N. galligena* sont incubées à 18 °C durant 7, 10, 13, 17, 20 et 23 jours après l'ensemencement. A la suite de chacun de ces pré-séjours, elles sont transférées à la température de 25 °C jusqu'à la fin des expériences, d'une durée de 35 jours.

Tous les essais sont pratiqués en milieu liquide M23, sous un éclairage de lumière blanche (12hL/12hO, 750 μWcm^{-2}).

2.- RESULTATS

Dans le tableau 13, sont reportés les résultats de cette expérimentation où l'évolution de la reproduction sexuée est constatée, après 35 jours, par la présence ou l'absence d'ébauches périthéciales (protopérithèces), de périthèces sub-adultes immatures, d'ascocarpes contenant de asques puis des ascospores.

L'absence de périthèce fertile, à la suite de pré-cultures à 18 °C, d'une durée de 7 à 17 jours, suppose, la réversibilité des effets thermiques sur le métabolisme durant cette période de développement. De fait, inversement, une incubation initiale du *N. galligena*, à 25 °C, pendant 7 et 10 jours, suivie d'un transfert des cultures à 18 °C ne modifie pas, ou très peu, la production finale de périthèces fertiles.

L'évolution des ébauches périthéciales et des périthèces sub-adultes, immatures, ces derniers induits, uniquement, après 17 jours de culture à 18 °C, est bloquée par une incubation sub-séquente à 25 °C. Cet effet néfaste s'exerce jusqu'à la formation des asques (20^e jour) mais n'intervient pas sur l'ascosporogenèse qui semble cryoindifférente et, de fait, indissociable de la présence ascale.

Tableau 13 : Influence de la durée d'un pré-séjour à 18 °C et d'une incubation finale à 25 °C sur la reproduction sexuée du *N. galligena*.

RÉPRODUCTION SEXUÉE ¹	DUREE DU PRE-SEJOUR à 18 °C, EN JOURS :						
	Stades -35è j.	7j.	10j.	13j.	17j.	20j.	23j.
Ebauche périthéciale		+	+	+	+	+	+
Périthèce sub-adulte		-	-	-	+	+	+
Périthèce + Asques		-	-	-	-	+	+
Ascospores		-	-	-	-	+	+



Légende : toutes les cultures se développent sur milieu synthétique M23 liquide, en présence de lumière blanche (12hL/12h0, 750 μWcm^{-2})

1. A la suite des différents pré-séjours à 18 °C, les cultures sont transférées à 25 °C jusqu'à la fin de l'expérience, d'une durée totale de 35 jours.
2. Les signes (+) et (-) indiquent respectivement la présence ou l'absence d'ébauches périthéciales, de périthèces sub-adultes immatures, de périthèces matures avec asques et d'ascospores.

3.- CONCLUSION

Chez le *N. galligena*, il semble donc que la température de 18 °C contrôle le déroulement de la morphogenèse sexuée depuis la fécondation jusqu'à la formation des hyphes à dangeardies ascogènes. Ainsi, la différenciation initiale des ébauches et, finalement, les divisions nucléaires ou les changements cellulaires à l'origine des ascospores paraissent échapper à cette thermorégulation. Celle-ci s'exerce donc différemment selon les stades de la morphogenèse sexuée du *N. galligena* et rapproche ce dernier champignon des espèces (tableau 10) où initiation et maturation sexuée dépendent d'optima thermiques différents.

L'intérêt des résultats (tableau 13) réside dans la possibilité de dissocier, d'une manière aisée par augmentation de la température d'incubation, divers stades évolutifs de la morphogenèse sexuée du *N. galligena* et donc d'en préciser le déterminisme.

IV. - INFLUENCE DES BASSES TEMPÉRATURES SUR L'INDUCTION SEXUÉE DU N. GALLIGENA : THERMO-INDUCTION PÉRITHÉCIALE ?

Pour cette étude, nous avons supposé que, dans la nature, à la suite d'une croissance mycélienne favorisée par les températures automnales mais protégée du rayonnement solaire par les tissus de l'hôte parasité, l'induction sexuée du *N. galligena* se réaliserait du fait des périodes froides de l'hiver.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué, au laboratoire, les expérimentations suivantes :

- Dans des conditions d'obscurité permanente, des cultures du *N. galligena*, sur milieu M23 liquide ou gélosé, sont incubées à 18 °C pendant 7, 10, 13 ou 17 jours après l'ensemencement. A la suite de chacun de ces pré-séjours, les lots culturaux sont transférés à 4 °C.
- . A la fin de l'expérience d'une durée de 35 jours, aucun de ces essais n'aboutit à la formation de structures sexuées.
- . Chez le *N. galligena* comme pour les *Leptosphaeria* photosensibles (LACOSTE, 1965), les basses températures (4 °C), malgré un développement mycélien optimal (pré-séjours à 18 °C), ne suffisent pas pour déclencher la sexualisation, en l'absence de lumière. Dans ce cas, l'effet d'un choc thermique ne se substitue donc pas aux irradiations lumineuses qui orientent le métabolisme sexué du *N. galligena*.

Des réactions différentes caractérisent *Hypomyces solani*, f sp, *cucurbitae* (HIX et BAKER, 1964) ou *Pleospora herbarum* (LEACH, 1971). Ces champignons photosensibles peuvent différencier des protopérithèces à l'obscurité lorsque leur traitement par le froid (4 °C-10 °C) survient à la suite de leur incubation à 21 °C durant 7 jours.

V. - CONCLUSIONS

Cette étude de l'influence thermique sur le développement *in vitro*, du *N. galligena* met en évidence :

- les capacités de fructification parfaite du champignon aux températures de 10 °C, 14 °C, 18 °C et 22 °C où une incubation constante à 18 °C stimule l'ensemble du processus sexué, si par ailleurs, l'environnement est favorable
- l'inhibition de la différenciation sexuée provoquée par des températures égales ou supérieures à 25 °C alors que cette valeur thermique satisfait normalement la croissance mycélienne et une importante conidiogenèse,
- les blocages possibles de l'évolution sexuée par des transferts à 25 °C de cultures pré-incubées à 18 °C durant des temps variables. Ainsi peut-on envisager une thermo-régulation particulière selon les stades de la morphogenèse sexuée :
 - . cryo-indifférence relative de la formation des primordiums et de l'ascosporogenèse,
 - . cryo-dépendance de la phase sporophytique et des cellules pro- ascales.

A ce niveau, des expériences et une étude cytologique ultérieures devraient nous permettre de préciser nos résultats.

- l'incapacité des basses températures à remplacer l'effet du photostimulus sur l'induction périthéciale,
- la coïncidence, à toutes les températures éprouvées, de la différenciation des premières ébauches sexuées avec l'arrêt de l'accroissement pondéral des thalles lorsque ceux-ci sont cultivés en présence de lumière.

Finalement, cette seconde partie de notre étude précise les conditions trophiques et thermiques de la reproduction sexuée *in vitro*, du *N. galligena* dont certaines exigences sont spécifiques vis à vis de celles suffisantes au développement végétatif ou asexué. Ainsi, certains éléments minéraux, carbonés ou azotés et l'équilibre carbone-azote du milieu où, des températures inférieures à 22 °C, représentent des facteurs limitants du déterminisme sexué, et, donc, de bons moyens d'étudier celui-ci.

Par ailleurs, la stérilité sexuée de toutes les cultures pratiquées à l'obscurité constante révèle la stricte photo-dépendance de la fructification parfaite du *N. galligena*.

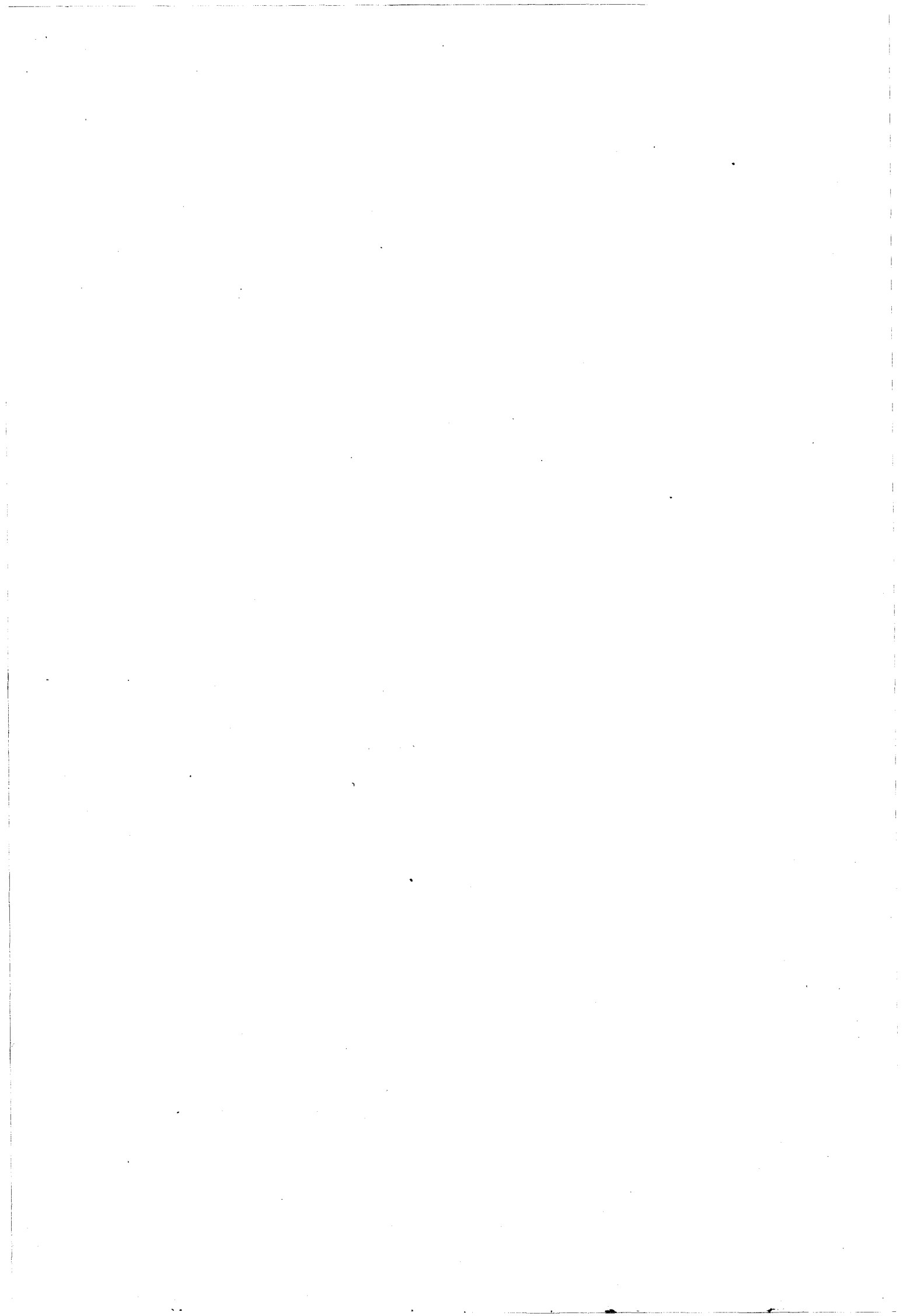
TROISIEME PARTIE

INFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LA REPRODUCTION SEXUEE DU *N. GALLIGENA*

Toutes nos expériences démontrent que, seules, les cultures du *N. galligena*, exposées à la lumière, différencient des ascocarpes fertiles. Aussi avons-nous tenté de définir les exigences lumineuses de la reproduction sexuée de ce Pyrénomycète placé dans des conditions génétiques, nutritives et thermiques favorables à sa sexualisation.

Au plan de cette troisième partie :

- un premier chapitre bibliographique décrit l'effet lumière chez les Ascomycètes et les hypothèses sur la photoreception fongique,
- un second chapitre est consacré à l'étude expérimentale de la photoinduction des périthèces du *N. galligena*.



C H A P I T R E I

EFFETS DE LA LUMIERE CHEZ LES ASCOMYCETES : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

Comme pour le *N. galligena*, la lumière influence le développement de nombreux organismes fongiques et fait partie de cet environnement dont tous les éléments conditionnent, de façon interdépendante, leur physiologie.

Les multiples aspects de l'activité lumineuse sont soulignés dans de nombreuses revues bibliographiques dûes principalement à : MARSH et al (1959), INGOLD (1962), CARLILE (1970), LEACH (1971a), DURAND (1976), TAN (1978), KUMAGAI (1980), SENGER (1982)...

Ces effets photoniques, très diversifiés, sur la croissance, la pigmentation, le phototropisme, les morphogénèses reproductrices, la libération et la germination des spores... sont mis en évidence dans tous les groupes fongiques notamment les Ascomycètes. Chez ces derniers, les réactions sexuées à la lumière nous ont plus particulièrement intéressés. Ainsi, avons-nous voulu analyser l'incidence des rayonnements lumineux sur la fructification parfaite des Ascomycètes en fonction de :

- la diversité des photoréponses,
- l'influence des paramètres lumineux,
- la nature (hypothèses) du photorécepteur.

Au préalable, nous pouvons constater que le terme photosporulation amalgame les effets de la lumière sur la formation de spores d'origine sexuée ou issues de la conidiogénèse. Notre étude ne mentionne pas, sans pour autant en ignorer la qualité, les travaux plus nombreux consacrés à l'influence de la lumière sur la sporulation conidienne. Celle-ci, de par ses origines, rôle ou déterminisme, ne peut être confondue avec la production d'ascospores résultant d'un développement sporophytique sexué.

Ainsi, chez le *N. galligena*, ces deux aspects de la propagation de l'organisme sont soumis à des contrôles génétique, nutritif ou thermique, très différents qui peuvent éventuellement interférer avec l'activité lumineuse. De fait, la conidiogénèse de ce champignon se révèle photo-indépendante.

I. - RÉACTIONS SEXUÉES À LA LUMIÈRE

1.- DIVERSITÉ DES PHOTORÉPONSES

En réponse aux irradiations lumineuses, la production finale d'ascocarpes fertiles traduit des réactions de :

- *photoinhibition* : la lumière empêche la formation de périthèces fertiles du *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1974)...
- *photoindifférence* : les espèces fongiques considérées différencient leurs ascocarpes en présence -ou non- d'éclairement : *Arachniotus albicans* (LACOSTE et DUJARDIN 1972), *Anthracobia* sp (ECHTLER et SHRANTZ, 1975), *Sporormiella* sp (ASINA et al, 1977), *Sordaria macrospora* (ESSER, 1980),...
- *photostimulation* : la lumière multiplie le nombre de périthèces fertiles qui peuvent néanmoins être présents à l'obscurité continue : certaines souches de *Leptosphaerulina trifolii* (LEACH, 1972), *Hypomyces solani* (QURESHI et PAGE, 1972), *Cochliobolus kusanoï* (WAKI et al, 1979),...
- *photoinduction* : la morphogénèse périthéciale de nombreuses espèces de *Leptosphaeria* (LACOSTE, 1965 ; ROQUEBERT-HUBERT et LACOSTE, 1971 ; ANDRIEU et al, 1980) ou de *Nectria* (HANLIN, 1961 ; LACOSTE et DEHORTER, 1973 ; PARKER, 1976 ; DEHORTER et PERRIN, 1983b) est strictement tributaire de l'éclairement.

2.- PHOTODEPENDANCE DES STADES SEXUES

Pour les Ascomycètes à reproduction sexuée photoinduite, les besoins lumineux varient :

- ils sont nécessaires au déroulement complet du processus de fructification : *Hypomyces solani* f. *cucurbitae* (CURTIS, 1964 ; TOUSSOUN et WEINHOLD, 1967) ou *Leptosphaeria avenaria* (HOGENSON et HOSFORD, 1971).

- ils ne sont requis que pour certaines séquences morphogénétiques :

* la lumière apparait indispensable à la constitution des ébauches sexuées dont la maturation peut se réaliser à l'obscurité : *Diaporthe phaseolarum* (TIMNICK et al, 1951), *Pleurage setosa* (CALLAGHAN, 1962), certaines souches de *Leptosphaerulina* (LEACH, 1972), *Cochliobolus sativus* (TINLINE et DICKSON, 1958) ou de *Pyronema domesticus* (MOORE-LANDECKER, 1979a). En outre, pour ces deux derniers organismes, des irradiations, prolongées au delà de la phase initiale de photoinduction des primordiums, gênent l'ascosporogénèse,

* chez d'autres champignons, la photodépendance se situe à la maturation des périthèces tandis que le début de leur différenciation s'accomplit à l'obscurité : *Leptosphaerulina briosiana* (MARTINEZ et HANSON, 1963 ; LEATH, 1971), *Cochliobolus kusanoï* (WAKI et al, 1979),

* enfin, la lumière peut modifier la décharge des ascospores (BROOK, 1975) ou leur germination (BRAGG, 1981).

II. - RÔLE DES DIFFÉRENTS PARAMÈTRES LUMINEUX

Chez les Ascomycètes à reproduction sexuée photosensible, l'efficacité des éclaircissements requis est fonction de leurs durée, intensité, qualité et moment d'application.

Si l'interférence de ces paramètres rend délicate toute analyse de leur rôle particulier ; il nous semble, néanmoins, que l'activité d'un photostimulus dépende, en premier lieu, de son absorption par un système photorécepteur fonctionnel et donc, respectivement de ses nature (λ) et intervention à un stade biologique précis, ensuite ses durée et intensité modulent son rendement morphogénétique. Les divers exemples, choisis ci-dessous, reflètent l'inter-action de ces facteurs et ... l'arbitraire de notre plan d'étude.

1.- MOMENT D'APPLICATION, DUREE ET INTENSITE DES ECLAIREMENTS

L'activité des irradiations lumineuses sur la sexualisation des Ascomycètes peut varier selon :

a) Le moment d'application du photostimulus

Les photoréponses sexuées de certains Ascomycètes dépendent précisément du moment d'application de la lumière. Celui-ci, fonction d'un état particulier de la croissance mycélienne, conditionne alors la durée et l'intensité des éclairagements.

Ainsi diverses expériences démontrent l'inutilité de tout éclairagement qui affecterait des thalles dont le développement cultural serait inférieur à : 18 heures pour *Sordaria fimicola* (SURAPIPTH et LINDENMAYER, 1969), 30 heures pour *Gelasinospora reticulospora* (INOUE et FURUYA, 1974a), 36 heures pour *Pyronema domesticus* (MOORE-LANDECKER, 1979b), 5 à 6 jours pour *Gibberella zeae* (TSCHANZ et al., 1976) 7 à 9 jours pour *Nectria ditissima* (DEHORTER et PERRIN, 1983b) ou encore 20 jours pour *Podosordaria leporina* (KOEHN, 1971).

Durant ces périodes initiales d'incubation, dont la durée est fonction de la vitesse et des conditions de croissance des Champignons, les irradiations lumineuses se révèlent dénuées d'activité stimulatrice et sont même, parfois, inhibitrices de la photoinduction ultérieure des ascocarpes. Dans ce cas, pour les trois premiers organismes cités ci-dessus, l'efficacité biologique des éclairagements est subordonnée à leur application sur des mycéliums uniquement pré-cultivés à l'obscurité totale ("inductive dark period").

Ainsi, chez *Pyronema domesticus*, MOORE-LANDECKER peut provoquer par des illuminations de diverses durées : 6, 12 et 36 heures, la photoinduction de séquences morphogénétiques différentes, respectivement : les apothécies, le "tissu" ascogène puis les asques. Ces résultats sélectifs exigent un maintien préalable (36 heures) des cultures à l'obscurité.

D'autres expérimentateurs démontrent l'efficacité d'éclairagements qui touchent un mycélium jeune en voie de croissance (STEVENS, 1928 ; CALLAGHAN, 1962 ; LACOSTE, 1965) et, inversement, leur inactivité lorsqu'ils sont trop tardifs. Des microirradiations rendent compte que seules les hyphes mycéliennes à contenu protoplasmique dense sont photosensibles (INOUE et FURUYA, 1978).

Dans leur ensemble, ces résultats nous suggèrent que la photoinduction requiert un développement gamétophytique préalable qui, de par sa constitution, peut assurer l'absorption lumineuse mais surtout les conséquences métaboliques de celle-ci qui seront à l'origine de la morphogénèse sexuée.

b) La durée et l'intensité des éclairements

Souvent, des éclairements, faibles en durée et en intensité mais répétés, paraissent biologiquement plus efficaces qu'un bref et unique photostimulus, hautement énergétique (BINDER et LILLY, 1976) mais susceptible de causer la saturation du système photorécepteur.

Cependant les exigences lumineuses varient selon les organismes dont les réactions sexuées, à la lumière blanche, sont favorisées :

- soit par un éclairement continu : *Hypomyces solani* (CURTIS, 1964), *Leptosphaerulina briosiana* (LEATH, 1971)
- soit par une nécessaire alternance de périodes illuminées et obscures : *Diaporthe phaseolarum* (TIMNICK et al, 1951), *Gelasinospora reticulospora* (TYLUTKI, 1958), *Leptosphaeria* sp (LACOSTE, 1965)
- soit par des intensités très différentes qui, faibles ($10 \mu\text{Wcm}^{-2}$), déclenchent la fructification parfaite du *Nectria ditissima* ou qui, plus élevées ($150 \mu\text{Wcm}^{-2}$), induisent celles d'*Hypomyces solani* (BAKER, 1956) ou d'*Ophiobolus graminis* (WESTE, 1970a). Sommairement, nous pouvons constater que les éclairements optimaux du processus sexué varient de 80 à $800 \mu\text{Wcm}^{-2}$, au delà de cette dernière valeur, des effets répressifs ou inhibiteurs se produisent.

Enfin, les photopériodes et les valeurs des éclairements, nécessaires à la reproduction sexuée, dépendent étroitement de la nature de la lumière appliquée aux cultures fongiques, comme le démontrent certains résultats décrits dans le paragraphe suivant.

2.- QUALITE DE LA LUMIERE

Ce paramètre module l'énergie lumineuse nécessaire à la formation des structures reproductrices. En outre, il présente un intérêt tout particulier qui fournit les premières indications sur la nature du système photorécepteur.

● La nature de la lumière conditionne les durée et intensité des éclairements. Ainsi, l'induction périthéciale du *Pleospora herbarum* (LEACH, 1963) s'opère en quelques secondes sous un éclairement à la longueur d'onde 238 nm, mais ne s'accomplit qu'après 6 heures sous la radiation 404 nm. Dans ce cas, comme pour le *Nectria haematococca* (CURTIS, 1964) ou chez *Mycosphaerella ligulicola* (Mc COY et al, 1972), des doses énergétiques croissantes peuvent palier corrélativement la relative inefficacité de certaines radiations sur le processus sexué. Ainsi, la reproduction parfaite du *Pleospora herbarum* (LEACH et TRIONE, 1966) dépend d'une augmentation des intensités lumineuses de 50 à $500 \mu\text{Wcm}^{-2}$ si la qualité du rayonnement varie de 230 à 320 nm.

D'une manière plus générale, des irradiations plus brèves et moins énergétiques sanctionnent le rendement biologique des faibles longueurs d'onde ainsi :

- quelques secondes à cinq minutes de rayonnement ultra-violet ($\lambda < 300 \text{ nm}$) suffisent à la sexualisation du *Glomerella cingulata* (STEVENS, 1928) ou du *Diaporthe phaseolarum* (TIMNICK et al, 1951),
- douze, 72 et 132 heures de lumière blanche sont nécessaires à la formation des périthèces, respectivement, d'*Ophiobolus graminis* (WESTE, 1970b), du *Nectria haematococca* (DIETERT et al, 1983) et de *Podosordaria leporina* (KOEHN, 1971).

● La qualité des éclairagements, actifs sur la fructification parfaite des Ascomycètes, permet de partager ceux-ci en trois groupes de photosensibilité particulière soit :

- aux longueurs d'onde ultraviolettes lointaines (UV : $200 \text{ nm} < \lambda < 300 \text{ nm}$), et proches (N UV : $300 \text{ nm} < \lambda < 380 \text{ nm}$),
- aux radiations proche-ultraviolettes violettes et bleues comprises entre 300 nm et 520 nm ,
- aux régions du spectre visible même supérieures à 560 nm .

a) Réponses sexuées aux ultra-violets (UV)

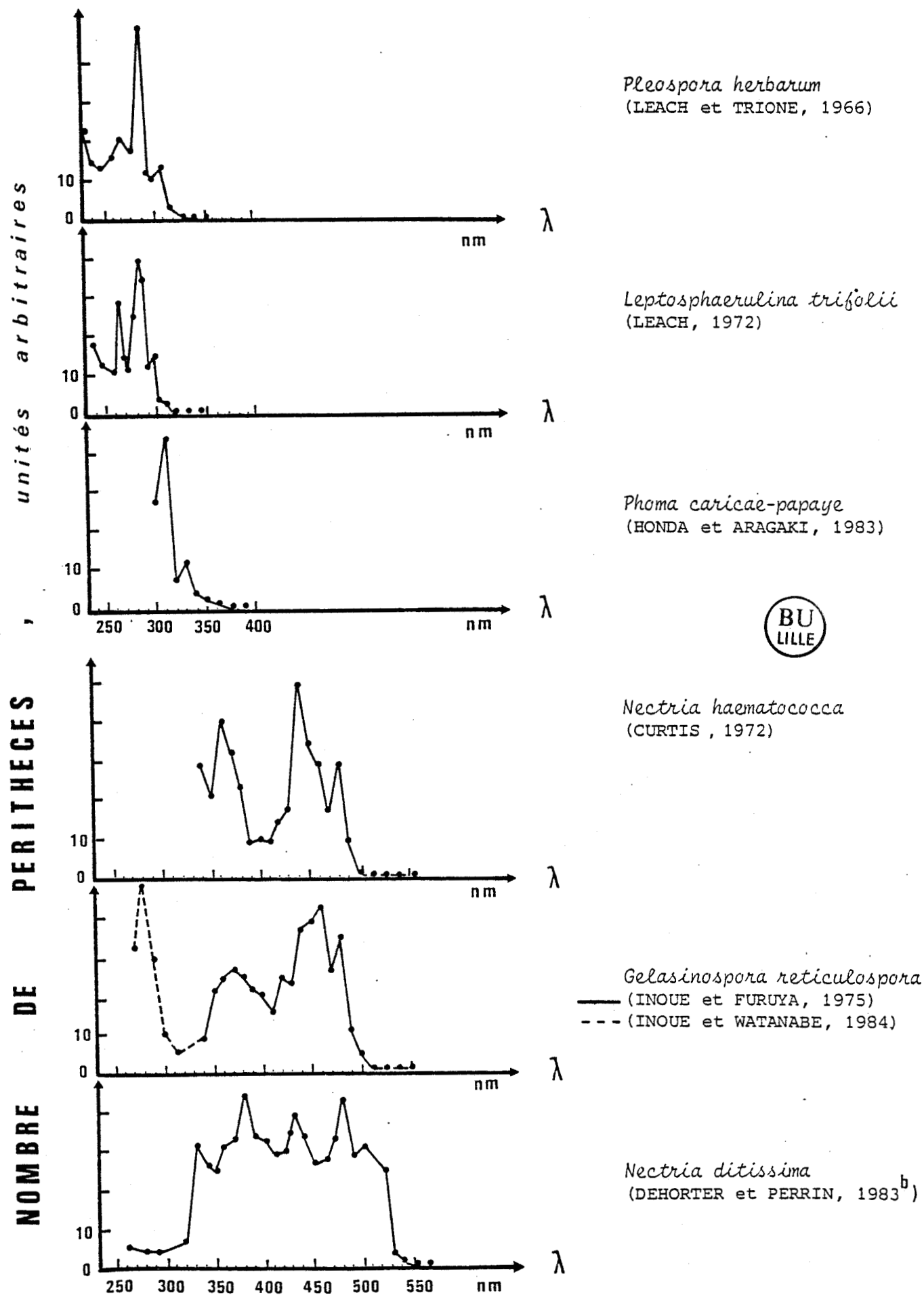
C'est uniquement, sous l'effet de l'ultra-violet ($200 \text{ nm} < \lambda < 300 \text{ nm}$) que les champignons *Glomerella cingulata* (STEVENS, 1928), *Diaporthe phaseolarum* (TIMNICK et al, 1951) ou *Gibberella zeae* (TSCHANZ et HORST, 1976) forment des ascocarpes fertiles. Plus précisément, la dépendance spectrale de la sexualisation (fig.15) du *Pleospora herbarum* (LEACH et TRIONE, 1966), des *Leptosphaerulina briosiana* (LEATH, 1971) et *L. trifolii* (LEACH, 1972) ou d'une souche de *Phoma caricae-papaye* (HONDA et ARAGAKI, 1983) confirme que l'induction ou la maturation sexuée de ces espèces exigent des radiations UV inférieures à 380 nm , cependant les pics d'activité maximale différent selon les souches.

La conidiogenèse de nombreux champignons imparfaits, dépend aussi de cette zone spectrale qui peut affecter, de manière semblable, les deux formes de multiplication, asexuée et sexuée, d'un même organisme.

b) Réponses sexuées aux radiations proche UV, violettes et bleues

La production périthéciale reflète l'activité des éclairagements monochromatiques de 300 à 520 nm . Cet intervalle spectral favorise, plus particulièrement, la formation des ascocarpes fertiles de *Pleurage setosa* (CALLAGHAN, 1962), d'*Ophiobolus graminis* (WESTE, 1970b), de *Podosordaria leporina* (KOEHN, 1971), de divers *Leptosphaeria* graminicoles (ROQUEBERT-HUBERT et LACOSTE, 1971) ou

Figure 15 : Dépendance spectrale de la sexualisation de divers Ascomycètes.



de *Pyricularia oryzae* (YAEGASHI et HEBERT, 1976) où les radiations, respectivement, 440nm, 390-450nm, 450nm, 360nm (lumière de WOOD), 300-470 nm sont optimales.

L'influence de ces radiations proche UV, violettes et bleues, sur la différenciation périthéciale du *Nectria haematococca* (CURTIS, 1972), du *Nectria ditissima* (DEHORTER et PERRIN, 1983b) se traduit par une dépendance spectrale de leur sexualisation très similaire (fig. 15) notamment au niveau des pics proches de 370nm, 420nm et 480nm.

Ce type de réponses ("blue light responses") aux radiations de 300 à 520nm s'observe pour de nombreuses réactions biologiques tant chez les champignons (DURAND, 1976) que pour d'autres organismes végétaux (The blue light syndrome, SENGER, 1980).

c) Réponses sexuées aux longueurs d'onde visibles (400nm λ <math><700\text{nm}</math>)

Cette influence des radiations visibles s'exerce sur la reproduction sexuée de certains Pyrénomycètes comme en témoignent les travaux de WINSTEAD et al (1966), de HOGENSON et HOSFORD (1971) ou de Mc COY et al (1972). Ils rapportent que les radiations bleues (400 λ <math><490\text{nm}</math>) mais aussi vertes et rouges comprises entre 500 et 700nm induisent des périthèces fertiles de *Glomerella magna*, *Leptosphaeria avenaria* ou *Mycosphaerella ligulicola*.

Ces dernières données élargissent considérablement le domaine spectral efficace sur la sexualisation des Ascomycètes et rendent plus complexes les hypothèses sur la nature du système photorécepteur.

Enfin, il nous paraît important de souligner que la photoinduction sexuée ne se réalise que si des conditions génétiques, nutritives, thermiques, gazeuses, ... optimales sont simultanément réunies. Dans des cas particuliers, la lumière nécessaire à la sexualisation peut être remplacée, par une contribution d'origine trophique : cas de divers substrats naturels à l'exemple du milieu hôte pour le *Leptosphaeria typhae* (LACOSTE, 1965), thermique : cryo-induction du *Pleospora herbarum* (LEACH, 1971b) ou gazeuse : aération forcée des cultures du *Pyronema domesticus* (MOORE-LANDECKER et SHROPSHIRE, 1982).

III. - LE PROBLÈME DE LA PHOTORÉCEPTION

Les strictes exigences lumineuses de la différenciation sexuée de certains Ascomycètes soulèvent de nombreux problèmes ; parmi ceux-ci, la nature du système photorécepteur et les réactions photochimiques initiales demeurent encore énigmatiques.

Les hypothèses sur l'identité du photorécepteur, basées usuellement sur les spectres d'activité des longueurs d'onde, sont très diverses en raison même de l'étendue du domaine spectral, de 200 à 750nm, impliqué dans les réactions fongiques. Ces suppositions font surtout référence à des composés qui seraient capables d'absorber spécifiquement des radiations ultraviolettes, bleues ou supérieures à 520nm suivant les trois types principaux de photoréponse sexuée distingués précédemment.

Pour comprendre les diverses réactions des champignons à la lumière, les auteurs suggèrent l'existence d'un cryptochrome dont l'identité supposée varie : "P310", carotènes ou flavines, mycochrome,...

1.- "P310": COMPOSE PHOTORECEPTEUR

Les spectres d'action des radiations ultra-violettes de 230 à 380nm sur la sexualisation d'Ascomycètes ou la conidiogenèse d'Adéomycètes présentent de remarquables similitudes, notamment des pics d'activité maximale proches de 300nm. De ce fait, les auteurs principaux (LEACH, 1965 ; TRIONE et LEACH, 1969) admettent l'intervention d'un photorécepteur commun qu'ils identifient à un composé mycélien "P310" dont le spectre d'absorption (λ_{max} : 310nm) rappelle les longueurs d'onde biologiquement actives. La vaste répartition du P310 et sa prépondérance dans les mycéliums irradiés fertiles confortent l'idée de son éventuelle activité dans les mécanismes de l'absorption lumineuse. Les nombreuses données propres au "P310" ou mycosporine (ARPIN et al, 1977), que nous détaillerons ultérieurement, semblent démontrer que cette molécule n'exerce pas un rôle direct dans la réception des ultra-violets.

2.- NATURE CAROTENOÏDIQUE OU FLAVOPROTEÏQUE DU PHOTORECEPTEUR

Les réponses fongiques ou certaines réactions physiologiques chez les végétaux supérieurs qui dépendent des longueurs d'onde proche UV-bleues ($330nm < \lambda < 520nm$) mettraient en jeu un système photo-récepteur de type carotène ou flavine. Celui-ci serait donc à l'origine des photo-réponses dites "bleues" (TAN, 1978) qui intéressent notamment la reproduction sexuée des Ascomycètes.

Les arguments développés en faveur de la nature caroténoïdique ou flavinique du cryptochrome reposent sur trois types d'expérimentation.

a) Comparaison des spectres d'absorption et d'activité biologique

À l'origine, les auteurs se basent sur certaines analogies entre les spectres d'absorption des carotènes ou des flavines et ceux des réponses biologiques. Ces derniers, limités de 330nm à 520nm, présentent, généralement, deux

pics majeurs proches de 370nm et 450nm et deux pics secondaires voisins de 430nm et 480nm. Un tel profil spectral suggère, de par son efficacité maximale, soit dans le proche UV (370nm) bleu (450), soit dans la région bleue (450 nm, 450nm, 480nm), la participation respective des flavines ou des carotènes au niveau du système photorécepteur.

En fait, selon SCHMIDT (1980), les spectres d'absorption de certains caroténoïdes (cis β carotène, phytofluène) ou flavoprotéines, par suite de modifications liées à des réarrangements moléculaires ou associations pigmentaires *in vivo*, suggèrent que ces deux classes de composés peuvent, séparément, rendre compte des spectres d'activité physiologique. Ceux-ci ne suffisent donc pas à l'identification des molécules photoabsorbantes.

b) Contenu pigmentaire des thalles

Dans ce cas, sont recherchées des corrélations entre les variations des concentrations intra-mycéliennes de ces deux "pigments" et les modifications de la photosensibilité des organismes.

Ces études sont généralement basées sur l'emploi d'inhibiteurs de biosynthèse des carotènes (telle la diphénylamine) ou des flavines (telle l'atébrine) ou l'utilisation des souches mutantes "albinos" ou à très faible contenu pigmentaire (PAIETTA et SARGENT, 1981).

Dans ce sens, l'absence de carotènes chez un mutant "albinos" de *Pyronema confluens* n'empêche pas la sexualisation de cette souche (CARLILE et FRIEND, 1956). Par contre, l'action de l'atébrine peut inhiber la formation des périthèces du *Nectria haematococca* (TSCHABOLD, 1967). Dans l'ensemble ces résultats sont cependant très contradictoires et, souvent mis en doute par :

- la non spécificité des agents inhibiteurs,
- l'existence possible d'une quantité résiduelle de substances photoréceptrices techniquement indécélable mais théoriquement suffisante pour assurer l'absorption lumineuse.

c) Changements d'absorbance du mycélium

La mise en évidence de changements d'absorbance du thalle, après son illumination par des éclaircissements proche UV-bleus, démontre que les spectres d'efficacité des radiations incidentes sur les modifications de densité optique mycélienne et sur les réponses biologiques sont similaires (MUÑOZ et BUTLER, 1979).

Ces recherches récentes s'appliquent à divers processus photosensibles (carotenogénèse-rythme de conidiogénèse) chez *Neurospora*, *Phycomyces*, ... Elles

ne font pas, actuellement, référence à la photoinduction sexuée des Ascomycètes dépendante, cependant, des mêmes radiations que les réactions biologiques analysées. Les résultats obtenus, dans ces conditions, mettent en évidence le rôle déterminant des flavines dans la photoréception puis dans la photoréduction des cytochromes b et c qui représente une réaction primaire consécutive à l'absorption lumineuse (SENGER et BRIGGS, 1981).

En conclusion, TAN (1978) et SCHMIDT (1980) résument les arguments favorables -ou non- à la nature caroténoïdique ou flavinique du photorécepteur et admettent que celui-ci est, plus probablement, une flavoprotéine liée au plasmalemme.

3.- MYCOCHROME P_B - P_{NUV}

Des radiations lumineuses, de qualité identique à celles étudiées précédemment ($330 < \lambda < 520 \text{nm}$), entraînent, chez certains champignons, des réactions à effets d'inhibition ou d'induction réversible et définies comme photoréponses réversibles proche UV-bleues (TAN, 1978). Celles-ci, qui contrôlent la conidiogenèse de divers Deutéromycètes, invoquent la présence d'un système photorécepteur appelé, par KUMAGAI (1978, 1980) mycochrome P_B ("pigment bleu")- P_{NUV} ("pigment proche UV").

Ainsi, la formation des conidies d'*Alternaria tomato* ou d'*Helminthosporium oryzae* (KUMAGAI, 1982) est réduite par des radiations bleues (385nm, 400nm, 447nm, 480nm). Cette inhibition est levée par des expositions proche UV (300 à 320 nm) si celles-ci succèdent immédiatement à l'éclairement bleu défavorable, cette alternative pouvant se répéter. Les effets de ces deux lumières sont réciproquement réversibles et la sporulation dépend, finalement, de la qualité du dernier éclairement reçu.

Plus précisément, KUMAGAI (1978) démontre que des fractions acellulaires du mycélium d'*Alternaria tomato*, soumises successivement à des irradiations bleues puis proche UV, présentent corrélativement des changements de densité optique. Ceux-ci, réversibles et spécifiques de la nature du rayonnement incident terminal, expriment des réactions alternes de photo-oxydo-réduction au niveau de deux pigments P_B et P_{NUV} qui absorbent, respectivement, les radiations bleues et proche ultra-violettes. Ils constituent le mycochrome qui est mis en jeu dans ce type de photocontrôle biologique. Aucune expérience ne définit, à ce jour, l'intervention d'un tel système photorécepteur dans le processus sexué des Ascomycètes.

4.- IDENTITE DU CRYPTOCHROME : AUTRES HYPOTHESES

Les photoréponses fongiques obtenues sous l'effet d'éclaircements visibles de 400 à 750 nm suggèrent aux auteurs que l'absorption lumineuse pourrait être assurée soit :

- par un système de pigments énergétiquement associés comprenant vraisemblablement des caroténoïdes seuls ou liés à une flavine et à une porphyrine (JEREBZOFF et JACQUES, 1969 ; PREVOST-MONNOT, 1974 ; DURAND, 1975)
- par un phytochrome RC-RS (TAN, 1974) lorsque d'une manière analogue aux Végétaux supérieurs, les réactions fongiques dépendent, plus particulièrement, des radiations rouges claires (RC) et sombres (RS)

En définitive, il est admis que l'exacte identification du (des) photorécepteur(s) n'est pas encore effective (PAIETTA et SARGENT, 1983) et que, dans ce but, les recherches ne se fondent pas sur la photoinduction sexuée des Ascomycètes. Celle-ci révèle, par ailleurs, la diversité des exigences lumineuses selon les espèces fongiques étudiées, mais diversité encore amplifiée par les conditions culturales et les moyens techniques disponibles.

C H A P I T R E I I

CONDITIONS LUMINEUSES DE LA REPRODUCTION SEXUÉE DU *N. GALLIGENA*

Nous avons tenté de préciser la photodépendance de la fructification parfaite du *N. galligena* par :

- différents modes d'éclairement en lumière blanche pour déterminer les besoins lumineux minima et optima des principales phases du processus sexué,
- des radiations monochromatiques afin de définir l'effet inducteur des différentes longueurs d'onde (dépendance spectrale de la sexualisation)
- des comparaisons de divers spectres d'absorption d'origine mycélienne et celui de la réponse sexué pour supposer une explication de la photoréception ou un moyen d'étudier celle-ci.

Toutes les expériences, d'une durée minimale de 30 jours, sont effectuées sur milieu synthétique M23, gélosé ou liquide, à la température constante de 18 °C.

I. - INFLUENCE DE LA LUMIÈRE BLANCHE

Pour cette expérimentation, tous les éclairagements sont réalisés en lumière blanche et l'énergie du flux lumineux, sauf pour la dernière manipulation, est toujours égale à $750 \mu\text{Wcm}^{-2}$, au niveau des cultures.

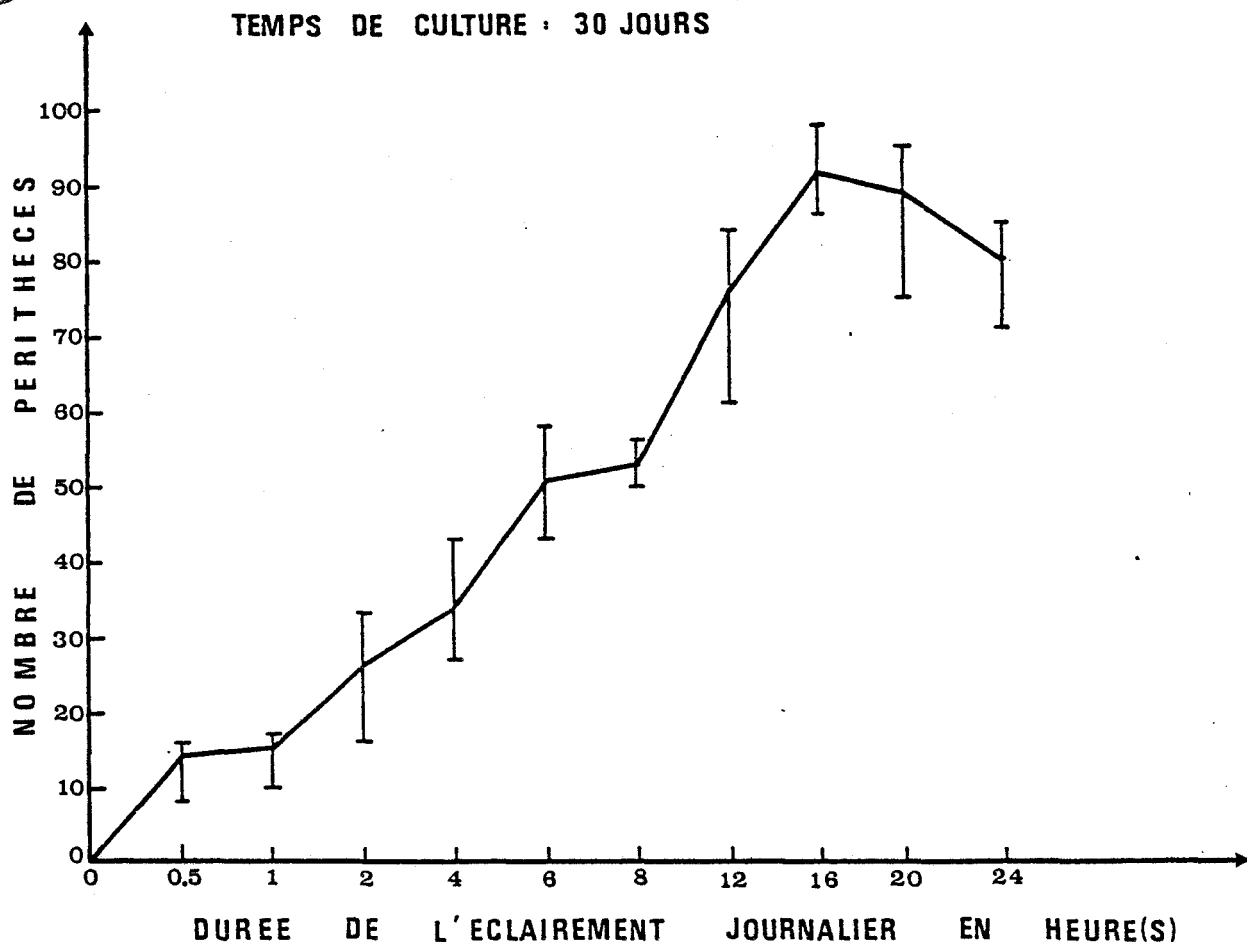
Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication parue au Canadian Journal of Botany (DEHORTER et LACOSTE, 1980.)

1.- INFLUENCE DE LA DUREE JOURNALIERE D'ECLAIREMENT

Durant 30 jours, les cultures du *N. galligena* sont éclairées quotidiennement durant 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 12 ; 16 ; 20 et 24 heures. Parallèlement à ces essais, une série culturale est maintenue à l'obscurité constante.

La production périthéciale qui résulte de ces diverses conditions lumineuses est représentée par la figure 16.

Figure 16. : Influence de la durée de l'éclairage journalier sur la reproduction sexuée du *N. galligena* cultivé à 18°C sur milieu synthétique M23 gélosé.



Ces résultats confirment que le développement du *N. galligena* à l'obscurité permanente entraîne sa stérilité sexuelle et donc que sa fructification parfaite est strictement photodépendante.

L'induction périthéciale nécessite, globalement, peu de lumière, au total, 15 heures d'irradiation, à raison d'une demi-heure par jour, peuvent déclencher la formation d'ascocarpes matures. Le rythme optimal d'éclairement est représenté par une alternance journalière de 16 heures de lumière et de 8 heures d'obscurité.

D'autre part, on constate que la lumière continue n'engendre qu'une très légère diminution de la production périthéciale, sans rapport avec la forte régression observée, dans ce cas, chez le *Leptosphaeria typhae* (VIDAL, 1983) par exemple.

Dans la suite de ce travail et pour des raisons matérielles, les cultures sont, le plus souvent, éclairées selon un rythme nyctéméral de 12 heures et non pas, logiquement, d'après le résultat précédent, durant 16 heures par jour.

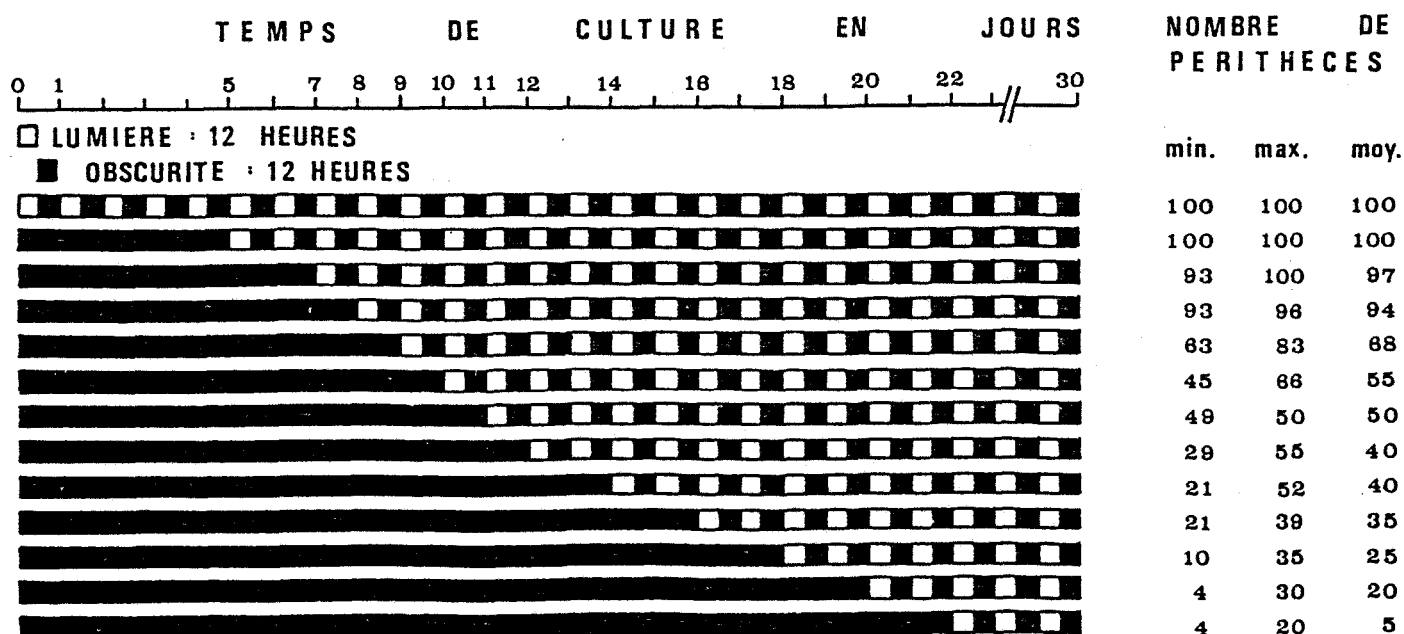
2. INFLUENCE DE LA DUREE D'UN PRE-SEJOUR OBSCUR

Dès l'inoculation, les cultures sont placées à l'obscurité permanente durant : 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20 ou 22 jours. A l'une de ces périodes, le champignon est éclairé quotidiennement jusqu'au terme de l'expérimentation : soit 30 à 40 jours.

La figure 17 illustre les résultats obtenus.

BU
LILLE

Figure 17. : Influence de la durée d'un pré-séjour des cultures à l'obscurité constante sur la reproduction sexuée du *N. galligena*, incubé à 18 °C sur milieu synthétique M23 gélosé.



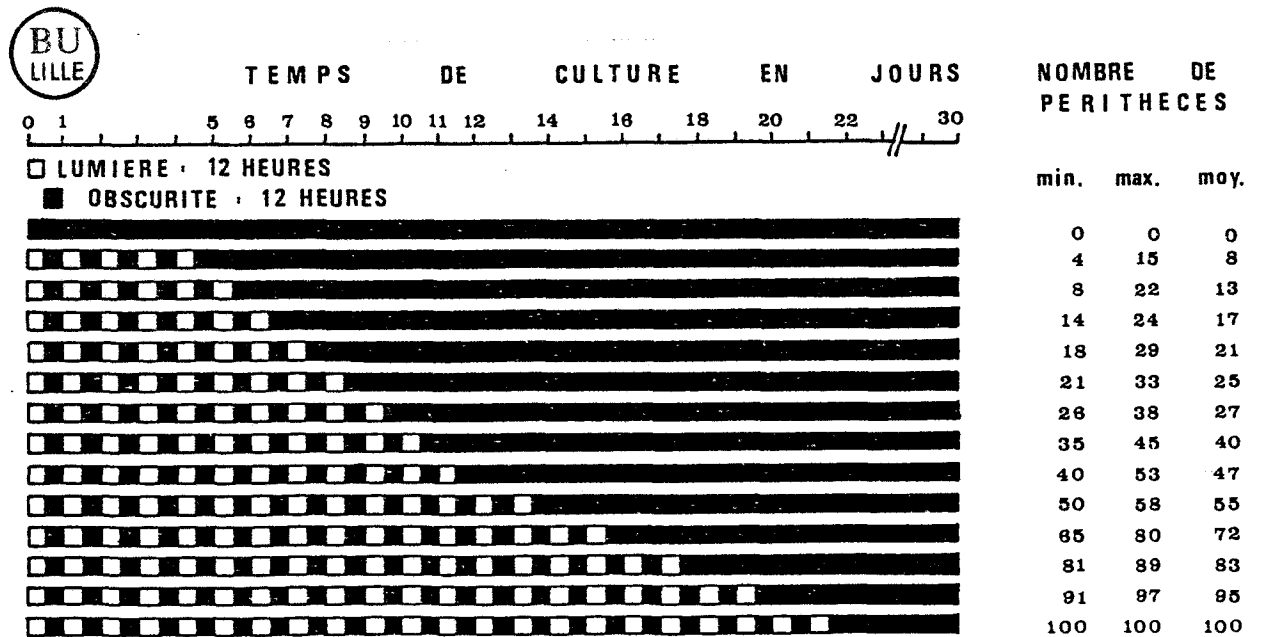
La figure 17 démontre que le nombre d'ascocarpes demeure important dans les cultures maintenues, initialement, 8 jours ou moins à l'obscurité totale et que, par la suite, il diminue graduellement avec l'allongement du pré-séjour obscur. Une durée de celui-ci égale à 11 jours réduit de moitié la production périthéciale par rapport à la réponse sexuée optimale.

3.- INFLUENCE DE LA DUREE D'UN PRE-SEJOUR ECLAIRE

Après l'ensemencement, les cultures sont soumises à un certain nombre (5,6,7,8,9,10,11,12,14,16,18,20 ou 22) de photopériodes journalières de 12 heures puis elles achèvent de se développer à l'obscurité continue.

Après 30 jours, les nombres d'ascocarpes fertiles ainsi obtenus sont reportés dans la figure 18.

Figure 18. : Influence de la durée d'un pré-séjour éclairé sur la reproduction sexuée du *N. galligena* cultivé à 18 °C sur milieu synthétique M23 gélosé



Les résultats, reportés dans la figure 18, font apparaître que des éclaircissements très précoces, sont fort peu efficaces en raison probablement d'une croissance mycélienne insuffisante.

L'augmentation, de 14 à 22, du nombre de photopériodes double la quantité d'ascocarpes fertiles qui devient optimale après 22 jours d'irradiation.

On remarque que le cycle sexué complet, d'une durée de 30 jours, peut s'achever sans application lumineuse directe si celle-ci intervient et dure, préalablement, de façon satisfaisante.

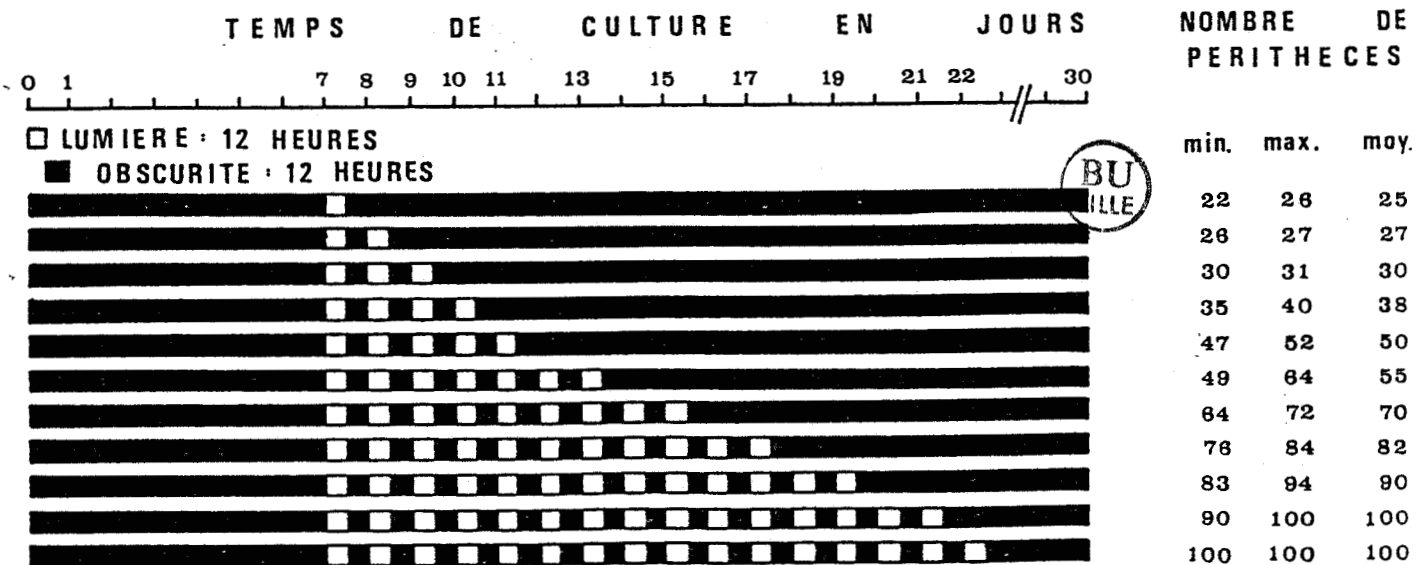
Compte tenu des résultats présentés dans les figures 17 et 18, il semble que, chez le *N. galligena*, la période de développement comprise entre les 7ème et 22ème jours soit très propice à l'action d'un photostimulus. L'expérience suivante a été conçue dans le but de vérifier ce point.

4.- INFLUENCE D'UN NOMBRE LIMITE DE PHOTOPERIODES (12hL/jour)

Le séjour initial à l'obscurité constante des cultures est interrompu à partir du 7ème jour par des éclaircissements quotidiens de 12 heures. Le nombre de ces photopériodes varie de 1 à 16 selon les cas. A la fin de la séquence d'irradiation, les cultures sont replacées à l'obscurité totale.

La figure 19 exprime les variations de la production périthéciale du *N. galligena* exposé à ces conditions.

Figure 19.: Influence d'un nombre limité de photopériodes (12hL/jour), appliquées à partir du 7ème jour, sur la reproduction sexuée du *N. galligena* cultivé à 18 °C sur milieu synthétique M23 gélosé.



Ces résultats (Fig. 19) confirment la photosensibilité du *N. galligena* entre les 7ème et 22ème jours de son développement où l'accroissement des nombres de photopériodes et d'ascocarpes vont de pair.

La production périthéciale (25 %) obtenue d'un seul éclaircissement de 12 heures au 7ème jour dépasse celle induite (17-21 %) à la suite d'un pré-séjour à la lumière de 7 jours (Fig. 18). Cette régression n'est, cependant, pas comparable aux effets d'inhibition sexuée causés par des éclaircissements précoces et observés chez *Gelasinospora reticulospora* (INOUE et FURUYA, 1974b) ou *Pyronema domesticus* (MOORE-LANDECKER, 1979b). Chez le *N. galligena*, cette diminution du nombre d'ascocarpes fertiles semble résulter d'un état de moindre réceptivité du thalle conditionné par une vitesse de croissance mycélienne plus faible à la lumière qu'à l'obscurité permanente (Fig. 14).

Enfin, les trois séries expérimentales (Fig. 17, 18 et 19) corroborent le fait d'une plus grande efficacité inductrice des irradiations données entre les 7ème et 12ème jours de développement par rapport à celle, inférieure de moitié, des photopériodes appliquées du 12ème au 22ème jour.

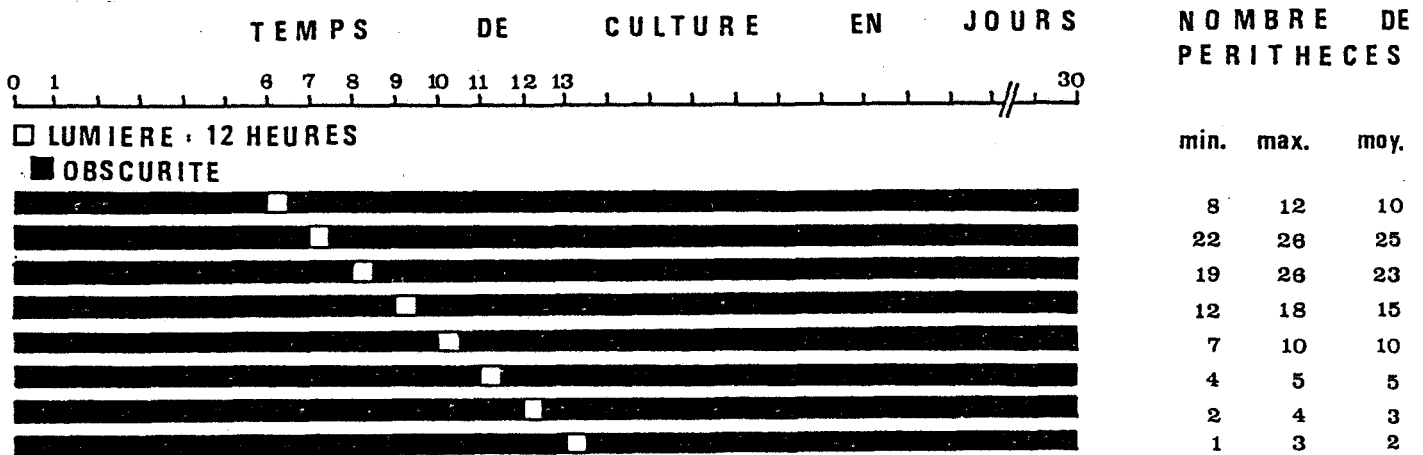
5.- INFLUENCE DU MOMENT D'APPLICATION D'UN SEUL ECLAIREMENT DE 12 HEURES

Durant les 30 jours de leur incubation à l'obscurité permanente, les cultures ne reçoivent qu'un seul éclaircissement de 12 heures. Cette irradiation unique intervient à l'un des journées comprises entre le 6ème et le 13ème jour après l'inoculation.

La figure 20 rend compte des nombres d'ascocarpes fertiles obtenus.

Les résultats (Fig. 20) montrent que le *N. galligena* manifeste un maximum de photoréceptivité dès le 7ème-8ème jour de son développement sur milieu solide et que 12 heures de lumière suffisent alors au déclenchement de la reproduction sexuée.

Figure 20. : Influence du moment d'application d'un éclaircissement unique de 12 heures sur la reproduction sexuée du *N. galligena*, cultivé à 18 °C sur milieu M23 gélosé.



BU
LILLE

Ces données traduisent, à nouveau, les faibles exigences lumineuses du champignon. Par rapport aux 30 heures de lumière fournies à raison de 1 heure par jour (fig. 16), un photostimulus unique de 12 heures induit de très nombreuses ébauches périthéciales et plus d'ascocarpes. Mais, ces derniers montrent, à l'examen microscopique, un plus petit nombre d'asques matures et un col périthécial très réduit ou absent.

CONTROLE DE CES RESULTATS EN MILIEU LIQUIDE

Des expériences identiques, réalisées en culture liquide permettent de situer aux 9ème et 10ème jours la période optimale d'application d'un seul éclaircissement dont la durée égale 24 heures.

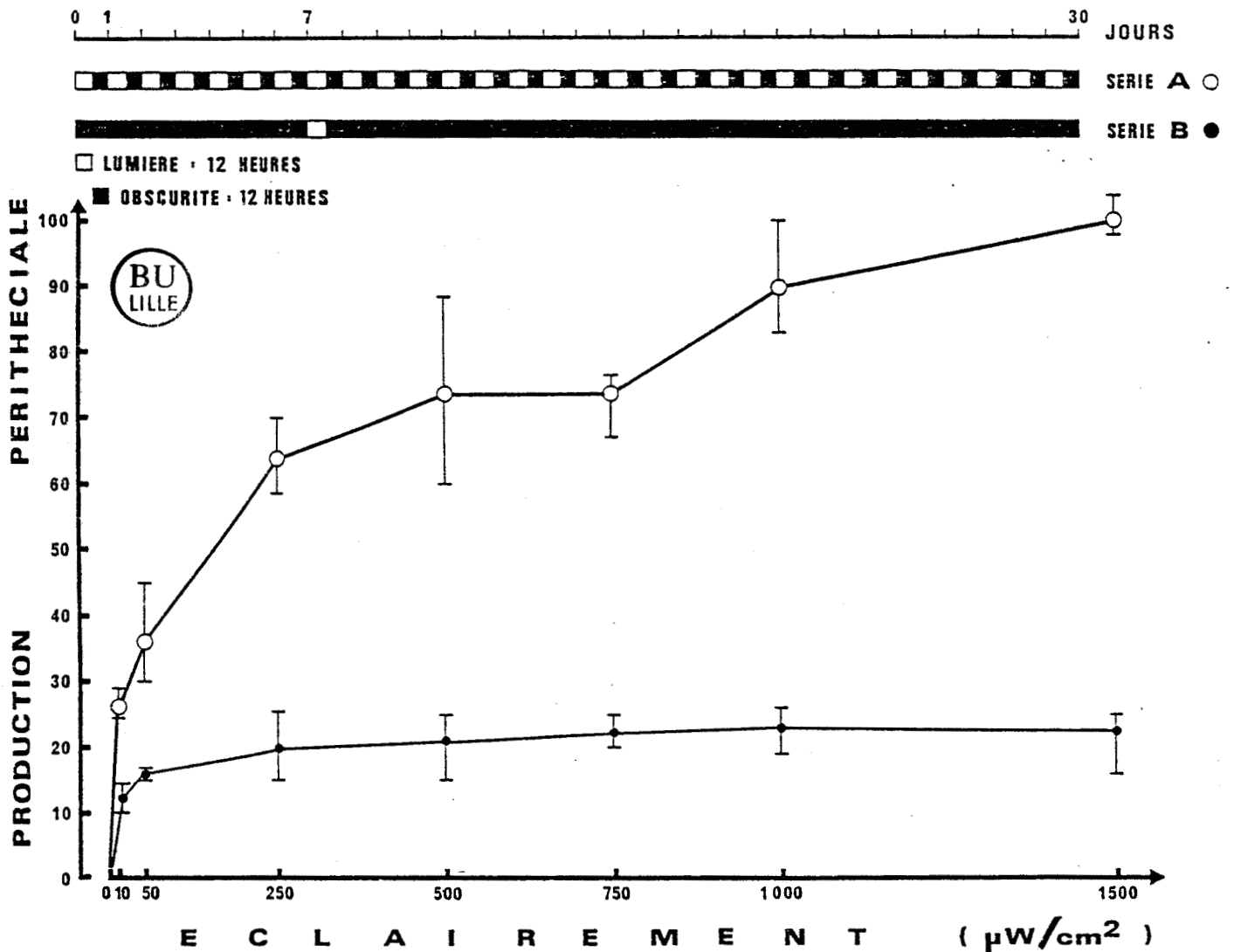
6.- INFLUENCE DE LA VALEUR DE L'ECLAIREMENT

Différents éclaircissements égaux à 10, 50, 250, 500, 750, 1000 et 1500 μWcm^{-2} ont été expérimentés au niveau de deux séries culturales A et B soumises à des régimes lumineux distincts.

La première série A est éclairée à raison de 12 heures par jour pendant 1 mois. La seconde série B reçoit, 7 jours après l'ensemencement, une seule irradiation de 12 heures qui interrompt son développement à l'obscurité. . . .

Les résultats, obtenus dans ces conditions, sont représentés par la figure 21.

Figure 21. : Influence de la valeur de l'éclairement sur la reproduction sexuée du *N. galligena*, cultivé à 18 °C sur milieu synthétique M23 gélosé.



Dans la série culturale A, le nombre d'ascocarpes progresse avec l'augmentation du niveau énergétique et atteint son maximum à $1500 \mu\text{Wcm}^{-2}$. Toutefois, on peut noter qu'à $250 \mu\text{Wcm}^{-2}$ et, plus encore, à 500 et $750 \mu\text{Wcm}^{-2}$, les taux de périthèces induits sont de valeurs très voisines et semblent représenter un palier de l'efficacité énergétique.

Dans le cas d'un photostimulus unique, l'intensité optimale d'éclairement est rapidement atteinte; ainsi de 250 à $1500 \mu\text{Wcm}^{-2}$, les irradiations induisent des quantités similaires de périthèces. A ce niveau, l'augmentation du flux énergétique se reflète essentiellement, à l'observation microscopique, par un accroissement du nombre d'asques matures par fructification. La courbe de la production périthéciale, induite dans ces conditions, suggère un phénomène de saturation du système photorécepteur par le fait de fortes énergies dispensées par un éclairage unique.

7.- DISCUSSION

L'ensemble de cette étude démontre que des éclairagements en lumière blanche de rythme, de durée et d'intensité fort différents peuvent induire la reproduction sexuée du *N. galligena*.

Ainsi une seule irradiation de 12 heures, à $10 \mu\text{Wcm}^{-2}$, aux jours propices de développement mais aussi une illumination de $750 \mu\text{Wcm}^{-2}$ ininterrompue durant un mois peuvent produire des ascocarpes fertiles. La multiplication des photopériodes et l'élévation de l'éclairement augmente le nombre de périthèces et celui des asques par ascocarpes. Les conditions lumineuses optimales de la morphogenèse sexuée du *N. galligena* sont définies par des éclairagements quotidiens de 12 à 16 heures de lumière blanche, variant de 750 à $1500 \mu\text{Wcm}^{-2}$ et appliqués entre les 7ème et 22ème jours de culture à 18°C sur milieu synthétique M23 liquide ou gélosé. De telles exigences lumineuses ne revêtent aucun caractère spécifique et sont comparables à celles de nombreux champignons photodépendants antérieurement cités.

La photoinduction de certains Ascomycètes ne se concrétise qu'à partir d'un certain état du développement gamétophytique dont la réalisation, à partir du 7ème jour de culture chez le *N. galligena*, varie selon les espèces fongiques et les conditions de croissance. Antérieurement à ce stade, les applications lumineuses se révèlent inefficaces (cas du *N. galligena*) ou parfois même inhibitrices de la future réponse photobiologique.

Chez le *N. galligena*, l'effet inducteur d'un photostimulus unique de 12 heures est très marqué au 7ème ou au 8ème jour ; après le 10ème jour, l'action positive de la lumière diminue considérablement. Pourtant, si nous comparons une telle activité biologique avec celle relative à des irradiations journalières de 12 heures appliquées entre les 7ème et 22ème jours, il est possible de constater que :

- sur la base du comptage des périthèces fertiles, les résultats sont très différents. Ainsi, dans le premier cas, l'induction sexuée devient quasiment nulle au delà du 13ème jour tandis que, dans le second cas, elle se poursuit jusqu'au 22ème jour.
- sur le fait des ébauches périthéciales produites, l'effet de ces deux traitements lumineux paraît similaire.

Ces constatations semblent indiquer que, selon les stades de la morphogenèse sexuée, les exigences lumineuses varient. Ainsi, des éclaircissements précoces (7ème au 12ème jour) et de faible durée (1 seule photopériode de 12 heures par exemple) paraissent totalement suffire à l'initiation périthéciale, tandis que la multiplication des photopériodes de 12 heures jusqu'au 22ème jour de culture serait nécessaire au développement ultérieur des ébauches sexuées, soit jusqu'à la différenciation des asques.

Pourtant, cette dernière proposition est infirmée par la présence d'ascocarpes fertiles (30 p.100 de la production périthéciale optimale) due aux irradiations lumineuses décrites ci-dessus qui favorisent l'induction des protopérithèces. Aussi pouvons-nous suggérer que cette photostimulation initiale entraînerait, alors qu'aucune structure sexuée n'est apparente, des changements métaboliques à effets immédiats, suffisant totalement à l'élaboration des initiales des ascocarpes, mais aussi à effets différés. Ces derniers, quantitativement insuffisants (saturation du système photorécepteur, effet de dilution, ... n'engendrent la maturation que pour une fraction des ébauches photoinduites. La fertilité de l'ensemble de ces dernières exige alors des éclaircissements complémentaires d'autant plus importants qu'ils sont appliqués sur un mycélium dont la photosensibilité (absence d'induction sexuée au delà du 13ème jour) paraît différente (modification du système photorécepteur ?, diminution des capacités de biosynthèse du champignon?...). Ainsi, l'induction et la maturation des périthèces semblent tributaires de réactions photosensibles d'ordre énergétique différent.

En définitive, ce travail précise l'influence de la lumière blanche sur la fructification parfaite du *N. galligena*, notamment les exigences lumineuses minimales de ce phénomène et le moment optimal d'application du photostimulus. Ces données représentent la base préalable qui a facilité notre recherche des longueurs d'onde lumineuse actives sur la différenciation sexuée de ce Pyrénomycète.

II. - INFLUENCE DE LA QUALITÉ DE LA LUMIÈRE

En recherchant les radiations lumineuses responsables de l'induction sexuée du *N. galligena*, le présent travail a pour but de :

- caractériser l'effet des longueurs d'onde sur la production périthéciale par la réalisation d'un spectre d'activité photobiologique.
- classer la reproduction sexuée de ce Pyrénomycète parmi l'un des trois types de photoréponse fongique, définis antérieurement, selon les limites des domaines spectraux efficaces (ultraviolet, proche UV-bleu, visible).

Cette étude comporte trois séries expérimentales qui sont basées sur des moyens techniques différents qui assurent progressivement une meilleure définition des radiations incidentes et donc celle de leurs activités sur la sexualisation du *N. galligena*.

Les résultats acquis ont été publiés au Canadian Journal of Botany (DEHORTER, JACQUES et LACOSTE, 1980 a).

1.- PREMIERE SERIE EXPERIMENTALE

Les cultures sont éclairées par des lumières blanche, rouge, verte, bleue ou proche ultra-violette émises par des tubes fluorescents ou transmises par des filtres interférentiels associés, dans ce cas, à une source lumineuse différente (lampe à arc au xénon et chlorure de césium, haute pression, Philips CSx450W).

Outre leurs qualités et leurs valeurs (de 500 à 1000 μWcm^{-2}) différentes, les éclairagements ont été fournis selon deux rythmes distincts où :

- une série culturale A se développe pendant 30 jours à l'obscurité et ne reçoit qu'une seule irradiation de 12 heures au 7ème jour,
- un lot cultural B est irradié pendant 1 mois à raison de 16 heures par jour.

Les résultats obtenus, relatifs à la production périthéciale, sont reportés dans le tableau 14.

Tableau 14. : Première série expérimentale : influence de la qualité de la lumière sur la reproduction sexuée du *N. galligena*, cultivé à 18 °C sur milieu M23 gélosé.

ECLAIREMENT*		PRODUCTION PERITHECIALE					
Qualité	Intensité (μWcm^{-2})	Série culturale A			Série culturale B		
		Min.	Max.	Moy.	Min.	Max.	Moy.
Blanche	500	21	24	23	71	76	73
Rouge 600< λ nm<750	500	0	0	0	0	0	0
Verte 490< λ nm<600	500	14	16	15	43	52	47
Bleue 400< λ nm<500	500	23	32	28	88	107	98
Proche UV 300< λ nm<400	500	29	32	30	103	116	108
Filtre 14 525< λ nm<528	700	8	16	11	19	28	25
Filtre 15 542< λ nm<548	1000	2	6	4	15	20	17
Filtre 16 557< λ nm<561	1000	0	0	0	0	0	0

* La série A est irradiée une seule fois pendant 12 heures au 7ème jour de culture ; La série B est éclairée pendant 30 jours à raison de 16 heures par jour. Les caractéristiques des filtres interférentiels n° 14, 15 et 16 sont données dans le tableau 14.

L'absence totale de périthèces fertiles démontre l'inefficacité de la lumière rouge, plus précisément, des longueurs d'onde égales ou supérieures à 560 nm. Si les radiations bleues et surtout proche UV sont les plus inductrices, les éclairagements de couleur verte compris entre 490 nm et 560 nm ne sont cependant pas dénués d'activité.

Un large domaine spectral influence donc les réponses sexuées du *N. galligena*.

2.- DEUXIEME SERIE EXPERIMENTALE

Celle-ci repose sur l'utilisation de filtres interférentiels définissant des intervalles spectraux plus restreints que ceux obtenus des tubes fluorescents précédemment employés.

L'irradiation est donnée sous forme d'un seul éclaircissement de $80 \mu\text{Wcm}^{-2}$ qui interrompt, au 7ème jour de croissance, pendant 12 heures, une période de 30 jours d'obscurité.

Le tableau 15 indique les nombres de périthèces fertiles résultant de ces 16 conditions lumineuses.

Tableau 15. : Deuxième série expérimentale : influence des longueurs d'onde lumineuse sur la reproduction sexuée du *N. galligena*, cultivé à 18°C sur milieu M23 gélosé.

ECLAIREMENT*

Filtre Interférentiel n°	Domaine spectral (λnm)	λ max. (nm)	PRODUCTION PERITHECIALE		
			Min.	Max.	Moy.
1	253< λnm <266	259	11	16	12
2	285< λnm <308	294	4	7	5
3	301< λnm <319	307	14	19	17
4	326< λnm <330	328	19	21	20
5	350< λnm <374	360	18	23	19
6	374< λnm <388	380	12	18	15
7	399< λnm <405	403	7	10	9
8	414< λnm <424	418	11	18	15
9	437< λnm <450	443	16	19	17
10	451< λnm <467	460	14	16	15
11	480< λnm <484	482	16	20	19
12	488< λnm <493	490	16	19	17
13	500< λnm <507	503	10	15	11
14	523< λnm <528	525	8	10	9
15	542< λnm <548	545	2	4	2
16	557< λnm <561	560	0	0	0

* La lumière est fournie aux cultures sous forme d'un seul éclaircissement ($80 \mu\text{Wcm}^{-2}$) de 12 heures au 7ème jour de développement.

Les résultats du tableau 15 montrent que cinq intervalles spectraux centrés sur les longueurs d'onde 328 nm, 360 nm, 443 nm, 482 nm et 490 nm induisent le plus grand nombre d'ascocarpes fertiles.

L'activité biologique des radiations proches de 260 nm paraît remarquable en raison de la durée de l'exposition (12 h) à ce rayonnement.

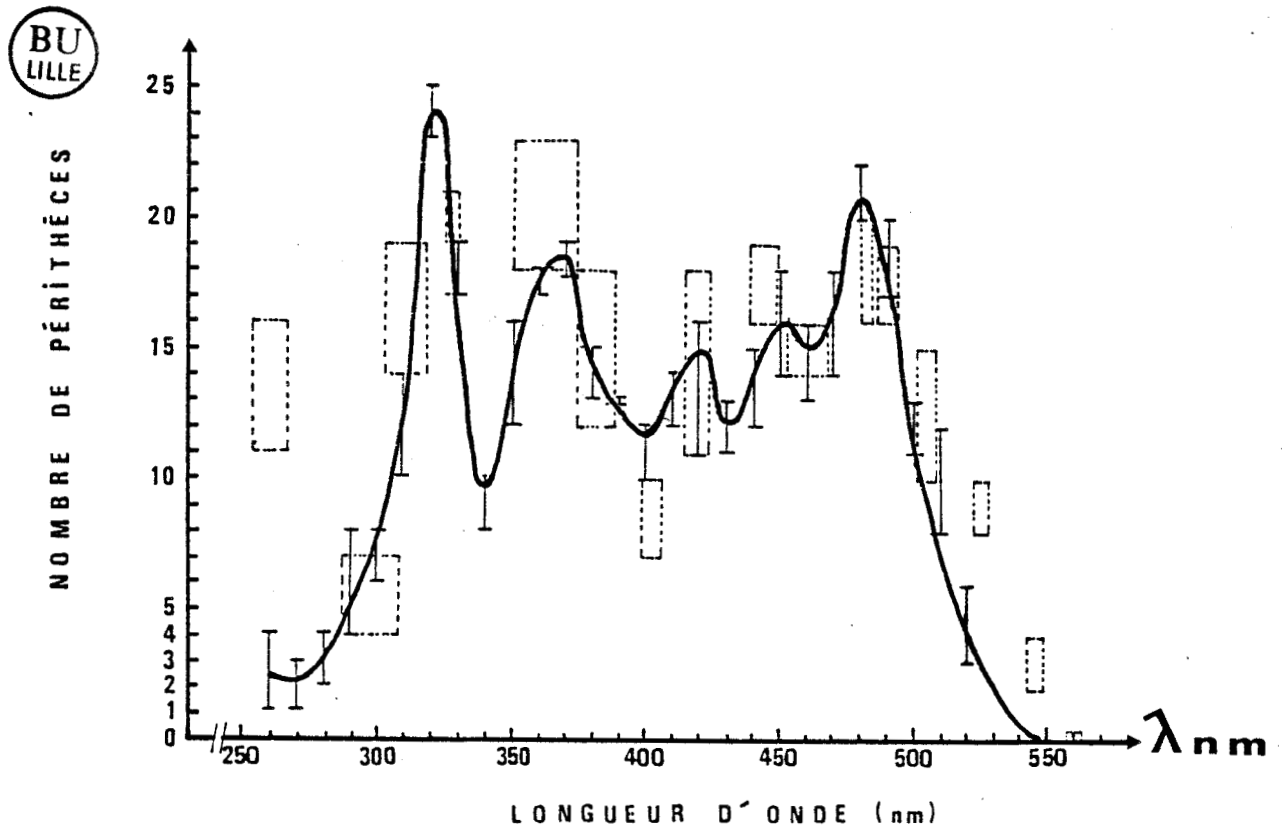
3.- TROISIEME SERIE EXPERIMENTALE

Au moyen du monochromateur, par intervalle de 10 nm, nous avons étudié l'influence des longueurs d'onde, comprises entre 260 nm et 560 nm, sur la formation de périthèces fertiles du *N. galligena*.

Une seule illumination d'une durée de 12 heures est fournie, le 7ème jour, aux cultures qui se développent un mois à l'obscurité constante. Le flux énergétique s'élève, dans tous les cas, à $40 \mu\text{Wcm}^{-2}$, cette valeur représente l'éclairement maximal susceptible d'être obtenu pour toutes les radiations monochromatiques éprouvées.

La figure 22 traduit les résultats obtenus.

Figure 22. : Troisième série expérimentale : influence de la qualité de la lumière sur la reproduction sexuée du *N. galligena*, cultivé à 18°C , sur milieu M23 gélosé.



Légende :

La courbe représente le nombre d'ascocarpes induits, à la suite d'un seul photostimulus de 12 heures à $40 \mu\text{Wcm}^{-2}$, par des longueurs d'onde ($\Delta\lambda = 5\text{nm}$) monochromatiques comprises entre 260 nm et 560 nm.

La figure 22 fait apparaître que cinq longueurs d'onde : 320 nm, 370 nm, 420 nm, 450 nm et 480 nm provoquent une photoinduction périthéciale optimale tandis que les radiations : 340 nm, 430 nm et 460 nm sont nettement moins stimulatrices.

Ces données corroborent les résultats précédents où l'éclairement, de valeur double, peut expliquer la plus grande activité inductrice de certaines longueurs d'onde (260 nm, 520 nm et 540 nm) en comparaison de leur présente action.

En conclusion, la dépendance spectrale de la sexualisation du *Nectria galligena*, limitée de 300 nm à 520 nm et définie par cinq pics d'effet maximal à 320 nm, 370 nm, 420 nm, 450 nm et 480 nm, classe ce champignon parmi les nombreux organismes à photosensibilité proche UV-bleue. Cette situation permet donc d'envisager, pour le *N. galligena*, toutes les hypothèses déjà décrites, sur l'identité du système photorécepteur correspondant à ce type de photoréponse.

4.- DISCUSSION

La dépendance spectrale de la sexualisation du *N. galligena* présente, au plan des longueurs d'onde d'activité maximale (λ_{max} : 320, 370, 420, 450 et 480 nm), beaucoup de similitudes avec celle observée chez :

- . *Nectria haematococca* (CURTIS, 1972), λ_{max} : 360, 420, 440, 460 et 480 nm
- . *Gelasinospora reticulospora* (INOUE et FURUYA, 1975 ; INOUE et WATANABE, 1984), λ_{max} : 280, 370, 420, 460 et 480 nm
- . *Nectria ditissima* (DEHORTER et PERRIN, 1983b), λ_{max} : 330, 380, 430, 480 et 500 nm

Ainsi, par rapport au *Nectria haematococca*, le profil spectral du *N. galligena* se distingue essentiellement par un pic d'activité surnuméraire à 320 nm. Toutefois, le rôle des longueurs d'onde inférieures à 340 nm, n'ayant pas été envisagé pour le premier champignon, l'influence de la radiation 320 nm ne peut être totalement écartée.

Si les photosensibilités des *N. ditissima* et *N. galligena* se ressemblent, le premier organisme réagit cependant mieux aux plus grandes longueurs d'onde, notamment dans les régions bleue et verte du spectre lumineux. Dans ce cas, on peut remarquer l'activité prépondérante de la radiation 500 nm. La différence des rapports entre les activités des radiations proche UV-bleues-vertes, ainsi observées chez ces deux espèces, suggère un changement de proportions entre les pigments, hypothétiques photorécepteurs, absorbant respectivement ces deux types de lumière.

Par ailleurs, notre mode d'expérimentation basé sur un éclairage constant, égal à $40 \mu\text{Wcm}^{-2}$, pour toutes les radiations lumineuses éprouvées ne met pas en évidence leur réelle efficacité au plan photonique. Cette dernière, qui serait calculée au niveau des cinq pics d'activité maximale déterminés selon notre protocole expérimental, démontre alors que, pour un nombre identique de photons dans les cinq cas, la production périthéciale obtenue à 320 nm serait 1,5, 1,8 et 2,1 fois supérieure à celle observée respectivement à 370 nm, 480 nm et 420-450 nm. Ces données établissent donc un ordre de rendement biologique des radiations quelque peu différent de celui proposé (figure 22).

En définitive, l'originalité du spectre d'action du *N. galligena* réside dans le fait qu'il démontre une réponse sexuée à double photosensibilité :

- soit à l'ultraviolet ($\lambda < 370\text{nm}$) comme *Pleospora herbarum* (LEACH et TRIONE, 1966) ou *Leptosphaerulina trifolii* (LEACH, 1972)
- soit également, au proche UV, violet-bleu ($370 \text{ nm} < \lambda < 490 \text{ nm}$) comme *Pleurage setosa* (CALLAGHAN, 1962) ou *Ophiobolus graminis* (WESTE, 1970b).

Contrairement au *N. galligena*, la photoinduction périthéciale de ces différents champignons se limite exclusivement à l'un ou l'autre de ces deux domaines lumineux. De ce fait, les diverses hypothèses considérant la nature chimique des photorécepteurs, selon les photoréactions UV ou proche UV-bleues, pourraient être confondues chez le *N. galligena*.

Par ailleurs, les résultats obtenus de la photoconidiogenèse du *Trichoderma viride* (KUMAGAI et ODA, 1969) témoignent d'une possible analogie des réactions photochimiques déterminant les processus asexués et sexués des champignons. Enfin dans les cas d'*Alternaria tomato* et d'*Helminthosporium oryzae* (KUMAGAI, 1982), le profil spectral des photoréponses conidiennes proche UV-bleues où les radiations proche UV inductrices et bleues inhibitrices seraient absorbées respectivement par deux pigments P_{NUV} et P_{B} (KUMAGAI et al, 1976) rappelle celui établi pour la fructification parfaite du *N. galligena*. Aussi, en dépit de réactions différentes sous l'effet des radiations bleues, serait-il possible d'envisager pour le *N. galligena*, l'existence d'un tel système pigmentaire ($P_{\text{NUV}}, P_{\text{B}}$) ou mycochrome qui régulerait la photoinduction sexuée ?

III. - COMPARAISONS DES SPECTRES D'ACTIVITÉ SEXUÉE ET D'ABSORPTION DU MYCÉLIUM

En fonction du spectre de la photoinduction sexuée du *N. galligena* et de certaines hypothèses sur la nature du photorécepteur (P_{310} , carotènes, flavines,...) que suggère une telle photoréponse, nous avons recherché à répondre de la présence -ou non- de ces composés dans le thalle du champignon.

Cette étude se borne à reproduire divers spectres d'absorption mycélienne réalisés directement *in vivo*, ou indirectement, après extraction des thalles par divers solvants (eau, acétone,...).

Tous les spectres UV-visible ont pour origine des mycéliums recueillis à partir de cultures qui, âgées de 9-10 jours, sont effectuées :

- sur milieu synthétique M23 liquide
- à la température de 18 °C
- en présence de lumière blanche (12hL/12hO ; 750 μWcm^{-2}) ou à l'obscurité permanente.

1.- SPECTRE D'ABSORPTION IN VIVO

Les thalles issus des cultures éclairées -ou non- offrent des spectres d'absorption analogues, la figure 23 B représente l'un d'eux.

Les spectres *in vivo* *N. galligena* se caractérisent par des absorptions maximales, pics et épaulements, respectivement, à 370 nm, 420 nm et 520 nm à 560 nm et minimales à 340 nm et 380 nm.

Ces données rendent compte des photoréponses sexuées du *N. galligena* obtenues de 360 nm à 420 nm. Au delà de cette dernière radiation, demeure une forte absorbance mycélienne qui pourrait aussi expliquer la formation importante de périthèces à 450 nm. Par ailleurs, les résultats enregistrés à 320 nm, limite inférieure de nos mesures, n'excluent pas toute corrélation avec le grand nombre d'ascocarpes induit par cette radiation.

Enfin un tel profil spectral qui, pour les longueurs d'onde 420 nm et 520 nm à 560 nm simule celui établi chez le *Neurospora crassa* (MUNOZ et al, 1974), suggère la présence de cytochromes de type b et c.

2.- SPECTRES D'ABSORPTION D'EXTRAITS AQUEUX. DOSAGE DES FLAVINES TOTALES.

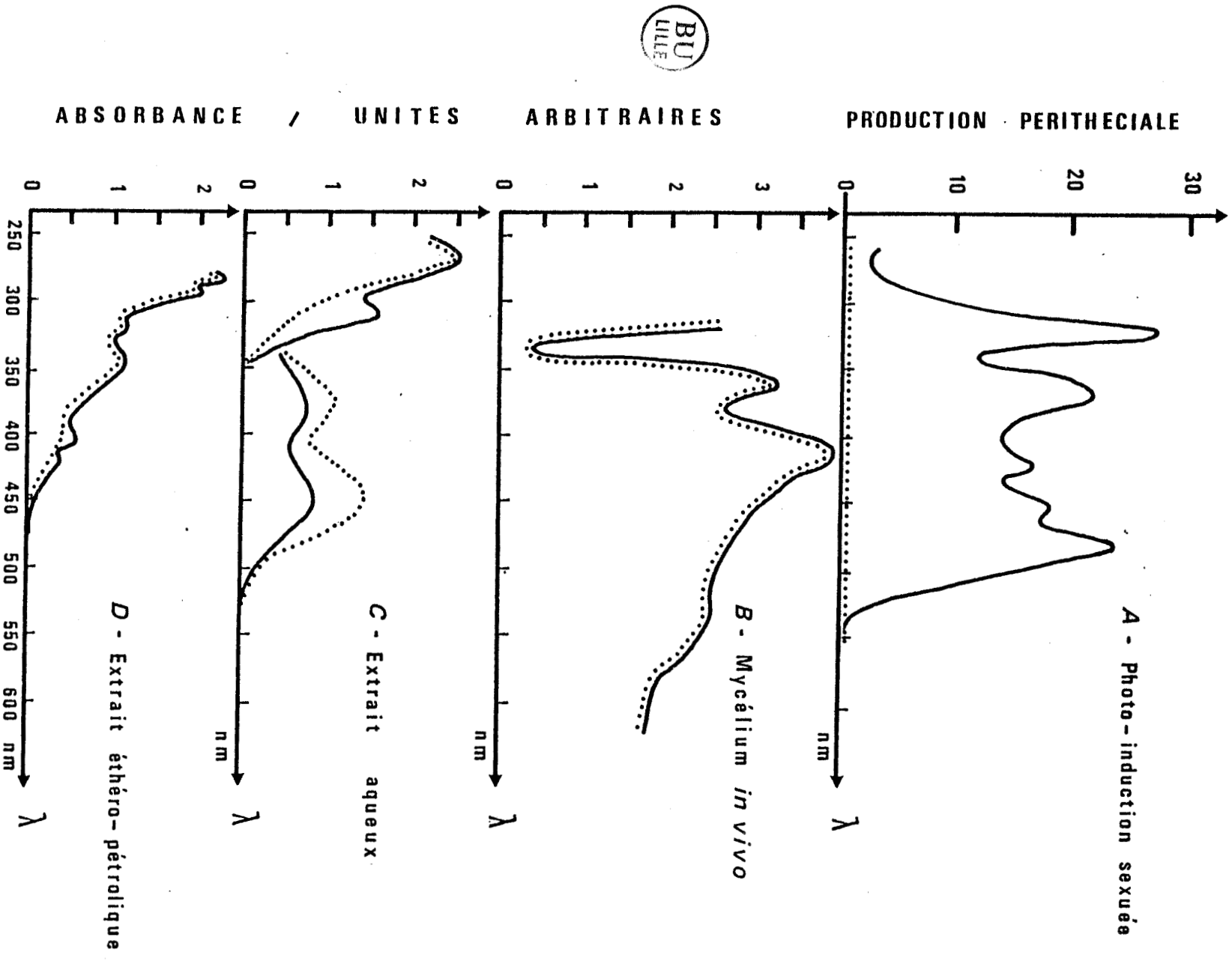
Pour cette expérimentation, les échantillons, soumis aux analyses (spectres et dosages) proviennent d'extractions aqueuses pratiquées sur les mycéliums du *N. galligena*

a) Spectres d'absorption

L'absorption des échantillons aqueux, préalablement délipidés par extraction chloroformique, est mesurée au spectrophotomètre de 250 nm à 570 nm.

Les deux spectres obtenus (figure 23C) des extraits aqueux de mycéliums récoltés de cultures éclairées -ou non- se ressemblent au niveau de trois pics d'absorbance maximale à 265 nm, 370 nm et 450 nm. Ils diffèrent essentiellement de par leur absorption à 310 nm. Celle-ci, pratiquement nulle pour les échantillons issus de thalles incubés à l'obscurité constante, devient très importante si le

Figure 23. : Spectres de la photoinduction sexuelle et d'absorption du mycélium chez *N. galligena*.



Légende : Le spectre de la photoinduction sexuelle a été obtenu dans des conditions précédemment décrites (figure 22). Les mycéliums du *N. galligena*, à l'origine des spectres d'absorption décrites sont obtenus de cultures réalisées à 18 °C sur milieu M23 liquide, en présence de lumière blanche (—) ou à l'obscurité (.....).

champignon se développe en présence de lumière. Dans ce dernier cas, le profil spectral UV-visible des extraits aqueux se rapproche, par ses pics à 310 nm, 370 nm et 450 nm, de celui concernant la photoinduction sexuée.

A la première longueur d'onde, peut-être précisément rapporté le composé "P310" découvert par LEACH (1965) ; aux deux autres, la présence de flavines (λ max : 375 nm et 448 nm). Celles-ci (riboflavine, FMN et FAD), souvent citées comme possibles photorécepteurs, sont effectivement mises en évidence dans les échantillons aqueux du *N. galligena* qui sont chromatographiés sur papier selon la technique de KILGOUR et al (1957).

b) Dosage des flavines totales

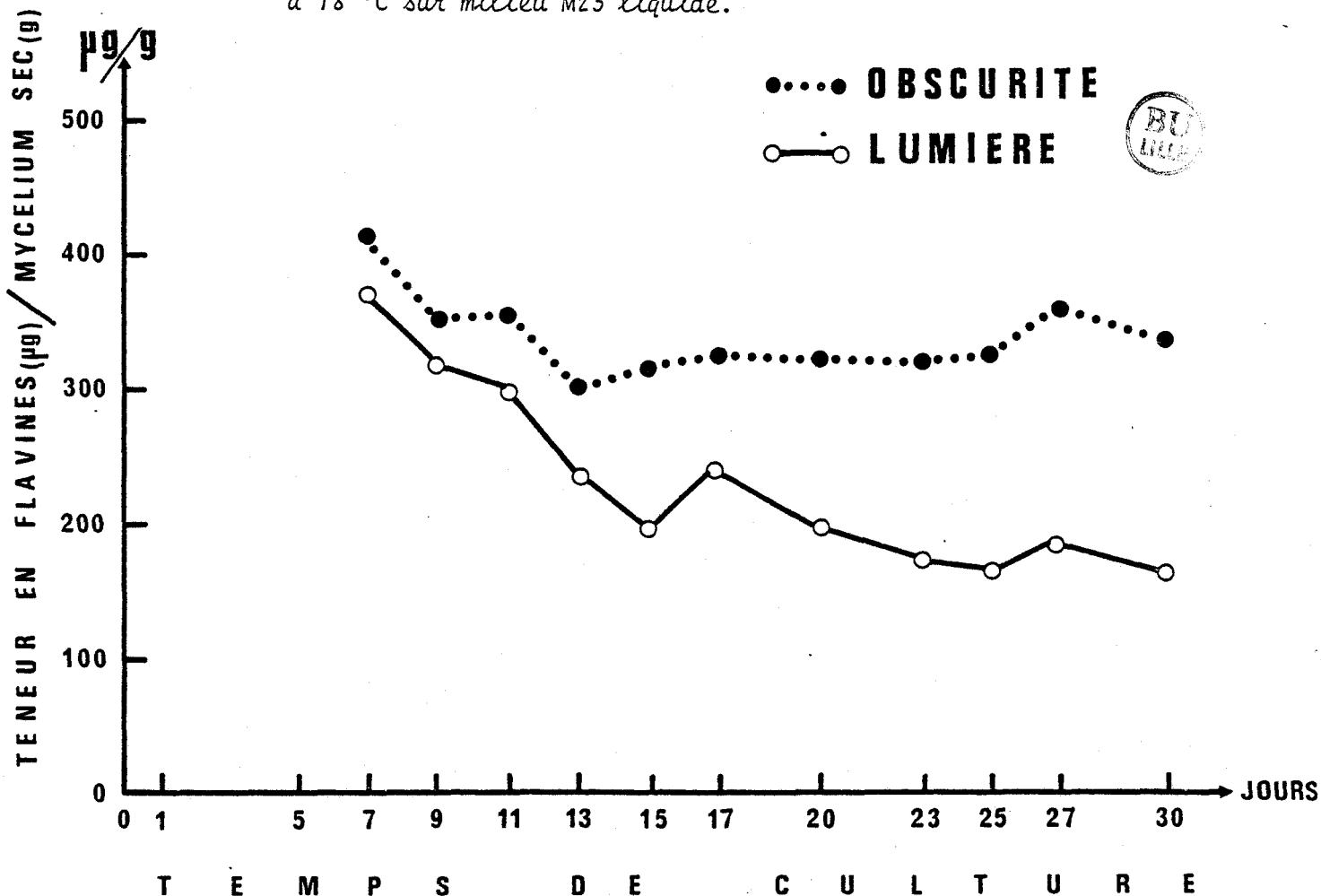
Le contenu en flavines des hyphes du *N. galligena* est déterminé selon une méthode adaptée de YAGI (1962), il est défini en "équivalent (μ g) de riboflavine" par gramme de mycélium sec (μ g/g).

L'évolution du contenu flavinique, chez le *N. galligena*, est suivie du 7ème au 30ème jour de son développement : soit à la lumière (12hL/12hO, $750 \mu\text{Wcm}^{-2}$), soit à l'obscurité continue.

Pour chaque mesure, le mycélium recueilli de 5 boîtes de Roux compose le matériel biologique de l'échantillon.

Les résultats sont reportés dans la figure 24.

Figure 24. : Contenu en flavines totales du mycélium du *N. galligena* cultivé à 18 °C sur milieu M23 liquide.



Indépendamment des conditions lumineuses, le contenu flavinique mycélien demeure élevé jusqu'au 11ème jour de développement du champignon. Par la suite, l'éclairement abaisse fortement la concentration en flavines qui, à l'obscurité, demeure pratiquement constante et plus élevée.

Dans les deux cas, si l'on adopte l'hypothèse du rôle des flavines dans la photoréception chez le *N. galligena*, les proportions importantes de ces composés du 7ème au 11ème jour de culture, pourraient expliquer la photosensibilité optimale du champignon durant cette période.

Par ailleurs, le contenu en flavines des hyphes du *N. galligena* semble très supérieur à celui estimé chez le *Neurospora crassa* par PAIETTA et SARGENT (1981). Ces auteurs mettent en évidence une étroite corrélation entre la déficience en flavines de certaines souches mutantes du *N. crassa* et la régression de leur photosensibilité, ils concluent à l'intervention de une ou plusieurs flavoprotéines dans l'absorption lumineuse.

3.- SPECTRES D'ABSORPTION D'EXTRAITS ETHERO-PETROLIQUES.

RECHERCHE DES CAROTENOIDES

Les spectres d'absorption des extraits éthéro-pétroliques, obtenus après traitement par un mélange acétone-méthanol des mycéliums, sont, malgré des origines culturelles différentes, d'allure similaire et la figure 23D représente l'un d'eux. Ce profil spectral se distingue par des sommets d'absorption proches de 280, 295, 320, 340, 400 et 420 nm où les 2 premiers pics traduisent la présence de stéroïdes et où les 4 suivants nous paraissent, à ce stade de l'analyse et de nos connaissances, d'interprétation difficile quant à la présence -ou non- de caroténoïdes. Par ailleurs, un tel spectre caractérise tous les extraits de mycéliums récupérés du 7ème au 13ème jour de croissance. Durant cette période, l'éclairement des cultures double la valeur des densités optiques mesurées à 400 et 420 nm. Au delà de cette phase initiale, l'absorption des échantillons provenant de thalles éclairés ou non, âgés de 15 à 30 jours et de périthèces isolés de cultures gélosées se situe essentiellement dans le proche UV soit à 320 nm et surtout à 340 nm. L'addition de soude (NaOH, N) à ces extraits déplace alors leur absorption maximale à 356 nm tandis que leur chromatographie met en évidence des composés à fluorescence jaune.

En définitive, l'étude spectrophotométrique d'extraits éthéro-pétroliques des mycéliums du *N. galligena* ne nous permet pas de conclure à la présence de caroténoïdes chez ce Pyrénomycète. L'existence de ces pigments : β carotène (λ_{max} 425, 451 et 482 nm) et ester méthylique de la neurosporaxanthine est pourtant démontrée chez le *Nectria cinnabarina* (FIASSON et BOUCHEZ, 1970).

IV. - CONCLUSIONS

Dans des conditions génétiques, nutritives et thermiques favorables à sa reproduction sexuée qui est strictement photodépendante, le *N. galligena* forme des ascocarpes fertiles sous des éclairagements très variés.

Ainsi, quantitativement, douze heures de lumière blanche suffisent à produire des périthèces fertiles qui peuvent, également, se différencier sous un éclairage continu durant 30 jours.

Un éclairage minimum de 12 heures se révèle d'une efficacité optimale si son application se réalise les 7ème et 8ème jours ou les 9ème et 10ème jours de développement sur milieu synthétique respectivement gélosé et liquide. Apparaît donc la nécessité d'un état particulier de croissance mycélienne conditionnant la photosensibilité du champignon.

Par rapport à l'action de ce photostimulus unique à l'origine de nombreuses ébauches périthéciales mais d'un faible pourcentage d'ascocarpes fertiles, le nombre maximal de ces derniers, produit par des irradiations journalières, de 12 à 16 heures, dispensées du 7ème au 22ème jour d'incubation, semble indiquer que :

- l'initiation sexuée et le développement ultérieur des ébauches périthéciales jusqu'à la différenciation ascale présentent des besoins lumineux différents. Aussi, la première phase morphogénétique paraît être la réponse directe à l'application lumineuse tandis que la seconde, développement du sporophyte jusqu'à la formation des cellules ascogènes, requiert, en fonction d'exigences métaboliques supplémentaires, une énergie lumineuse accrue.
- l'ascosporogénèse n'apparaît pas directement tributaire de la lumière.

Ainsi, qualitativement, une très large gamme de radiations lumineuses, essentiellement de 300 à 520 nm, peut provoquer la formation des ascocarpes du *N. galligena*. Plus précisément, la dépendance spectrale de la sexualisation de ce dernier (λ max : 320, 370, 420, 450 et 480 nm) se confond sauf pour le premier pic avec celle décrite dans de nombreux cas, fongiques ou non. Ces résultats suggèrent aux auteurs l'intervention très probable d'une flavoprotéine comme agent photorécepteur.

Les spectres d'absorption d'extraits mycéliens aqueux et les analyses complémentaires confirment, chez le *N. galligena*, l'existence de flavines dont les proportions élevées, du 7ème au 11ème jour de culture, peuvent coïncider avec la remarquable efficacité d'un photostimulus appliqué durant cette période. Par contre, nous n'avons pu déceler la présence de caroténoïdes colorés au niveau des thalles du champignon où les spectres d'extraits éthéropétroliques

n'offrent pas un profil caractéristique de ces composés comme chez d'autres organismes (*Neurospora* - *Verticillium*) traités de la même manière.

Par ailleurs, le grand nombre de périthèces induit par la radiation 320 nm singularise la photoréponse du *N. galligena* qui, de ce fait, s'apparente à celles de caractère essentiellement ultraviolet ($\lambda < 370$ nm) comme à celles de type proche UV-bleu ($370 \text{ nm} < \lambda < 520 \text{ nm}$).

Ces résultats rendent plus complexes les interprétations relatives à l'identité du système photorécepteur chez le *N. galligena*. A cet égard, la formation du "P310" spécifiquement dans les cultures irradiées et potentiellement fertiles (Figure 20C) fait-elle de ce composé :

- un élément constitutif du mycochrome (LEACH, 1965) responsable de la réception et de l'efficacité de la radiation 320 nm,
- ou un métabolite secondaire dont la biosynthèse dépend de la lumière absorbée et du photorécepteur (TAN, 1978).

Dans le cas du *N. galligena*, l'existence du "P310" s'avère étroitement liée à la photoinduction sexuée, c'est pourquoi son étude nous a semblé être un moyen pour préciser le rôle indispensable de la lumière sur la sexualisation de ce Pyrénomycète.

QUATRIEME PARTIE

REPRODUCTION SEXUÉE ET MÉTABOLISME DU N. GALLIGENA.

De nombreux auteurs recherchent, au niveau du métabolisme, les raisons de la différenciation fongique et, donc, selon KLEBS (1900), les facteurs "intrinsèques" du développement des Champignons.

A ce sujet, les travaux de CANTINO, TURIAN... démontrent l'importance du métabolisme intermédiaire. Ce dernier est précisément étudié dans les conditions de la reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae* (VIALA, 1972), du *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1975)... Dans un but semblable, VIDAL (1983), en analysant l'évolution des lipides et des stérols, associe orientation oxydative du métabolisme et différenciation des ascocarpes du *L. typhae*.

De même, chez le *N. galligena*, la définition très complète du déterminisme externe de la reproduction sexuée nous amène à considérer les événements biochimiques provoqués par des variations de l'environnement qui contrôle la fructification parfaite. A ce niveau peut être introduit un facteur nouveau, puisqu'à la lumière requise pour l'induction périthéciale, nous pouvons substituer un composé (P 310 ou mycosporine) biosynthétisé par le Champignon soumis à des irradiations. Ainsi, outre l'étude des conditions métaboliques de la reproduction sexuée du *N. galligena* comme nous l'inspirent les travaux déjà cités, nous tenterons de situer l'intervention de la mycosporine au plan biologique et biochimique et donc de préciser son rôle photomimétique.

D'une manière générale, diverses publications font déjà référence au

problème évoqué ci-dessus. Ces résultats se fondent sur des organismes asexués ou sexués appartenant aux principaux groupes fongiques : les Phycomycètes (*Blastocladiella emersonii*, CANTINO, 1961 - *Allomyces*, TURIAN, 1960 a et b), les Ascomycètes (*Neurospora*, TURIAN, 1960 a et b, 1969, 1970 - *Leptosphaeria typhae*, VIALA, 1972 ; VIDAL, 1983 - *Gnomonia leptostyla*, FAYRET, 1975), les Basidiomycètes (*Coprinus cinereus*, MOORE, 1984). Ces recherches font part d'un équilibre fonctionnel qui, entre les voies ou cycles métaboliques, conduit le champignon du stade végétatif à la reproduction. Les auteurs rapportent l'induction des morphogénèses reproductrices à de concomitantes changements internes. Ceux-ci : amplification du cycle tricarboxylique, prédominance de la voie des pentoses phosphates, augmentation du degré d'insaturation des lipides, évolution du contenu stérolique, accélération des échanges respiratoires, synthèses enzymatiques... rendent compte globalement, de la stimulation des activités oxydatives lors de la différenciation des structures reproductrices.

Dans leur ensemble, ces démonstrations s'appuient sur la comparaison des analyses effectuées sur des cultures fongiques fertiles et stériles amenées à ces états de fécondité -ou non- par des modifications de l'environnement externe (aération, température, lumière, milieu nutritif, emploi de composés chimiques...). Ces procédés, qui stimulent les systèmes d'oxydation cellulaire, profitent à la reproduction ; ceux, qui favorisent un métabolisme de type réducteur, maintiennent le champignon en phase végétative gamétophytique.

D'une façon analogue, nous pouvons étudier le déterminisme interne de la sexualisation du *N. galligena* en nous basant sur le fait que la production périthéciale résulte de modalités génétiques et externes distinctes de celles suffisantes à la croissance mycélienne et à la conidiogénèse. Ainsi, certaines variations trophiques (présence -ou non- de zinc dans le milieu nutritif), thermiques (incubation à 18 °C ou à 25 °C), lumineuses (éclairage -ou non- des cultures) qui provoquent l'évolution sporophytique sexué ou la persistance de l'état gamétophytique végétatif asexué du champignon nous suggèrent qu'elles exercent, corrélativement à leurs effets morphogénétiques, des changements métaboliques.

Précisément, chez le *N. galligena*, la mycosporine (P310), isolée des mycéliums irradiés fertiles mais absente dans les thalles stériles non éclairés (DEHORTER, 1972), semble être un exemple de l'influence d'un facteur externe (la lumière), simultanément, sur les différenciations morphogénétique (production d'ascocarpes) et biochimique (biosynthèse du P310).

La mycosporine constitue-t-elle un médiateur photochimique, déterminant interne de la sexualisation du *N. galligena* ? Afin de répondre à cette question qui rejoint notre projet initial de recherche, un premier chapitre est consacré

à l'étude de cette substance : revue bibliographique, conditions de biosynthèse et rôle biologique chez le *N. galligena*.

D'une manière originale, la mycosporine, extraite préalablement d'hyphes éclairées puis incorporée au substrat nutritif de cultures maintenues à l'obscurité, nous permet de définir l'influence métabolique (activités enzymatiques, composition stérolique) du "P310" et, par là même, de saisir, très ponctuellement (partiellement ?), l'effet interne de la lumière en liaison avec son efficacité morphogénétique. Le 2ème chapitre tente ensuite de caractériser certains aspects des métabolismes, intermédiaire et stérolique, du *N.galligena* soumis à diverses conditions culturales et, plus particulièrement, à celle de la mycosporine additionnée au milieu nutritionnel.

Ainsi, cette étude, très partielle, du déterminisme interne de la reproduction parfaite du *N. galligena* nous permettra-t-elle de :

- comparer l'évolution du métabolisme de ce champignon au cours de son développement, soit uniquement gamétophytique, soit sexué à celle des espèces fongiques "modèles"
- conclure au rôle de la mycosporine dans la photoinduction périthéciale du *N. galligena*, en tant que substitut (total ou partiel ?) de la lumière et médiateur photochimique aux activités, biologiques et métaboliques, photomimétiques ?



CHAPITRE I

MYCOSPORINE (P310) ET PHOTOINDUCTION SEXUEE DU *N. GALLIGENA*

Chez les champignons photosensibles, l'action de la lumière pose deux questions essentielles au sujet de l'identification du système photorécepteur et de la connaissance des réactions métaboliques consécutives à l'absorption photonique.

Dans ce sens, un composé appelé "P310" (LEACH, 1965) puis mycosporine (FAVRE-BONVIN et al, 1976) pourrait constituer un élément de réponse à ces interrogations.

A l'origine de l'étude du "P310", chez le *N. galligena*, se situent trois constatations :

- les deux premières, établies précédemment pour ce champignon, résident respectivement dans la remarquable activité biologique de la radiation 320 nm et dans l'absorption à 310 nm caractérisant les extraits aqueux des mycéliums irradiés, potentiellement fertiles.
- la troisième résulte de la grande analogie de ces deux observations avec les travaux originaux de LEACH (1965). Cet auteur met en évidence, pour diverses espèces fongiques, une corrélation entre la photoinduction de leur reproduction et la biosynthèse d'une substance ("P310") qui, responsable de l'absorption maximale à 310 nm des hyphes irradiées aux UV, se révèle morphogénétiquement active.

Ces données assignent au "P310" un rôle sinon comme photorécepteur, du moins, comme intermédiaire biochimique entre l'absorption lumineuse et la

réponse biologique. En fonction de cette hypothèse, il nous semble que la mycosporine représente alors une intéressante voie d'étude du photo-déterminisme sexuée du *N. galligena*. Ce chapitre comporte deux ensembles :

- l'un, bibliographique, fait part des recherches consacrées aux mycosporines, plus particulièrement, à leurs structures chimiques et à leurs rôles (hypothèses
- l'autre, expérimental, définit, par rapport à la production périthéciale, les conditions de la présence et de l'activité biologique du P310 chez le *N. galligena*

A.- MYCOSPORINE (P310) : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette analyse s'inspire des mises au point récentes (ARPIN et al, 1979 ; ARPIN et BOUILLANT, 1981) qui traduisent l'évolution des connaissances relative aux présence, localisation, répartition, structure et activité du "P310", depuis sa découverte (LEACH, 1965).

I.- MISE EN EVIDENCE DES MYCOSPORINES. PROBLEME DE LEUR PHOTOINDUCTIBILITE

Initialement la recherche des mécanismes d'action des ultra-violets, sur la sporogénèse photodépendante d'espèces fongiques, aboutit à la mise en évidence du "P310" (LEACH, 1965). Ce composé spécifiquement présent dans les mycéliums irradiés fertiles, asexuellement (*Alternaria chrysanthemi*, *Ascochyta pisi*,...) ou sexuellement (*Pleospora herbarum*, *Pyronema omphalodes*) s'impose à LEACH comme l'une des clefs du problème de la photoinduction biologique.

Par la suite, un certain nombre d'auteurs confirment l'enchaînement : absorption lumineuse → biosynthèse de P310 → reproduction. Ainsi, VARGAS et WILCOXSON (1969), HITE (1973), BROOK (1981) et PITTET (1983a) admettent que la nécessaire photoinduction de la conidiogénèse, respectivement chez *Helminthosporium dictyoïdes*, *Botrytis cinerea*, *Glomerella cingulata*, *Ascochyta fabae*, s'accompagne de la biosynthèse d'un composé intra-mycélien absorbant à 310 nm. De même, l'étude de la formation des ascocarpes du *N. galligena* (DEHORTER, 1972) corrobore ces constatations.

De façon contradictoire, d'autres travaux dissocient la corrélation précédente : lumière, P310 et reproduction où :

- le P310 ne devient qu'un simple photo-produit sans rapport avec la sporulation. Cette conclusion repose sur les résultats de VAN DEN ENDE et CORNELIS (1970) ou de TAN et EPTON (1974), ainsi, l'éclairement des mycéliums de *Sclerotinia fructicola* ou du *Botrytis cinerea* provoque la formation du "P310" mais pas celle de structures reproductrices.

- le P310 apparaît, effectivement, associé aux phénomènes de reproduction mais non à l'exposition lumineuse des cultures. Dans ce cas, à l'obscurité constante, la présence du P310 est concomitante de la production, soit des conidies chez certaines souches d'*Ascochyta pisi* (LEACH, 1965) ou de *Cladosporium herbarum* et du *Botrytis cinerea* (ARPIN et BOUILLANT, 1981), soit des périthèces du *Lep-tosphaerulina briosiana* (MOYER et LEATH, 1976) ou du *Gnomonia leptostyla* (FAYRET et VITO, 1981). Par ailleurs, une évolution parallèle des taux de production du P310 et des structures, asexuées ou sexuées, est remarquée chez diverses espèces fongiques, photoexigentes ou non : *Ascochyta pisi* (LEACH, 1965), *Botrytis cinerea* (TAN et EPTON, 1974 ; ARPIN et al, 1979), *Pyronema omphalodes* (LUNEL et al, 1980), *Gnomonia leptostyla* (FAYRET et VITO, 1981), *Ascochyta fabae* (PITTET, 1982).

- le P310 n'est pas décelé dans les mycéliums irradiés et fertiles des champignons photodépendants tels que *Ophiobolus graminis* (WESTE, 1970 b), *Aspergillus ornatulus* (STALLINGS, 1970) ou *Trichoderma viride* (VAN DEN ENDE et CORNELIS, 1970). De même, en constatant l'absence d'absorption à 310 nm au niveau des carpophores mûrs de Basidiomycètes (*Coprinus*, *Russula*, *Lactarius*,...) , ARPIN et al (1979) remarquent , cependant, que d'autres substances peuvent masquer la détection du P310 ou que celui-ci, présent initialement, peut être métabolisé au cours du développement.

Ces différents exemples démontrent la variabilité des relations : lumière, P310 et reproduction. Toutefois, les mycosporines semblent étroitement associées aux morphogénèses reproductrices. Aussi, quand ces dernières exigent une période d'éclairement, la photoinductibilité du P310 apparaît nettement très semblable à celle des réponses biologiques. Par contre, lorsque ces dernières s'avèrent non tributaires de la lumière, les mycosporines, présentes à l'obscurité, ne constituent plus, strictement, des photoproduits même si des irradiations avantagent leur production.

II.- LOCALISATION ET DISTRIBUTION DES MYCOSPORINES

1) Localisation dans les champignons

Chez les champignons, le P310 s'accumule, d'une façon privilégiée, dans les structures de reproduction ; c'est d'ailleurs, cette localisation, quasi-totale, dans les basidiospores de *Stereum hirsutum* (ARPIN et al, 1977) qui lui a valu la dénomination de mycosporine (FAVRE-BONVIN et al, 1976).

De fait, les mycosporines sont exclusivement détectées dans : les ascostromas de *Leptosphaerulina briosiana* (MOYER et LEATH, 1976), les apothécies de *Pyronema omphalodes* (LUNEL et al, 1980 ; BERNILLON, 1982), la tête fertile de *Morchella esculenta*, les conidies du *Botrytis cinerea* et du *Cladosporium herbarum* ou les ascospores de *Plectania coccinea* (ARPIN et BOUILLANT, 1981) alors que les parties végétatives de ces espèces en sont quasiment dépourvues. Par contre, FAYRET et VITO, (1981) montrent que la teneur en P310 des périthèces du *Gnomonia leptostyla* est toujours inférieure à celle des thalles qui les produisent.

Ainsi, se pose le problème de lieu de formation des mycosporines ; soit, initialement différent, de leur site de stockage, soit au niveau même de celui-ci. Dans ce dernier cas, PITTE (1982) démontre que la dernière étape de la synthèse de la mycosporine glucosylée d'*Ascochyta fabae* se réalise au sein de la fraction cytoplasmique soluble des spores, celles-ci concentrant les deux tiers du P310 total dosé chez ce champignon.

Pour leur part, ARPIN et BOUILLANT (1981) remarquent que certaines caractéristiques du P310 (hydrophilie, faible poids moléculaire) pourraient favoriser sa migration du mycélium végétatif vers les appareils de multiplication. Dans ce sens, HITE (1973) note que l'irradiation ultra-violette déclenche la formation du P310 dans le thalle du *Botrytis cinerea* avant qu'il ne sporule et n'accumule, finalement, ce composé dans les conidies. Il en serait de même, selon FAYRET et VITO (1981), chez le *Gnomonia leptostyla* où l'appauvrissement en P310 des mycéliums, au moment de la différenciation, serait dû au passage de cette molécule dans les conidies ou les ascospores. Mais ces dernières ne sont-elles pas aussi des lieux de synthèse ?

2) Distribution

D'une manière plus générale, ARPIN et BOUILLANT (1981) établissent une liste d'une centaine de champignons (Zygomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes, Deutéromycètes) dont l'analyse révèle une absorption caractéristique à 310 nm.

Plus précisément, chez le genre *Nectria*, nous avons mis en évidence ce fait dans les mycéliums éclairés des *N. cinnabarina*, *N. coccinea*, *N. ditissima*, *N. gliocladioides* et *N. haematococca*.

La distribution des mycosporines ne se limite pas au monde fongique. Ainsi la présence de tels composés ou substances apparentées est remarquée chez :

- des algues rouges : *Porphyra yezoensis* (YOSHIDA et SIVALINGAM, 1970) ; *Chondrus yendoï* (TSUJINO et al, 1978)
- des organismes animaux marins (NAKAMURA et KOBAYASHI, 1982) tels que :
 - . des Coelentérés : *Palythoa tuberculosa* et *Physalia physalis* (ITO et HIRATA, 1977 ; TAKANO et al, 1978 ; FURUSAKI et al, 1980)
 - . des Mollusques : *Mytilus galloprovincialis* (CHIOCCARA et al, 1979)
 - . des Poissons (oeufs), (CHIOCCARA et al, 1980).

Ainsi, la vaste répartition des mycosporines, qui semble indiquer la participation de ces molécules à des métabolismes très variés, accentue la complexité du problème de leur signification physiologique.

III.- STRUCTURE DES MYCOSPORINES

Si TRIONE et LEACH, dès 1966-1969, précisent certains caractères physico-chimiques du P310 isolé d'*Ascochyta pisi*, la structure chimique de cette molécule (fig.28,c) n'est pourtant établie qu'en 1982 (PITTET). Ce résultat fait suite à l'élucidation initiale par FAVRE-BONVIN et al (1976) de la formule du P310 (mycosporine I, fig.26 b) présent dans les basidiospores de *Stereum hirsutum* (ARPIN et al, 1977).

Depuis cette date, le terme nouveau de mycosporine désigne une classe de petites molécules azotées, très hydrophiles, manifestant une absorption maximale unique dans le proche UV . Ces composés résultent de la condensation entre une cyclohexénone et une fraction azotée constituée d'un acide aminé ou de l'amino-alcool correspondant.

Les diverses structures de ces composés diffèrent au niveau des substituants du chromophore et par la nature de la partie aminée. Ainsi, une classification structurale des mycosporines (PITTET, 1982; BERNILLON et al, 1984) peut être proposée en fonction des variations relatives à :

1) la cyclohexénone

Cette substance (fig.25) est caractérisée à l'état natif dans des oeufs de poissons (CHIOCCARA et al, 1980) mais non chez les champignons.

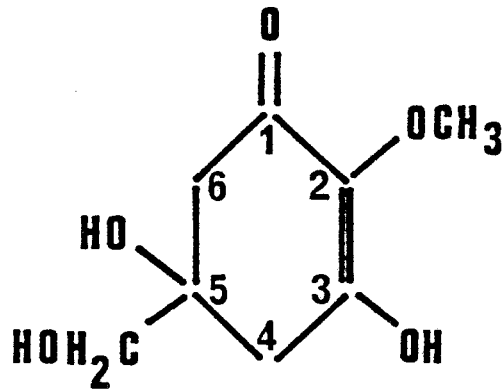


Figure 25 : Structure de la cyclohexénone

La nature, méthyle ou hydroxyle, du radical substitué sur le C2 du chromophore permet de différencier les mycosporines *sensu stricto* (2-OMe, UV max : 310 m) des normycosporines (2-OH, UV max : 320 nm). A l'intérieur de ces deux groupes de composés, les structures changent en fonction de l'acide aminé.

2) la nature de l'acide aminé

Au niveau des mycosporines, sont mises en évidence quatre fractions aminées principales, formées ou dérivant de la sérine, de l'acide glutamique, de la glutamine et du glycofolle, ce dernier ne faisant pas partie d'une mycosporine d'origine fongique.

a) Sérine

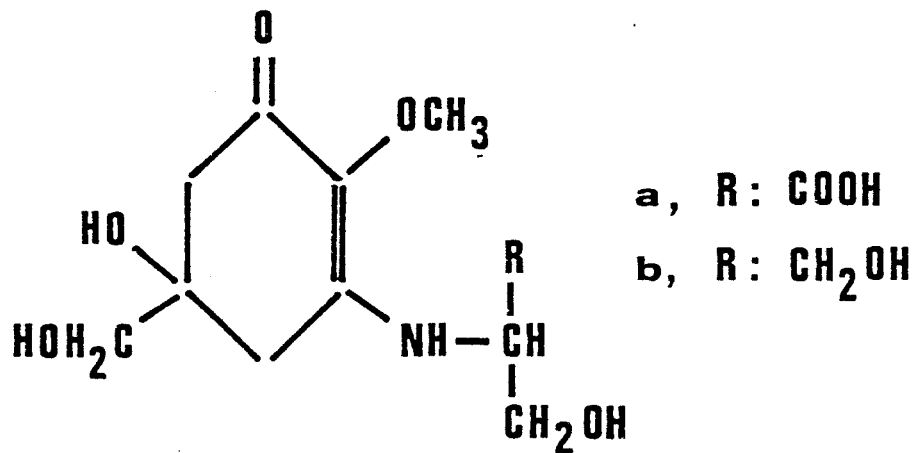


Figure 26 : Structure des mycosporines - sérine et sérinol.

- . sérine (fig. 26 a) composé mineur isolé de *Stereum hirsutum* (ARPIN et al, 1979)
- . sérine réduite ou sérinol (fig. 26 b), substance majeure de *Stereum hirsutum* et du *Nectria galligena* (FAVRE-BONVIN et al, 1976) appelée mycosporine I

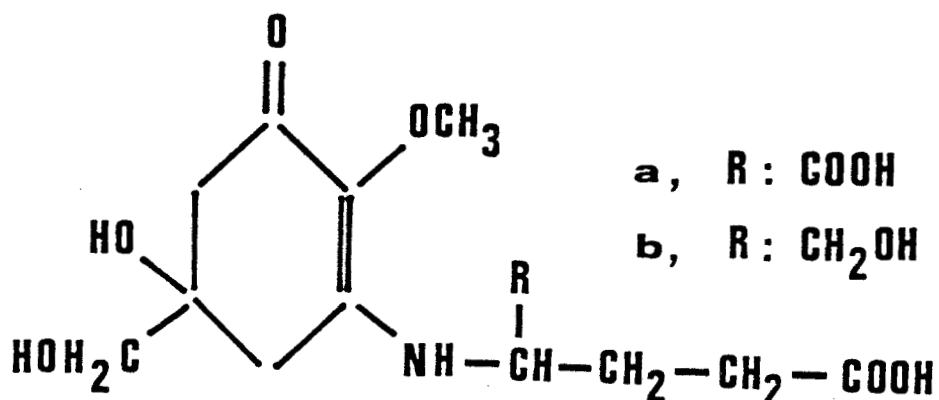
b) acide glutamique

Figure 27 : Structure des mycosporines-acide glutamique et glutamicol.

- . acide glutamique (fig. 27 a) mis en évidence chez *Glomerella cingulata* (YOUNG et PATTERSON, 1982) ou *Helvella leucomelaneae* (BERNILLON et al, 1984)
- . acide glutamique réduit ou glutamicol (fig. 27 b) rencontré chez *Gnomonia leptostyla* (FAYRET et al, 1981), *Morchella esculenta* (BOUILLANT et al, 1981) ou *Trichothecium roseum* et *Botrytis cinerea* (PITTET et al, 1983b)
- . d'autres structures de mycosporine-glutamicol sont décrites, elles représentent probablement des composés artificiels (forme cyclique ou glucosylée de l'acide glutamique réduit) résultant des processus de purification.

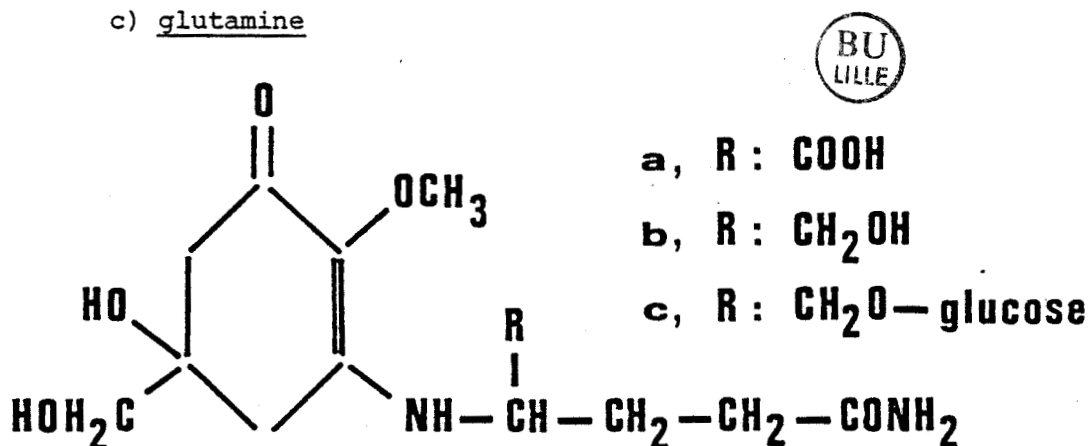
c) glutamine

Figure 28 : Structure des mycosporines-glutamine, glutaminol et glutaminol glucosylée.

- . glutamine (fig. 28 a) chez *Pyronema omphalodes* et *Glomerella cingulata* (BERNILLON et al, 1984)
- . glutamine réduite ou glutaminol (fig. 28 b) chez *Trichothecium roseum* ; *Botrytis cinerea* ou *Gnomonia leptostyla* (PITTET et al, 1983b)
- . glutamine réduite et glucosylée (fig. 28 c) chez *Ascochyta fabae*, *A. pisi* et *Cladosporium herbarum* (PITTET et al, 1983b) ou *Pyronema omphalodes* (BERNILLON, 1982).

d) glycocolle

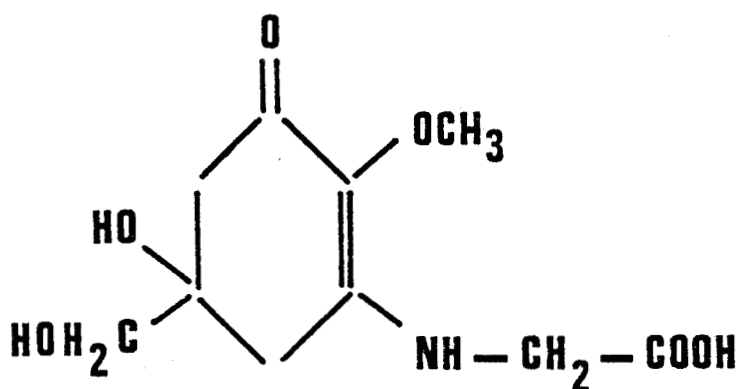


Figure 29 : Structure de la mycosporine-glycocolle

Ce P310, isolé de Coelentérés (TAKANO et al, 1978) et d'algues rouges (TSUJINO et al, 1978), présente une structure où la cyclohexénone est liée au glycocolle (fig. 29).

Les principaux auteurs confirment pour les mycosporines *sensu stricto* les propriétés physico-chimiques déjà décrites par TRIONE et LEACH (1969). En outre, le comportement en chromatographie liquide haute performance (HPLC) de ces substances a pu être précisément établi (BERNILLON, 1982 ; NAKAMURA et al, 1982).

En conclusion, la détermination de la structure des différentes mycosporines ne permet pas, dès à présent, de résoudre le problème de leur origine métabolique, même si :

- celle-ci est supposée proche de l'acide shikimique ou de ses dérivés (CHIOCCARI et al, 1979 ; BERNILLON, 1982 ; NAKAMURA et al, 1982).
- la présence conjointe de différentes mycosporines chez le *Pyronema omphalodes* (BERNILLON et al, 1984) permet aux auteurs de proposer un schéma des relations biosynthétiques entre ces divers composés.

En fait, si l'identification chimique du P310 représente une importante étape devant décider, selon LEACH (1965), du rôle de cette substance dans la reproduction fongique, elle fait apparaître, aussi, une diversité structurale des mycosporines qui, à l'exemple de leur vaste répartition, multiplie les hypothèses sur leur biogenèse ou leur signification biologique.

IV.- ROLE DES MYCOSPORINES

Chez les champignons, le rôle physiologique des mycosporines n'est pas clairement défini ainsi les résultats expérimentaux, souvent contradictoires, remettent en question la signification biologique générale de ces composés.

1) P310 : photorécepteur ?

Initialement, LEACH et TRIONE (1965) supposent que le P310 constitue le système photo-récepteur impliqué dans la photosporulation des espèces fongiques qu'ils étudient. Par la suite, l'existence de ce composé, dans des thalles fertiles, cultivés à l'obscurité, rend improbable cette éventualité.

Dans ce sens, TAN (1978) considère le P310 comme une conséquence secondaire de l'absorption lumineuse. Ces expériences (TAN et EPTON, 1974) placent la biosynthèse du P310 sous le contrôle du mycochrome proche UV-bleu qui intervient dans les réponses conidiogènes photo-réversibles du *Botrytis cinerea*.

2) P310 : facteur morphogène photomimétique ?

Cette activité est démontrée pour certains champignons à sporulation photodépendante où la mycosporine, incorporée au milieu nutritif, induit, à l'obscurité totale, des morphogénèses reproductrices et se substitue donc à la lumière.

Un tel rôle physiologique est, pour la première fois, mis en évidence par LEACH (1965), TRIONE et LEACH (1966, 1969). Ces auteurs remplacent les irradiations UV, normalement indispensables à la différenciation des pycnides d'*Ascochyta pisi* et des périthèces du *Pleospora herbarum*, par une addition de P310 au substrat cultural. Cet effet photomimétique du P310 se confirme chez *Stemphyllium solani* (SPROSTON, 1969 ; cité par LEACH et TRIONE, 1969) alors que TAN et EPTON (1974), en raison de résultats inconstants, ne peuvent conclure à l'efficacité sporogénique de cette substance sur la conidiogénèse du *Botrytis cinerea*. Quant à eux, FAYRET et VITO (1981) mentionnent "qu'une activité morphogène de la mycosporine semble intervenir chez le *Gnomonia leptostyla* mais que celle-ci doit être plus précisément confirmée."

Enfin RUSMIN et LEONARD (1975-1978) provoquent, chez une souche haploïde, normalement stérile, de *Schizophyllum commune*, la formation de carpophores. Cette induction repose sur l'incorporation, dans le milieu nutritif, d'une substance "FIS" ("fruiting inducing substance") qui, extraite de *Cladosporium cladioïdes*, présente une absorption maximale à 310nm. L'activité de la "FIS" est nécessairement complétée par une irradiation lumineuse où ces deux paramètres, biochimique et photonique, n'entraînent, séparément, aucune fructification du mycélium monocaryotique. Pour leur part, ARPIN et BOUILLANT (1981) notent que l'absorption à 310 nm des extraits mycéliens de *Cladosporium cladioïdes* et *C. herbarum* peut être rapportée, chez cette dernière espèce, à la mycosporine glutaminol glucosylée. Toutefois, aucune relation n'est établie entre la "FIS" et la mycosporine.

Contrairement aux résultats précédents, ceux obtenus par : VARGAS et WILCOXON (1969) pour *Helminthosporium dictyoïdes*, VAN DEN ENDE et CORNELIS (1970) pour *Sclerotinia fructicola*, HITE (1973) pour *Botrytis cinerea*, MOYER et LEACH 1976 pour *Leptosphaerulina briosiana* ou PITTET et al, (1983a) chez *Ascochyta fabae* démontrent que le P310, additionné au milieu nutritif, ne restaure pas, à l'obscurité, la fertilité photodépendante de ces champignons. Ainsi, pour ces auteurs, les mycosporines n'apparaissent plus comme des facteurs sporogènes photomimétiques. Elles seraient, plutôt, des métabolites secondaires issus de biosynthèses particulièrement stimulées par la lumière, durant les processus de reproduction.

3) P310 : agent photoprotecteur ?

La détection des mycosporines chez certains Coelentérés à l'exemple de *Palythoa tuberculosa* (ITO et HIRATA, 1977) suggère aux auteurs que le P310 peut exercer, pour ces organismes, une fonction de protection vis à vis du rayonnement ultra-violet.

Cette hypothèse semble vérifiée par les expériences de BROOK (1981) relatives à la photosensibilité des conidies germantes du *Glomerella cingulata*. Ainsi, l'auteur démontre :

- d'une part, que l'effet léthal, très important, des radiations UV (280 nm < λ < 320 nm) sur les conidies différenciées à l'obscurité et dépourvues de mycosporine, devient nul pour les spores qui, formées, à la lumière, contiennent du P310
- d'autre part, qu'au contact d'une solution de P310, les spores de premier type présentent, malgré un rayonnement UV, un taux de survie comparable à celui des conidies à mycosporine native.

Dans ce cas précis de multiplication asexuée, la mycosporine représenterait une forme de protection des conidies vis à vis des rayons UV solaires.

4) P310 : substance de réserve ?

Du fait de leur accumulation privilégiée dans les spores fongiques et de leur nature physico-chimique, les mycosporines pourraient, selon FAYRET et VITO (1981), constituer des substances de réserve, facilement métabolisées lors de la germination des conidies ou des ascospores.

Confortant cette possibilité, les résultats préliminaires de TAN et EPTON (1974) indiquent, effectivement, une diminution de la teneur initiale en P310 des spores asexuées du *Botrytis cinerea* au cours de leur germination. Les études poursuivies dans cette voie, par PITTET (1982), démontrent, sans ambiguïté, que les conidies non dormantes d'*Ascochyta fabae*, de *Botrytis cinerea* et de *Trichothecium roseum* n'utilisent pas les mycosporines, concentrées à leur niveau, durant les premières phases de leur développement.

5) P310 : composé de désintoxication ?

La présence de mycosporines ou de substances apparentées dans les êtres animaux marins (coelentérés, mollusques bivalves, échinodermes, ...) ne pose plus le problème de la signification physiologique de ces composés en terme de facteur sporogénique photoproduit ou non.

La vaste distribution des mycosporines dans ce monde animal (NAKAMURA et KOBAYASHI, 1982) ferait de ces substances les éléments (finaux) d'une chaîne alimentaire dont les modalités/spécifiques dans chaque cas, expliqueraient la variabilité des structures rencontrées. Pour CHIOCCARA et al (1979), la biogenèse des mycosporines, marquée par une réaction de condensation entre un chromophore cyclohexénique et un acide aminé, serait le signe d'un processus de désintoxication. Par celui-ci, les organismes élimineraient les métabolites étrangers ou devenus indésirables en les rendant moins polaires et relativement moins actifs.

Une telle signification physiologique des "P310" est envisagée chez les champignons par PITTET (1982). Cet auteur rapproche, au plan fonctionnel, les mycosporines glucosylées (*Ascochyta fabae*) de certains sucres conjugués : glucuronides (animaux) ou β glucosides (végétaux supérieurs) qui représentent des formes d'élimination très hydrosolubles d'aglycones toxiques initialement peu

hydrophiles. Par analogie avec les mycosporines fongiques non glucosylées, un autre mode d'épuration, surtout animale, procède de la conjugaison du "déchet" avec un acide aminé qui est souvent la glutamine, l'ornithine, la sérine ou le glyco-colle. A l'exception de l'ornithine, ces composés azotés sont effectivement parties intégrantes des "P310".

Au terme de cette revue bibliographique, il apparaît qu'aux résultats remarquables définissant les structures chimiques des mycosporines ne correspondent pas encore, comme le supposait LEACH, la connaissance précise du rôle joué par ces substances, notamment au niveau de la photosporulation fongique.

De fait, si diverses expériences font état d'étroites relations entre le "P310" et la formation des spores, plus précisément lorsque celle-ci est photodépendante, les nombreuses hypothèses émises sur la signification biologique des mycosporines traduisent l'incertitude à ce sujet, plus particulièrement, quant à l'activité sporogénique de ces composés. Sur ce point, les résultats contradictoires confondent :

- ceux qui, déniaient toute fonction sporogène du P310, intéressent davantage la conidiogénèse, soit une différenciation gamétophytique dépendante de conditions souvent peu restrictives.
- avec ceux qui traitent de la photoinduction périthéciale du *Pleospora herbarum* (LEACH, 1965) ou du *N. galligena* (DEHORTER, 1976). Cette dernière, évolution sporophytique, procède spécifiquement de l'influence conjuguée et optimale de nombreux paramètres génétiques, externes,.... Ainsi le contrôle rigoureux de ces facteurs, exigé pour la formation *in vitro* des structures sexuées serait-il plus favorable à l'expression des activités métaboliques et morphogènes du P310 exogène utilisé comme substitut de la lumière ?

Compte tenu de ces différentes suggestions, notre travail, s'appuyant sur des conditions précisément définies de la photoinduction périthéciale du *N. galligena*, tentera d'élucider le rôle du P310 dans la sexualisation de ce Pyrénomycète.

B.- PRÉSENCE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE DU P310 CHEZ LE *N. GALLIGENA*

Les principales interrogations, énoncées dans la revue bibliographique précédente, qui concernent la structure, la localisation, la photoinductibilité et l'activité biologique des mycosporines constituent le plan de notre étude des relations entre le P310 et la photoinduction des périthèces du *N. galligena*.

Certaines de ces questions ont fait l'objet de deux publications parues au Canadian Journal of Botany (DEHORTER, 1976 ; DEHORTER et BERNILLON, 1983).

I.- MISE EN EVIDENCE, PURIFICATION ET STRUCTURE CHIMIQUE DU P310

Cette étude rappelle les conditions initiales de la mise en évidence du P310 chez le *N. galligena* (DEHORTER, 1972). Elle définit, en outre, les modalités de purification de ce composé dont la structure a été établie par FAVRE-BONVIN et al (1976).

1) Mise en évidence

a) conditions de culture

Deux séries culturales du *N. galligena* se développent, durant 30 jours, sur milieu synthétique M23 liquide, à la température constante de 18°C :

- la première, qui est placée sous un éclairage de lumière blanche (12hL/12hO, 750 μWcm^{-2}) produit finalement un grand nombre d'ascocarpes fertiles
- la seconde, incubée de façon permanente à l'obscurité, ne différencie aucune structure sexuée.

A l'issue de l'expérience, les mycéliums recueillis constituent le matériel végétal soumis aux extractions. Celles-ci, qui relèvent de procédés déjà décrits (page 15), aboutissent à l'obtention, pour chaque lot cultural, d'un extrait aqueux de faible volume ajusté à pH : 5.

b) résultats

Les profils d'absorption des deux solutions aqueuses (pH : 5) sont établis au spectrophotomètre entre 250 et 500 nm. La figure 30 en illustre les caractéristiques :

Les enregistrements spectrophotométriques permettent de constater l'existence :

- commune d'un pic majeur proche de 265 nm dans les thalles des deux lots culturaux,

- singulière d'une absorption maximale à 310 nm au niveau des mycéliums éclairés et sexuellement fertiles.

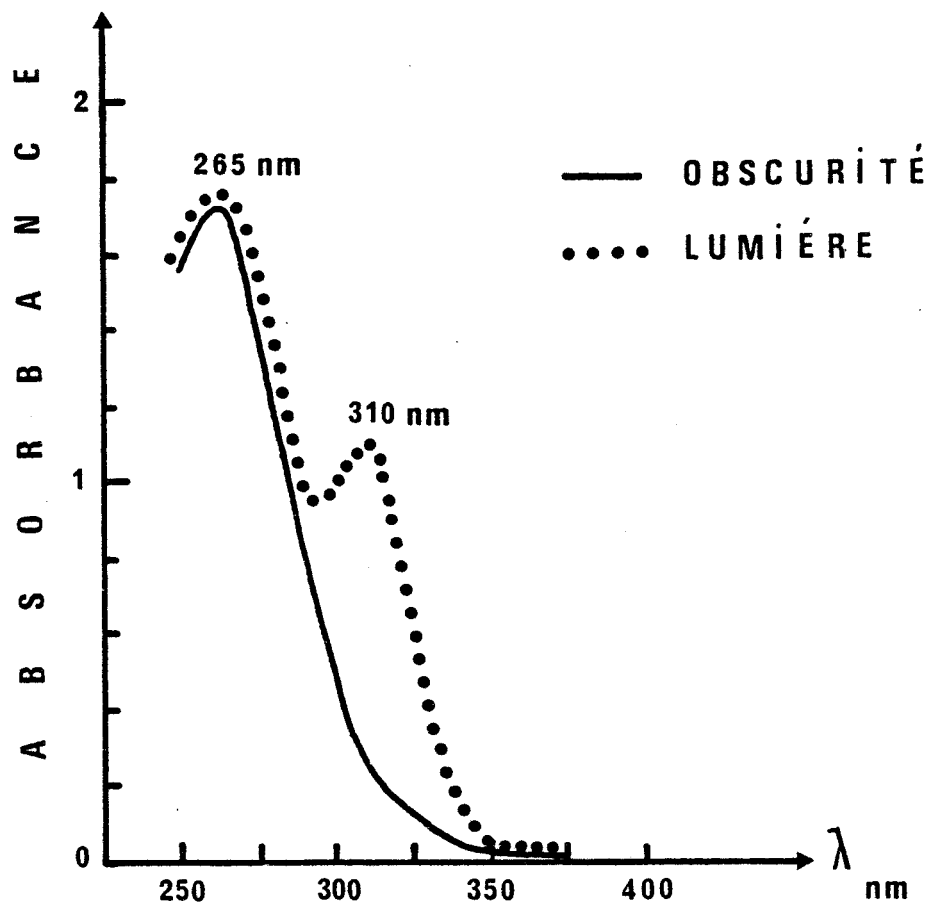


Figure 30 : Spectres d'absorption d'extraits aqueux des mycéliums du *N. galligena*

Ces résultats corroborent parfaitement ceux, déjà cités, de TRIONE et LEACH et confirment la présence du P310 dans les cultures photoinduites du *N. galligena*.

2) Purification du P310

Les étapes de purification, qui conduisent à l'isolement du P310, sont effectuées sur des solutions aqueuses (pH : 5) provenant d'hyphes irradiées du champignon.

a) Chromatographies

Les extraits aqueux, d'absorption maximale à 265 nm et 310 nm, sont purifiés par trois passages successifs sur des résines échangeuses d'ions de type DOWEX.

Le diagramme (figure 31) schématise les résultats essentiels de ces trois chromatographies d'une solution aqueuse (pH : 5) obtenue, dans le cas présent, du traitement de 175 grammes de mycélium lyophilisé et récupéré après 30 jours de culture à la lumière (12 hL/12hO, $750 \mu \text{Wcm}^{-2}$)

α) *résine DOWEX 1 x 8, forme Cl^-* :

L'éluion par l'eau de la colonne entraîne une sortie rapide du P310 non adsorbé et sa séparation quasi totale avec :

- des substances qui, outre des maxima d'absorption à 267, 375 et 446 nm, présentent une forte fluorescence jaune sous UV et un R_f chromatographique comparable à celui de la riboflavine
- des composés, d'absorption maximale (265 nm) dont les premières analyses en CLHP (BERNILLON) révèlent la nature nucléosidique (AMP, ADP, ATP, nucléotides) et aminée (phénylalanine, tryptophane).

β) *résine DOWEX 50 W, forme H^+* :

Cette chromatographie de l'éluat "P310" précédent achève d'éliminer les fractions absorbant à 265 nm. Elle permet de distinguer deux ensembles d'éluats aqueux d'absorption maximale à 310 nm, soit, successivement :

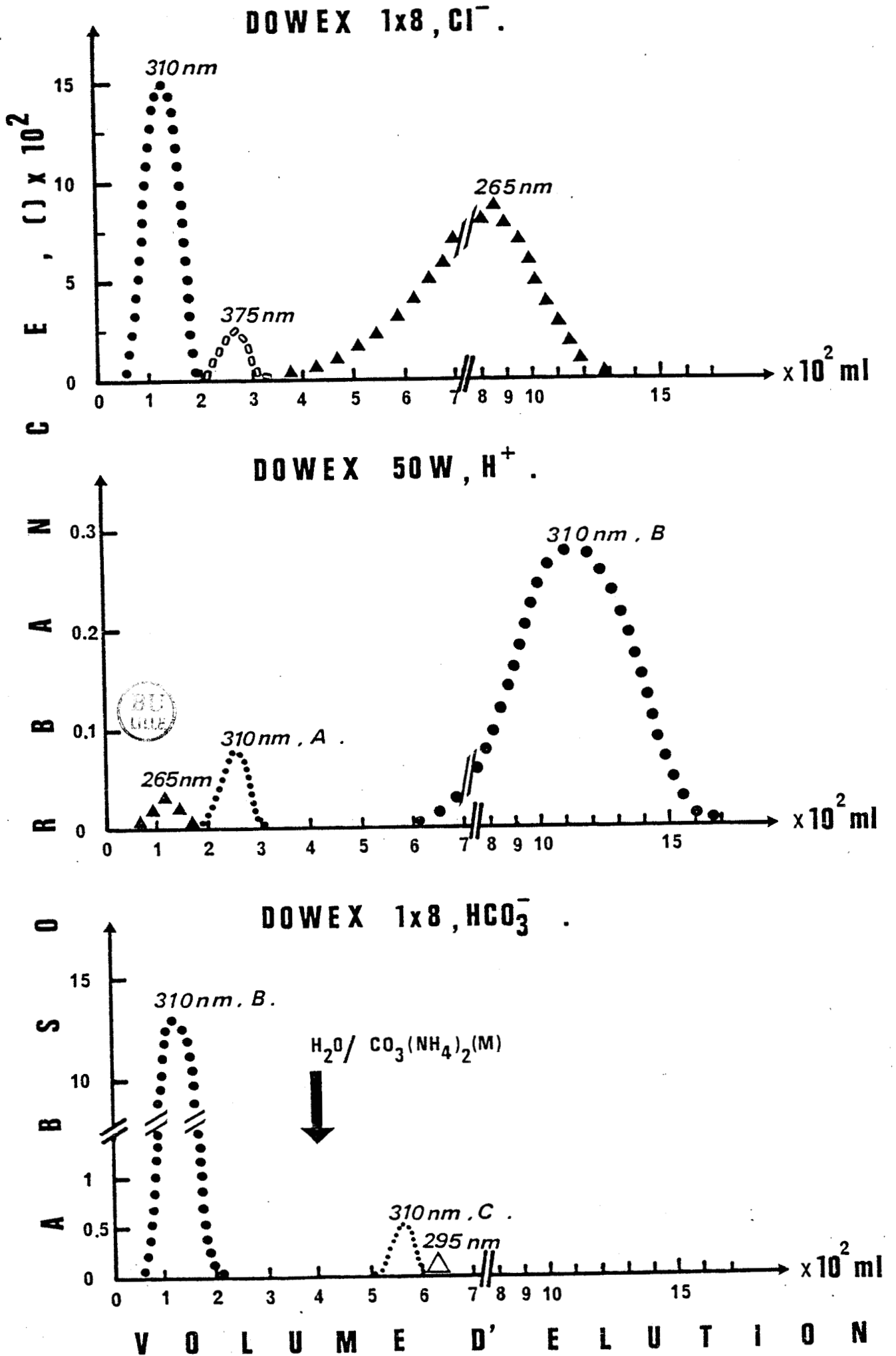
- le P310 A en faible proportion
- le P310 B composé majeur dont nous avons poursuivi la purification ci-dessous.

γ) *résine DOWEX 1 x 8, forme HCO_3^-* :

Le P310 est élué très rapidement par l'eau. Dans l'exemple choisi, sa teneur atteint 330 mg soit environ 0,19% du poids de mycélium lyophilisé traité. Ce pourcentage se rapproche de ceux, compris entre 0,16 et 0,32%, définis pour ce même composé chez *Stereum hirsutum* (ARPIN et al, 1977).

Finalement, un gradient continu : eau/carbonate d'ammonium ($\text{CO}_3 (\text{NH}_4)_2, \text{M}$) assure les désorptions successives de substances absorbant à 310 nm (P310B et C) et à 295 nm. Cette dernière pourrait alors correspondre à la cyclohexénone ($\lambda \text{ max} : 294 \text{ nm}$) chromophore de la mycosporine tel qu'il a été détecté dans des oeufs de poisson par CHIOCCARA et al (1980).

Figure 31 : Diagramme d'élution chromatographique d'extraits aqueux de mycéliums photoinduits du *N. galligena*.



En résumé, ces résultats chromatographiques indiquent que, chez le *N. galligena*, l'absorption à 310 nm de l'extrait aqueux brut semble résulter de trois composés "P310" A, B et C où le second est considérablement plus abondant.

Ces données confirment celles de TRIONE et LEACH (1966) qui séparent, chez *Ascobryta pisi*, trois fractions "P310". De même, ARPIN et al (1977), démontrent que l'absorption à 310 nm décelée dans les carpophores du *Stereum hirsutum* est le fait de la présence :

- primordiale (96%) de la mycosporine I (mycosporine-sérine réduite) identique au P310 B isolé du *N. galligena* (FABRE-BONVIN et al, 1976)
- secondaire de la mycosporine III (mycosporine-sérine) qui pourrait correspondre au P310 A du *N. galligena*
- éventuelle d'un troisième P310 dérivé de l'alanine réduite (P310 C du *N. galligena* ?).

La coexistence de plusieurs P310 est également décrite chez *Pyronema omphalodes* (BERNILLON et al, 1984) où l'évolution des structures des mycosporines, concomitante du déroulement du processus sexué, tend vers une plus grande stabilité de ces composés.

Enfin, les éluats présentant une absorption maximale à 295 nm correspondent-ils à la présence, sous forme non conjuguée, de la cyclohexénone, dont les très faibles quantités recueillies n'ont pas permis de vérifier ce point, ni l'éventuelle activité biologique de ce produit chez le *N. galligena*.

b) Caractérisation physico-chimique du P310 B

Cette étude permet de définir certaines caractéristiques du P310 B, isolé du *N. galligena* notamment :

- sa grande solubilité dans les solvants polaires (eau, méthanol, éthanol,...) et son insolubilité totale dans les solvants organiques (éther éthylique, éther de pétrole, chloroforme, acétone,...)
- sa bonne stabilité en milieu acide (maximum d'absorption déplacé à 305 nm), mais également à température élevée. Dans ce cas, le P310 résiste à un autoclavage à 120°C (30 minutes)
- ses réactions colorées : négative avec la ninhydrine, jaune-orange avec la 2-4 dinitro-phénylhydrazine, rouge brun avec le chlorure ferrique ou encore positives avec le nitrate d'argent et la para-nitraniline diazotée.

- son comportement en chromatographie sur couche mince de cellulose ou de gel de silice : Rf respectivement égal à 0,90 et 0,58 dans le système solvant phénol/eau (3 : 1, p/p)
- son exclusion des membranes dialysantes (p.m < 1000) ou des gels chromatographiques (Sephadex G10).

Ces divers critères corroborent, pour l'essentiel, ceux énoncés par TRIONE et al (1969).

3) Structure chimique du P310 B du *N. galligena*

Une dizaine d'années sépare la mise en évidence du P310 (LEACH, 1965) et la découverte de la structure moléculaire d'un composé de ce type isolé des carpophores du *Stereum hirsutum* (FAVRE-BONVIN et al, 1976). Les informations chimiques et spectrales qui définissent la structure de cette substance sont résumées par ARPIN et al, (1977). Ces auteurs précisent l'identité en tous points (spectres UV, IR, SM, RMN et chromatographie) des P310 majeurs des *Stereum hirsutum* et *N. galligena*.

La structure du "P310" B du *N. galligena* (fig. 32) se rapporte donc à la méthoxy-2, bis (hydroxyméthyl) méthylamino-3, hydroxy-5, hydroxyméthyl-5, cyclohexène-2, one 1 encore désignées sous les termes de mycosporine I ou mycosporine-sérine réduite ou mycosporine-sérinol.

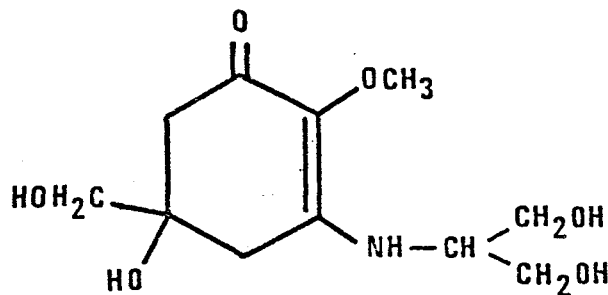


Figure 32 : Structure du P310 B du *N. galligena*

Cette substance, C₁₁ H₁₉ NO₆, de couleur blanche, de consistance pâteus à la température ordinaire, présente une absorption unique à 310 nm : $\epsilon = 27270$ et $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1045 \pm 5/\text{eau}$. Elle fait partie des mycosporines (2-Ome) *sensu stricto*

En conclusion, cette étude nous permet de retenir que :

- l'absorption à 310 nm des mycéliums irradiés du *N. galligena* résulte de trois formes de "P310" dont l'une, en proportions majeures, est identifiée à la mycosporine-sérinol. Précisément, cette structure du P310, différente d'autres mycosporines fongiques, a-t-elle une spécificité fonctionnelle ou n'est-elle qu'une variable selon le métabolisme du champignon ?
- des teneurs en P310, relativement importantes, sont présentes dans les thalles du *N. galligena*. Dans ce sens, la culture du *N. galligena* sur milieu synthétique liquide nous permet de disposer, en vue d'études ultérieures, de quantités appréciables de mycosporine dont, le défaut, avait limité les travaux de LEACH
- la biosynthèse de P310 dans les mycéliums comme la production des périthèces du *N. galligena* s'avère inexistante à l'obscurité, ainsi la photodépendance de ces deux événements, biochimique et biologique, constatée globalement à la lumière blanche, se vérifie-t-elle, d'une manière identique dans les 2 cas, pour chacun des paramètres lumineux ?

II.- CONDITIONS LUMINEUSES DE LA FORMATION DE MYCOSPORINE

Afin de répondre de la similitude - ou non- des exigences lumineuses qui, chez le *N. galligena*, conditionnent la biosynthèse du P310 et la reproduction sexuée, cette étude précise les effets des paramètres de l'éclairement (durée, intensité et qualité) sur la teneur en P310 des thalles et les confronte avec ceux, déjà décrits, sur la production des périthèces fertiles.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec J. BERNILLON (DEHORTER et BERNILLON, 1983).

1) Conditions générales d'étude

Dans tous les cas, les cultures du *N. galligena* se développent à la température de 18°C, sur milieu synthétique M23 liquide. L'arrêt des expériences se situe : soit au 30^e jour dans les cas d'irradiation unique, soit 12 heures après le dernier éclairement dans les cas de séquences photopériodiques.

Après lyophilisation des mycéliums recueillis ou des filtrats de culture, des extractions hydro-alcooliques (H₂O-éthanol : 80/20, v/v) sont pratiquées sur les lyophilisats.

Les teneurs en mycosporine I des extraits filtrés sont déterminées par CLHP. Elles sont généralement exprimées en mg/g de mycélium lyophilisé ou en mg/l de milieu ou filtrat de culture.

Les valeurs de la production périthéciale qui apparaissent dans les tableaux ou figures font référence aux résultats obtenus (troisième partie) dans des conditions culturelles similaires.

2- Influence de la durée de l'éclairement

L'effet de ce paramètre lumineux sur la formation du P310 est déterminé en fonction, soit du nombre de photopériodes, soit d'un photostimulus unique ; les cultures sont éclairées en lumière blanche.

a) Influence du nombre de photopériodes (12 h L/jour)

Les cultures fongiques sont réparties en deux lots :

- le premier reçoit quotidiennement 12 heures de lumière (12 h L/12 h O, 750 μ Wcr)
- le second est maintenu constamment à l'obscurité.

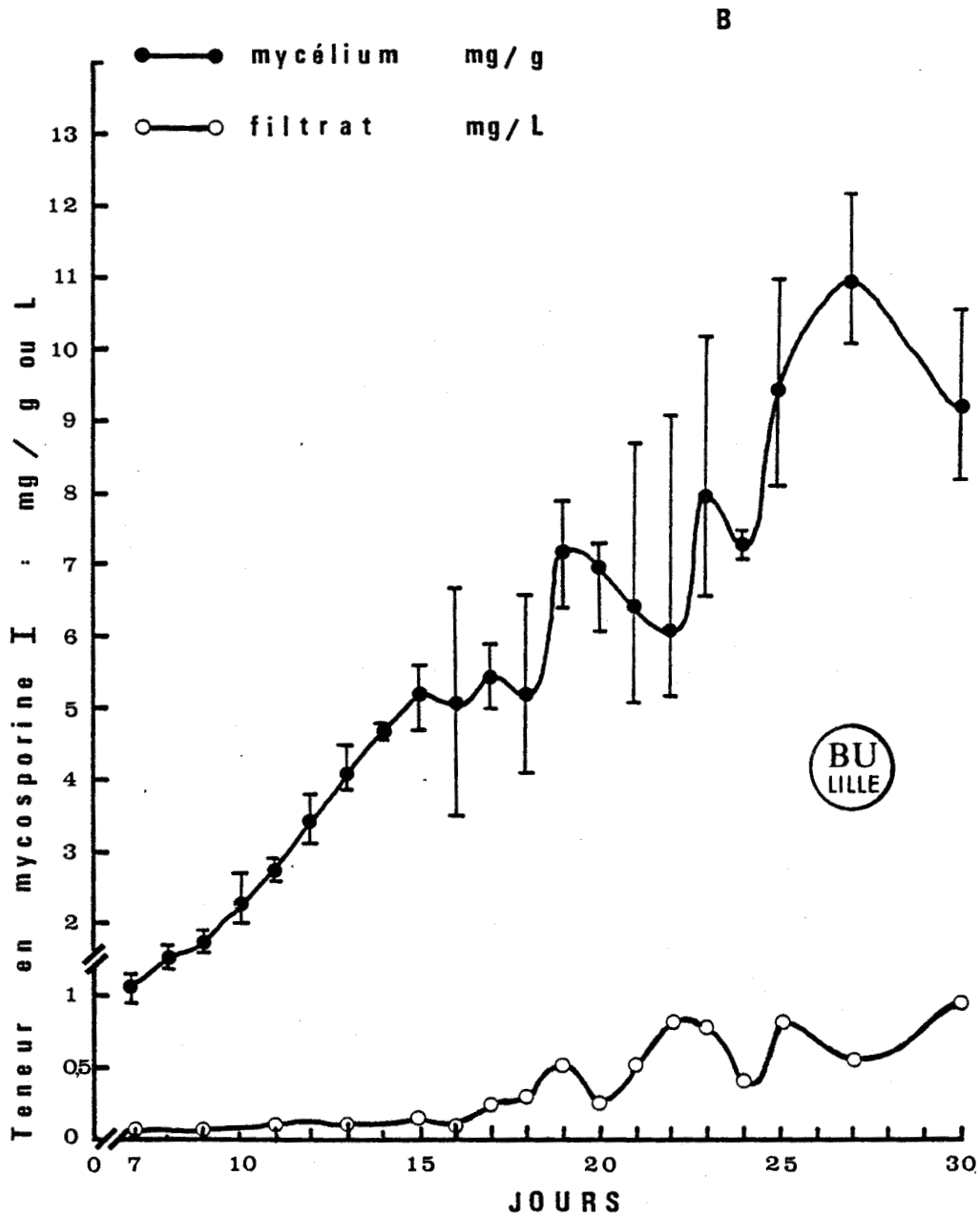
Les figures 33, A et B, traduisent les résultats obtenus à partir des mycéliums du 1er lot cultural soit :

- A : les rapports entre la production de P310 et les développements mycélien et sexué au niveau d'une unité culturelle représentée par une boîte de Roux contenant 100 mL de milieu M23
- B : l'évolution de la teneur en mycosporine I des thalles et des filtrats de culture.

La figure 33 A fait apparaître que la production de mycosporine débute précocement et précède nettement toute formation de structure reproductrice. La quantité de P310 progresse régulièrement du 7^e au 15^e jour, se stabilise à la différenciation périthéciale, et augmente à nouveau au cours de la maturation des ascocarpes. Elle chute à la libération des ascospores (27^e jour) mais son niveau demeure élevé au 30^e jour de développement.

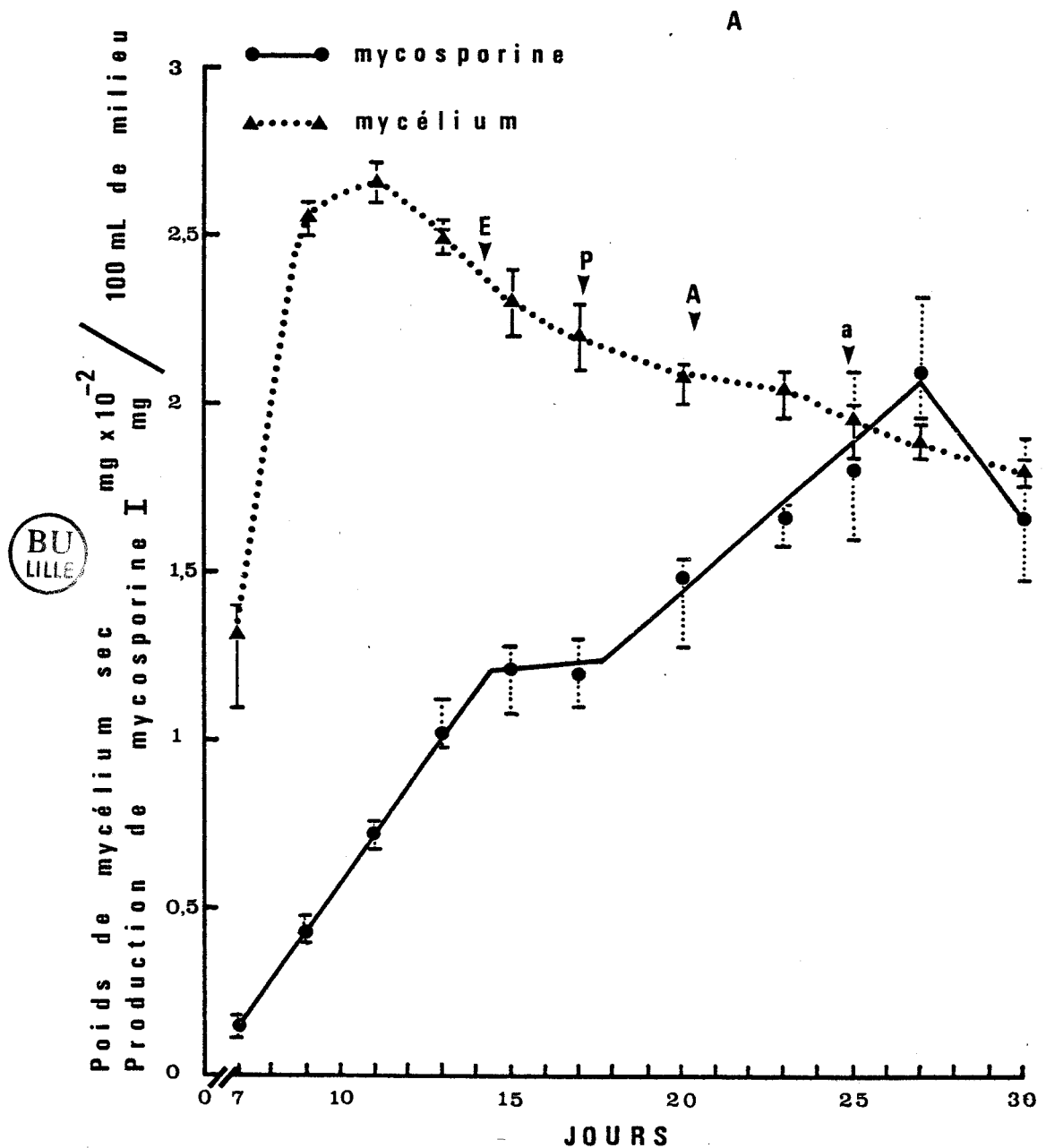
La figure 33 B démontre, également, que la teneur en P310 s'accroît quasi-continuellement jusqu'au 27^e jour d'incubation, malgré de fortes fluctuations du 15^e au 25^e jour, ces dernières pouvant donner, à la courbe de biosynthèse, une allure sinusoïdale propre à chaque série expérimentale. Durant cette période de grande variabilité, au plan des dosages de la mycosporine, se produisent, corrélativement, des échanges oscillants de cette substance

Figure 33 B : Influence du nombre de photopériodes (12hL/jour) sur la teneur en mycosporine I des mycéliums du *N. galligena* et des filtrats de culture.



Légende : Les cultures sont réalisées à 18 °C, sur milieu M23 liquide et sous un éclaircment (750 μWcm^{-2}) en lumière blanche.

Figure 33 A : Influence du nombre de photopériodes (12hL/jour) sur la croissance mycélienne et la production de mycosporine I des cultures du *N. galligena* au cours de leur développement sous un éclaircissement ($750 \mu\text{Wcm}^{-2}$) en lumière blanche.



Légende : Les cultures sont réalisées à 18°C sur milieu M23 liquide. Les moments d'apparition des ébauches périthéciales (E), des périthèces (P), des asques (A) et des ascospores (a) sont indiqués par des têtes de flèches (\blacktriangledown).

entre le champignon et le milieu cultural. La quantité de P310, ainsi libérée dans le substrat, peut représenter, au 30^e jour, 5 à 8% de celle dosée dans les thalles dont la teneur en P310 correspond à environ 1% du poids de matière sèche.

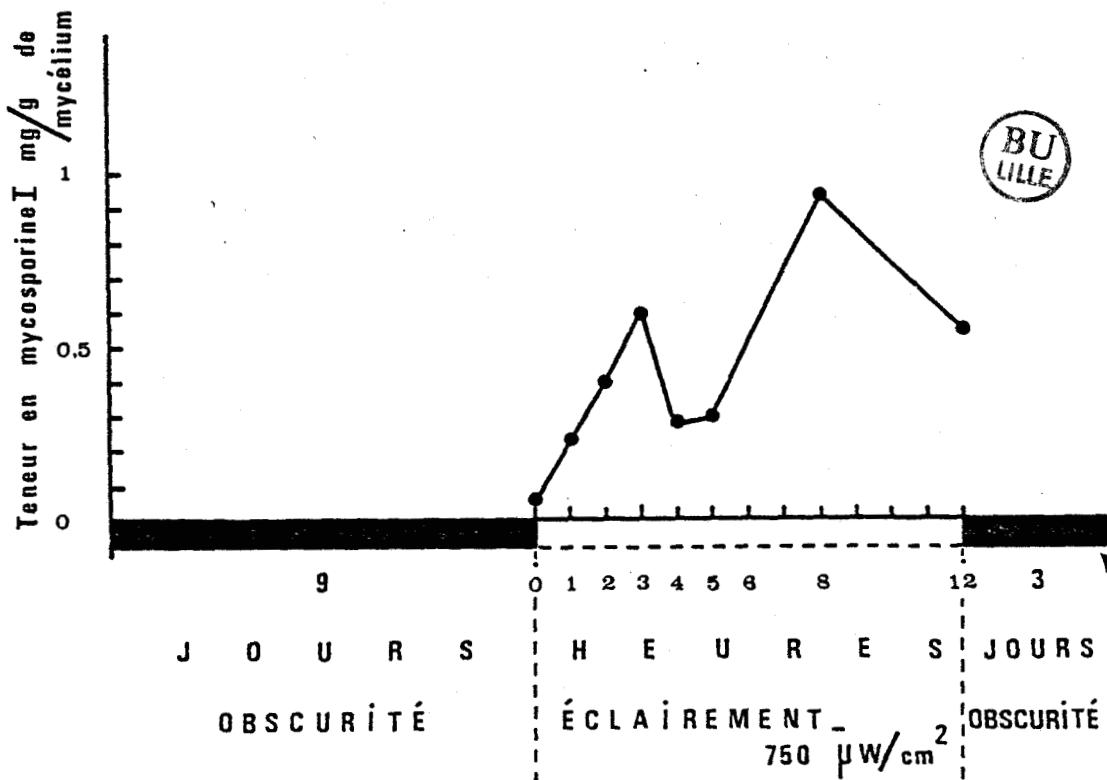
Au niveau du second lot cultural, placé à l'obscurité continue, le taux maximal de mycosporine I des hyphes stériles s'élève, au 30^e jour, à 0,1 mg/g de mycélium lyophilisé, soit une valeur cent fois inférieure à celle obtenue des cultures irradiées. En outre, l'analyse des filtrats culturaux n'a pas permis de déceler des quantités dosables de P310.

b) Influence de la durée d'un photo-stimulus unique

Dans ce cas particulier, les cultures du *N. galligena* sont incubées 12 jours à l'obscurité. Elles reçoivent, le 9^e jour après l'ensemencement, un seul éclaircissement ($750 \mu\text{Wcm}^{-2}$) de 1 à 12 heures de lumière blanche.

La figure 34 rend compte de la teneur en mycosporine des mycéliums éclairés dans ces conditions.

Figure 34 : Influence de la durée d'une seule photopériode sur la teneur en mycosporine I du mycélium du *N. galligena*.



Légende : Les cultures, incubées 12 jours à l'obscurité, reçoivent, le 9^e jour, un seul éclaircissement ($750 \mu\text{Wcm}^{-2}$) de 1 à 12 h de lumière blanche.

Cette expérience démontre que des temps d'irradiation de courte durée déclenche la biosynthèse du P310 qui est, alors, particulièrement stimulée par un photostimulus de 3 h puis de 8 h.

3) Influence de la valeur de l'éclairement

Les mycéliums du *N. galligena* sont soumis à des éclairagements en lumière blanche de 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 et 1500 μWcm^{-2} qui sont dispensés sous forme :

- soit de 11 à 30 photopériodes journalières de 12 heures
- soit d'un seul photostimulus de 24 heures interrompant, au 9^e jour, une incubation de 30 jours à l'obscurité.

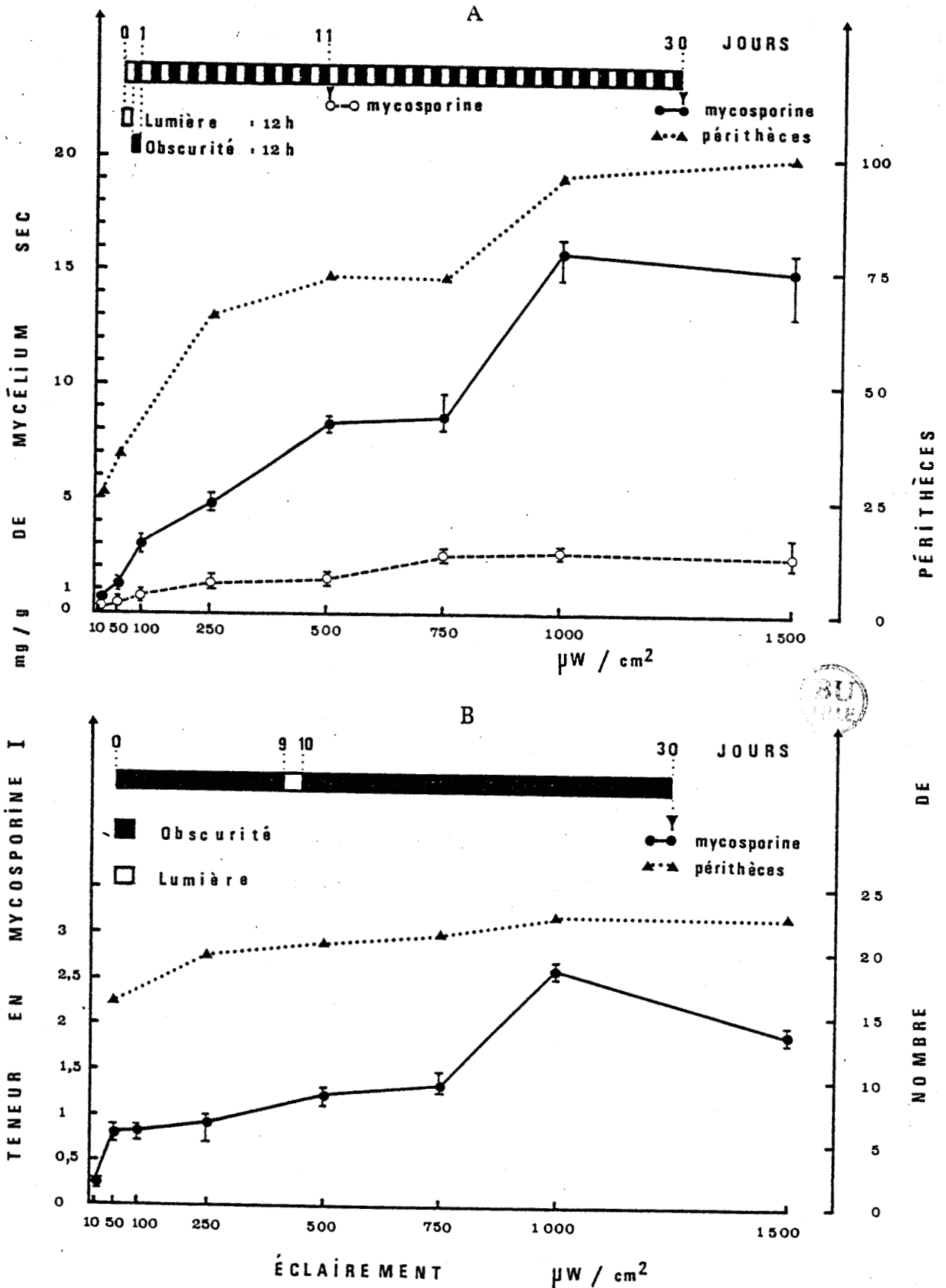
La figure 35 illustre les résultats ainsi obtenus des variations de la teneur en mycosporine I des mycéliums et de la production périthéciale du *N. galligena* en fonction des valeurs et du mode d'éclairement.

L'augmentation énergétique du flux lumineux de 10 à 1000 μWcm^{-2} accroît les taux de mycosporine et de périthèces produits. Dans chaque cas, l'éclairement optimum se situe à 1000 μWcm^{-2} , au delà de cette valeur, apparaît une saturation du processus de biosynthèse de la mycosporine.

Les teneurs en mycosporine, relevées après une séquence initiale de 11 photopériodes (12 hL/jour) ne démontrent pas de différences significatives selon les éclairagements et sont, sans rapport, avec les nombres d'ascocarpes obtenus ultérieurement.

De fait, il semble que la durée des irradiations, bien plus que leur intensité, s'impose comme le paramètre déterminant les niveaux des productions du P310 et des structures sexuées. Ainsi, la multiplication des photopériodes implique qu'un éclairage de 100 μWcm^{-2} produise une quantité de mycosporine équivalente à celle induite par un seul photostimulus d'intensité 1500 μWcm^{-2} . De même, le nombre de périthèces et la teneur en mycosporine sont multipliés par six lorsque la durée d'un éclairage de 1000 μWcm^{-2} varie de 24 heures à 360 heures.

Figure 35 : Influence de l'éclairé sur la reproduction sexuée et la teneur en mycosporine I (milligramme par gramme de mycélium lyophilisé) du *N. galligena*.



Légende : Eclairé en lumière blanche de 10 à 1500 $\mu W cm^{-2}$, le champignon est soumis soit à 11 ou 30 photopériodes journalières de 12 h (A), soit, au 9^e jour de développement, à un seul photostimulus de 24 h (B). Les têtes de flèches (▼) marquent les périodes de mesure de la production de mycosporine (11^e et 30^e jours) ou de perithèces (30^e jour)

4) Influence de la qualité de la lumière

Deux séries expérimentales ont permis d'étudier le rôle de la qualité de la lumière en fonction d'éclaircements soit multipliés et élevés, soit unique et faible.

a) Première série expérimentale

Les cultures du *N. galligena* sont exposées à des radiations blanches, rouges, vertes, bleues et proche UV émises par des tubes fluorescents qui autorisent des éclaircements de $750 \mu\text{Wcm}^{-2}$. Ces derniers sont appliqués quotidiennement 12 h pendant 11 et 30 jours, tandis qu'un lot cultural est maintenu à l'obscurité permanente.

Le tableau 16 indique la teneur en mycosporine des mycéliums et la production périthéciale mesurées dans ces conditions.

Tableau 16 : Influence de la qualité de la lumière sur la reproduction sexuée et la teneur en mycosporine I du *N. galligena*



QUALITE DE LA LUMIERE ¹		RYTHME D'IRRADIATION ¹		
		Série A: 11 x 12 h de lumière		Série B: 30 x 12 h de lumière
Eclairciment ¹	750 μWcm^{-2}	Mycosporine ² (mg/g)	Mycosporine ² (mg/g)	Périthèces ³
		Obscurité		0,04
Rouge	600 nm $<\lambda <$ 700 nm	0,04	0,15 \pm 0,05	0
Verte	490 nm $<\lambda <$ 600 nm	1,1 \pm 0,1	3,7 \pm 0,2	47
Bleue	400 nm $<\lambda <$ 500 nm	3,7 \pm 0,2	12,6 \pm 0,6	98
Proche UV	300 nm $<\lambda <$ 400 nm	3,9 \pm 0,2	13,7 \pm 0,2	108
Blanche		2,9 \pm 0,3	9,2 \pm 0,9	73

1 : le champignon reçoit des éclaircements de $750 \mu\text{Wcm}^{-2}$ émis par des tubes fluorescents. Les cultures sont irradiées pendant 11 jours (série A) ou 30 jours (série B) à raison de 12 h par jour

2 : le dosage, par CLHP, de la mycosporine I est effectué sur les mycéliums récoltés les 12^e (série A) et 31^e jours (série B). La teneur en mycosporine I est exprimée en milligramme par gramme de mycélium lyophilisé

3 : le nombre de périthèces représente la quantité moyenne d'ascocarpes fertiles par tube de culture sur milieu M23 gélosé.

Les données du tableau 16 démontrent que les taux de mycosporine des thalles, incubés à l'obscurité permanente ou en lumière rouge, sont très faibles et, éventuellement, insuffisants pour assurer la formation des périthèces. Ainsi, malgré des éclaircissements importants (durée et intensité), les radiations rouges demeurent inactives.

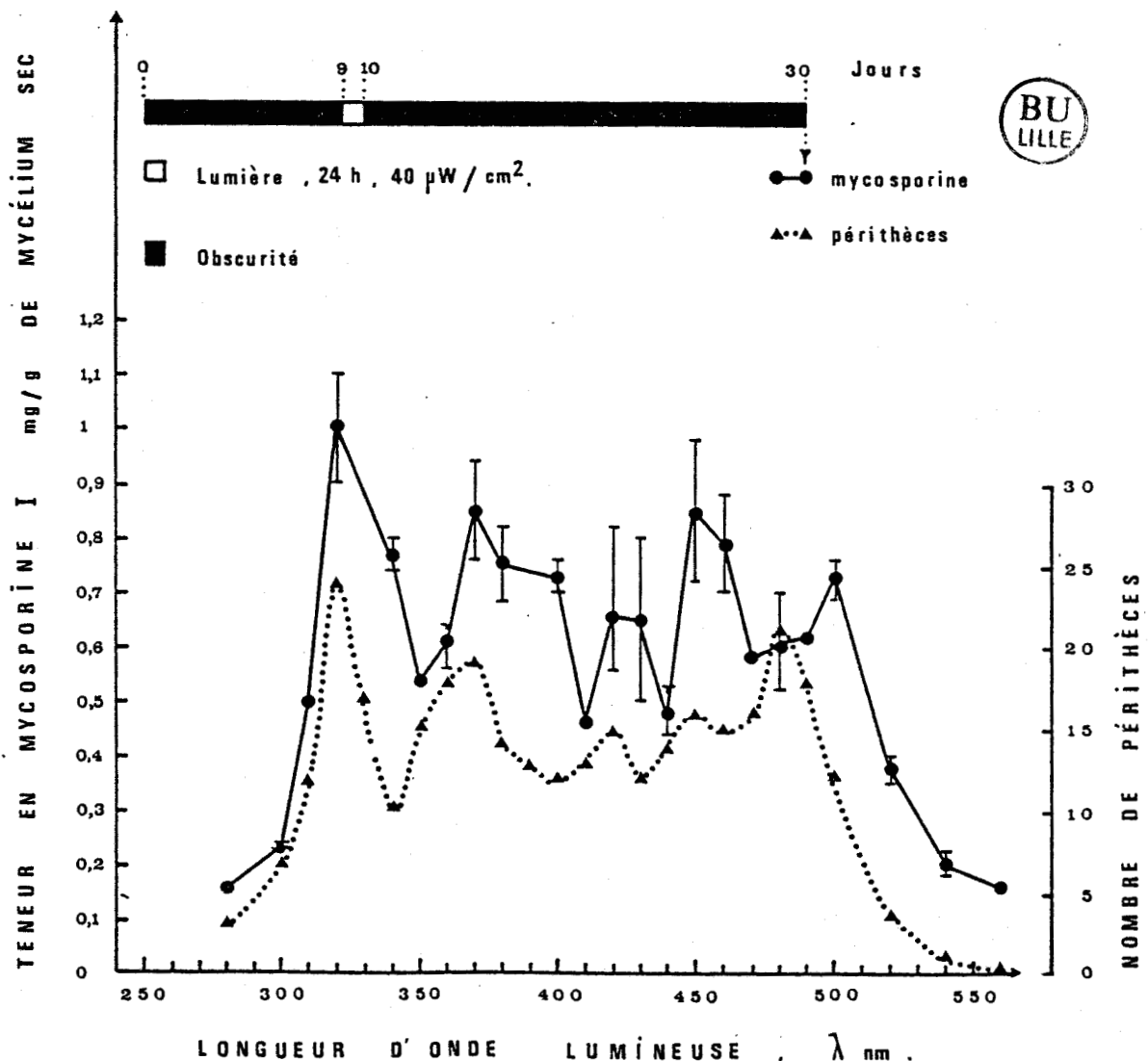
Inversement, ces résultats révèlent la grande efficacité des radiations bleues et surtout proche ultra-violettes, simultanément, sur les productions de mycosporine et d'ascocarpes.

b) Deuxième série expérimentale

A l'aide d'un monochromateur, nous avons déterminé, par intervalle de 10 nm, l'influence des longueurs d'onde, comprises entre 270 nm et 560 nm, sur la biosynthèse de mycosporine. Dans ce cas, une seule irradiation ($40 \mu\text{Wcm}^{-2}$) de 24 heures interrompt, au 9^e jour, le développement du champignon d'une durée de 30 jours, à l'obscurité permanente.

La figure 36 rend compte de l'influence des radiations monochromatiques sur la teneur en mycosporine et sur la formation des ascocarpes du *N. galligena*.

Figure 36 : Influence des longueurs d'onde lumineuse, sur la teneur en mycosporine I et la reproduction sexuée du *N. galligena*.



Cette étude prouve l'intervention prépondérante des radiations : 320 nm, 370 nm, 420 nm, 450 nm et 500 nm sur la biosynthèse de mycosporine qui est donc, particulièrement, stimulée par certaines longueurs d'onde proche ultra-violettes ou bleues. Elle confirme la quasi-inactivité des radiations supérieures à 560 nm.

Ces résultats, très homogènes pour les deux séries expérimentales, démontrent une grande analogie des photoréponses biologique (reproduction sexuée) et métabolique (teneur en P310) aux irradiations 320 nm, 370 nm, 420 nm et 450 nm. Ainsi, les spectres d'activité lumineuse établis pour ces deux phénomènes sont-ils très comparables, mis à part le décalage entre les effets optima des radiations 480 nm et 500 nm sur les productions, respectivement, des périthèces et de mycosporine.

Discussion

Dans les mycéliums éclairés du *N. galligena*, la présence du P310, antérieurement à toute morphogénèse périthéciale, corrobore nos résultats précédents (DEHORTER, 1972, 1976) ou ceux obtenus par FAYRET et VITO (1981) chez le *Gnomonia leptostyla*. Cette réponse contraste avec les observations faites sur *Botrytis cinerea* (TAN et EPTON, 1974) ou *Ascochyta fabae* (PITTET, 1982) où la formation, moins précoce, du P310 coïncide avec le début de la conidiogénèse.

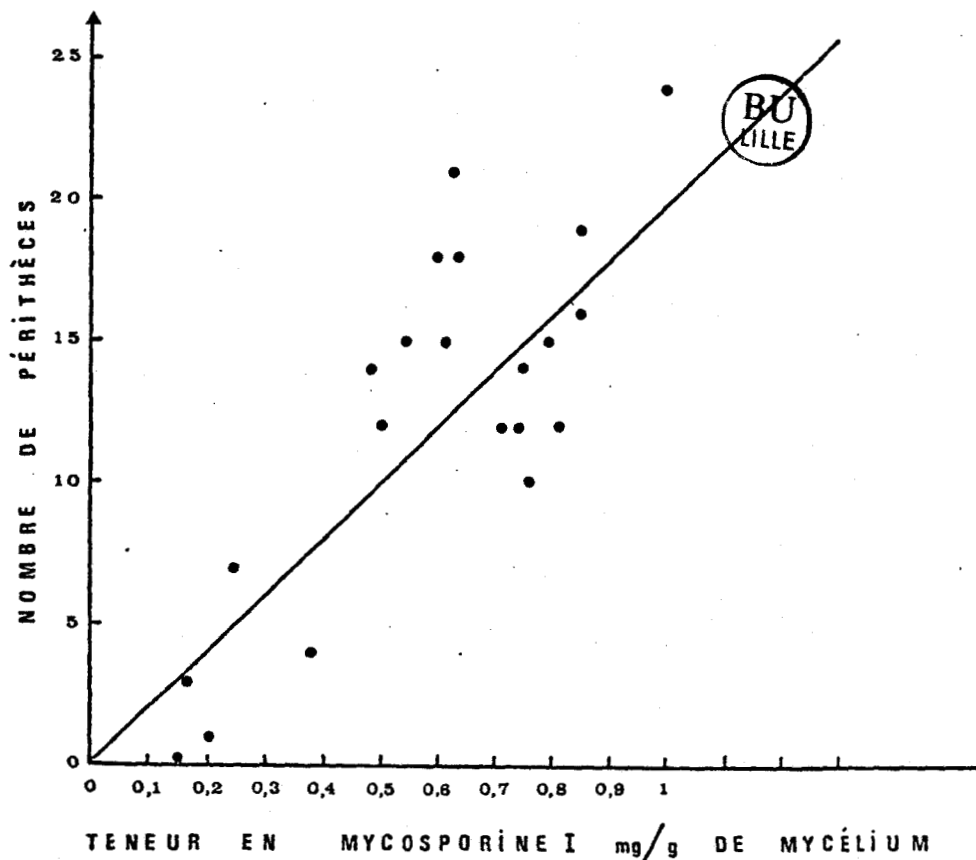
Chez le *N. galligena*, les taux de mycosporine progressent bien au delà du 12^e jour de culture et donc de la période optimale de croissance mycélienne. Ils atteignent finalement 1% du poids de mycélium sec. Cette valeur est pratiquement double de celle dosée chez le *G. leptostyla* où, inversement, la formation maximale de P310 est, très antérieure, à l'obtention du poids optimal de matière végétale sèche. Le décalage entre les moments des productions maximales de mycélium et de mycosporine, relevé chez le *N. galligena* comme pour *Ascochyta fabae* (PITTET, 1982), suggère, à cet auteur, que les mycosporines représentent des métabolites secondaires. Dans le même sens, TAN (1978) considère le P310 comme une conséquence secondaire de l'absorption lumineuse par le fait que sa synthèse ne succède pas immédiatement au photostimulus et nécessite un minimum de 4 heures d'irradiation chez le *Botrytis cinerea*.

Les fluctuations très nettes de la teneur en mycosporine I du *N. galligena*, entre les 15^e et 25^e jours, supposent, soit le relargage de ces molécules dans le milieu de culture, soit leur métabolisation durant cette période. Celle-ci, cruciale au plan morphogénétique, correspond en effet, à l'achèvement de la différenciation du sporophyte à dicaryons et à la formation puis à l'évolution des cellules ascogènes (méiose, asques, ascospores).

Par ailleurs, cette étude démontre que des conditions lumineuses très semblables sont requises pour les productions de P310 et d'ascocarpes du *N. galligena*. Ainsi, ces deux phénomènes peuvent être initiés par des éclairagements uniques de courte durée (12 h) et de faible énergie ($10 \mu\text{Wcm}^{-2}$) ou atteindre des valeurs optimales sous des régimes lumineux identiques. Le spectre de l'activité des radiations lumineuses sur la biosynthèse de P310 présente 5 pics d'efficacité maximale à 320 nm, 370 nm, 420 nm, 450 nm et 500 nm qui, pour les quatre premiers, correspondent aussi à une photoinduction sexuée importante.

Ces résultats indiquent que, dans un environnement cultural propice à la sexualisation, le nombre de périthèces est, directement, corrélé à la teneur en mycosporine I comme le démontre la figure 37.

Figure 37 : Relation linéaire entre le nombre de périthèces et le taux de mycosporine I (milligramme par gramme de mycélium lyophilisé) photoproduits chez le *N. galligena* ($r = 0,8$).



Légende : Le champignon est éclairé dans les mêmes conditions que celles décrites à la figure 36.

Cette proportionalité entre les taux de P310 et de sporulation se vérifie pour *Botrytis cinerea* (ARPIN et al, 1979) et *Ascochyta fabae* (PITTET et al, 1983a)

Enfin, les analyses par CLHP permettent, contrairement aux méthodes précédemment employées, de déceler des doses très minimes de P310 dans les mycéliums, sexuellement stériles, éclairés en lumière rouge ou incubés à l'obscurité permanente. Ce fait démontre l'existence de potentialités génétiques qui ne peuvent réellement s'exprimer qu'en présence de lumière ($\lambda < 560\text{nm}$) effectivement absorbée par le photorécepteur. Celui-ci, particulièrement sensible aux radiations 320, 370, 420, 450 et 480-500 nm, serait à l'origine des réactions photochimiques communes au métabolisme sexué et à la formation de mycosporine; cette dernière n'étant pas, uniquement, biosynthétisée sous l'effet des longueurs d'onde proches de 310 nm comme le supposait LEACH (1965).

En définitive, la similitude des critères lumineux qui régissent les photoinductions des périthèces et de mycosporine ou la corrélation entre les taux de sexualisation et du P310 mycélien semblent signifier que la lumière contrôle ou déclenche des voies métaboliques qui seraient, totalement ou partiellement, communes à ces deux événements.

De fait, la précocité de la formation du P310, antérieure à toute morphogenèse périthéciale, suggère que, initialement, la photorégulation du métabolisme sexué s'exercerait par l'intermédiaire du P310 ou comprendrait la synthèse de celui-ci. Dans ce sens, s'impose l'étude des conséquences morphogénétiques de la substitution de l'énergie photonique par un apport externe de mycosporine. Au préalable, nous avons recherché si les présences - ou absences - corrélatives du P310 et des ascocarpes, démontrées sous l'effet de la lumière ou de l'obscurité, se vérifient également sous l'influence d'autres facteurs de l'environnement et, sinon, les conditions de la dissociation de ces deux phénomènes.

III.- INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS D'INHIBITION SEXUEE SUR LA BIOSYNTHESE DU P3

Chez le *N. galligena*, les formations des périthèces fertiles et de mycosporine reposent sur les mêmes exigences lumineuses qui, non satisfaites, empêchent, simultanément, la réalisation des deux processus.

De même, les expériences présentes tentent de vérifier si des facteurs d'inhibition sexuée, autres que lumineux, provoquent parallèlement l'arrêt de la biosynthèse du P310.

1) Conditions expérimentales

Tous les essais sont pratiqués, en culture liquide, dans des conditions lumineuses (12 h L/12 h O, 750 μWcm^{-2}) optimales à la fructification parfaite du *N. galligena*.

Chaque cas expérimental traite d'un seul changement des paramètres expérimentaux qui, par ailleurs, demeurent tous favorables à la sexualisation. Ainsi, ces modifications successives, contraires à la production d'ascocarpes fertiles, se situent aux niveaux suivants :

- *génétique* : l'inoculum monoascal est remplacé par des implants issus de souches soit monoascospores (a, ou a25), soit mutante (Ab)
- *thermique* : la température d'incubation est élevée de 18°C à 25°C
- *nutritif* : la composition du milieu M23 subit deux changements successifs et indépendants : soit une soustraction du sulfate de zinc, soit une substitution qualitative du complexe azoté (acide glutamique-alanine-asparagine) par la cystéine, le pH initial du milieu étant ajusté à 7
- *chimique* : par addition ; soit de diphénylamine (5mg/l), de 5-fluoro-uracile (5 mg/l), de 6-méthylpurine (25 mg/l), de fluorure de sodium (500 mg/l), de cyanure de potassium (50 mg/l), de malonate de sodium (200 mg/l) ou d'acétate de sodium (5 g/l).

Ces diverses substances ont été éprouvées chez les champignons en raisons de leurs effets d'inhibition : sur la synthèse des caroténoïdes (diphénylamine : KUMAGAI et ODA, 1969 ; KITAMOTO et al, 1972, JEREBZOFF-QUINTIN et JEREBZOFF, 1974...) sur la présence des flavoprotéines (acide phénylacétique et quinacrine : TSCHABOLD, 1967 ; KUMAGAI et ODA, 1969 ; HARMAN et al, 1971...) sur la formation des acides ribonucléiques (5-fluorouracile et 6-méthylpurine : BETINA et ZAJACOVA, 1978), sur le métabolisme intermédiaire ou respiratoire (fluorure, malonate et acétate de sodium, cyanure de potassium).

Chez le *N. galligena*, chacun de ces inhibiteurs, est introduit avant l'ensemencement dans le milieu nutritif à une concentration choisie en fonction d'essais préliminaires. Ces derniers nous ont permis d'écartier toutes les teneurs, ou autres composés, qui se révélaient trop néfastes à la croissance mycélienne.

A l'issue de l'incubation, d'une durée de 30 jours, sont principalement constatées :

- la valeur pondérale des thalles
- l'évolution de la différenciation sexuée : présence - ou non - des ébauches périthéciales
- la teneur en P310, dosée spectrophotométriquement, des mycéliums traités selon la technique de FAYRET et VITO (1981).

2) Résultats

Les divers résultats (développements mycélien et sexué, formation du P310 de ces essais sont reportés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Influence de divers facteurs (génétique, thermique, nutritif, chimique) sur la teneur en P310 et le développement du *N. galligena*.

FACTEURS ¹	CROISSANCE ² mg/ fiole	R. SEXUEE ³ Ebauches périthéciales	TENEUR EN ⁴ P310, mg/g
- GENETIQUE			
. souche monoascospore a1	141	-	2,5
. souche monoascospore a25	191	+	6,5
. souche mutante Ab	154	-	0
- THERMIQUE			
. 25°C	177	+	8,8
- NUTRITIF			
. M23 - (Zn SO ₄ H ₂ O)	178	-	1,8
. M23 / Cystéine, pH = 7	83	-	0
- CHIMIQUE			
. diphénylamine (5 mg/l)	192	+	11,2
. acide phénylacétique (50 mg/l)	162	-	2,8
. quinacrine (250 mg/l)	95	-	0
. 5-fluorouracile (5 mg/l)	116	-	7,4
. 6-méthylpurine (25 mg/l)	137	-	4,6
. fluorure de sodium (500 mg/l)	127	+	10,5
. cyanure de potassium (50 mg/l)	104	-	3,2
. malonate de sodium (200 mg/l)	117	-	4,6
. acétate de sodium (5 g/l)	228	+	7,7
- T ⁵ (souche monoascale-M23-18°C)	178	P*	9

Légende : Dans tous les cas, les cultures sont éclairées en lumière blanche (12 h L/12 h O, 750 μWcm^{-2}) durant 30 jours

1 : Nature des facteurs modifiés par rapport aux conditions T⁵ optimales à la production de périthèces fertiles "P*"

2 : Poids de mycélium sec par boîte de Roux contenant 100 ml de milieu (moyenne de 5 mesures)

3 : les signes (+) et (-) indiquent respectivement la présence ou l'absence des ébauches périthéciales

P* : signale la présence de périthèces fertiles

4 : Valeur de la teneur en P310 exprimée en mg/g de mycélium sec (moyenne de 5 mesures)

Dans tous les essais, hormis celui de référence (T) se confirme l'absence d'ascocarpes fertiles qui ne peut être confondue avec une croissance mycélienne inexistante. Néanmoins, l'évolution de la différenciation sexuée apparaît différente selon les cultures ainsi :

- elle semble totalement inhibée où les thalles ne forment pas ou très peu de protopérithèces pour des raisons génétiques (souches monoascospore "a1" et mutante "Ab") nutritives (absence de sulfate de zinc, incorporation de cystéine) ou chimiques (addition d'acide phénylacétique, de quinacrine, de fluorouracile, de 6-méthylpurine, de malonate de sodium ou cyanure de potassium)
- elle parvient au stade des ébauches périthéciales qui sont produites en grand nombre par les mycéliums issus de l'isolat monoascopore "a25" ou incubés, soit à 25°C, soit en présence d'acétate ou de fluorure de sodium ou de diphénylamine.

A ces deux aspects morphologiques des cultures du *N. galligena* correspondent des teneurs en P310 très différentes soit :

- nulles ou faibles en l'absence d'ébauches sexuées
- élevées dans les cas où le champignon différencie des protopérithèces.

Ainsi, la corrélation entre le taux de mycosporine et le nombre de périthèces fertiles, établie précédemment (figure 37) semble se vérifier, présentement, si elle est rapportée à la production d'ébauches sexuées. Par ailleurs, dans trois cas expérimentaux (souche mutante Ab, présence de cystéine ou de quinacrine), on constate les absences réciproques de P310 et de toute structure sexuée, alors que d'autres essais démentent cette relation où la biosynthèse du P310 ne fait plus référence à un stade sexué.

La comparaison des teneurs en P310 qui sont :

- nulles ou très faibles par suite de l'addition de quinacrine ou d'acide phénylacétique, considérés comme inhibiteurs de flavoprotéines
- élevées en présence de diphénylamine, agent anticarotenogène, permet d'évoquer la nature flavoprotéique du photorécepteur à l'origine des réactions lumineuses qui déterminent la synthèse de mycosporine. Dans ce sens, le rôle défavorable de la cystéine s'exercerait par un effet réducteur qui empêcherait toute (photo)-oxydation cellulaire.

REMARQUE

L'influence de la qualité des sources carbonées et azotées dans des conditions définies par les tableaux 6 et 7 sur la teneur en P310 des mycéliums éclairés démontre que :

- dans tous les cas de nutrition carbonée, les taux de P310 se révèlent peu différents. On remarque, alors, que l'absence d'ascocarpes, constatée dans certains essais, ne correspond pas à un défaut de mycosporine
- la nature des sources azotées influe fortement sur la quantité de P310 qui reflète souvent le niveau de production périthéciale. Ainsi, dans les thalles cultivés sur les milieux comprenant le glyco-colle, l'alanine, la sérine, la thréonine, l'asparagine ou l'adénine, la concentration en mycosporine est particulièrement élevée. Inversement, les acides aminés soufrés, les sels d'ammonium, la glutamine et la lysine sont particulièrement défavorables à la production du P310.

CONCLUSION

En définitive, chez le *N. galligena*, contrairement à d'autres espèces fongiques, la biosynthèse de mycosporine constitue un phénomène strictement photodépendant dont les exigences lumineuses s'identifient à celles de la sexualisation du champignon.

En fonction de l'efficacité de certaines radiations lumineuses, de l'activité des agents inhibiteurs des flavines et de la présence démontrée de celles-ci dans le mycélium, il semble que les formations du P310 et des ascocarpes soient tributaires d'un même système photo-récepteur dont la nature serait flavoprotéique.

Chez le *N. galligena*, si la relation : présence de périthèces fertiles / absence de P310 n'a pu être démontrée, la proposition inverse est constatée où l'existence du P310 dans les thalles peut être sans rapport avec leur sexualisation. Ainsi peut-on opposer la simplicité des critères essentiellement lumineux de la biosynthèse du P310 à la complexité des exigences simultanément lumineuses, nutritives, thermiques ou génétiques, de la fructification parfaite

IV.- LOCALISATION ET DEVENIR DU P310

Deux expériences permettent d'évoquer le problème de la localisation et du devenir du P310 chez le *N. galligena*.

1) Localisation

A partir de cultures monoascales du champignon, éclairées en lumière blanche (12 h L/ 12 h O, 750 μWcm^{-2}) et incubées à 18°C sur milieu synthétique M23 liquide ou gélosé, nous avons pratiqué successivement, les 7è, 17è

et 30è jours après l'ensemencement, des prélèvements, respectivement de :

- mycélium uniquement végétatif
- périthèces immatures
- nombreuses ascospores agglomérées au niveau de l'ostiole périthéciale.

Les mesures spectrophotométriques des extraits aqueux de ces trois échantillons révèlent, dans chaque cas, une absorption caractéristique à 310 nm. En outre, au 30è jour, si les ascospores isolées présentent une forte concentration en mycosporine, soit 3 à 5% de leur poids après lyophilisation, elles n'accumulent, cependant pas, la totalité du P310 dont une grande partie demeure dans le mycélium exempt de structure sexuée.

Cette étude qualitative démontre, chez le *N. galligena*, une répartition de la mycosporine commune à divers stades morphologiques : hyphes mycéliennes, périthèces, ascospores. Cette observation qui se vérifie, même au 30è jour, à l'issue du déroulement complet de la morphogenèse sexuée, s'oppose à certains résultats antérieurs. Ces derniers relatent une accumulation quasi-totale voire une synthèse exclusive du P310, au niveau des seules structures reproductrices : ascostromas de *Leptosphaerulina briosiana* (MOYER et LEATH, 1976), apothécies de *Pyronema omphalodes* (LUNEL, 1980 ; BERNILLON, 1982), ascospores de *Plectania coccinea* (ARPIN et BOUILLANT, 1981). Inversement, la présence de P310, non spécifique d'un stade morphogénétique, et sa synthèse précoce, précédant toute forme reproductrice, rapprochent le *N. galligena* du *Gnomonia leptostyla* (FAYRET et VITO, 1981).

Toutefois, notre expérimentation ne permet pas de préciser le lieu de formation du P310 :

- soit au niveau cellulaire comme PITTET (1982) a pu le démontrer dans la fraction cytoplasmique soluble des spores d'*Ascochyta fabae*
- soit au niveau des structures (thalle, ascocarpes ou spores) où la biosynthèse précoce de ce composé dans les hyphes végétatives n'exclut pas une formation ultérieure dans les périthèces ou les ascospores.

2) Devenir du P310. Germination des ascospores du *N. galligena*

La richesse en mycosporine des ascospores du *N. galligena* suggère que ce composé représente une substance de réserve métabolisée au moment de la germination sporale.

En fonction de cette hypothèse, l'expérience suivante consiste à suivre l'évolution de la teneur en mycosporine des ascospores durant leur germination.

a) conditions expérimentales

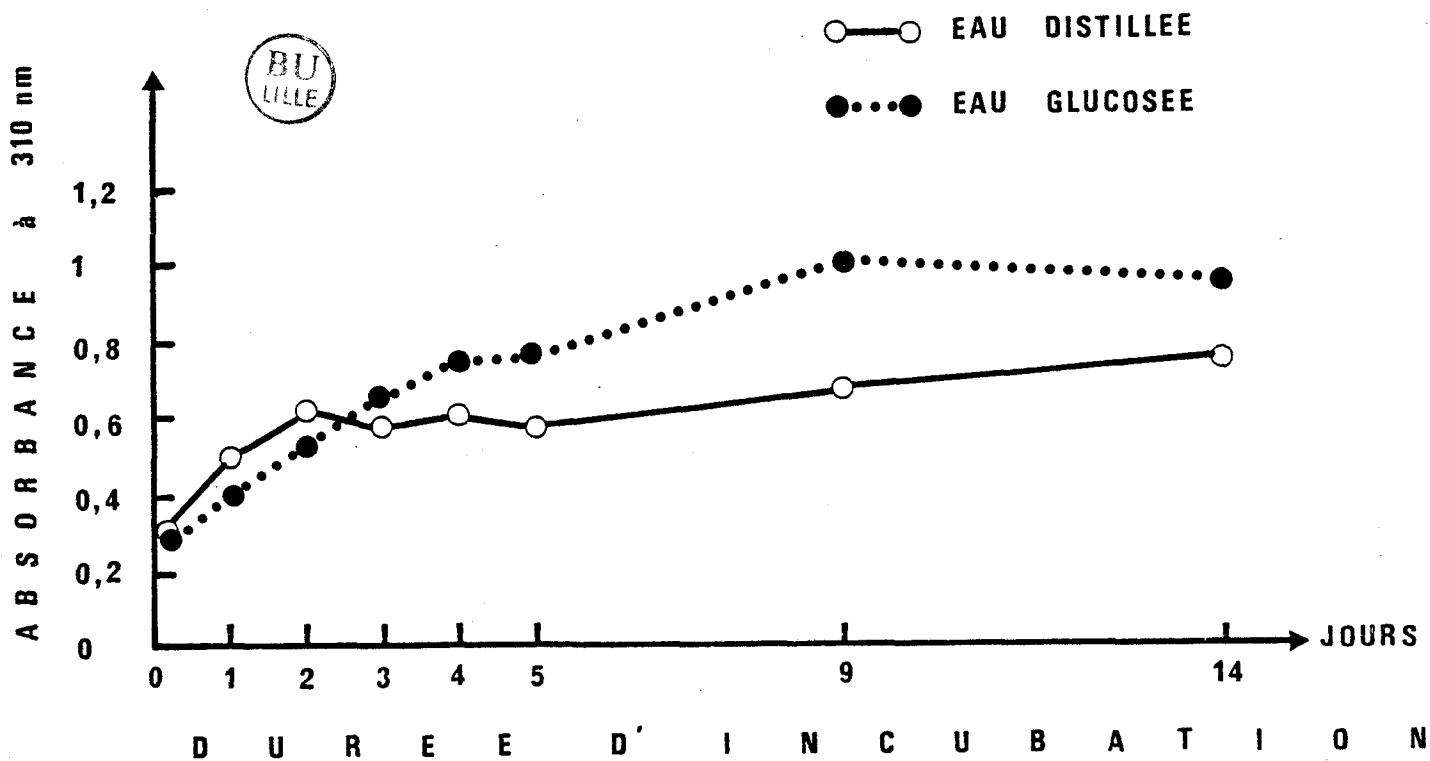
Des ascospores du *N. galligena*, mises en suspension dans l'eau distillée, additionnée - ou non - de glucose (0,5%), sont incubées, à 18°C et à l'obscurité permanente, pendant 0, 1, 2, 3, 4, 5, 9 et 14 jours. A l'issue de chacune de ces périodes, le matériel végétal, recueilli par centrifugation, est soumis à des extractions aqueuses.

Les mesures, au spectrophotomètre, de l'absorption à 310 nm de ces extraits aqueux sont reportées dans la figure 38.

b) résultats

La figure 38 démontre l'augmentation, à l'obscurité continue, de la teneur en mycosporine des ascospores durant leur germination. Cet accroissement du taux de P310 semble traduire, non seulement l'absence de métabolisation de ce composé, mais plus encore le fait d'une biosynthèse qui, dans ce cas, se réalise en l'absence de tout éclaircissement. Ce phénomène est, par ailleurs, accentué lorsque les ascospores germent en présence d'eau glucosée.

Figure 38 : Evolution de la teneur en P310 des ascospores du *N. galligena* lors de leur germination, à l'obscurité continue et à 18°C.



Ces données corroborent les travaux de PITTET (1982) qui concluent, formellement, à la non utilisation des mycosporines lors de la germination des conidies des *Botrytis cinerea*, *Trichothecium roseum* ou *Ascochyta fabae*. Elles semblent infirmer l'hypothèse selon laquelle le P310, accumulé dans les spores, serait une substance de réserve.

V.- ACTIVITE MORPHOGENE DU P310

Le rôle du P310 en tant que "facteur sporogène, substitut de lumière" tel que TRIONE et LEACH ont pu le caractériser, chez *Ascochyta pisi* ou *Pleospora herbarum*, se vérifie-t-il au niveau de la fructification parfaite, strictement photodépendante du *N. galligena* ?

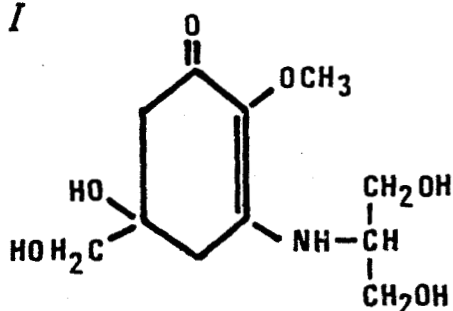
La réponse à cette question constitue le but de notre étude basée :

- sur l'observation des effets de morphogénèse périthéciale provoqués, à l'obscurité constante, par l'incorporation au milieu nutritif de la mycosporine I (P310 B) extraite préalablement des thalles irradiés du *N. galligena*.
- sur le rapport, dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, entre l'efficacité morphogène photomimétique et la structure chimique de différentes mycosporines.

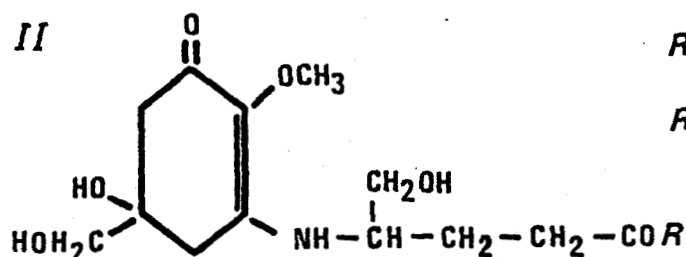
La présente expérimentation est donc la recherche, au plan de la différenciation périthéciale du *N. galligena*, des potentialités morphologiques de trois mycosporines chimiquement distinctes : soit la mycosporine I native et les formes amide et acide de la mycosporine II. La figure 39 représente la structure de ces trois composés

Figure 39 : Structures chimiques des mycosporines I et II

MYCOSPORINE I



MYCOSPORINE II



R : OH, forme acide

R : NH₂, forme amide

1) Conditions expérimentales

a) Cultures

Des cultures monoascales du *N. galligena*, incubées pendant 30 jours à 18°C et à l'obscurité continue, se développent sur milieu M23 liquide dans lequel sont incorporées, avant l'ensemencement, différentes quantités des trois mycosporines.

Simultanément à ces essais, deux autres lots cultureux de référence ne recevant pas d'apport exogène de P310 sont maintenus, l'un à l'obscurité permanente, l'autre sous un éclairage de lumière blanche ((12 h L/ 12 h O, 750 μWcm^{-2})).

b) Origine des mycosporines additionnées au milieu M23

La mycosporine I (mycosporine-serine réduite) provient des mycéliums irradiés et fertiles du *N. galligena*.

La mycosporine II forme amide (mycosporine-glutamine réduite, ARPIN et al, 1977) est extraite des spores du *Botrytis cinerea*.

La mycosporine III forme acide (mycosporine-acide-glutamique réduit FAYRET et al, 1981) est issue des thalles éclairés conidiogènes du *Gnomonia leptostyla*.

Les extractions et purifications de ces substances relèvent de protocoles précédemment décrits. Ces composés sont introduits dans le milieu nutritif liquide, après leur chromatographie sur résines échangeuses d'ions successivement cationique (DOWEX 1 x 8, forme Cl^-) et anionique (DOWEX 50W, forme H^+). Pour les mycéliums traités du *Gnomonia leptostyla*, l'acidité du milieu d'extraction (pH 4,5) et de l'éluant (HCL ; 0,05 N) de chromatographie (anionique) conduit à la forme acide de la mycosporine II.

c) Mesures

La détermination des concentrations de mycosporine dans les thalles, milieux ou filtrats de culture, est basée sur la mesure spectrophotométrique d'absorbances à 310 nm des divers extraits aqueux et les caractéristiques physico-chimiques du P310 ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1020$). Ces méthodes sont déjà décrites ou référencées (ARPIN et al, 1977 ; FAYRET et VITO, 1981).

Les teneurs en mycosporine sont ainsi exprimées en mg/g de mycélium lyophilisé ou en mg/l de milieu ou filtrat de culture.

2) Résultats

Dans les conditions énoncées ci-dessus, l'effet morphogène des mycosporines I et II (formes acide et amide) sur la production, à l'obscurité, des ascocarpes fertiles du *N. galligena* et l'évolution des taux de ces "P310" sont reportés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Activité morphogène des mycosporines I et II sur la reproduction sexuée du *N. galligena*.

MYCOSPORINE I ⁽¹⁾							MYCOSPORINE II ⁽²⁾						
CONCENTRATION ⁽³⁾				ACTIVITE MORPHOGENE ⁽⁴⁾			CONCENTRATION ⁽³⁾			ACTIVITE MORPHOGENE ⁽⁴⁾			
MILIEU (mg/L)		MYCELIUM (mg/g)		NOMBRE de PERITHECES ⁽⁴⁾			MILIEU (mg/L)			NOMBRE de PERITHECES ⁽⁴⁾			
t:0j	t:30j	t:0j	t:30j	min.	max.	moy.	t:0j	min.	max.	moy.	min.	max.	moy.
0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	7	6	11	8							
60	0	0	10	11	18	15	60	2	5	3	5	8	6
80	20	0	14	28	35	33							
120	58	0	16	35	39	37	120	4	7	5	10	14	11
0°	24°	0°	10°	98°	104°	100°							

Légende :

1- La mycosporine I est la mycosporine sérine-réduite extraite du *N. galligena*

2- La mycosporine II provient, sous sa forme amide^a (mycosporine-glutamine réduite), du *B. cinerea* et sous sa forme acide^b (mycosporine-acide glutamique réduit), du *G. leptostyla*

3- Les différentes mycosporines sont introduites dans le milieu de culture à diverses concentrations (mg/l) et dosées dans les mycéliums (mg/g de mycélium lyophilisé) après 30 jours d'incubation (t = 30 jours)

4- L'activité morphogène des mycosporines est exprimée par le nombre de périthèces induits à l'obscurité et calculé selon la formule : (nombre de périthèces fertiles par tube du lot sujet/nombre de périthèces fertiles par tube du lot témoin) X 100. Les minimum (min.), maximum (max.) et moyenne (moy.) de ce nombre sont indiqués

Toutes les cultures sont maintenues à 18°C pendant 30 jours à l'obscurité continue sauf celles du lot témoin[•] qui reçoivent, quotidiennement, 12 h de lumière blanche à 750 μWcm^{-2}

A la lecture des résultats du tableau 18, on constate que la formation de périthèces fertiles est induite, à l'obscurité par les trois différentes mycosporines additionnées au substrat culturel. Les variations du nombre d'ascocarpes ainsi produits démontrent, d'une part, la plus grande activité biologique de la mycosporine I naturellement présente chez le *N. galligena*, et, d'autre part, une efficacité légèrement différente selon les formes acide et amide de la mycosporine II. Ainsi, la fructification parfaite obtenue de l'incorporation des P310 au milieu se révèle :

- fondamentalement différente de la stérilité sexuée du champignon incubé à l'obscurité sans contact avec le P310
- nettement inférieure à la production périthéciale observée dans les cultures irradiées.

Par ailleurs, les dosages de mycosporine I, dans les milieux culturels après 30 jours de développement, montrent une disparition totale de ce composé pour des concentrations initiales inférieures à 60 mg/l de substrat. Au delà de cette valeur, les excédants de P310 se retrouvent en totalité dans le milieu culturel. Dans tous les cas, il apparaît que les mycosporines exogènes pénètrent effectivement dans les mycéliums et y sont métabolisées dans des proportions similaires.

Lorsque la teneur en P310 du mycélium atteint un certain niveau, il apparaît que l'absorption des mycosporines exogènes devient limitée. La valeur de cette concentration interne en P310 qui semble réguler la pénétration de ce composé avoisine 10 mg/g de thalle lyophilisé, elle correspond au taux de P310 des mycéliums éclairés.

3) Discussion

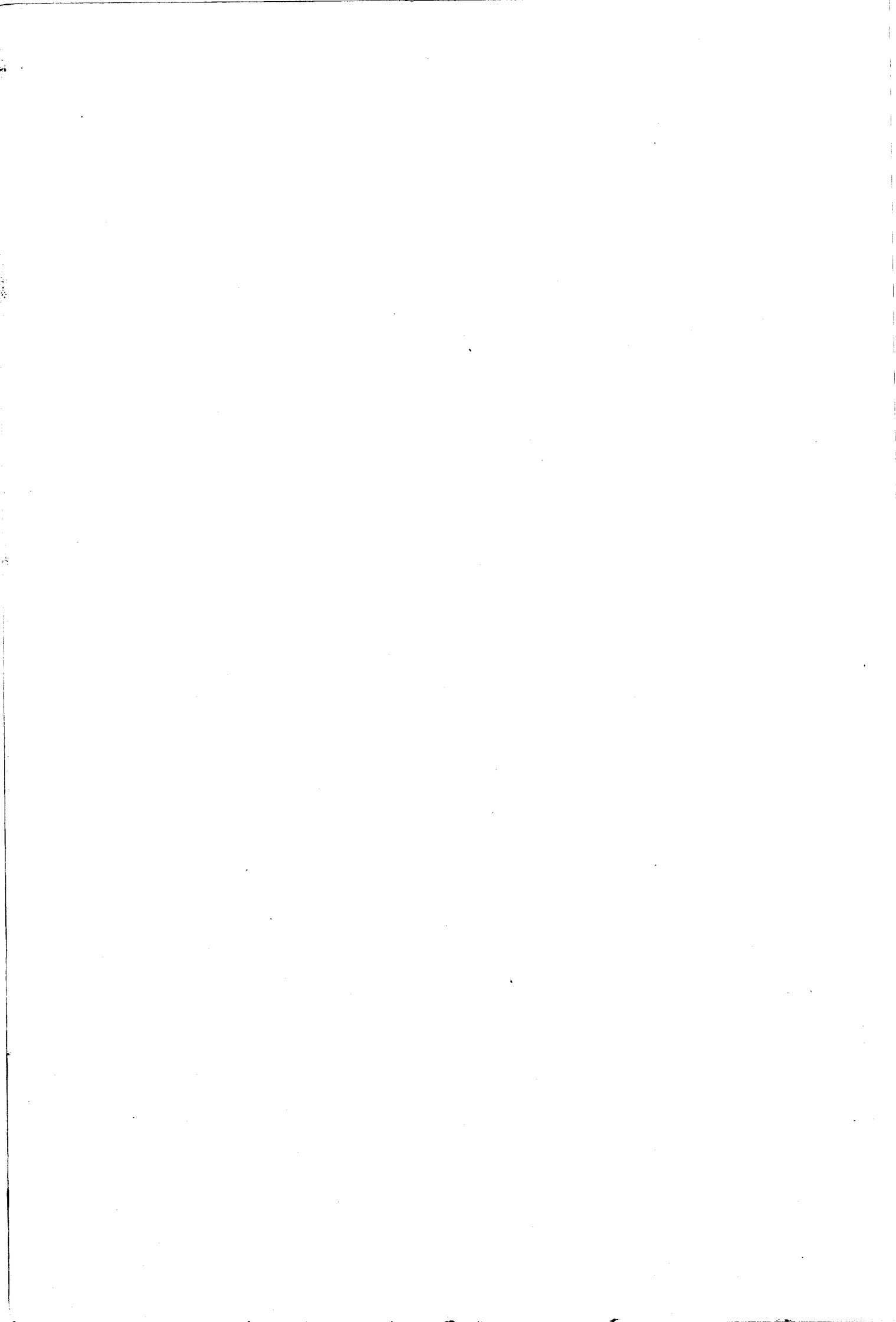
Ce travail confirme nos résultats antérieurs (DEHORTER, 1976) démontrant une activité morphogène photomimétique du P310, au niveau de la reproduction sexuée du *N. galligena*. Des faits analogues sont décrits pour *Pleospora herbarum* (TRIONE et al, 1966) ou soupçonnés chez *Gnomonia leptostyla* (FAYRET et VITO, 1981). Inversement, chez diverses espèces fongiques à conidiogénèse photodépendante notamment *Ascochyta fabae* (PITTET, 1982), l'addition de mycosporine demeure sans effet sur la sporulation gamétophytique.

Néanmoins, la réaction sexuée du *N. galligena*, à la présence exogène de P310 demeure, malgré une absorption mycélienne optimale de ce composé, très inférieure à la fertilité des cultures irradiées. Ce résultat est à rapprocher, tant par la faible production d'ascocarpes matures que par la quantité importante d'ébauches périthéciales, de l'effet d'un seul éclaircissement ($40 \mu\text{Wcm}^{-2}$) de 12 heures interrompant, au 7^e jour, le développement à l'obscurité du champignon (figure 22). L'analogie de ces deux réponses biologiques semble infirmer l'hypothèse selon laquelle la teneur insuffisante en P310 des thalles, exposés à un seul photostimulus de 12 heures expliquerait le faible pourcentage de périthèces fertiles, observé dans ce cas. Aussi peut-on supposer que la lumière sous forme de photopériodes multiples auxquelles sont soumises directement les cultures, permet, soit par la production de photocomposés mycéliens autres que le P310, soit par une régulation des activités enzymatiques comme chez le *Leptosphaeria typhae* (VIDAL et VIALA, 1973), de compléter l'action morphogène de la mycosporine. Cette dernière s'exercerait alors principalement sur l'initiation périthéciale.

L'activité biologique du P310, chez le *N. galligena*, ne semble pas relever d'une stricte spécificité liée à la structure chimique de la mycosporine I. Ainsi des modifications de la fraction azotée de cette molécule réduisent, sans toutefois l'annuler, son efficacité morphogène. Dans ce cas, PITTET (1982) démontre que des mycosporines exogènes, différentes de la mycosporine glutamine réduite glucosylée synthétisée par *Ascochyta fabae*, sont modifiées à l'image de celle-ci après leur pénétration dans les hyphes mycéliennes.

Il apparaît nécessaire de préciser, pour le *N. galligena*, les relations entre la structure chimique et l'activité biologique de la mycosporine I. A cet égard, les faibles quantités de cyclohexénone, obtenues après purification (P 295 ?), ne permettent pas de conclure, expérimentalement, au rôle biologique de ce composé.

En définitive, malgré certaines imprécisions, cette étude souligne la capacité du P310 à restaurer, à l'obscurité, la fertilité sexuée du *N. galligena*. De ce fait, chez ce champignon à reproduction sexuée strictement photodépendante, la mycosporine apparaît comme l'un des intermédiaires biochimiques entre l'absorption lumineuse et la réponse biologique.



CHAPITRE II

MÉTABOLISME DU N. GALLIGENA EN FONCTION DU DÉTERMINISME DE SA REPRODUCTION SEXUÉE. RÔLE DE LA MYCOSPORINE.

L'étude du déterminisme sexué des champignons conduit à rechercher les processus métaboliques qui caractérisent la différenciation de leurs structures reproductrices.

D'une manière générale, TURIAN (1969) conçoit que la morphogénèse fongique dépend d'initiateurs. Ceux-ci, très divers tels que métabolites internes ou externes, hormones, facteurs nutritifs ou physiques, agissent sur certains systèmes enzymatiques qui représentent les effecteurs cytoplasmiques de la différenciation. Ainsi, des activités enzymatiques et un métabolisme différents concrétisent l'évolution sexuée ou morphogénétique de souches du *Neurospora* cultivées dans des conditions thermiques distinctes (COMBEPINE et TURIAN, 1970 ; VISWANATH - REDDY ET TURIAN, 1975).

Dans le même sens, FAYRET (1975) indique que les effets opposés de la lumière, soit inducteurs de la conidiogénèse, soit inhibiteurs de la maturation des ascocarpes, correspondent à d'importantes divergences biochimiques selon la formation de ces deux formes de reproduction du *Gnomonia leptostyla*. Pour leur part VIALA et VIDAL (1972) et VIDAL (1983) relie la présence des périthèces du *Leptosphaeria typhae* à un fonctionnement plus oxydatif du métabolisme (intermédiaire et lipidique) contrôlé par certains paramètres de l'environnement (aération, substrat cultural, lumière).

Dans leur ensemble, ces travaux et autres publications (CANTINO, 1956.; TABER 1966 ; TURIAN, 1970) montrent la prépondérance des voies oxydatives au cours de la différenciation des structures reproductrices fongiques. Précisément, une semblable relation peut-elle être mise en évidence chez le *N. galligena* ?

Nos études antérieures démontrent que certains facteurs externes permettent d'opposer la reproduction sexuée du *N. galligena* à son développement gamétophytique et représentent, dans ce sens, les indices d'une orientation biochimique particulière à l'évolution sexuée sporophytique. A cet égard, chaque paramètre, inducteur spécifique ou inhibiteur de la production périthéciale, doit provoquer un changement métabolique qu'il serait nécessaire d'analyser. En regard de l'ampleur d'un tel sujet, nous nous sommes limités à une simple approche de ce problème en comparant, au plan de l'activité de certaines enzymes du métabolisme intermédiaire puis au niveau de la biosynthèse des stérols, des cultures sexuellement fertiles à d'autres demeurant gamétophytiques pour des raisons génétique, nutritive, thermique ou lumineuse. Ainsi, nous avons plus particulièrement étudié les aspects biochimiques de l'influence morphogénétique de la lumière et comparé ceux-ci avec le métabolisme des thalles végétatifs ou sexués maintenus à l'obscurité constante. A ce niveau, la mycosporine constitue une voie expérimentale originale du fait qu'additionnée au milieu nutritif, elle déclenche à l'obscurité, la formation d'ascocarpes fertiles dont le nombre, quoique dix fois inférieur à la production périthéciale induite par un éclairage optimal, s'oppose à la stérilité sexuelle constatée à l'obscurité. Il nous paraît donc intéressant de caractériser, au niveau métabolique, ces différents degrés de fertilité et notamment l'activité morphogène photomimétique du P310.

Ce chapitre rapporte donc l'influence de diverses conditions inductrices ou inhibitrices de la différenciation sexuée du *N. galligena* sur :

- l'activité de quelques enzymes des cycles citrique et glyoxylique (A)
- la biosynthèse des stérols (B)

A.- ETUDE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES IN VITRO

La recherche des relations entre les différenciations biochimique et morphogénétique se fonde, souvent, sur le fonctionnement du métabolisme intermédiaire. Ainsi du rapport entre les activités des enzymes du cycle de KREBS (notamment la succinodeshydrogénase, la fumarate hydratase, l'isocitrate deshydrogénase) et celles du shunt glyoxylique (particulièrement l'isocitrate lyase) peut dépendre les types d'appareils reproducteurs formés où :

- plus généralement, la stimulation du cycle de KREBS correspond à la différenciation des structures sexuées : celle des ascogones du *Neurospora* (COMBEPINE et TURIAN, 1970), celle des périthèces du *Leptosphaeria typhae* (VIDAL, 1983), celle des carpophores matures du *Coprinus cinereus* (MOORE, 1984).
- à l'inverse, un blocage du cycle citrique compensé par une activation du cycle glyoxylique favorise la conidiogenèse du *Neurospora* ou contrarie la production des ascocarpes du *L. typhae*.

Dans cette perspective, chez le *N. galligena*, le gradient de différenciation morphogénétique suivant : stérilité sexuée (en l'absence de lumière ou pour des raisons génétique, nutritive ou thermique) → forte initiation et faible maturation périthéciale (à l'obscurité en présence de P310) → fructification parfaite optimale (éclairage et environnement favorables), pourrait se traduire, au niveau du métabolisme intermédiaire par des variations enzymatiques caractéristiques de chaque degré évolutif.

Un première approche de cette hypothèse consiste à mesurer les activités *in vitro* des enzymes suivantes : NADP-isocitrate deshydrogénase (IDH), succinodeshydrogénase (SDH), fumarate hydratase (FH) et isocitrate lyase (IL). Ce choix et le protocole technique font référence aux travaux de VIDAL (1983) sur les relations entre le métabolisme intermédiaire et la reproduction sexuée photoinduite du *Leptosphaeria typhae*.

Notre étude comporte deux séries expérimentales qui précisent les activités enzymatiques *in vitro* du *N. galligena* en fonction :

- des effets de l'éclairage soit directs (cultures à la lumière ou à l'obscurité), soit indirects (incorporation de P310 au milieu nutritif des cultures maintenues à l'obscurité),
- de divers facteurs inhibiteurs de la production périthéciale, indépendamment de conditions lumineuses optimales.

I.- ETUDE DES RELATIONS ENTRE LES ACTIVITES ENZYMATIQUES ET LES EFFETS
DE L'ECLAIREMENT

Les valeurs de la production périthéciale, soit élevée sous l'influence d'éclaircements optima, soit nulle en l'absence de lumière, soit faible en présence de mycosporine à l'obscurité, suggèrent des activités enzymatiques corrélativement différentes.

Afin de vérifier cette éventuelle relation, nous avons suivi l'évolution des activités *in vitro* des quatre enzymes précitées (IDH, SDH, FH, IL) au cours du développement du *N. galligena* placé dans 3 conditions expérimentales distinctes.

1) Conditions culturelles

Des cultures monoascales, incubées à 18 °C sur milieu synthétique liquide (100 ml/boîte de ROUX), sont réparties en 3 lots :

- le premier reçoit un éclairciment en lumière blanche (12hL/12h0, 750 μWcm^{-2})
- le second est maintenu à l'obscurité constante,
- le troisième se développe, à l'obscurité, en présence de mycosporine, incorporée à raison de 40 mg/l de substrat.

Les résultats (moyenne de trois mesures) des dosages enzymatiques *in vitro* effectués du 7ème au 27ème jour de culture sont représentés par les figures 40 et 41.

2) Résultats

a) Influence des conditions lumineuses (1er et 2è lot culturaux).

Dans les deux cas, au niveau des cultures en présence de lumière ou incubées à l'obscurité constante, les résultats obtenus les 7ème et 9ème jours (figures 40 et 41) sont très semblables, ainsi la chute des activités mesurées peut être expliquée par le développement pondéralement analogue et uniquement gamétophytique des mycéliums. Par la suite, l'orientation sporophytique photoinduite ou asexuée du *N. galligena* modifie ces données.

Ainsi les dosages de la succinodeshydrogénase et de la fumarate hydratase (figure 40) permettent de distinguer les cultures fertiles éclairées de celles stériles maintenues à l'obscurité. L'activité de la première enzyme (SDH) apparaît prépondérante en l'absence d'éclairciment alors que celle de la seconde (FH) est toujours stimulée par les photopériodes.

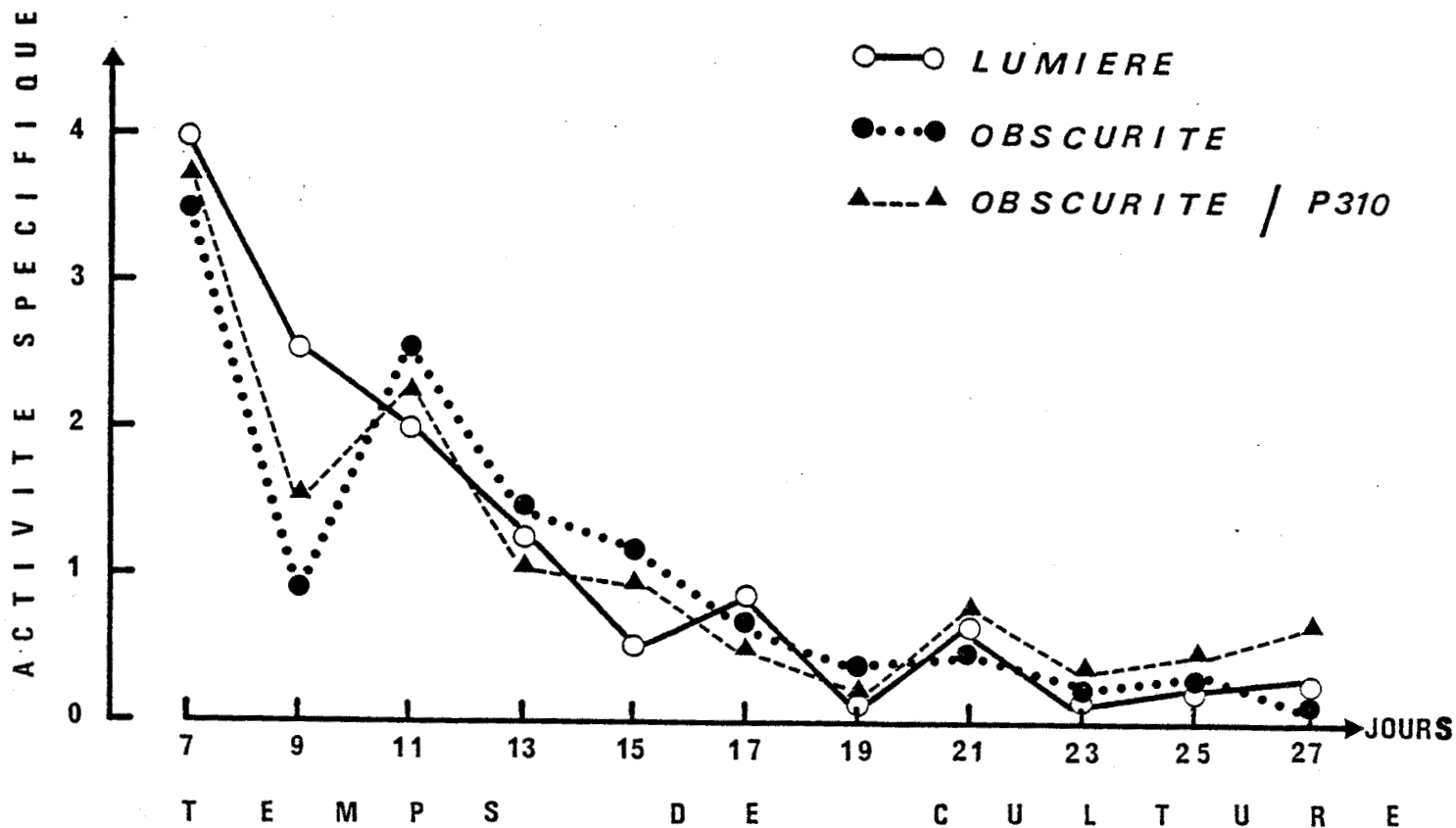
Dans le cas du *Leptosphaeria typhae*, ces deux enzymes sont également favorisées par la lumière (VIDAL, 1983).

La figure 41 montre l'évolution des activités *in vitro* de l'isocitrate deshydrogénase et de l'isocitrate-lyase.

(L'isocitrate deshydrogénase présente une activité supérieure dans les thalles irradiés et, plus particulièrement, à chaque stade décisif de la différenciation sexuée semble correspondre une valeur plus élevée des dosages.

Figure 40 : Evolution des activités *in vitro* de la succinate deshydrogénase et de la fumarate hydratase relevée chez le *N. galligena* en fonction de son développement à la lumière ($750 \mu\text{Wcm}^{-2}$, 12hL/jour), à l'obscurité ou en présence de mycosporine incorporée (40 mg/l) au milieu nutritif.

SUCCINATE DESHYDROGENASE



FUMARATE HYDRATASE

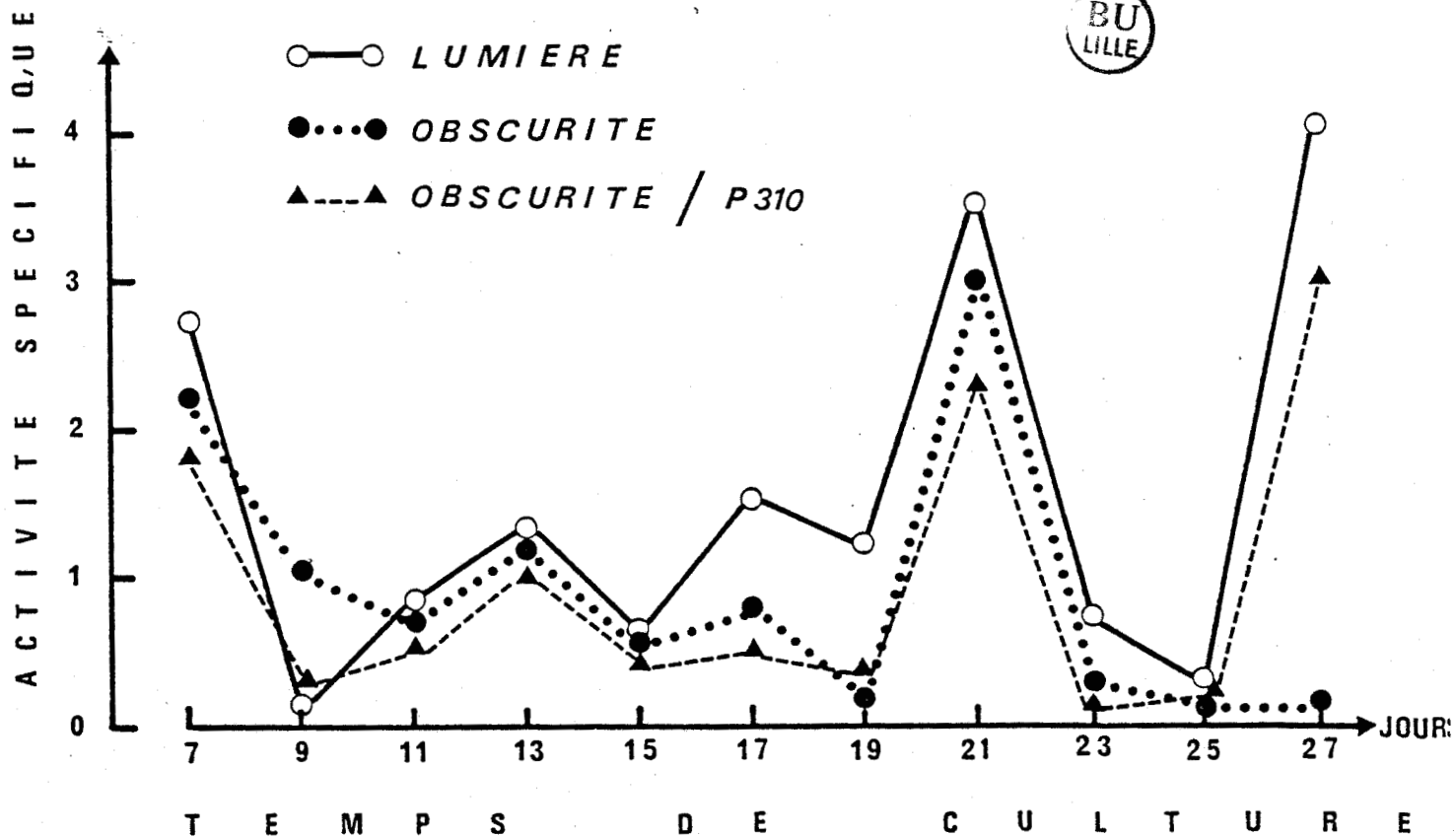
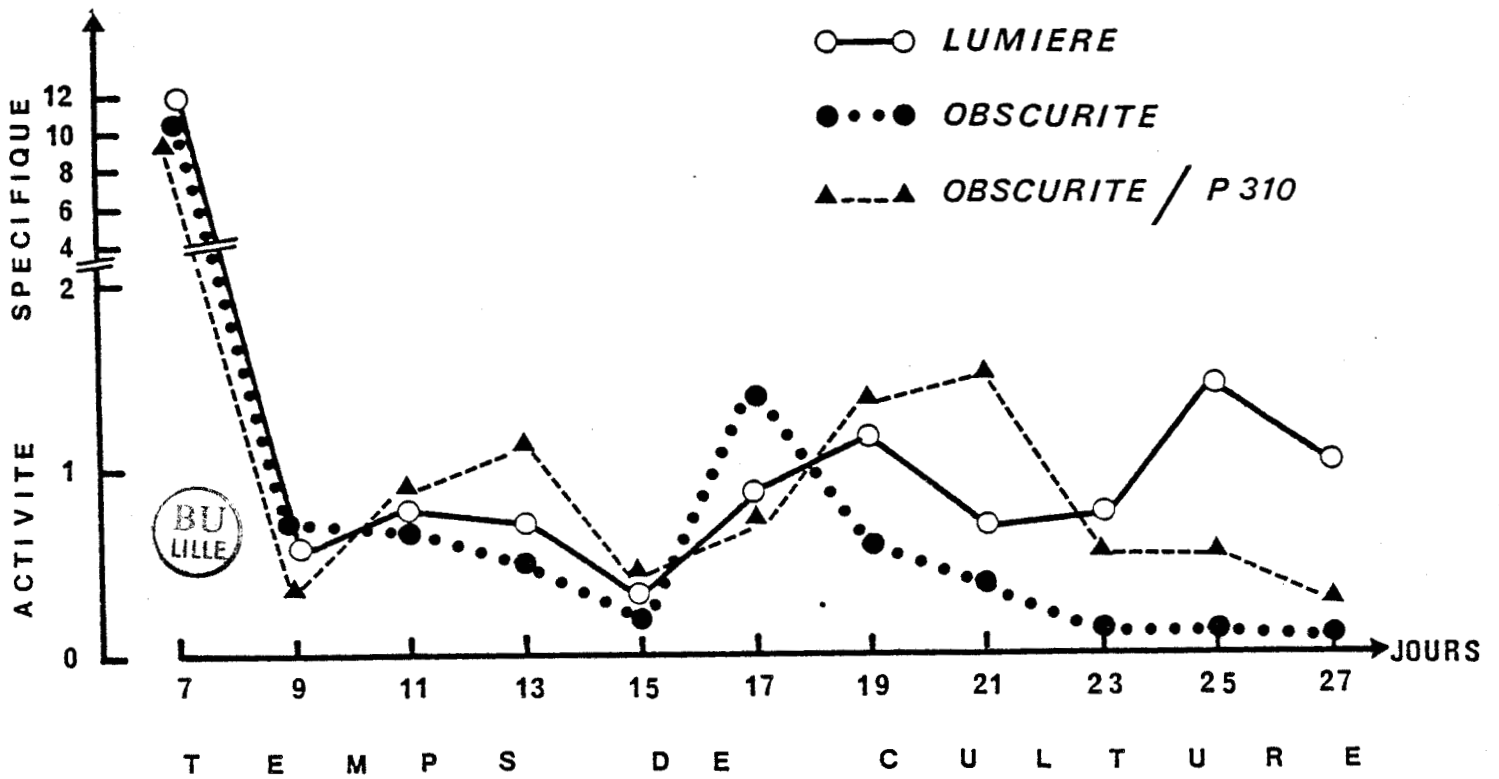
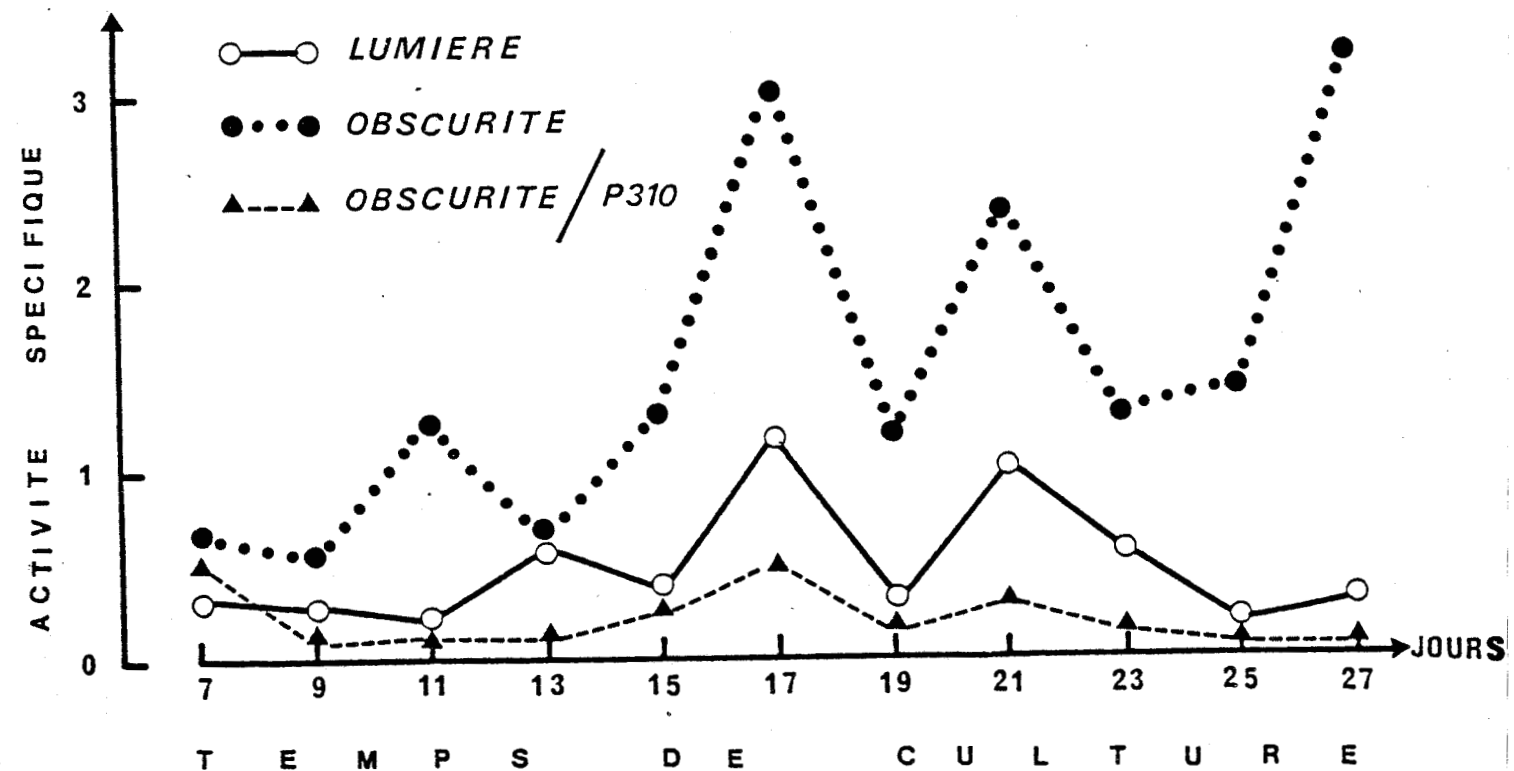


Figure 41 : Evolution des activités *in vitro* de l'isocitrate deshydrogénase et de l'isocitrate lyase relevée chez le *N. galligena* en fonction de son développement à la lumière ($750 \mu\text{Wcm}^{-2}$, 12hL/jour), à l'obscurité ou en présence de mycosporine incorporée (40 mg/l) au milieu nutritif.

NADP - ISOCITRATE DESHYDROGENASE



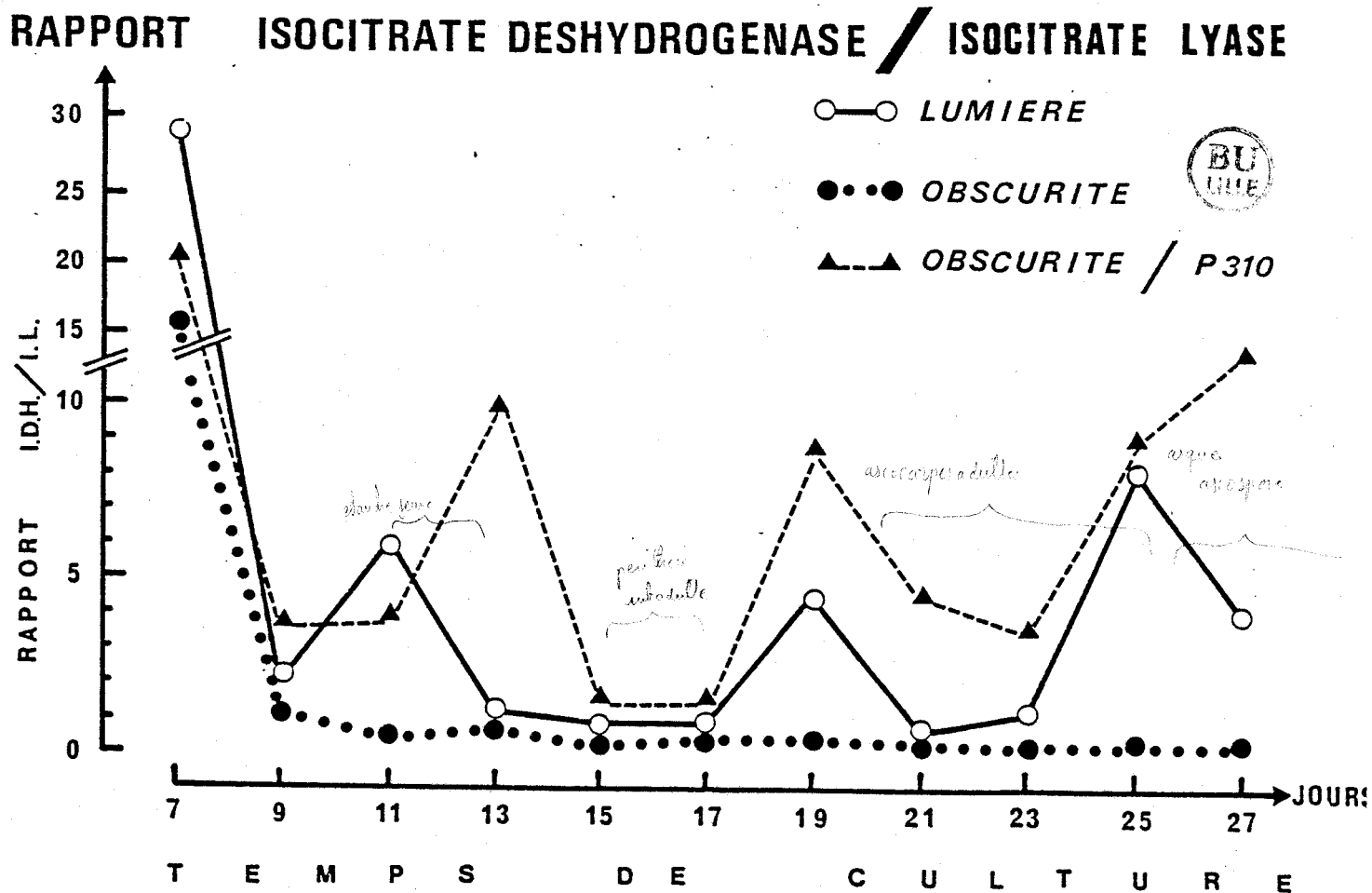
ISOCITRATE LYASE



L'étude de l'isocitrate-lyase, enzyme clef du cycle glyoxylique révèle une très nette divergence entre les deux séries expérimentales où l'obscurité semble exercer une constante stimulation de l'activité isocitrate-lyasique par rapport à l'éclaircissement. Ce résultat obtenu à l'obscurité, au niveau des thalles asexués peut être rapproché de l'effet produit par l'acétate, incorporé au milieu nutritif du *Neurospora* (TURIAN, 1961) ou du *Leptosphaeria typhae* (VIDAL, 1983) qui favorise cette enzyme et simultanément inhibe la reproduction sexuée de ces champignons.

Les divergences des activités de l'isocitrate deshydrogénase et de l'isocitrate lyase, observées dans les 2 conditions culturelles, entraînent une évolution (fig.42) de leur rapport IDH/IL qui permet de différencier très nettement les thalles photoinduits des mycéliums stériles. Ainsi, dans le premier cas, des taux IDH/IL toujours supérieurs, sinon maxima aux périodes primordiales de la morphogénèse sexuée contrastent avec les quotients IDH/IL uniformément faibles qui caractérisent les cultures demeurées gamétophytiques à l'obscurité.

Figure 42 : Variations du rapport entre les activités de l'isocitrate deshydrogénase et de l'isocitrate lyase, mesurées *in vitro*, chez le *N. galligena* en fonction de son développement dans les conditions définies précédemment (figure 41).

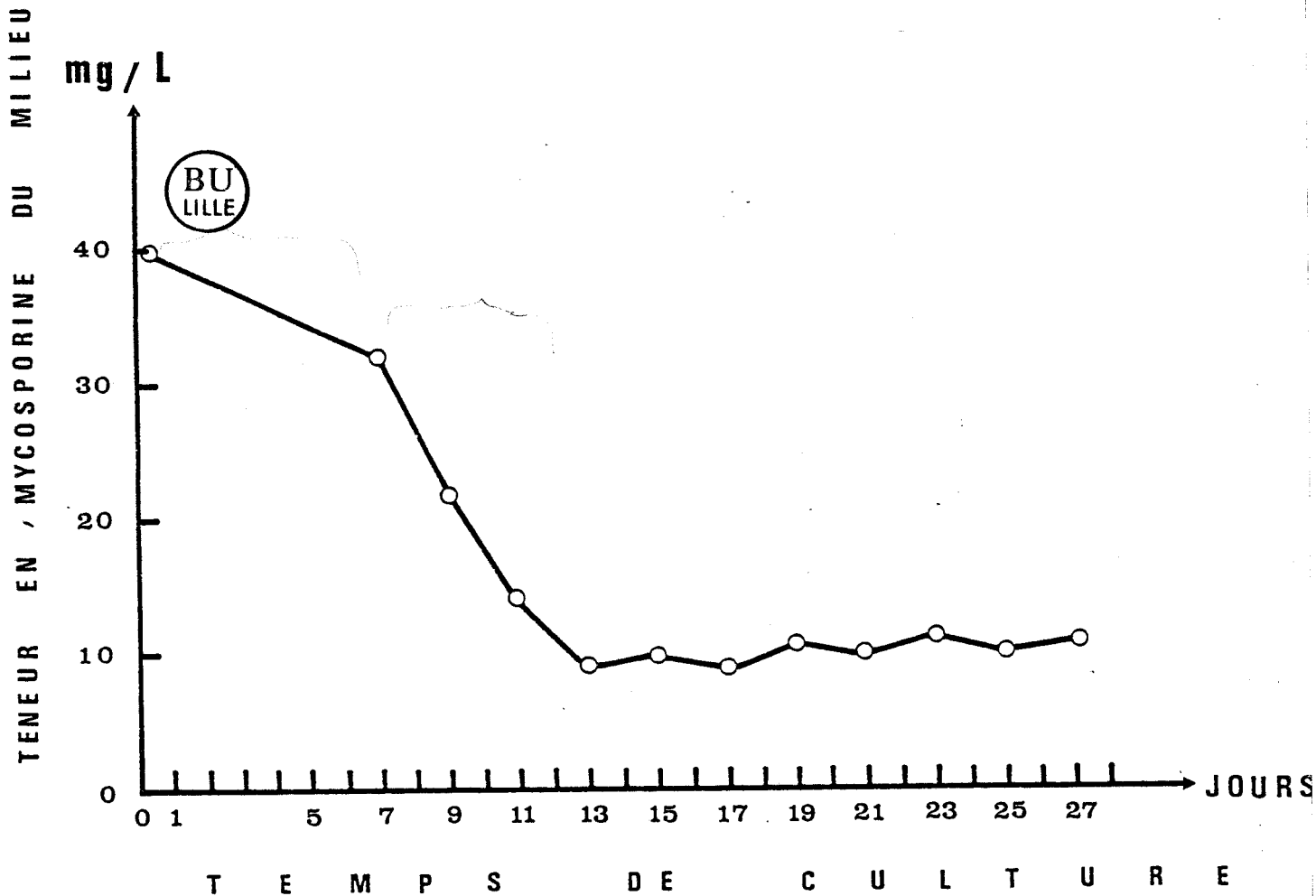


b) Influence de la mycosporine incorporée au milieu (3^e lot cultural)

a) Evolution de la concentration de la mycosporine incorporée au milieu.

La figure 43 rend compte des dosages du P310 dans les filtrats de culture lorsque le champignon est incubé à l'obscurité en présence de mycosporine.

Figure 43: Evolution de la concentration de la mycosporine (40 mg/l) incorporée au milieu nutritif du *N. galligena*.



Légende : Les cultures du *N. galligena* se développent sur milieu synthétique liquide (M23), à 18 °C et à l'obscurité constante.

L'évolution de la teneur en mycosporine additionnée au milieu (figure 43) met en évidence qu'aux trois périodes suivantes et comprises : depuis l'ensemencement jusqu'au 7^e jour, du 7^e jour au 13^e jour et enfin du 13^e au 27^e jour de culture correspond un appauvrissement en P310 du milieu avoisinant respectivement 25, 50 et 0 p100 de la concentration initiale en mycosporine.

Ainsi la diminution en P310 du milieu paraît très en rapport avec le développement du champignon : à une absorption limitée du P310 durant la période initiale de croissance succède une pénétration plus élevée de ce composé pendant la phase de plus intense prolifération mycélienne. Ensuite, une concentration intra-mycélienne de P310, proche de celle normalement photoinduite, semble limiter l'entrée de ce composé dans les hyphes.

De semblables relations, entre les taux de mycosporine absorbés par le champignon et le développement de celui-ci, sont déjà observées pour *Ascochyta fabae* (PITTET, 1982).

B) Activités enzymatiques (figures 40 et 41)

L'influence de la mycosporine, incorporée au milieu cultural, sur les activités enzymatiques des thalles cultivés à l'obscurité est reportée dans les figures 40 et 41.

Du 7^e au 9^e jour, les dosages des 4 enzymes étudiées ne traduisent aucun effet particulier de la mycosporine exogène par rapport aux résultats déjà décrits pour les deux premiers lots culturaux.

Au delà du 9^e jour, l'incorporation de mycosporine ne change pas les activités de la succinodeshydrogénase et de la fumarate hydratase (figure 40) en comparaison de celles mesurées à l'obscurité (2^e lot cultural).

Ainsi, on n'observe pas, à la différence des cultures éclairées, une stimulation de la fumarate hydratase.

A l'opposé, l'apport de P310 modifie considérablement les résultats relatifs à l'isocitrate deshydrogenase et surtout à l'isocitrate lyase (figure 41) précédemment enregistrés au niveau des mycéliums stériles à l'obscurité. Dans ce cas, pour la première enzyme citée (IDH), les dosages indiquent que la mycosporine additionnée rappelle l'effet de l'éclaircissement qui favorise l'IDH.

D'une façon très significative, le P310 exogène affaiblit considérablement l'isocitrate lyase dont l'activité est pourtant prépondérante à l'obscurité. Ainsi au niveau de ces deux enzymes, l'addition de mycosporine au milieu nutritif inverse l'influence de l'obscurité et simule celle de la lumière. En conséquence, sous l'effet du P310 (3^e lot cultural), les valeurs du rapport IDH/IL (figure 42) sont très différents de celles qui caractérisent les cultures demeurant gamétophytiques à l'obscurité. Elles impliquent une évolution du quotient IDH/IL qui se rapproche davantage de celle des thalles photoinduits.

8) *Mesure in vitro de l'activité de l'isocitrate lyase :
addition de P310 au substrat de la réaction enzymatique.*

Les très faibles valeurs des dosages de l'isocitrate lyase dues, malgré l'obscurité constante, à l'incorporation de mycosporine suggèrent que cet apport externe entraîne rapidement une accumulation intra-mycélienne maximale en ce composé. Cette saturation, ainsi provoquée, pourrait alors entraver soit la synthèse de l'enzyme, soit son activité mesurée *in vitro*.

De fait, lorsque nous ajoutons, dans la cuve spectrophotométrique contenant le mélange réactionnel propre au dosage de l'isocitrate lyase, une solution concentrée de P310, celle-ci ne modifie pas les fortes valeurs obtenues d'un extrait enzymatique issu de mycéliums stériles non irradiés (2^e série cultural). Dans les mêmes conditions, l'addition de fructose 1-6 diphosphate (F 1-6 di-P, 0,1 M), inhibiteur de l'isocitrate lyase, annule totalement la réaction enzymatique. Ces données suggèrent donc que la mycosporine, accumulée *in vivo*, n'affecte pas l'activité de l'isocitrate lyase mais inhibe plus précisément le taux de synthèse de cette enzyme.

3- Discussion

Cette étude préliminaire met en évidence que l'influence de diverses conditions lumineuses favorables ou non à la reproduction sexuée du *N. gallige* se traduit corrélativement au plan métabolique. Ainsi d'une manière plus remarquable, les activités de l'isocitrate deshydrogénase, de l'isocitrate lyase et du rapport de celles-ci permettent de caractériser les potentialités morphogénétiques du Champignon.

A l'activité importante de l'isocitrate lyase et aux valeurs du quotient IDH/IL propres aux mycéliums stériles à l'obscurité s'opposent les résultats concernant les thalles fertiles irradiés ou incubés en présence de mycosporine. Dans ce cas, la mycosporine exogène simule l'effet lumière qu'elle accentue, soit en stimulant l'activité de l'isocitrate deshydrogénase, soit en minimisant à l'extrême le rôle de l'isocitrate lyase. La mycosporine pourrait alors inhiber la synthèse de cette enzyme plus que son activité.

Pour sa part, MOORE (1984) mentionne que les très faibles activités de l'isocitrate lyase détectées chez *Coprinus cinereus* sont liées à la présence, dans les extraits bruts des carpophores d'un composé inhibiteur de faible poids moléculaire.

Dans leur ensemble, nos résultats confirment ceux établis pour *Gnomonia leptostyla* (FAYRET, 1975) ou *Leptosphaeria typhae* (VIALA, 1972 ; VIDAL, 1983) qui révèlent la prépondérance du métabolisme de type oxydatif lors des processus de reproduction sexuée fongique. Ainsi la photoinduction sexuée du *N. gallige*

correspond à une stimulation du cycle citrique comme en témoignent les valeurs du rapport IDH/IL. Cependant, l'orientation exagérément oxydative provoquée par l'incorporation du P310 n'entraîne pas corrélativement une augmentation de la production périthéciale. Ainsi la réponse biologique optimale demeure le fait d'un juste équilibre entre les différentes fonctions métaboliques régulées dans leur ensemble par la lumière au niveau de nombreuses réactions photosensibles dont l'une d'elles serait la biosynthèse de mycosporine.

Toutefois, cette influence positive de la lumière sur la reproduction parfaite du *N. galligena* ne s'exprime pas dans des conditions génétique, nutritive ou thermique défavorables. Dans ce cas, l'inhibition sexuée, pour des raisons autres que l'obscurité ou l'absence de mycosporine, se concrétise-t-elle également par une évolution du rapport IDH/IL analogue à celle décrite précédemment ? Cette question fait l'objet de la série expérimentale suivante.

II.- INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS D'INHIBITION SEXUEE SUR LE RAPPORT IDH/IL

Une activité isocitrate lyasique accrue et la faiblesse des rapports IDH/IL traduisent le rôle néfaste de l'obscurité sur la sexualisation du *N. galligena*. La biosynthèse de P310, inexistante dans ces conditions, peut justifier ces résultats et nous laisse supposer une photorégulation enzymatique, à moins que ces données ne soient la marque de toute inhibition sexuée, indépendamment de son origine.

En fonction de cette hypothèse, nous avons dosé l'isocitrate deshydrogénase et l'isocitrate lyase au niveau de mycéliums dont la stérilité sexuée, pour des raisons génétique, trophique ou thermique, n'est pas le fait d'irradiations lumineuses inadéquates, les cultures étant normalement éclairées.

1) Conditions culturelles

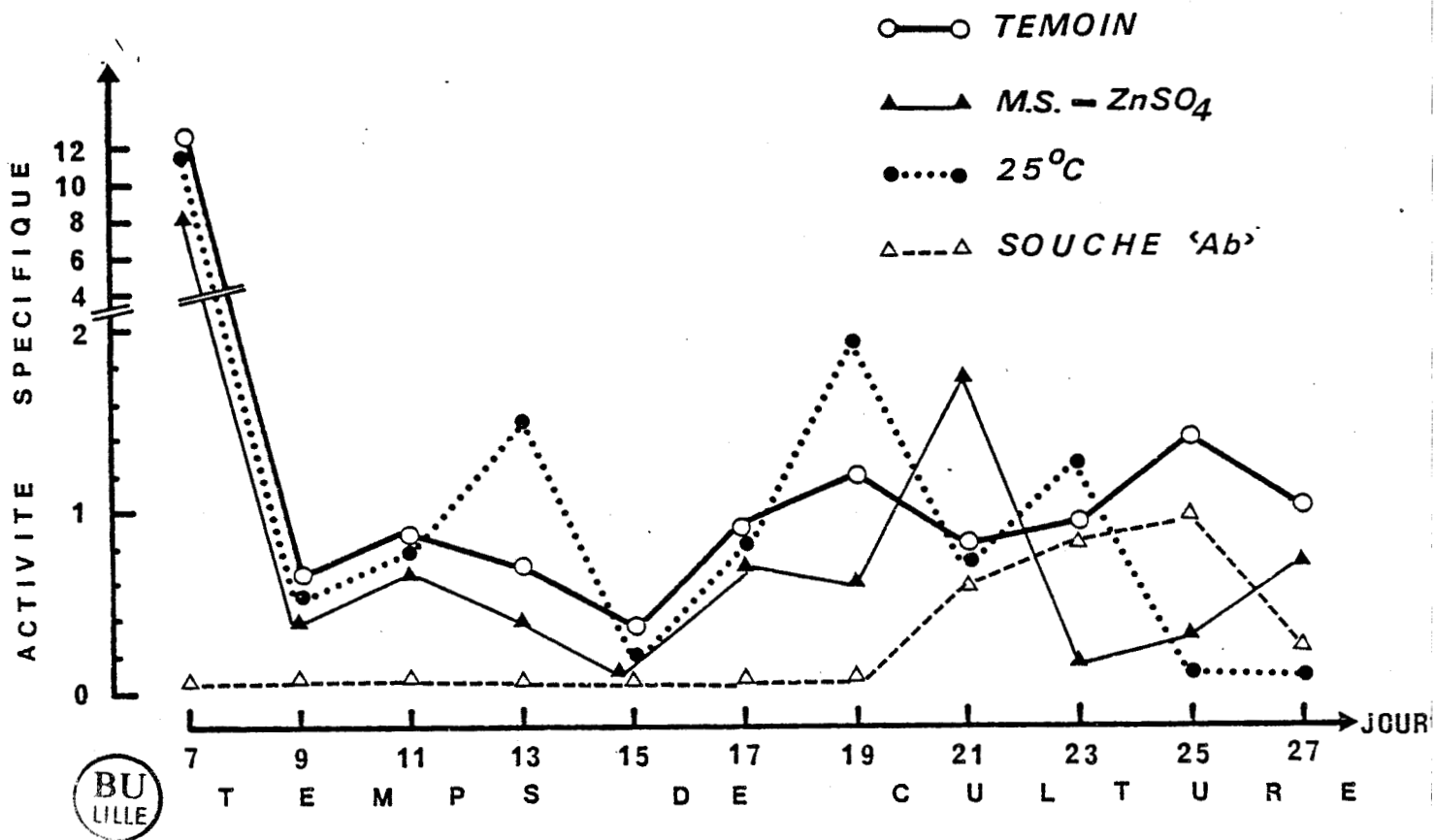
Quatre lots cultureux du *N. galligena* sont exposés durant 27 jours, à la lumière blanche (12hL/12h0, $750 \mu\text{Wcm}^{-2}$). La première série culturelle, servant de témoin, produit à terme de nombreux ascocarpes fertiles.

Au niveau des 3 lots suivants, une des conditions génétique (souche monoascale), trophique (milieu synthétique liquide M23) ou thermique (18 °C), propice à la fructification parfaite, est remplacée par un facteur qui entraîne la stérilité soit :

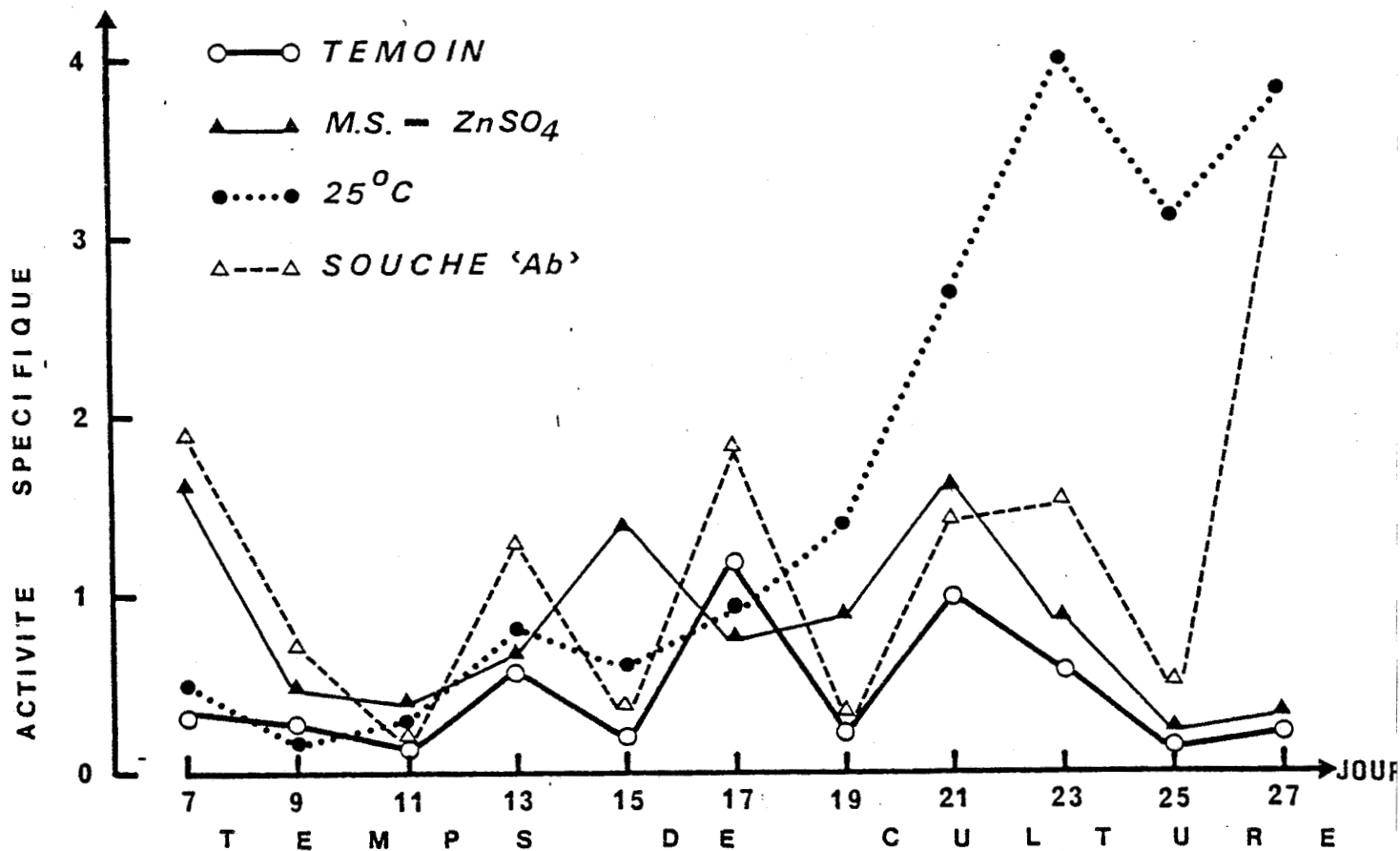
- un inoculum issu d'une souche mutante (Ab) du champignon (2^e lot),
- un substrat nutritif M23 dépourvu de sulfate de zinc (3^e lot),
- une température élevée à 25 °C (4^e lot).

Figure 44 : Evolution des activités de l'isocitrate deshydrogénase et de l'isocitrate lyase, mesurées *in vitro*, chez le *N. galligena* cultivé dans des conditions optimales (Témoin) ou inhibitrices (milieu synthétique M23 sans zinc, température égale à 25 °C, souche stérile <Ab> de sa reproduction sexuée.

NADP-ISOCITRATE DESHYDROGENASE



ISOCITRATE LYASE



2) Résultats

Nous avons mesuré les activités isocitrate deshydrogénase et isocitratase des différents mycéliums, recueillis du 7^e au 27^e jour de leur développement.

Les résultats de ces dosages (moyenne de trois mesures) et l'évolution consécutive du rapport IDH/IL sont reportés dans les figures 44 et 45.

Dans les trois cas, se confirme l'absence totale d'ascocarpes fertiles et, sauf à 25 °C, celle d'ébauches sexuées. En outre, chacun de ces traitements modifie la teneur en P310 des mycéliums qui est respectivement nulle (2^e lot), faible (3^e lot) et normale (4^e lot) par rapport au taux de P310 dans les thalles fertiles (1^{er} lot).


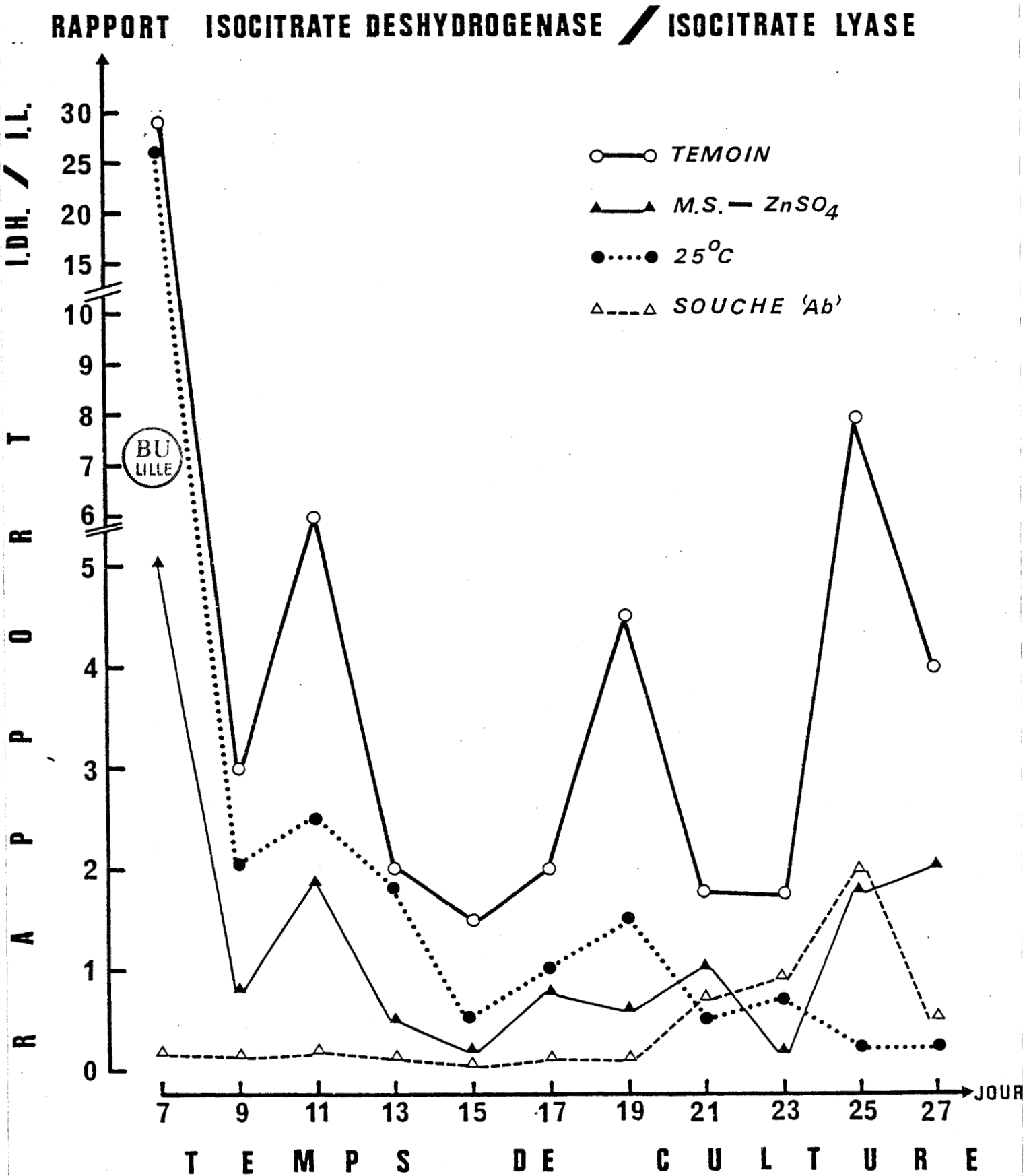
La figure 44 révèle que l'isocitrate deshydrogénase est généralement plus active dans les cultures incubées à 25 °C. L'augmentation thermique de 18 °C à 25 °C stimule même l'activité de cette enzyme. Celle-ci apparaît déficiente, ou subit les mêmes variations qu'à l'obscurité, dans les thalles stériles pour des raisons respectivement génétique ou nutritionnelle.  Les résultats relatifs aux dosages *in vitro* de l'isocitrate lyase indiquent que :
 - le maintien des cultures à 25 °C ne modifie pas, jusqu'au 17^e jour, la faible activité de l'enzyme détectée, par ailleurs, dans les mycéliums cultivés à 18 °C. Au delà de cette période qui marque le blocage de la différenciation des ébauches produites à 25 °C et, au contraire, la poursuite de leur évolution à 18 °C, l'effet de la température supérieure se traduit par une augmentation considérable de la teneur en isocitrate lyase des thalles. Celle-ci ne semble plus contrôler par la lumière ou par la mycosporine, présente pourtant à un niveau optimal.
 - à la stérilité sexuelle, impliquée par les facteurs génétique et trophique, correspond une activité isocitrate lyasique nettement supérieure à celle détectée dans les mycéliums fertiles éclairés (1^{er} lot). Dans ces deux cas la biosynthèse de P310, nulle ou réduite, pourrait répondre de ces résultats.
 Le rapport des activités de l'isocitrate deshydrogénase et de l'isocitratase qui traduit l'équilibre fonctionnel entre les cycles citrique et glyoxylique définit nettement l'inhibition sexuelle et, dans une certaine mesure, les différents taux de synthèse du P310. Ainsi, les valeurs de ce quotient IDH/IL (fig.45) apparaissent, comme à l'obscurité, uniformément faibles dans les mycéliums de la souche mutante (Ab) dépourvue de P310, elles progressent dans les cultures sur milieu trophique défavorable et, plus encore, dans les thalles incubés à 25 °C. Dans ce dernier lot cultural, les taux IDH/IL ne sont cependant pas significatifs de la quantité de P310 formée (optimale) mais ils caractérisent, plus précisément, l'avortement des structures reproductrices. *à partir du 25^e jour*

Figure 45 : Variations du rapport des activités de l'isocitrate deshydrogénase et de l'isocitrate lyase, mesurées *in vitro*, chez le *N. galligena* en fonction de son développement dans les conditions définies précédemment (figure 44).



DISCUSSION

Cette étude préliminaire, très partielle, du métabolisme intermédiaire montre, cependant, que la fructification parfaite du *N. galligena* est concomitante d'un déplacement, dans le sens oxydatif, de l'équilibre fonctionnel entre les cycles citrique et glyoxylique. A cet égard, le rapport IDH/IL constitue un remarquable indice métabolique, de la différenciation sexuée :

- de valeur élevée, il signale la fécondité du champignon et les principaux stades de la morphogénèse sexuée.
- de faible niveau, il en indique toute inhibition.

Dans le premier cas, la lumière et la mycosporine exogène entraînent une évolution similaire des taux IDH/IL en stimulant l'isocitrate deshydrogénase et en réduisant l'isocitratase. Sur ce plan, on peut donc considérer que le P310 exerce un rôle photomimétique. Toutefois, celui-ci paraît insuffisant où, au niveau biologique, la fertilité des très nombreuses ébauches périthéciales induites par la mycosporine à l'obscurité demeure faible comparativement à celle décrite à la lumière. Ainsi, cette réponse sexuée du *N. galligena* impliquée par l'addition de mycosporine au milieu nutritif peut paraître analogue à la "féminisation" des souches d'*Allomyces* ou du *Neurospora* (TURIAN, 1970) qui s'accompagne, également, d'une activité démesurée du cycle citrique. Chez le *N. galligena*, ce déséquilibre "sur-oxydatif" nuit à la complète évolution sporophytique. Celle-ci résulte d'une régulation métabolique complète tributaire de tous les paramètres, pas seulement lumineux, qui déterminent la fructification parfaite (2^e série expérimentale).

Dans le second cas, l'inhibition sexuée se traduit par de faibles quotients IDH/IL dont l'évolution est peu différente selon la nature du facteur limitant (obscurité, souche mutante, absence de zinc, température de 25 °C). A ce niveau, l'influence de la lumière n'apparaît plus spécifique même si, par l'intermédiaire de taux croissants de P310 biosynthétisé, elle semble contrôler, corrélativement, la réduction de l'activité isocitratasique. Les dosages effectués sur les mycéliums de la souche mutante "Ab" ou cultivés soit à l'obscurité, soit sur milieu dépourvu de zinc, confortent cette hypothèse. Celle-ci est, partiellement, infirmée lorsque les thalles sont incubés à 25 °C. Cette dernière expérience indique que la régulation de l'isocitratase, comme celle des rapports, entre les cycles citrique et glyoxylique, est finalement assurée par une pluralité de facteurs, ceux-là mêmes qui permettent la sexualisation du *N. galligena*.

En conclusion notre expérimentation démontre que la photoinduction sexuée correspond, à l'exemple de la biosynthèse de mycosporine, à une modification très précoce des activités métaboliques. Nos résultats confirment, sur ce plan, le rôle morphogène photomimétique de la mycosporine. Toutefois, ce composé, en raison de ses activités biologique et biochimique partielles, ne se substitue pas totalement à la lumière qui exerce, à ces deux niveaux, une régulation plus complexe.

L'action des différentes irradiations pourrait alors se réaliser par le biais de certaines enzymes directement photostimulées. Un tel concept, basé sur la présence d'enzymes simultanément photorécepteurs et effecteurs métaboliques, est évoqué par GRESSEL (1979), il expliquerait le déterminisme biochimique de certaines réponses biologiques photosensibles. Dans ce sens, KLEMM et NINNE-MAN, (1979) suggèrent que les radiations bleues stimulent la conidiogenèse du *Neurospora crassa* du fait de leur absorption par la nitrate réductase et de la photoactivation subséquente de cette enzyme flavoprotéinique.

B.- VARIATIONS DES STÉROLS LIBRES EN FONCTION DES EFFETS DE L'ÉCLAIREMENT ET DE LA MYCOSPORINE SUR L'INDUCTION SEXUÉE DU N. GALLIGENA

De nombreux travaux ou analyses bibliographiques (HENDRIX, 1970 ; ELLIOTT 1977 ; Mc MORRIS, 1978) concluent à l'importance des stérols dans les processus sexués de certains champignons. La preuve du rôle joué par ces composés en est faite, soit :

- par l'addition de stérols au milieu cultural. Cette incorporation induit ou stimule la formation des organes reproducteurs de divers Phycomycètes : *Pythium* sp (HASKINS et GARDNER, 1978 ; HENDRIX, 1975 ; JACQUET, 1979), *Phytophthora cactorum* (ELLIOTT et al, 1964), *Phytophthora* sp (ELLIOTT et SANSOME, 1977). Pour sa part, LACOSTE (1965) observe que l'addition de β sitostérol au substrat nutritif du *Leptophaeria typhae* prolonge la période de photosensibilité du mycélium. Ainsi, le champignon différencie des ascocarpes fertiles sous l'effet d'éclaircements tardifs dont, par ailleurs, l'application à des thalles non traités par les stérols, n'induit aucune structure sexuée.
- par l'emploi d'inhibiteurs de la synthèse de composés stéroliques. Dans ce cas, NELSON et al, 1967 bloque, sélectivement, les différentes étapes de la morphogenèse périthéciale de *Cochliobolus carbonum* dont il restaure ensuite la fertilité par adjonction de divers stérols au substrat nutritif. De la même manière, MOYER et LEATH (1976) empêchent l'ascosporogenèse du *Leptosphaerulina briosiana* qu'un apport subséquent d'ergostérol ramène, finalement à un niveau normal.

Par ailleurs, chez certains Ascomycètes photosensibles tels *Gnomonia leptostyla* (FAYRET et al, 1979) ou *Leptosphaeria typhae* (VIDAL et al, 1979), les analyses du contenu stérolique des thalles suggèrent certaines relations entre l'évolution de ces substances et l'influence de la lumière sur les morphogénèses reproductrices. Ainsi, VIDAL (1983) propose que la composition stérolique du *L. typhae* reflète l'orientation oxydative du métabolisme sexué photodépendant. Dans ce sens, les stérols semblent directement impliqués dans les processus de photoinduction de la reproduction fongique, à l'exemple de l'ergostérol qui se substitue aux rayonnements ultra-violetts normalement indispensables à la conidiogénèse de *Stemphylium solani* (SPROSTON et SETLOW 1968).

Ces diverses considérations suggèrent donc que les stérols prennent part aux manifestations structurales, métaboliques et photochimiques de la reproduction fongique. Cette participation pourrait se confondre avec leurs fonction :

- au niveau respiratoire (PARKS et al, 1978) à l'exemple de l'effet favorable d'un apport d'ergostérol sur la croissance du *Saccharomyces cerevisiae* en culture anaérobie (ANDREASEN et al, 1953) ou des variations du contenu stérolique du *Mucor rouxii* (SAFE, 1973) en fonction des conditions d'oxygénation du milieu.
- au niveau hormonal comme précurseurs d'autres stéroïdes ou comme hormones contrôlant le transport actif d'ions ou de molécules.
- au niveau membranaire en tant que constituants des membranes réglant en partie la perméabilité de celles-ci (GRUNWALD, 1978).

L'ensemble de ces données permet de supposer l'existence d'étroites relations entre les stérols et le développement fongique notamment la morphogénèse sexuée. Par suite, dans le cas du *N. galligena* à fructification parfaite photodépendante, le métabolisme stérolique devrait être influencé par l'action de la lumière et, à ce niveau, devrait se confirmer le rôle photomimétique de la mycosporine.

Afin de préciser cette hypothèse, nous avons étudié les variations des stérols libres du *N. galligena* en fonction de trois conditions expérimentales qui, se rapportant aux effets de la lumière, de l'obscurité et de l'addition de mycosporine du substrat en l'absence d'éclairement, sont favorables -ou non- à la différenciation sexuée.

I.- CONDITIONS EXPERIMENTALES

Dans tous les cas, les cultures monoascales du *N. galligena* sont maintenues à la température constante de 18 °C et sur milieu synthétique liquide M23 réparti en boîtes de Roux (100 ml/boîte).

Les analyses des stérols sont pratiquées sur des mycéliums recueillis à l'issue de leur développement dans les cinq conditions suivantes :

- soit après 7 et 13 jours d'éclairement en lumière blanche (12hL/12h0, 750 μWcm^{-2}) ; respectivement séries expérimentales 1 et 2.
- soit après 7 et 13 jours d'obscurité continue ; respectivement séries expérimentales 3 et 4.
- soit après 13 jours d'incubation à l'obscurité permanente sur milieu synthétique additionné, préalablement à l'ensemencement, de mycosporine (15mg/l). Ce composé est extrait de thalles irradiés du *N. galligena* et purifié selon des modalités déjà décrites ; série expérimentale 5.

Chaque série expérimentale est basée sur la réalisation successive de 4 à 5 lots culturaux composés chacun de 120 boîtes de Roux. Après regroupement des mycéliums récoltés, nous avons ainsi obtenu, indépendamment de la durée d'expérimentation, des masses mycéliennes pondéralement très voisines (100 g de mycélium lyophilisé) et, pour chaque condition, qualitativement homogènes.

Finalement les thalles, recueillis et lyophilisés, sont soumis aux analyses selon le protocole précédemment défini (page 22).

II.- RESULTATS

1) Observations biologiques

Sur le plan biologique, on constate que pour des temps de culture semblables, la croissance mycélienne est pondéralement similaire dans les différents lots culturaux.

La reproduction sexuée se manifeste, au 13^e jour, dans les cultures éclairées, sous la forme de très nombreuses ébauches périthéciales microscopiquement visibles, tandis qu'aucune structure sexuée n'est repérable dans les cultures à l'obscurité.

La poursuite de l'expérimentation jusqu'au 30^e jour de culture, terme normal du développement du *N. galligena* nous permet de vérifier :

- la production optimale d'ascocarpes fertiles lorsque le champignon est éclairé
- l'absence de sexualisation de l'organisme à l'obscurité
- l'existence de très nombreuses ébauches périthéciales et d'un faible nombre de périthèces mûrs au niveau des cultures réalisées à l'obscurité sur milieu additionné de mycosporine.

2) Composition stérolique

Les résultats des analyses du contenu stérolique du *N. galligena*, en fonction des cinq conditions culturales, sont reportés dans les tableaux 19 et 20.

a) Contenu stérolique global

Les quantités de stérols libres extraites des thalles du *N. galligena* figurent dans le tableau 19.

Tableau 19 : Quantités de stérols libres isolées du *N. galligena* cultivé dans des différentes conditions.

Série expérimentale n°	Conditions culturales	Stérols (mg/100g de mycélium lyophilisé)
1	7 jours lumière	130
2	13 jours lumière	140
3	7 jours obscurité	210
4	13 jours obscurité	270
5	13 jours (obscurité + P310)	80



Légende : Les cultures du *N. galligena* sont effectuées à 18 °C, sur milieu synthétique liquide M23 et incubées soit à la lumière (12hL/12hO, 750 μWcm^{-2}), soit à l'obscurité constante en l'absence ou en présence de mycosporine (15 mg/L de milieu).

Ces résultats ne rendent pas compte des stérols liés qui, chez le *N. galligena*, ne représentent souvent qu'une très faible proportion (de l'ordre de 1 %) des stérols totaux. De ce fait, ils n'ont pu être analysés, contrairement au cas du *Leptosphaeria typhae* (ALAIS et al, 1974) et du *Gnomonia leptostyla* (FAYRET et al, 1979) où les stérols liés atteignent parfois 58 % du contenu stérolique global. Aussi, chez le *N. galligena*, l'insuffisance des méthodes d'extraction, pourtant identiques à celles employées dans les deux cas précédents, ou la constitution membranaire peuvent-elles expliquer ce faible poids de stérols liés ?

Les teneurs stéroliques des thalles irradiés ou cultivés en présence de P310 exogène sont très nettement inférieures à celles existantes dans le champignon incubé à l'obscurité sans apport de mycosporine. En particulier,

L'addition de P310 abaisse considérablement le "pool" stérolique et le rend même déficitaire par rapport à celui des cultures éclairées. On remarque aussi que la biosynthèse stérolique augmente sensiblement du 7^e au 13^e jour lorsque le *N. galligena* se développe à l'obscurité (séries 3 et 4) tandis qu'elle varie peu dans les cultures éclairées (séries 1 et 2).

b) Analyse qualitative et quantitative des stérols libres

La nature et les pourcentages respectifs des différents stérols libres présents chez le *N. galligena* sont indiqués dans le tableau 20.

Tableau 20 : Nature et pourcentages relatifs des stérols libres isolés du *Nectria galligena* aux différentes conditions culturelles.

Stérols	M*	BU LILLE				
		7 jours lumière	13 jours lumière	7 jours obscurité	13 jours obscurité	13 jours obsc. + 'P310'
<u>Stérols saturés</u>						
Éthyl-24 cholestane ol-3 β*	416	1	2	<1	1	2
<u>Stérols Δ₅</u>						
Cholestérol*	386	4	8	1	2	4
Ergostatrien-5,8,22 ol-3 β*	396	24	17	14	9	16
Éthyl-24 cholestèn-5 ol-3 β*	414	—	2	—	<1	<1
<u>Stérols Δ₇</u>						
Cholestène-7 ol 3 β	386	2	2	2	2	2
Méthyl-24 cholestadien-7,22 ol-3 β	398	1	1	1	<1	1
Méthylène-24 cholestèn-7 ol-3 β*	398	2	1	2	<1	2
Méthyl-24 cholestèn-7 ol-3 β	400	—	—	<1	—	—
Stérol Δ ₇ , 4α méthyl	412	—	<1	<1	—	1
<u>Stérols Δ_{5,7}</u>						
Ergostérol*	396	64	64	75	80	64
Ergostatétraène ol-3 β	394	2	3	3	4	5
Ergostatrièneol-3 β	396	—	—	<1	—	1
Éthyl-24 cholestatrien-5,7, 22ol-3 β	410	—	—	—	—	1
Cholestadien-5,7 ol-3 β*	384	<1	—	—	<1	—
% Stérols saturés		1	2	<1	1	2
% Stérols Δ ₅ totaux†		28	27	15	11	20
% Stérols Δ ₇ totaux†		3	4	5	2	6
% Stérols Δ _{5,7} totaux†		66	67	78	84	71
Rapport ergostérol/cholestérol		16	8	75	40	16
Rapport $\frac{\text{Stérols } \Delta_{5,7} \text{ totaux}}{\text{Stérols } \Delta_5 \text{ totaux}}$		2,3	2,5	5,2	7,6	3,5

Les pourcentages indiqués correspondent aux intensités relatives des ions moléculaires dans les spectres de masse conventionnels des fractions de chromatographie sur plaque, compte-tenu de leurs poids relatifs ; les intensités sont corrigées pour la contribution des pics isotopiques.

* Spectres comparés avec les spectres des produits de référence suivants : cholestérol (386), cholestène-7 ol-3 β (386), ergostérol (396), lichestérol (396), 5,6 dihydroergostérol (398), épistérol (398), méthyl-24 cholestène-7 ol-3 β (400) β sitostérol (414), β sitostanol (416).

Les différents stérols insaturés isolés ont été classés en trois catégories selon la position des doubles liaisons sur le noyau stérolique, soit C₅-C₆ (Δ₅), soit C₇-C₈ (Δ₇) soit C₅-C₆ et C₇-C₈ (Δ_{5,7}).

Nous pouvons ainsi constater qu'il existe, chez le *N. galligena*, une grande diversité qualitative des stérols mais aussi quantitative du contenu stérolique où surtout l'ergostérol puis l'ergostatrien-5,8,22 ol-3 β (lichestérol), le cholestérol et l'ergostatétraène ol-3 β sont les plus abondants.

Dans tous les cas, l'ergostérol représente plus de la moitié du "pool" stérolique et sa teneur est nettement plus élevée dans les mycéliums stériles développés à l'obscurité sans P310 que dans les autres cultures potentiellement fertiles. Inversement, on constate que l'éclairement ou l'introduction de mycosporine dans le milieu favorisent la biosynthèse des stérols $\Delta 5$ qui sont représentés essentiellement par le cholestérol, le lichestérol et le β sitostérol.

Parmi les stérols en quantité mineure, trois composés ont été décelés uniquement dans les mycéliums cultivés à l'obscurité, en présence ou non de mycosporine. Il s'agit du méthyl-24 cholestèn-7 ol-3 β (M⁺410), de l'ergostatriène ol-3 β (M⁺396) et de l'éthyl-24 cholestatrien-5,7,22 ol-3 β (M⁺410) ou corbistérol.

De tous les stérols isolés, seul l'ergostatétraène ol-3 β oppose, entre elles, les cultures potentiellement fertiles. En effet, la teneur de ce corps dans les mycéliums éclairés dès l'ensemencement est inférieur à celle observée dans toutes les autres séries culturales. Le prolongement de la durée d'incubation, du 7^e au 13^e jour, modifie peu la teneur des principaux stérols qui, appartenant à la classe des composés $\Delta 5,7$, prédominent à l'obscurité tandis que les autres conditions culturales (séries 1,2 et 5) augmentent les proportions des stérols $\Delta 7$ et surtout $\Delta 5$. De ce fait, des valeurs doubles ou triples du rapport entre les stérols $\Delta 5,7$ totaux (ergostérol essentiellement) et les stérols $\Delta 5$ totaux (lichestérol, cholestérol) caractérisent les cultures stériles à l'obscurité en comparaison des mycéliums potentiellement fertiles qui se développent en présence de lumière ou de mycosporine exogène.

3) Discussion

Comparée aux quantités de stérols esterifiés, formes de réserve du *Leptosphaeria typhae* (ALAIS et al, 1974) et du *Gnomonia leptostyla* (FAYRET et al, 1979), la faible valeur (1 %) de la fraction stérolique estérifiée du *N. galligena* peut-être expliquée par l'arrêt précoce des expérimentations au 13^e jour, soit au début de la formation des structures reproductrices et en période active de croissance mycélienne. Dans ce cas, PARKS et al (1978) démontrent que l'augmentation considérable (10 fois plus) de l'estérification des stérols des *Saccharomyces* se réalise durant la phase végétative stationnaire.

La richesse en ergostérol des thalles du *N. galligena* n'est pas surprenante. De nombreuses analyses, pratiquées notamment chez les Mucorales (Mc CORKINDALE et al, 1969) ou les Basidiomycètes (YOKOKAWA et MITSUHASHI, 1981) révèlent la prédominance de l'ergostérol. A ce titre, ce corps est utilisé comme indice de référence de la croissance mycélienne dans les techniques modernes de détection des contaminants d'origine fongique (SEITZ et al, 1979).

L'évolution globale du contenu stérolique (stérols libres) du *N. galligena*, du *G. leptostyla* (FAYRET et al, 1979) et du *L. typhae* (VIDAL et al, 1979) est fonction des potentialités reproductrices des organismes considérés mais non de la qualité de leur déterminant. Ainsi, la totale inhibition de la formation des ascocarpes, chez ces trois espèces, provoquée respectivement par l'obscurité, la lumière et le milieu nutritif (xylose, 40g/l) se traduit, de façon commune par une augmentation du "pool" des stérols libres. Inversement, l'élaboration des structures sexuées peut justifier la diminution de la teneur en stérols libres, ces derniers seraient activement incorporés aux membranes néo-formées (ELLIOTT, 1977).

Contrairement à l'évolution du contenu stérolique total, les variations de chaque composé ou catégorie de stérols ($\Delta 5$, $\Delta 7$, $\Delta 5,7$) sont bien plus tributaire de la nature du paramètre contrôlant la différenciation sexuée que de l'orientation de cette dernière. A cet égard, pour un même degré de fécondité du *L. typhae* (ALAIS et al, 1976), des milieux nutritifs de composition différente bouleversent la répartition qualitative et quantitative des stérols. Au niveau du *N. galligena* et du *G. leptostyla*, la lumière influe, pareillement, sur les proportions des trois classes stéroliques alors qu'elle exerce, chez ces deux champignons, une action biologique opposée, respectivement inductrice et inhibitrice de la sexualisation. Ainsi, la fructification parfaite du *N. galligena* se caractérise par des teneurs accrues en stérols $\Delta 5$ (cholestérol, lichestérol, β sitostérol) et plus faibles en composées $\Delta 5,7$ (ergostérol surtout). Les quantités de ces divers composés évoluent, inversement, lors de la morphogenèse sexuée du *G. leptostyla* et du *L. typhae* où, notamment, la forte teneur en ergostérol et l'augmentation du quotient ergostérol/cholestérol (stérol $\Delta 5,7$ /stérols $\Delta 5$) opposent ces deux champignons au *N. galligena*. Chez ce dernier, les résultats ainsi obtenus paraissent, pourtant, très significatifs si l'on se réfère aux travaux d'ELLIOTT (1979) ou d'ELLIOTT et MATH (1983) sur le *Phytophthora cactorum*.

Ces auteurs démontrent, en effet, que l'activité biologique des stérols $\Delta 5$ et, à un degré moindre, des composés $\Delta 7$ est nettement supérieure à celle des stérols $\Delta 5,7$. L'efficacité biologique de ces derniers, additionnés au milieu nutritif, est subordonnée à leur transformation en stérols $\Delta 5$. Ces chercheurs supposent alors que la présence d'une double liaison en C5 favorise la synthèse hormonale ou des réactions d'oxydation. Au vu de ces données, le gradient de concentration en stérols $\Delta 5$ rendrait compte de celui affectant la différenciation sexuée du *N. galligena*

Dans les mycéliums du *N. galligena* incubés à l'obscurité, l'addition de mycosporine suscite une spectaculaire régression du contenu stérolique dont l'évolution, quantitative mais aussi qualitative, rappelle celle des thalles irradiés. Sur ce plan, la mycosporine simule l'effet lumineux et seule la stimulation de la biosynthèse du cholestérol, précoce à la lumière mais différée dans le temps en présence de P310 exogène, semble distinguer les effets de l'éclairement et ceux d'un apport de mycosporine. Cette différence pourrait suffire à expliquer la disparité des deux réponses sexuées, si l'on se réfère au rôle biologique primordial du cholestérol et des stérols $\Delta 5$, évoqué ci-dessus ou démontré par ailleurs (JACQUET, 1979 ; VIDAL, 1983).

III.- CONCLUSIONS

La comparaison de l'évolution stérolique mycélienne, dans divers cas de différenciation sexuée, révèle de nombreuses contradictions qui rendent aléatoires toute conclusion, d'ordre général, sur les relations : stérols-lumière-formation périthéciale.

Chez le *N. galligena*, la qualité de la composition stérolique des thalles irradiés -ou non- ne rend pas compte, spécifiquement, de la fertilité -ou non- du champignon. Dans ce sens, nos essais d'incorporation au milieu trophique M23 de stérols divers, en nature et concentration, n'ont jamais abouti au déclenchement, à l'obscurité, de la fructification parfaite. Toutefois, nos expériences et analyses ne permettent pas d'écarter toute intervention, par le biais de précurseurs stéroliques, d'une régulation hormonale au niveau de la morphogenèse périthéciale du *N. galligena*. Celle-ci pourrait, ainsi, dépendre, de l'activité de phéromones décelées, par ailleurs, chez des Ascomycètes comme *Ascobolus stercorarius* (BISTIS et RAPER, 1963).

Finalement, l'intérêt principal de cette étude réside dans l'influence de la mycosporine sur le métabolisme stérolique que cette substance modifie dans le même sens que les irradiations lumineuses. L'activité du P310, sur le contenu stérolique global, qui surpasse celle du photostimulus, crée sans doute un déséquilibre préjudiciable à une production optimale d'ascocarpes matures. Au niveau qualitatif, la mycosporine d'une part, la lumière d'autre part, induisent les gradients stéroliques qui coïncident avec les résultats biologiques, ces réponses mettent en évidence la complexité de la photorégulation. Néanmoins, nous pouvons affirmer que nos analyses confèrent à la mycosporine un rôle d'intermédiaire biochimique entre l'absorption lumineuse et la reproduction sexuée du *N. galligena* et, parallèlement, confirment l'activité morphogène photomimétique du P310.

CONCLUSIONS DE LA QUATRIÈME PARTIE

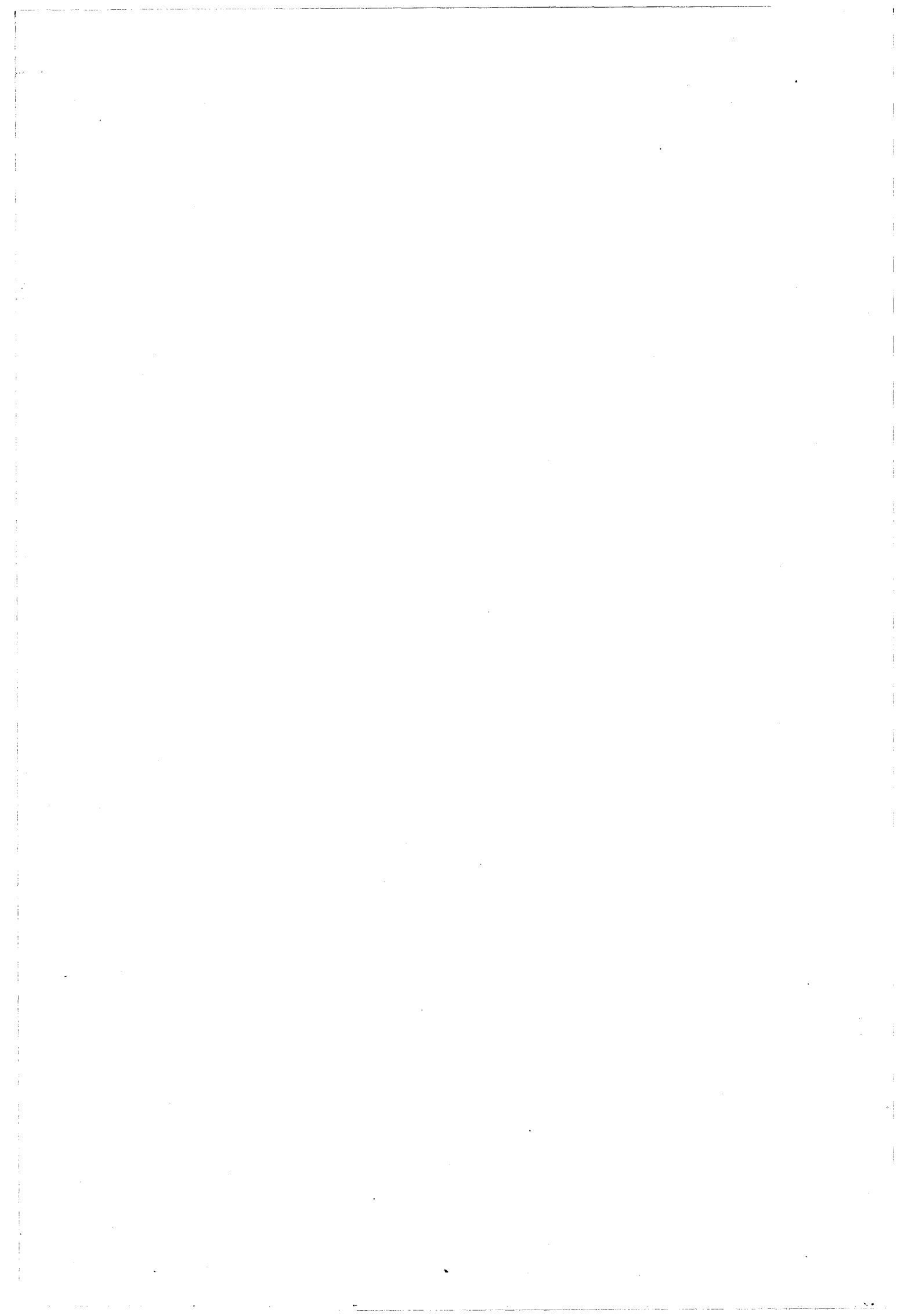
Au début de cette étude, l'analyse bibliographique relative aux mycosporines révèle les nombreuses incertitudes et hypothèses que suscitent la présence et le rôle de ces composés.

Les expériences, menées chez le *N. galligena*, permettent d'apporter quelques réponses sur ce sujet, ainsi :

- la biosynthèse de P310 qui est photodépendante ne se réalise que sous des éclairagements similaires à ceux qui provoquent la fructification parfaite. Plus particulièrement, on remarque la coïncidence des spectres d'activité des radiations monochromatiques sur ces deux phénomènes. Dans ce cas, l'efficacité maximale des longueurs d'onde 320 nm, 370 nm, 420 nm et 450 nm mais également celle des inhibiteurs flaviniques confortent les hypothèses émises sur la nature flavoprotéique du photorécepteur à l'origine de deux réponses observées.

- la production du P310 qui est déclenchée antérieurement à toute morphogénèse reproductrice apparait parfaitement corrélée au nombre d'ascocarpes matures. Toutefois, la présence de la mycosporine n'implique pas forcément la différenciation périthéciale.
- la synthèse du P310, induite dans un large domaine spectral non limité aux radiations proches de 310 nm et accrue lors de la germination des ascospores, ne permet pas de conclure au rôle d'agent photorécepteur ou de substance de réserve proposé pour ce composé.
- la mycosporine exerce une activité morphogène photomimétique qui restaure, à l'obscurité, une certaine fertilité du champignon. Plus précisément, cette action semble se situer sur l'initiation de nombreuses ébauches sexuées dont le faible taux de maturation souligne l'insuffisance du P310 à se substituer complètement aux éclaircissements indispensables. Ce rôle peut être assumé par des mycosporines, autres que celle extraite du *N. galligena*, à fraction azotée différente. L'influence du chromophore (cyclohexénone) n'a pas été envisagée, en raison des faibles quantités isolées de ce produit.
- au niveau du métabolisme intermédiaire ou de la synthèse des stérols, la mycosporine accentue les effets de la lumière. Ainsi, en réprimant l'isocitrate lyase, le P310 provoque l'augmentation des valeurs du rapport entre les activités de l'isocitrate deshydrogénase et de l'isocitratase. Par ailleurs, l'apport exogène de mycosporine réduit le "pool" des stérols libres, tout en restaurant l'équilibre entre les stérols $\Delta 5,7$ (ergostérol) et $\Delta 5$ (cholestérol, lichestérol) tel qu'il est défini dans les thalles irradiés. Finalement, en regard des multiples hypothèses proposées par les auteurs intéressés au rôle des mycosporines, nous pouvons conclure que le P310 agit sur le métabolisme dans le même sens que la lumière et très précisément en réprimant la synthèse de l'isocitrate lyase.

Sur ce plan se confirme le rôle photomimétique de la mycosporine dans la photoinduction périthéciale du *N. galligena*.



CONCLUSIONS GENERALES

L'étude de la reproduction sexuée *in vitro* du *Nectria galligena*, démontre la complexité des déterminants de ce phénomène.

Ainsi, la production périthéciale dépend de l'influence, simultanée et optimale, de nombreux facteurs :

- elle résulte de la compatibilité génétique de souches monoascospores
- elle nécessite des conditions trophiques équilibrées, soit sous forme de certains substrats naturels (décoction avoine-blé 40 g/l), soit fournies par un milieu synthétique dont certains microéléments (le zinc en particulier) et le rapport carbone-azote jouent un rôle particulier.
- elle se réalise sous des températures constantes de 10°C à 22°C mais optimale de 18°C. Une élévation de la température au delà de 25°C entraîne la stérilité sexuée du champignon.
- elle est strictement photodépendante et la qualité de la lumière fournie paraît primordiale. Dans ce cas, des radiations lumineuses proches de 320 nm, 370 nm, 420 nm, 450 nm et 480 nm induisent le plus grand nombre d'ascocarpes si elles sont appliquées à un moment particulier du développement, soit durant le temps où le gamétophyte végétatif peut être sexualisé.

L'ensemble de ces exigences démontre l'antagonisme entre l'évolution sporophytique concrétisée par la formation des ascocarpes fertiles et le développement gamétophytique du champignon dont la croissance mycélienne et la conidiogénèse peuvent s'accomplir dans un environnement très différent, voire inhibiteur, de celui nécessaire à sa sexualisation. Ces résultats ont permis de définir :

- cytologiquement, les principales étapes de la morphogénèse sexuée. Ainsi apparaît l'intérêt au plan systématique d'une telle étude ontogénique qui permet de classer, sans aucun doute, le *N. galligena* parmi les Pyrenomycètes Ascoloculaires ou Loculoascomycètes.

- les modalités thermiques et lumineuses propres aux étapes primordiales de la différenciation périthéciale
- les conséquences métaboliques de la photoinduction de la fructification parfaite. Celles-ci se traduisent notamment par la production de P310 ou mycosporine. L'étude de ce composé révèle que sa biosynthèse est tributaire des mêmes besoins lumineux que ceux nécessaires à la sexualisation. En outre, additionnée en faible quantité au milieu culturel, la mycosporine peut remplacer l'éclairement pour induire la formation d'ascocarpes. Cette substitution se concrétise par des modifications de certaines activités enzymatiques (isocitrate déshydrogénase et isocitratase) ou de la teneur en stéroïdes des mycéliums du *N. galligena*. Ces mêmes orientations métaboliques sont provoquées, à un degré moindre, par l'irradiation des cultures dont l'activité biologique est pourtant supérieure. Ces résultats démontrent la complexité de la photorégulation sexuée dont la mycosporine ne représente qu'un élément.

Le rôle de la lumière sur la formation du P310 et des ascocarpes pose le problème de l'absorption des radiations à l'origine de ces deux processus. Les spectres d'activité et certains essais (dosage et inhibition des flavines) présumant de la nature flavoprotéique du système photorécepteur du *N. galligena*.

Ce travail doit nous permettre d'aborder, dans des conditions très précises les nombreuses questions qui demeurent, au sujet du déterminisme sexué, chez le *N. galligena* :

- cytologie des structures sexuées abortives observées dans divers cas expérimentaux
- physiologies respectives de l'induction et de la maturation périthéciale
- investigations plus complètes de l'action de la mycosporine au niveau enzymatique
- recherche des éléments qui, complémentaires à la mycosporine, assurent l'activité optimale des rayonnements lumineux sur la production périthéciale.

Des études similaires, réalisées chez le *Nectria ditissima* ou en cours pour le *N. coccinea*, également appliquées à d'autres espèces du genre, devraient nous permettre de définir, sur un plan plus général, le déterminisme sexué des *Nectria*

B I B L I O G R A P H I E .

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

- AINSWORTH G.C. et BISBY'S, 1971. - Dictionary of the fungi, 6eme ed.
Ed. AINSWORTH G.C., Kew, England.
- 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. - Influ-
ence du milieu de culture sur la composition en stérols de
Leptosphaeria typhae. *Phytochemistry*, 15 : 49-51.
- ALEXOPOULOS C.J. et C.W. MIMS, 1979. - Introductory Mycology, 3eme ed.
Ed. WILEY J. and Sons Inc., New-York.
- ANDREASSEN A.A. et T.J.B. STIER, 1953. - Anaerobic nutrition of *Saccha-
romyces*. I- Ergostérol requirement for growth in a defined medium.
J. Cell. Physiol., 41 : 24-36.
- ANDRIEU S., F. TRAORE, L. DUJARDIN et L. LACOSTE, 1980. - *Leptosphaeria sene-
galensis* : Facteurs optimums de sa sexualisation. *Ann. Parasitol.*,
55 (1) : 135-144.
- ARCHER J.F., 1971. - Perithecium formation by *Nectria lugdunensis* on
natural material. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 56 : 475-477.
- ARPIN N., S. THIVEND et J. FAVRE-BONVINI, 1977a. - Substances photoabsor-
bantes de *Stereum hirsutum* (Will ex. Fr.) ; isolement, purification
et caractéristiques de P310 (Mycosporine). *Bull. Soc. Mycol. Fr.*,
93 : 39-52.
- ARPIN N., J. FAVRE-BONVIN et S. THIVEND, 1977b. - structure de la mycos-
porine 2, nouvelle molécule, isolée de *Botrytis cinerea*. *Tetrahedron
Lett.*, 10 : 819.
- ARPIN N., R. CURT et J. FAVRE-BONVIN, 1979. - Mycosporine : mise au point
et données nouvelles concernant leurs structures, leur distribution,
leur localisation et leur biogenèse. *Rev. Mycol.*, 43 : 247-257.
- ARPIN N. et M.L. BOUILLANT, 1981. - Light and mycosporines. In: Fungal
spore : morphogenetic controls. Ed. TURIAN G. et H.R. HOHL.
Academic Press, London. pp 435-457.
- ASINA S., K. JAIN et R.F. CAIN, 1977. - Factors influencing growth and
ascocarp production in three species of *Sporormiella*. *Can. J. Bot.*,
55 : 1915-1925.

- BABAY-AHARY A., M.J. DABOUSSI-BAREYRE et D. PARISOT, 1982. - Isolation and genetic analysis of self-sterility and perithecial pigmentation mutants in a homothallic isolate of *Nectria haematococca*. *Can. J. Bot.*, 60 : 79-84.
- BAKER R., 1956. - Fertilizing ability of males and hermaphrodites in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. *Phytopathology*, 46 : 644-649.
- BAKER R. et B. WARE, 1962. - Induction of perithecial primordia in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. *Phytopathology*, 52, 359.
- BARNETT H.L. et V.G. LILLY, 1947. - The relation of thiamin to the production of perithecia by *Ceratostomella fimbriata*. *Mycologia*, 39 : 699-708.
- BARTHE P., 1971. - Recherche de substances de type cytokinine synthétisées par *Nectria galligena*, var *major* Wr., en culture pure. *C.R. Acad. Sci. Paris, ser. D.*, 272 : 2881-2883.
- BASU S.N., 1951. - Significance of calcium in fruiting of *Chaetomium* species, particularly *Chaetomium globosum*. *J. Gen. Microbiol.*, 5 : 231-238.
- BASU S.N. et R.G. BOSE, 1958. - Effet of biotin, manganese and calcium on the growth and fruiting of *Chaetomium* species. *J. Sci. Indus. Res.*, 17 : 5-16.
- BELTRA R., A.M. BALLESTEROS et R. LAHOZ, 1969. - Estudios sobre la producción de sustancias de crecimiento por *Nectria galligena*. *Microbiol. Españ.*, 22 : 41-53.
- BERDUCOU J., 1956. - Mécanisme de la formation des chancres à *Nectria* du pommier. Rôle de l'acide indole β -acétique dans la biologie de *Nectria galligena* Bres. et de *Nectria cinnabarina* Tode. *Thèse Doct. Sci. Nat.*, Toulouse, 179 p.
- BERNILLON J., 1982. - Application de la C.L.H.P. à l'étude de molécules azotées (mycosporines et acides aminés) extraites de champignons. *Thèse C.N.A.M.*, Lyon, 139 p.
- BERNILLON J., M.L. BOUILLANT, J.L. PITTET, J. FAVRE-BONVIN et N. ARPIN, 1984. - Mycosporine glutamine and related mycosporines in the fungus *Pyronema omphalodes*. *Phytochemistry*, 23 : 1083-1087.
- BETINA V. et J. ZAJACOVA, 1978. - Inhibition of photoinduced *Trichoderma viride* conidiation by inhibitors of RNA synthesis. *Folia Microbiol.*, 23 : 460-464.

- BHATTACHARYYA J.P. et S.N. BASU, 1962. - The effect of trace elements, other nutritional factors and pH on the growth and sporulation of *Penicillium* species. *J. Sci. Ind. Res.*, 21 : 263-268.
- BILINSKI C.A. et J.J. MILLER, 1980. - Introduction of normal ascosporeogenesis in two-spored *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, acetate and zinc. *J. Bacteriol.*, 143 : 343-348.
- BINDER F.L. et V.G. LILLY, 1976. - Qualitative and quantitative effects of radiation on pycnidial formation by *Dendrophoma obscurans*. *Can. J. Bot.*, 54 : 566-571.
- BISTIS G. et J.R. RAPER, 1963. - Heterothallism and sexuality in *Ascobolus stercorarius*. *Am. J. Bot.*, 50 : 880-891.
- BOOTH C., 1959. - Studies of Pyrenomycetes. IV-*Nectria* (Part I). *Mycological Papers*, 73 : 1-115.
- BOOTH C., 1966. - The genus *Cylindrocarpon*. *Mycological Papers*, 104 : 1-56.
- BOOTH C., 1978. - Do you believe in genera ? *Trans. Br. mycol. Soc.*, 71 : 1-9.
- BOUILLANT M.L., J.L. PITTET, J. BERNILLON, J. FAVRE-BONVIN et N. ARPIN, 1981. - Glucosides de mycosporines isolés d'*Ascochyta pisi*, de *Cladosporium herbarum* et de *Septoria nodorum*. *Phytochemistry*, 20 : 2709-2710.
- BRAGG J.D., 1981. - Inhibitory effects of light on ascospore germination of *Pseudoarachniotus marginosporus*. *Mycologia*, 73 : 681-688.
- BRETZLOFF C.W., 1954. - The growth and fruiting of *Sordaria fimicola*. *Amer. J. Bot.*, 41 : 58-67.
- BROOK P.J., 1975. - Effects of light on ascospore discharge by five fungi with bitunicate asci. *New. Phytol.*, 74 : 85-92.
- BROOK P.J., 1981. - Protective function of an ultraviolet absorbing compound associated with conidia of *Glomerella cingulata*. *N.Z.J. Bot.*, 19 : 299-304.
- BROWN A.E. et T.R. SWINBURNE, 1974. - The metabolism of L-phenylalanine by *Nectria galligena* Bres. *Phytopath. Z.*, 81 : 254-257.
- BULIT J., 1957. - Contribution à l'étude biologique du *Nectria galligena* Bres., agent du chancre du pommier. *Ann. Epiph.*, 8 : 67-89.

- CALLAGHAN A.A., 1962. - Observations on perithecium production and spore discharge in *Pleuraea setosa*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 45 : 249-254.
- CAMPBELL R., 1958. - Nutrient requirements for the production of perithecia by *Ceratocystis variospora* and other species. *Amer. J. Bot.*, 45 : 263-270.
- CANTINO E.C., 1956. - The relation between cellular metabolism and morphogenesis in *Blastocladiella*. *Mycologia*, 48 : 225-240.
- CANTINO E.C., 1961. - The relationships between biochemical and morphological differentiation in non-filamentous aquatic fungi. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 11 : 243-271.
- CARLILE M.J. et J. FRIEND, 1956. - Carotenoïds and reproduction in *Pyronema confluens*. *Nature*, 178 : 369-370.
- CARLILE M.J., 1970. - The photoresponses of fungi. In: The photobiology of microorganisms. Ed. HALLDAL et J. WILEY and Sons Ltd., Chichester, Sussex, England, pp 309-344.
- CAYLEY D.M., 1921. - Some observations on the life history of *Nectria galligena* Bres. *Ann. of Bot.*, 35 : 79-92.
- CHADEFAUD M., 1960. - Les végétaux non vasculaires (Cryptogamie). *Traité de Botanique*, Tome I. Ed. MASSON, Paris, 1016p.
- CHILD J.J., G. DEFAGO et R.H. HASKINS, 1969. - The influence of carbon and nitrogen nutrition on growth and sterol induced sexuality of *Pythium* sp PRL 2142. *Mycologia*, 61 : 1096-1105.
- CHIOCCARA F., G. MISURACA, E. NOVELLINO et G. PROTA, 1979. - Occurrence of two new mycosporine-like aminoacids, mytilins A and B in the edible mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Tetrahedron Lett.*, 34 : 3181-3182.
- CHIOCCARA F., A. DELLA GALA, M. DE ROSA, E. NOVELLINO et G. PROTA, 1980. - Mycosporine aminoacids and related compounds from the eggs of fishes. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 89 : 1101-1106.
- COCHRANE V.W., 1958. - *Physiology of fungi*. Ed. WILLEY J., New York, 524p.
- COMBEPINE G. et G. TURIAN, 1970. - Activités de quelques enzymes associées à la conidiogenèse du *Neurospora crassa*. *Arch. Microbiol.*, 72 : 36-47.

- COTTER H.U.T. et R.O. BLANCHARD, 1978. - Heterothallism in *Nectria coccinea* var. *faginata*. *Mycologia*, 70 : 697-700.
- CURTIS C.R., 1964. - Physiology of sexual reproduction in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. II- Effets of radiant energy on sexual reproduction. *Phytopathology*, 54 : 1141-1145.
- CURTIS C.R., 1969. - Photoinduced perithecial formation by *Nectria haematococca* on media containing either L-tyrosine, L-phenylalanine, or D-glucose + Na NO₃ as sole carbon and nitrogen sources. *Can. J. Microbiol.*, 15 : 863-866.
- CURTIS C.R., 1972. - Action spectrum of the photoinduced sexual stage in the fungus *Nectria haematococca* Berk. and Br. var. *cucurbitae* (Snyder and Hansen) Dingley. *Plant Physiol.*, 49 : 235-239.
- DABOUSSI-BAREYRE M.J., D. LAILLIER-ROUSSEAU et D. PARISOT, 1979. - Contrôle génétique de deux états différenciés de *Nectria haematococca*. *Can. J. Bot.*, 57 : 1161-1173.
- DASGUPTA A. et P.N. NANDI, 1957. - Role of nitrogen concentration on production of perithecia in *Penicillium vermiculatum* Dangeard. *Nature*, 179 : 429-430.
- DAVIDSSON M. et T. UNESTAM, 1974. - Factors affecting the sexual reproduction of a dermatophyte, *Arthroderma benhamiae*, in synthetic media. *Physiol. Plant.*, 31 : 237-244.
- DEBRAY L., 1982. - Sexualisation, *in vitro*, de *Nectria coccinea* (Pers ex Fries) Fries, agent de la maladie de l'écorce du hêtre. D.E.A. Biologie, Lille, 64 p.
- DEHORTER B., 1972. - Biologie et physiologie de la reproduction sexuée du *Nectria galligena* Bres. Thèse 3eme cycle, Lille, 149 p.
- DEHORTER B., 1976. - Induction des périthèces du *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* Bres. I- Influence de la lumière blanche. *Can. J. Bot.*, 58 : 2206-2211.
- DEHORTER B., R. JACQUES et L. LACOSTE, 1980a. - Photoinduction des périthèces du *Nectria galligena* Bres. II- Influence de la qualité de la lumière. *Can. J. Bot.*, 58 : 2212-2217.

- DEHORTER B., M.F. BROCCQUET, L. LACOSTE, J. ALAIS, A. LABLACHE-COMBIER, A. MAQUESTIAUX, Y. VAN HARVERBEKE, R. FLAMMANG et H. MISPREUVE, 1980b. - Influence de la lumière et de la mycosporine sur la composition stéroïdique du *Nectria galligena* au cours de la morphogénèse sexuée. *Phytochemistry*, 19 : 2311-2315.
- DEHORTER B. et R. PERRIN, 1983a. - Production *in vitro* de périthèces du *Nectria ditissima*, agent du chancre du hêtre (*Fagus sylvatica*). I- Influence du milieu de culture et de la température. Application à la réalisation d'infections artificielles du hêtre. *Can. J. Bot.*, 61 : 1941-1946.
- DEHORTER B. et R. PERRIN, 1983b. - Production *in vitro* de périthèces du *Nectria ditissima*, agent du chancre du hêtre (*Fagus sylvatica*). II- Effets de la composition carbone-azote du milieu nutritif et influence de la lumière. *Can. J. Bot.*, 61 : 1947-1954.
- DEHORTER B. et J. BERNILLON, 1983. - Photoinduction des périthèces du *Nectria galligena* : production et activité photomorphogène des mycosporines. *Can. J. Bot.*, 61 : 1435-1442.
- DE NOTARIS G., 1844. - *G. Bot. Ital.*, Ann. 1, pt.1, Tom ii, 48.
- DIETERT M.F., H.D. VANETTEN et P.S. MATTHEWS, 1983. - *Nectria haematococca* mating population. VI- Cultural parameters affecting growth, conidiation, and perithecial formation. *Can. J. Bot.*, 61 : 1178-1184.
- DIXON G.H. et H.L. KORNBERG, 1959. - Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. *Biochem. J.*, 72 : 3 p.
- DUJARDIN L., J. BIGUET et L. LACOSTE, 1975. - Croissance et reproduction sexuée du champignon dermatophyte *Arthroderma vanbreuseghemii* Takashio (*Trichophyton mentagrophytes* Robin Bancharde) sur un milieu de culture synthétique. *Mycopathologia*, 57 : 113-120.
- DUMONT J.C., 1968. - Contribution à l'étude de la biologie culturale du *Nectria galligena*. D.E.S. Lille, 64 p.
- DURAND R. 1975. - Photomorphogénèse d'un Basidiomycète, *Coprinus congregatus* Bull. ex. Fr. : Influences de variations quantitatives et qualitatives de la lumière sur les phases successives du développement des carpophores. Analyses du phénomène de photoréception. Thèse 3eme cycle, Lyon, 116 p.
- 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.

- ECHTLER A. et J.P. SCHRANTZ, 1975. - La culture pure de quelques *Anthracoïbia* (Discomycètes) : déterminisme de la reproduction sexuée, conséquences taxonomiques. *Rev. cyt. Biol. végét.*, 38 : 217-227.
- 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.
- ELLIOTT C.G., 1977. - Sterols in fungi : their functions in growth and reproduction. *Adv. microbiol. Physiol.*, 15 : 121-173;
- 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., 1979. - Influence of the structure of the sterol molecule on sterol-induced reproduction in *Phytophthora cactorum*. *J. Gen. Microbiol.*, 115 : 117-126.
- ELLIOTT C.G. et V.B. MATH, 1983. - Effects of 6-substituted sterols on sterol induced reproduction in *Phytophthora cactorum*. *Lipids*, 18 : 358-362.
- ESSER K., 1980. - Effects of temperature and light on perithecial development in *Sordaria macrospora*. *Mycologia*, 72 : 619-622.
- FAVRE-BONVIN J., N. ARPIN et C. BREVARD, 1976. - Structure de la mycosporine (P310). *Can. J. Chem.*, 54 : 1105-1113.
- FAYRET J., 1967. - Action de la température et de la lumière sur la multiplication asexuée et la reproduction sexuelle de *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not. en culture pure. *C.R. Acad. Sci. Paris, ser. D*, 265 : 1887-1900.
- FAYRET J., 1974. - Photoinhibition de la formation des périthèces au cours de la morphogénèse sexuée chez *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not. *C.R. Acad. Sci. Paris, ser D*, 278 : 2909-2912.
- FAYRET J., 1975. - Etude du cycle de reproduction du *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not. Déterminisme et physiologie. Thèse Doc. Sci. Nat., Toulouse : 296 p.
- FAYRET J., 1977. - Influence des facteurs trophiques sur la croissance et l'obtention des morphogénèses reproductrices *in vitro* de *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not. *Rev. Myc.*, 41 : 49-72.

- 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.
- FAYRET J., J. BERNILLON M.L. BOUILLANT, J. FAVRE-BONVIN et N. ARPIN, 1981. - Open and ring forms of mycosporin -2 from the ascomycete *Gnomonia leptostyla*. *Phytochemistry*, 20 : 2709-2710.
- 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.
- FIASSON J.L., N. ARPIN et P. LEBRETON, 1969. - Sur l'analyse qualitative et quantitative des caroténoïdes naturels. *Chimie analytique*, 51 : 1-10.
- FIASSON J.L. et M.P. BOUCHEZ, 1970. - Présence de l'ester méthylique de la neurosporaxanthine chez l'ascomycète *Nectria cinnabarina*. *Phytochemistry*, 9 : 1133-1136.
- FLACK N.J. et T.R. SWINBURNE, 1977. - Host range of *Nectria galligena* Bres. and the pathogenicity of some Northern Ireland isolates. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 68 : 185-192.
- FRIES E.M., 1985. - *Systema Orbis Vegetabilis*, 103-105.
- FRIES E.M., 1849. - *Summa Veg. Scand.*, 387-388.
- FRIES N., 1965. - The chemical environment for fungal growth. III- Vitamins and other organic growth factors, *vol I* : 491-523. In : *The Fungi*. Ed. AINSWORTH G.C. et A.S. SUSSMAN, Academic Press, New-York et Londres.
- FURUSAKI A., T. MATSUMOTO, I. TSUJINO et I. SEKIKAWA, 1980. - The crystal and molecular structure of palythine trihydrate. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 53 : 319-323.
- GEOFFRION R., 1980. - Le chancre commun du pommier. *Phytoma*, 11 : 5-6.
- GHAZANFARI J. et Z. BANIHASHEMI, 1976. - Factors influencing ascocarp formation in *Polystigma ochraceum*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 66 : 401-406.
- GHORA B.K. et K.L. CHAUDHURI, 1975. - Comparative studies on the role of nitrogenous compounds in the growth and perithecial development of *Chaetomium aureum*. *Folia Microbiol.*, 20 : 157-165.

- GRESSEL J., 1979. - Blue light photoreceptor. *Photochem. Photobiol.*, 30 : 749-7
- GRUNWALD C., 1978. - Function of sterols. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 284 : 541-558.
- GOETHE R., 1880. - Weitere Mitteilungen über den Krebs der Apfelbäume. *Landw. J.B.*, Jb : 837-852.
- GOTWOLS T.A., R.O. BLANCHARD et W.C. SHORTLE, 1980. - Some factors affecting canker formation in American beech inoculated with *Nectria coccinea* var. *faginata*. *Eur. J. For. Pathol.*, 10 : 365-370.
- HALL R., 1971. - Effect of carbon-nitrogen ratios on production of perithecia by *Sordaria fimicola*. *Can. J. Microbiol.*, 17 : 132-134.
- HANLIN R.T., 1961. - Studies in the genus *Nectria*. I- Factors influencing perithecial formation in culture. *Bull. Torrey Bot. Club*, 88 : 95-103.
- HARMAN G.E., 1967. - Physiology of sexual reproduction in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. III- Perithecium formation on media containing compounds involved in the shikimic acid pathway. *Phytopathology*, 57 : 1138-1139.
- HARMAN G.E., A.A. KHAN et R.E. DRURY, 1971. - Morphactin influences sexual and asexual reproduction in fungi. *Can. J. Microbiol.*, 17 : 1477-1479.
- HARTIG R., 1878. - Die krebsartigen Krankheiten der Rotbuche Donnckelmannsche. *Z. Forstu. Jagdwessen*, 9 : 377-383.
- HASKINS R.H. et N.R. GARDNER, 1978. - Effects of *Trichoderma* on sexual reproduction of some species of *Pythium* and *Phytophthora*. *Can. J. Bot.*, 56 : 1651-1654.
- HAWKER L.E., 1939. - The influence of various sources of carbon on the formation of perithecia by *Melanospora destruens* Shear in the presence of accessory growth factors. *Ann. Bot.*, 3 : 455-468.
- HAWKER L.E. et S.D. CHAUDHURI, 1946. - Growth and fruiting of certain ascomycetous fungi as influenced by the nature and concentration of the carbohydrate in the medium. *Ann. Bot.*, 9 : 185-194.
- HAWKER L.E., 1947. - Further experiments on growth and fruiting of *Melanospora destruens* Shear in the presence of various carbohydrates, with special reference to the effects of glucose and sucrose. *Ann. Bot.*, 11 : 245-259.

- HAWKER L.E., 1957. - The physiology of reproduction in fungi. Ed. Cambridge Univ. Press, London and New-York, 128p.
- HAWKER L.E., 1966. - Environmental influences on reproduction. *Vol II* : 435-469. In : The Fungi. Ed. AINSWORTH G.C. et A.S. SUSSMAN, Academic Press, New-York, London.
- HAYMAN D.S., 1963. - *Rosellinia limoniispora* : effect of biotin and thiamin and various sugar sources on perithecial production in pure culture. *Can. J. Bot.*, 41 : 1649-1656.
- HENRIKSSON L.E. et J. MORGAN-JONES, 1951. - The effect of temperature, pH and malt extract upon growth and perithecial development of two *Gnomonia* species. *Svensk. Bot. Tidskr.*, 45 : 648-656.
- 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 : 633-666.
- HIRSCH H.M., 1954. - Environmental factors influencing the differentiation of perithecia and their relation to tyrosinase and melanin formation in *Neurospora crassa*. *Physiol. Plant.*, 7 : 72-97.
- HITE R.E., 1973. - Substances from *Botrytis cinerea* associated with sporulation and exposure to near ultraviolet radiation. *Plant. Dis. Rep.*, 57 : 760-764.
- HIX S.M. et R. BAKER, 1964. - Physiology of sexual reproduction in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. I- Influence of carbon and nitrogen. *Phytopathology*, 54 : 584-586.
- HOCHBERG M.L. et M.L. SARGENT, 1974. - Rhythms of enzyme activity associated with circadian conidiation in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 120 : 1164-1175.
- HOCK B., M. BAHN et G. BITTER, 1976. - The control of fruiting body formation in the ascomycete *Sordaria macrospora* by biotin and arginine. *J. Cell Biol.*, 70 : 10.
- HOGENSON R.O. et R.M. HOSFORD, 1971. - Sexual reproduction in *Leptosphaeria avenaria* f. *sp. triticea* induced by wavelengths of light greater than 560 m μ . *Mycologia*, 63 : 958-963.

- HOLMES F.W., 1970. - Formation of perithecia by *Ceratocystis ulmi* on natural and synthetic nutrient media. *Netherl. J. Plant Pathol.*, 3 : 129-134.
- HONDA Y. et M. ARAGAKI, 1983. - Light dependence for fruiting body formation and its inheritance in *Phoma caricae-papayae*. *Mycologia*, 75 : 22-29.
- HORRIERE F., 1976. - Influence sur la fructification de *Coprinus congregatus* Bull. ex. Fr. des concentrations en glucose et en asparagine, et de l'équilibre carbone-azote du milieu. *Mycopathologia*, 58 : 81-89.
- HUANG L.H., 1976. - Developmental morphology of *Triangularia backusii* (Sordariaceae). *Can. J. Bot.*, 54 : 250-267.
- HUBERT M.F., 1967. - Recherches sur le développement en culture pure de : *Leptosphaeria microscopica*, *Leptosphaeria eustomoïdes* et *Leptosphaeria arundinacea*. Rôle de la température et de la lumière dans le déterminisme de leur fructification. Thèse Doct. Spéc., Toulouse, 136 p.
- INGOLD C.T., 1962. - The reaction of fungi to light and the problem of photoreception. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 16 : 154-169.
- INOUE Y. et M. FURUYA, 1974a. - Perithecial formation in *Gelasinospora reticulospora*. II- Promotive effects on near-ultraviolet and blue light after dark incubation. *Plant Cell Physiol.*, 15 : 195-204.
- INOUE Y. et M. FURUYA, 1974b. - Perithecial formation in *Gelasinospora reticulospora*. III- Inhibitory effects of near-ultraviolet and blue light during the inductive dark period. *Plant Cell Physiol.*, 15 : 469-475.
- INOUE Y. et M. FURUYA, 1975. - Perithecial formation in *Gelasinospora reticulospora*. IV- Action spectra for the photoinduction. *Plant Physiol.*, 55 : 1098-1101.
- INOUE Y. et M. FURUYA, 1978. - Perithecial formation in *Gelasinospora reticulospora*. VI- Inductive effect of microbeam irradiation with blue light. *Planta*, 143 : 255-259.
- INOUE Y. et M. WATANABE, 1984. - Perithecial formation in *Gelasinospora reticulospora*. VII- Action spectra in U.V. region for the photoinduction and the photoinhibition of photoinductive effect brought by blue light. *Plant Cell Physiol.*, 25 : 107-113.
- ITO S. et Y. HIRATA, 1977. - Isolation and structure of a mycosporine from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Lett.*, 28 : 2429-2430.

- JACQUET M., 1979. - *Pythium tracheiphylum* Matta, agent du flétrissement de la laitue (*Lactuca sativa* L.). Étude biologique et épidémiologique. Thèse 3eme cycle, Lille, 131 p.
- JEREBZOFF S. et R. JACQUES, 1969. - Recherche du système pigmentaire actif sur la stabilisation du rythme interne de *Leptosphaeria michotii*. *C.R. Acad. Sci. Paris, ser. D*, 268 : 691-694.
- JEREBZOFF-QUINTIN S. et S. JEREBZOFF, 1974. - Action de la diphénylamine sur la stabilisation de la période du rythme de zonation du *Leptosphaeria michotii*. Rôles comparés de la lumière et de l'antimycine. *C.R. Acad. Sci. Paris, ser. D*, 278 : 1239-1242.
- KAARIK C.A., 1960. - Growth and sporulation of *Ophiostoma*. *Symbol. Bot. Upsal.*, 16 : 3.
- KATO H., T. YAMAGUCHI et N. NISHIHARA, 1976. - The perfect state of *Pyricularia oryzae* Cav. in culture. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 42 : 507-510.
- KILGOUR G.L., S.P. FELTON et F.M. HUENNEKENS, 1957. - Paper chromatography of flavins and flavin nucleotides. *J. Amer. Chem. Soc.*, 79 : 2254-2256.
- KITAMOTO Y., A. SUZUKI et S. FURUKAWA, 1972. - An action spectrum for light induced primordium formation in a basidiomycete *Favolus arcularius* (Fr) Ames. *Plant Physiol.*, 49 : 338-340.
- KLEBS G., 1900. - Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze. III- Allgemeine Betrachtungen. *Jahrb. wiss. Bot.*, 35 : 80-203.
- KLEMM E. et M. NINNEMANN, 1979. - Nitrate reductase - a key enzyme in blue light promoted conidiation and absorbance change of *Neurospora*. *Photochem. Photobiol.*, 29 : 629-632.
- KOEHN R.D., 1971. - Laboratory culture and ascocarp development of *Podosordaria leporina*. *Mycologia*, 63 : 441-458.
- KRUGER J., 1974a. - Zur genetik von *Nectria galligena* Bres. *Phytopath. Z.*, 79 : 320-342.
- KRUGER J., 1974b. - Der Einfluss verschiedener Umweltbedingungen auf die Perithezienbildung von *Nectria galligena* Bres. *Phytopath. Z.*, 80 : 293-302.
- KUMAGAI T., N. YOSHIOKA et Y. ODA, 1976. - Further studies on the blue and near ultraviolet reversible photoreaction with an intracellular particulate fraction of the fungus *Alternaria tomato*. *Biochim. Biophys. Acta*, 421 : 133-140.

- KUMAGAI T. et Y. ODA, 1969. - An action spectrum for photoinduced sporulation in the fungus *Trichoderma viride*. *Plant Cell Physiol.*, 10 : 287-392.
- KUMAGAI T., 1978. - Mycochrome system and conidial development in certain fungi imperfecti. *Photochem. Photobiol.*, 27 : 371-379.
- KUMAGAI T., 1980. - Blue and near ultraviolet reversible photoreaction in conidial development of certain fungi. In : The Blue light syndrome pp 251-260. Ed. SENGER H., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York.
- KUMAGAI T., 1982. - Blue and near ultraviolet reversible photoreaction in the induction of fungal conidiation. *Photochem. Photobiol.*, 35 : 123-125.
- KUMAGAI T., 1983. - Action spectra for the blue and near ultraviolet reversible photoreaction in the induction of fungal conidiation. *Physiol. Plant.*, 57 : 468-471.
- LACOSTE L., 1965. - Biologie naturelle et culturale du genre *Leptosphaeria*. Déterminisme de la reproduction sexuelle. Thèse Doct. Sci. Nat., Toulouse : 234 p.
- LACOSTE L. et L. DUJARDIN, 1972. - La reproduction sexuée d'*Arachniotus albicans* *Apinis* : influence de l'équilibre carbone-azote et du pH. *Bull. Soc. mycol. Fr.*, 88 : 5-14.
- LACOSTE L. et B. DEHORTER, 1973. - Déterminisme de la reproduction sexuée de *Nectria galligena* Bres. *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.*, 14 : 87-91.
- LAHOZ R., R. BELTRÁ et A.M. BALLESTEROS, 1970. - Biochemical changes in cultures of *Nectria galligena* during the autolytic phase of growth. *Ann. Bot.*, 34 : 205-210.
- LEACH C.M., 1963. - The quantitative and qualitative relationships of monochromatic radiation to sexual and asexual reproduction of *Pleospora herbarum*. *Mycologia*, 55 : 151-163.
- LEACH C.M., 1965. - Ultraviolet-absorbing substances associated with light induced sporulation in fungi. *Can. J. Bot.*, 43 : 185-200.
- LEACH C.M. et E.J. TRIONE, 1966. - Action spectra for light induced sporulation of the fungi *Pleospora herbarum* and *Alternaria dauci*. *Photochem. Photobiol.*, 5 : 621-630.

- LEACH C.M., 1971a. - A practical guide to the effects of visible and ultra-violet radiation on fungi. *In* : Methods in Microbiology, Vol 4 : 609-664. Ed. BOOTH C., Academic Press, New-York.
- LEACH C.M., 1971. - Regulation of perithecium development and maturation in *Pleospora herbarum* by light and temperature. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 57 : 295-315.
- LEACH C.M., 1972. - An action spectrum for light induced sexual reproduction in the ascomycete fungus *Leptosphaerulina trifolii*. *Mycologia*, 64 : 475-490.
- LEATH K.T., 1971. - Quality of light required for sporulation by *Leptosphaerulina*. *Phytopathology*, 61 : 70-72.
- LILLY V.G. et H.L. BARNETT, 1951. - Physiology of the fungi. Ed. Mc Graw-Hill, New-York, 464 p.
- LILLY V.G., 1965. - The chemical environment for fungal growth. *In* : The Fungi, vol I : 465-478. Ed. AINSWORTH G.C. et A.S. SUSSMAN, Academic Press, New-York, London.
- LOCKWOOD L.B., 1937. - Hydrogen ion concentration and ascus formation. *Mycologia*, 29 : 289-290.
- LORTIE M., 1964. - Production of perithecia of *Nectria galligena* Bres. in pure culture. *Can. J. Bot.*, 42 : 123-124.
- 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.
- LUNEL M.C., N. ARPIN et J. FAVRE-BONVIN, 1980. - Structure d'une normycosporine (P310) isolée de *Pyronema omphalodes* (Bull., ex Fr.) Fuckel. *Tetrahedron Lett.*, 21 : 4715-4716.
- LUTTRELL E.S., 1951. - Taxonomy of the pyrenomycetes. *Univ. Missouri Studies*, 24 : 1-120.
- MANACHERE G., 1980. - Conditions essential for controlled fruiting of macromycetes, a review. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 75 : 255-270.
- MARCHAL P. et J. RIGAUD, 1970. - Sur la présence et le métabolisme de l'indolyl 3 - acétaldéhyde chez *Nectria galligena* Bres. *C.R. Acad. Sci. Paris, ser.D*, 271 : 479-481.

- MARSH P.B., E.E. TAYLOR et L.M. BASSLER, 1959. - A guide to the literature on certain effects of light on fungi, reproduction, morphology, pigmentation and phototropic phenomena. *Plant. Dis. Rep. Suppl.*, 261: 251-312.
- MARTINEZ E.S. et E.W. HANSON, 1963. - Factors affecting sporulation, pathogenicity and dissemination of *Leptosphaerulina briosiana*. *Phytopathology*, 53 : 938-945.
- MATTEONI J.A. et D. NEELY, 1979. - *Gnomonia leptostyla* : growth, sporulation and heterothallism. *Mycologia*, 71 : 1034-1042.
- Mc CARTNEY W.O., 1967. - An unusual occurrence of eye rot of apple in California due to *Nectria galligena*. *Plant. Dis. Rep.*, 51 : 278-281.
- Mc CORKINDALE N.J., S.A. HUTCHINSON, B.A. PURSEY, W.T. SCOTT et R. WHEELER, 1969. - A comparison of the types of sterol found in species of the Saprolegniales and Leptomitales with those found in some other Phycomycetes. *Phytochemistry*, 8 : 861-867.
- Mc COY R.E., R.K. HORST et A.W. DIMOCK, 1972. - Environmental factors regulating sexual and asexual reproduction by *Mycosphaerella ligulicola*. *Phytopathology*, 62 : 1188-1195.
- Mc HAW F. et G.T. JOHNSON, 1970. - Zinc and amino acids: important components of a medium promoting growth of *Monoascus purpureus*. *Mycologia*, 62 : 1018-1031.
- Mc LEAN A., F.J. LYNCH et C. USSEY, 1976a. - Nitrogen metabolism in the photoresponsive phytopathogenic fungus *Cercospora beticola*. *Biochem. Soc. Trans.*, 4 : 886-888.
- Mc LEAN A., F.J. LYNCH et C. USSEY, 1976b. - Carbon-utilization patterns in the photoresponsive fungus *Cercospora beticola*. *Biochem. Soc. Trans.*, 4 : 889-891.
- Mc MORRIS T.C., 1978. - Antheridiol and the ogoniols, steroid hormones which control sexual reproduction in *Achlya*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 284 : 459-470.
- Mc ONIE K.C. et W.C. SNYDER, 1966. - Production of perithecia by *Gnomonia fructicola* in culture. *Phytopathology*, 56 : 197-202.
- MOORE D., 1984. - Developmental biology of the *Coprinus cinereus* carpophore : metabolic regulation in relation to cap morphogenesis. *Experimental Mycology*, 8 : 283-297.

- MOORE-LANDECKER E., 1975. - Effect of cultural conditions on apothecial morphogenesis in *Pyronema domesticum*. *Can. J. Bot.*, 53 : 2759-2769.
- MOORE-LANDECKER E., 1979a. - Effect of light regimens and intensities on morphogenesis of the discomycete *Pyronema domesticum*. *Mycologia*, 71 : 699-712.
- MOORE-LANDECKER E., 1979b. - Effect of cultural age and a single photoperiod on morphogenesis of the discomycete *Pyronema domesticum*. *Can. J. Bot.*, 57 : 1541-1549.
- MOORE-LANDECKER E. et W.J. SHROPSHIRE, 1982. - Effects of aeration and light on apothecia, sclerotia and mycelial growth in the discomycete *Pyronema domesticum*. *Mycologia*, 74 : 1000-1013.
- MOYER B.G. et K.T. LEATH, 1976. - Sporogens sterols and sporulation of *Leptosphaerulina briosiana*. *Can. J. Bot.*, 54 : 1839-1845.
- MUÑOZ V., S. BRODY et W.L. BUTLER, 1974. - Photoreceptor pigment for blue light responses in *Neurospora crassa*. *Research Comm.*, 58 : 322-327.
- MUÑOZ V. et W.L. BUTLER, 1975. - Photoreceptor pigment for blue light in *Neurospora crassa*. *Plant. Physiol.*, 55 : 421-426.
- MUNSON R.G., 1939. - Observations on apple canker. I- The discharge and germination of ascospores of *Nectria galligena*. *Ann. appl. Biol.*, 26 : 440-457.
- NAKAMURA H. et J. KOBAYASHI, 1982. - Separation of mycosporine like amino acids in marine organisms using reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 250 : 113-118.
- NANFELDT J.A., 1932. - Studien über die Morphologie und Systematik der nicht lichenisierten, inoperculaten Discomyceten. *Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsala, Ser IV*, 8 : 1-368.
- NELSON R.R., D. HUISINGH et R.K. WEBSTER, 1967. - Sexual differentiation in *Cochliobolus carbonum* as influenced by inhibition and repair of steroid biosynthesis. *Phytopathology*, 57 : 1081-1085.
- NG A.M.L., J.E. SMITH et A.F. Mc INTOSH, 1973. - Changes in activity of tri-carboxylic acid cycle and glyoxylate cycle enzymes during synchronous development of *Aspergillus niger*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 61 : 13-20.
- PARGUEY-LEDUC A., 1967. - Recherches sur l'ontogénie et l'anatomie comparée des ascocarpes des Pyrénomycètes ascoloculaires. II- Les ascocarpes des Pyrénomycètes ascoloculaires unituniqués. *Ann. Sc. Nat. Bot. Paris, ser.12*, 8 : 1-110.

- PARGUEY-LEDUC A. et B. DEHORTER, 1973-1974. - Les ascocarpes et les asques du *Nectria galligena* Bres. *Le Botaniste*, 66 : 157-175.
- PARGUEY-LEDUC A. et M.C. JANEX-FAVRE, 1981. - The ascocarps of ascohymenial Pyrenomycetes. In : *Ascomycete Systematics*, pp 102-123. Ed. REYNOLDS D.R., Springer-Verlag, New-York.
- PAIETTA J. et M.L. SARGENT, 1981. - Photoreception in *Neurospora crassa* : correlation of reduced light sensitivity with flavin deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 5573-5577.
- PAIETTA J. et M.L. SARGENT, 1983. - Modification of blue light photoresponses by riboflavin analogs in *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.*, 72 : 764-766.
- PARISOT D., 1983. - Libération d'acides aminés et d'électrolytes par des souches de *Nectria haematococca* (Berk and Br.) Wr. mutées pour la production de pigments. *Can. J. Microbiol.*, 29 : 746-754.
- PARKER E.J., 1976. - Production of *Nectria coccinea* perithecia in culture on a natural media. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 66 : 519-520.
- PARKS L.W., C. Mc LEAN-BOWEN, F.R. TAYLOR et S. HOUGH, 1978. - Sterols in yeast subcellular fractions. *Lipids*, 13 : 730-735.
- PERRIN R., 1976. - Clef de détermination des *Nectria* d'Europe. *Bull. Soc. Myc. Fr.*, 92 : 335-347.
- PITTET J.L., 1982. - Sporulation et mycosporines chez un champignon imparfait : *Ascochyta fabae*. Etudes physiologique, structurale et enzymologique. Thèse 3ème cycle, Lyon I, 125 p.
- PITTET J.L., B. BOURGUIGNON et N. ARPIN, 1983a. - Sporulation et mycosporines chez un champignon imparfait : *Ascochyta fabae*. *Physiol. Plant.*, 57 : 565-57
- PITTET J.L., M.L. BOUILLANT, J. BERNILLON, N. ARPIN et J. FAVRE-BONVIN, 1983b. - Sur la présence de mycosporines-glutamine réduite, nouvelles molécules chez plusieurs deutéromycètes. *Tetrahedron Lett.*, 24 : 65-68.
- PREVOST-MONNOT F., 1974. - Recherches sur la sporulation de *Pilobolus kleinii* Van Tiegh. (mucorale) et sa photoinduction. Thèse Doct. Sc. Nat., Paris Sud (Orsay), 165 p.

- PUGLIESE F.A. et J.P. WHITE, 1973. - Zinc stimulation of nitrogen assimilation by *Helminthosporium cynodontis*. *Mycologia*, 65 : 295-309.
- QURESHI A.A. et O.T. PAGE, 1972. - Observations on morphological and nutritional aspects of perithecial formation of *Nectria haematococca* and *Hypomyces solani*. *Can. J. Bot.*, 50 : 2443-2448.
- ROGERSON C.T., 1970. - The hypocrealean fungi (Ascomycètes, Hypocréales). *Mycologia*, 62 : 865-910.
- ROQUEBERT-HUBERT M.F. et L. LACOSTE, 1971. - Etude systématique et biologique de quelques *Leptosphaeria* graminicoles. II- Rôle des facteurs externes, principalement de l'éclaircissement, dans le déterminisme de la fructification de *L. eustomoïdes*, *L. arundinacea*, *L. microscopica*. *Bull. Soc. mycol. Fr.*, 87 : 67-72.
- ROSS R.G., 1961. - The effect of certain elements, with emphasis on nitrogen, on the production of perithecia of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Can. J. Bot.*, 39 : 731-738.
- ROSS R.G. et S.A. HAMLIN, 1962. - Production of perithecia of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. on sterile apple leaf discs. *Can. J. Bot.*, 40 : 629-635.
- ROSS R.G. et S.A. HAMLIN, 1965. - Influence of nutrients on perithecial production of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Can. J. Bot.*, 43 : 959-965.
- ROSS R.G. et M.D.J. BREMMER, 1971. - Effect of ammonium nitrogen and amino acids on perithecial formation of *Venturia inaequalis*. *Can. J. Plant Sci.*, 51 : 29-33.
- RICHTER H., 1928. - Die wichtigsten holzbewohnenden Nectrien aus der Gruppe der Krebserreger. *Z. Parasitenkde*, 1 : 24-75.
- RUSMIN S. et T.J. LEONARD, 1975. - Biochemical induction of fruiting bodies in *Schizophyllum commune* : a bioassay and its application. *J. Gen. Microbiol.*, 90 : 217-227.
- RUSMIN S. et T.J. LEONARD, 1978. - Biochemical induction of fruiting in *Schizophyllum*. Isolation and preliminary purification of an inducing substance from *Agaricus bisporus* mushrooms. *Plant Physiol.*, 61 : 538-543.
- SACCARDO P.A., 1878. - *Michelia*, 1.
- SAFE S., 1973. - The effect of environment on the free and hydrosoluble sterols of *Mucor rouxii*. *Biochim. Biophys. Acta*, 326 : 471-475.

- SAMUELS G.J., 1973. - The myxomyceticolous species of *Nectria*.
Mycologia, 65 : 401-420.
- SAMUELS G.J., 1976. - A revision of the fungi formerly classified as *Nectria* subgenus *Hyphonectria*. *Mem. New-York Bot. Gard.*, 26 : 1-126.
- SCHIMDT W., 1980. - Physiological blue light reception. *In* : Structure and Bonding, 41 : 1-44. Ed. DUNITZ J.D. and al., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New-York.
- SEITZ L.M., D.B. SAUER, R. BURROUGHS, H.E. MOHR et J.D. HUBBARD, 1979. - Ergosterol as a measure of fungal growth. *Phytopathology*, 69 : 1202-1203.
- SENGER H., 1980. - The blue light syndrome. Ed. SENGER H., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 540 p.
- SENGER H. et W.R. BRIGGS, 1981. - The blue light receptor(s) : primary metabolic reactions and subsequent metabolic changes. *In* : Photochemical and Photobiological Reviews, 6 : 1-38. Ed. SMITH K.C., Plenum Press, New-York.
- SENGER H., 1982. - The effect of blue light on plants and microorganisms. *Photochem. Photobiol.*, 35 : 911-920.
- SHIPTON W.A., 1977. - Some nutritional factors regulating formation of fertile perithecia of *Calonectria camelliae*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 69 : 59-62.
- SINGH R.A. et G. SHANKAR, 1971/1972. - Effect of physical factors and nutrition on growth and perithecial development of *Glomerella cingulata in vitro*. *Indian Phytopathol.*, 24 : 728-734.
- SMYK L.S., 1975. - Cycle of development and cultural peculiarities of *Nectria citrina* Fr.. *Ukrayn bot. Zh.*, 32 : 655-657.
- SPROSTON T. et R.B. SETLOW, 1968. - Ergosterol and substitutes for the ultra-violet radiation requirement for conidia formation in *Stemphylium solani*. *Mycologia*, 60 : 104-114.
- STALLINGS F.O., 1970. - The physiological control of light induced conidiation in *Aspergillus ornatus*. Ph. D. Thesis, University of WISCONSIN, U.S.A..
In : Ultra-violet-absorbing compounds associated with sporulation in *Botrytis cinerea* (TAN K.K. et H.A.S. EPTON, 1974).
- STEVENS F.L., 1928. - Effects of ultra-violet radiation on various fungi. *Bot. Gaz.*, 86 : 210-225.

- STRIKMANN E., 1961. - Les asques et le périthèce du *Nectria episphaeria* (Tode) Fr., et le problème de la position systématique des Nectriales.
Publ. Museum nation. H. Nat., 2 : 87-96.
- STRIKMANN E. et M. CHADEFAUD, 1961. - Recherches sur les asques et les périthèces des *Nectria* et réflexions sur l'évolution des Ascomycètes.
Rev. gen. Bot., 68 : 725-770.
- SURAPIPITH V. et A. LINDENMAYER, 1969. - Thioguanime dependent light sensitivity of perithecial initiation in *Sordoria fimicola*.
J. Gen. Microbiol., 57 : 227-237.
- TABER W.A., 1966. - Morphogenesis in Basidiomycetes. In : *The Fungi*, Vol. 2 : 387-412. Ed. AINSWORTH G.C. et A.S. SUSSMAN, Academic Press, New-York, Londres.
- TAKANO S., D. UEMURA et Y. HIRATA, 1978. - Isolation and structure of a new amino acid, palythine, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*.
Tetrahedron Lett., 26 : 2299-2300.
- TAN K.K., 1974. - Red-far red reversible photoreaction in the recovery from blue light inhibition of sporulation in *Botrytis cinerea*.
J. Gen. Microbiol., 82 : 201-202.
- TAN K.K. et H.A.S. EPTON, 1974. - Ultra-violet-absorbing compounds associated with sporulation in *Botrytis cinerea*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 63 : 157-167.
- TAN K.K., 1978. - Light-induced fungal development. In : *The Filamentous Fungi*, Vol. 3 : 334-357. Ed. SMITH J.E. et D.R. BERRY, Arnold, Londres.
- TARIS B. et Y. CLEMENCET, 1970. - Extraction et étude des substances de croissance produites, en culture pure, par le *Nectria galligena* Bres, agent du chancre européen des arbres fruitiers.
C.R. Acad. Sci. Paris, ser. D, 271 : 78-81.
- TAYEL A.A. et A.C. HASTIE, 1975. - Heterothallism and perithecium formation in *Nectria cosmariospora*. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 64 : 295-300.
- TERVI M. et Y. HARADA, 1967. - Cultural studies on the *Monilia* disease fungus of apples. IV- Apothecial production on peptone-saccharose agar medium. Hirosaki Univers. (Jpn.), Fac. Agric., Bull. 13.
- THILLY M.C., 1983. - *Nectria coccinea* est-il hétérothallique ? D.E.A. Lille, 44p.

- THRONEBERRY G.O., 1973. - Some physiological responses of *Verticillium albo-atrum* to zinc. *Can. J. Bot.*, 51 : 57-59.
- THUILLIER A. et P. NEUMANN, 1982. - Croissance et fructification de *Ceratocystis* spp. avec attention particulière à *C. picea* et *C. fimbriata*, en fonction du substrat. *Can. J. Bot.*, 60 : 358-363.
- TIMNICK M.B., V.G. LILLY et H.L. BARNETT, 1951. - Factors affecting sporulation of *Diaporthe phaseolorum* var. *batatatis* from soybean. *Phytopathology*, 41 : 327-336.
- TINLINE R.D. et J.G. DICKSON, 1958. - *Cochliobolus sativus*. I- Perithecial development and the inheritance of spore color and mating type. *Mycologia*, 50 : 697-706.
- TOKUNAGA J., I. MALCA, J.J. SIMS, D.C. ERWIN et N.T. KEEN, 1969. - Respiratory enzymes in the spores of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology*, 12 : 1829-1832.
- TOUSSOUN T.A. et A.R. WEINHOLD, 1967. - Light requirement and light inhibition of sexual reproduction in *Fusarium (Hypomyces) solani* f. sp. *cucurbitae* race 2. *Can. J. Bot.*, 45 : 951-954.
- TRIONE E.J., C.M. LEACH et J.T. MUTCH, 1966. - Sporogenic substances isolated from fungi. *Nature*, 212 : 163-164.
- TRIONE E.J. et C.M. LEACH, 1969. - Light-induced sporulation and sporogenic substances in fungi. *Phytopathology*, 59 : 1077-1083.
- TSCHABOLD E., 1967. - Physiology of sexual reproduction in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. IV- Influence of flavin inhibitors on perithecium formation. *Phytopathology*, 57 : 1140-1141.
- TSCHANZ A.T., R.K. HORST et P.E. NELSON, 1976. - The effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*. *Mycologia*, 68 : 327-340.
- TSUDA M., T. WAKI, M. TAGA et A. UYAMA, 1982. - Ascocarps production of *Magnaporthe salvinii* in culture. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 78 : 515-519.
- TSUJINO I., K. YABE, I. SEKIKAWA et N. HAMANAKA, 1978. - Isolation and structure of a mycosporine from the red alga *Chondrus yendoi*. *Tetrahedron Lett.*, 16 : 1401-1402.

- TURIAN G., 1960a. - Deficiences du métabolisme oxydatif et différenciation sexuelle chez *Allomyces* et *Neurospora*. Activité d'une DPN-deshydrogénase lactique chez *Allomyces*. *Path. Microbiol.*, 23 : 687-699.
- TURIAN G., 1960b. - 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., 1961. - L'acétate et son double effet d'induction isocitratasique et de différenciation conidienne chez les *Neurospora*. *C.R. Acad. Sci. Paris, ser. D*, 252 : 1374-1376.
- TURIAN G., 1966. - Quelques facteurs externes contrôlant la morphogénèse péri-théciale et la porphyrie du *Neurospora tetrasperma*. *Rev. Roum. Biol. Bot.*, 11 : 235-241.
- TURIAN G., 1969. - Différenciation fongique. Ed. Masson, Paris, 144 p..
- TURIAN G., 1970. - Aspects biochimiques de la différenciation fongique (modèle *Neurospora*). *Physiol. Vég.*, 8 : 375-386.
- TURIAN G. et M. VISWANATH-REDDY, 1971. - Metabolic and ultrastructural aspects of sexual differentiation in *Allomyces* and *Neurospora*. *J. Indian Bot. Soc. Golden Jubilee*, 50 A : 78-89.
- TURIAN G., 1978. - Sexual morphogenesis in the Ascomycetes. *In* : The Filamentous Fungi, vol.3 : 315-333. Ed. SMITH J.E. et D.R. BERRY, Arnold, Londres.
- TYLUTKI E.E., 1958. - Some aspects of morphology genetics and cultural behavior of *Gelasinospora calospora* var. *autosteria*. *Mycologia*, 50 : 353-356.
- VAN DEN ENDE G. et J.J. CORNELIS, 1970. - The induction of sporulation in *Sclerotinia fructicola* and some other fungi and the production of "P310". *Neth. J. Plant Pathol.*, 76 : 183-191.
- VARGAS J.M. et R.D. WILCOXON, 1969. - Some effects of temperature and radiation on sporulation by *Helminthosporium dictyoides* in agar media. *Phytopathology*, 59 : 1706-1712.
- VIALA G., 1972. - Développement du *Leptosphaeria typhae*. Métabolisme intermédiaire et reproduction sexuée. Thèse Doct. Sci. Nat., Toulouse : 137 p.
- VIALA G. et VIDAL G., 1972. - Reproduction sexuée, croissance et métabolisme intermédiaire chez le *Leptosphaeria typhae*. *Physiol. Vég.*, 10 : 481-494.

- VIDAL G. et G. VIALA, 1973. - Influence de la date d'éclaircissement sur la fructification et le métabolisme du *Leptosphaeria typhae*.
Ann. Sc. Nat. Bot., Ser 12, 14 : 53-70.
- 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.
- VIDAL G., L. LACOSTE, J. ALAIS, A. LABLACHE-COMBIER, A. MAQUESTIAU, Y. VAN HARVERBEKE, R. FLAMMANG et H. MISPREUVE, 1979. - Stéroïds et reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae* en fonction de la teneur du milieu de culture en xylose. *Phytochemistry*, 18 : 1405-1408.
- VIDAL G., 1983. - Relations entre le métabolisme intermédiaire, le métabolisme lipidique et la reproduction sexuée du *Leptosphaeria typhae* (Auersw.) Karsten. Thèse Doct. Sc. Nat., Lille, 207 p.
- VIENNOT-BOURGIN G., 1967. - Les champignons parasites des arbres fruitiers à pépin. Ed. Ponsot, Paris, pp 104-107.
- VINOGRADOVA N.V., 1957. - Biological peculiarities of the causal agent of apple canker. *Tr. Grodnensk. Sel.-kholz. Inst.*, 3 : 63-73.
- VISWANATH-REDDY M. et G. TURIAN, 1975. - Physiological changes during protoperithecial differentiation in *Neurospora tetrasperma*.
Physiol. Plant., 35 : 166-174.
- WAKI T., M. TAGA, M. TSUDA et A. UEYAMA, 1979. - Culture conditions for the ascocarp formation of *Cochliobolus kusanoi*.
Trans. mycol. Soc. Jpn., 20 : 73-81.
- WEESE J., 1918. - Studien über Nectriaceen. *Z. Gärungsphysiol.*, vi : 28-46.
- WEHMEYER L.E., 1975. - The Pyrenomycetous Fungi. *Mycologia Memoir*, 6 : 1-250.
- WESSEL H., 1977. - Einfluss von Umweltfaktoren auf die sporenkeimung und fruchtkörperbildung bei *Nectria galligena* Bres in vitro.
Med. Fac. Landbouws. Rijksuniv. Gent, 42 : 977-986.
- WESTE G., 1970a. - Factors affecting vegetative growth and the production of perithecia in culture by *Ophiobolus graminis*. I- Variations in media and age of mycelium. *Aust. J. Bot.*, 18 : 1-10.

- WESTE G., 1970b. - Factors affecting vegetative growth and the production of perithecia in culture by *Ophiobolus graminis*. II- Variations in light and temperature. *Aust. J. Bot.*, 18 : 11-28.
- WESTERGAARD M. et H.K. MITCHELL, 1947. - *Neurospora*. V-A synthetic medium favouring sexual reproduction. *Am. J. Bot.*, 34 : 573-577.
- WHITE H.L.K., 1949. - Heterothallism and sex in fungi. *Biol. Rev.*, 24 : 411-447.
- WICKLOW D. et D. MALLOCH, 1971. - Studies in the genus *Thelebolus* : temperature optima for growth and ascocarp development. *Mycologia*, 63 : 118-131.
- WILSON E.E., 1966. - Development of european canker in California apple district. *Plant Dis. Rep.*, 50 : 182-186.
- WILSON D.M., 1968. - Physiology of sexual reproduction in *Hypomyces solani* f. sp. *cucurbitae*. V- Influence of tyrosinase on perithecial formation. *Phytopathology*, 58 : 1697-1699.
- WILSON D.M. et R. BAKER, 1969. - Physiology of production of perithecia and microconidia in *Hypomyces solani* f. sp. *cucurbitae*. *Tr. Br. mycol. Soc.*, 53 : 229-236.
- WILTHSHIRE S.P., 1920. - The apple canker fungus. *Ann. Rept. Agr. Hort. Res. Sta. Long Ashton, Bristol*, 1919 : 23-29.
- WINSTEAD N.N., S.F. JENKINS, L.T. LUCAS, G.J. CAMPBELL et H.T. BONE, 1966. - Influence of light on perithecial formation in *Glomerella magna*. *Phytopathology*, 56 : 134-135.
- WOLLENWEBER R.W., 1924. Pyrenomyceten-Studien. *Angew. Bot.*, 6 : 300-313.
- YAGI K., 1962. - Chemical determination of flavins. In : *Methods of Biochemical Analysis*, 10 : 319-356. Ed. GLICK D., Wiley Interscience, New-York.
- YAEGASHI H. et T.T. HEBERT, 1976. - Effect of temperature, light and nutrients on production of perithecia by *Pyricularia*. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, 42 : 556-562.
- YOKOKAWA H. et T. MITSUHASHI, 1981. - The sterol composition of mushrooms. *Phytochemistry*, 20 : 1349-1351.
- YOSHIDA T. et P.M. SIVALINGAM, 1970. - Isolation and characterization of the 337 m μ UV-absorbing substance in red alga, *Porphyra yezoensis* UEDA. *Plant Cell Physiol.*, 11 : 427-434.

YOUNG H. et V.J. PATTERSON, 1982. - A UV protective compound from *Glomerella cingulata* -a mycosporine. *Phytochemistry*, 21 : 1075-1077.

YU-SUN C.C.C., 1964. - Nutritional studies of *Ascobolus immersus*.
Am. J. Bot., 51 : 231-237.

ZELLER S.M., 1926. - European canker of pomaceous fruit trees.
Oreg. Agric. cell. exp. Stat. Bull., 222, 52 p..

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
MATERIEL ET METHODES.....	5
TECHNIQUES CULTURALES.....	7
I. LES SOUCHES DU <i>N. GALLIGENA</i>	7
1) Obtention.....	7
2) Conservation.....	7
3) Ensemencements.....	8
II. LES MILIEUX CULTURAUX.....	8
1) Milieu hôte.....	8
2) Milieux naturels.....	8
3) Milieu synthétique M23.....	9
4) Stérilisation.....	10
III. CONDITIONS THERMIQUES ET LUMINEUSES DE CULTURE.....	10
1) Température.....	10
2) Lumière.....	11
a) lumière blanche.....	11
b) influence de la qualité de la lumière.....	11
c) mesure des éclairagements.....	12
d) cultures à l'obscurité continue.....	12
IV. MESURE DE LA CROISSANCE.....	12
V. ETUDE DE LA REPRODUCTION SEXUEE.....	13
1) Critères qualitatifs.....	13
2) Critères quantitatifs.....	13
3) Expression des résultats.....	14
TECHNIQUES CYTOLOGIQUES.....	15
I. OBSERVATIONS <i>IN TOTO</i>	15
II. COUPES AU MICROTOME.....	15
TECHNIQUES D'ANALYSE.....	16
I. SPECTRES D'ABSORPTION.....	16
1) Spectres d'absorption <i>in vivo</i>	16
2) Spectres d'absorption d'extraits acellulaires.....	16
II. DOSAGE DES FLAVINES TOTALES.....	16
III. OBTENTION D'EXTRAITS MYCELIENS ETHER DE PETROLE SOLUBLES.....	17
IV. EXTRACTION, DOSAGE ET PURIFICATION DE LA MYCOSPORINE I.....	18

V. RECHERCHE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES <i>IN VITRO</i>	19
1) Préparation de l'extrait acellulaire.....	19
2) Technique des dosages enzymatiques <i>in vitro</i>	20
a) isocitrate lyase.....	20
b) isocitrate deshydrogénase NADP ⁺ dépendante.....	21
c) succinate deshydrogénase.....	21
d) fumarase.....	21
3) Dosage des protéines.....	22
VI. EXTRACTION ET IDENTIFICATION DES STEROLS.....	22

PREMIERE PARTIE. LE NECTRIA GALLIGENA BRES..... **25**

I. BIOLOGIE NATURELLE.....	26
1) Agent phytoparasitaire.....	26
2) La maladie du chancre commun du pommier.....	26
3) Aspects morphologiques du parasite.....	26
4) Cycle biologique.....	27
II. DEVELOPPEMENT <i>IN VITRO</i> DU <i>N. GALLIGENA</i>	28
III. ONTOGENIE DES ASCOCARPES.....	31
1) Les primordiums des périthèces.....	32
2) Les ébauches des ascocarpes.....	33
a) protopérithèces.....	33
b) ébauches périthéciales fécondées.....	34
3) Les périthèces sub-adultes immatures.....	35
a) transformation des ébauches en périthèces sub-adultes.....	35
b) périthèces sub-adultes.....	36
c) évolution des pseudoparaphyses. Intérêt de l'étude ontogénique.....	38
4) Les périthèces adultes fertiles.....	39
5) Les asques et les ascocarpes.....	40
6) Discussion - Conclusion.....	41
IV. POSITION SYSTEMATIQUE DU <i>N. GALLIGENA</i>	42
1) Position systématique du genre <i>Nectria</i>	42
2) Distinction systématique des espèces du genre <i>Nectria</i>	44
V. PROBLEME D'HETEROTHALLISME.....	46
1) Conditions expérimentales.....	46
2) Résultats.....	47
a) cultures monoascospores.....	47
b) cultures croisées biascospores.....	47
3) Discussion.....	49
CONCLUSIONS.....	51

DEUXIEME PARTIE. INFLUENCE DES FACTEURS TROPHIQUES ET
THERMIQUES SUR LA REPRODUCTION SEXUEE DU N. GALLIGENA..... 53

CHAPITRE I. CONDITIONS NUTRITIONNELLES DE LA PRODUCTION PÉRITHÉCIALE
DU N. GALLIGENA..... 55

INTRODUCTION..... 55

- I. EXPERIENCE PRELIMINAIRE : INFLUENCE GLOBALE DE LA NATURE DU
SUBSTRAT..... 56
- II. CHOIX DU MILIEU SYNTHETIQUE DE BASE..... 60
- III. INFLUENCE DE LA COMPOSITION MINERALE ET VITAMINIQUE..... 62
 - 1) Première série expérimentale..... 62
 - 2) Deuxième série expérimentale..... 65
 - a) influence des microéléments..... 65
 - b) influence du zinc..... 65
 - 3) Discussion..... 65
- IV. INFLUENCE DE LA NATURE DE LA SOURCE DE CARBONE..... 67
- V. INFLUENCE DE LA NATURE DE LA SOURCE D'AZOTE..... 70
- VI. INFLUENCE DES CONCENTRATIONS EN CARBONE ET EN AZOTE DU MILIEU.
ROLE DE L'EQUILIBRE C:N..... 77
- VII. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN IONS HYDROGENE..... 88
- VIII. CONCLUSIONS..... 90

CHAPITRE II. CONDITIONS THERMIQUES DE LA REPRODUCTION SEXUÉE DU
N. GALLIGENA..... 91

INTRODUCTION..... 91

- I. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR LE DEVELOPPEMENT FONGIQUE *IN*
VITRO. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE..... 92
 - 1) Aspect écologique..... 92
 - 2) Cryosensibilité des principaux stades du développement..... 92
 - 3) Influence de la température sur la reproduction sexuée en
fonction de l'espèce fongique..... 95
 - 4) Conditionnement thermique des principales phases de la dif-
férenciation sexuée..... 95
- II. INFLUENCE DE TEMPERATURES CONSTANTES SUR LE DEVELOPPEMENT DU
N. GALLIGENA..... 97
- III. EFFETS THERMIQUES SUR L'INITIATION ET LA MATURATION DES PERI-
THECES DU *N. GALLIGENA*..... 101
- IV. INFLUENCE DES BASSES TEMPERATURES SUR L'INDUCTION SEXUEE DU
N. GALLIGENA : thermo-induction périthéciale ?..... 103
- V. CONCLUSIONS..... 104

TROISIEME PARTIE. INFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LA
REPRODUCTION SEXUEE DU N. GALLIGENA..... 105

CHAPITRE I. EFFETS DE LA LUMIERE CHEZ LES ASCOMYCETES : ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE..... 107

INTRODUCTION..... 107

I. REACTIONS SEXUEES A LA LUMIERE.....	108
1) Diversité des photoréponses.....	108
2) Photodépendance des stades sexués.....	109
II. ROLE DES DIFFERENTS PARAMETRES LUMINEUX.....	109
1) Moment d'application, durée et intensité des éclairagements ..	110
a) le moment d'application du photostimulus.....	110
b) la durée et l'intensité des éclairagements.....	111
2) Qualité de la lumière.....	111
a) réponses sexuées aux ultra-violets (UV).....	112
b) réponses sexuées aux radiations proche UV-bleues...	112
c) réponses sexuées aux longueurs d'onde visible. (400nm< λ <700nm).....	114
III. LE PROBLEME DE LA PHOTORECEPTION.....	114
1) "P310" composé photorécepteur.....	115
2) Nature caroténoïdique ou flavoprotéique du photorécepteur..	115
a) comparaison des spectres d'absorption et d'activité biologique.....	115
b) contenu pigmentaire des thalles.....	116
c) changements d'absorbance du mycélium.....	116
3) Mycochrome P _B -P _{NUV}	117
4) Identité du cryptochrome : autres hypothèses.....	118

CHAPITRE II. CONDITIONS LUMINEUSES DE LA REPRODUCTION SEXUÉE DU
N. GALLIGENA..... 119

INTRODUCTION..... 119

I. INFLUENCE DE LA LUMIERE BLANCHE.....	120
1) Influence de la durée journalière d'éclairément.....	120
2) Influence de la durée d'un pré-séjour obscur.....	121
3) Influence de la durée d'un pré-séjour éclairé.....	122
4) Influence d'un nombre limité de photopériodes (12hl/jour)..	123
5) Influence du moment d'application d'un seul éclairément de 12 heures.....	124
6) Influence de la valeur énergétique de l'éclairément.....	125
7) Discussion.....	127
II. INFLUENCE DE LA QUALITE DE LA LUMIERE.....	129
1) Première série expérimentale - Tubes fluorescents.....	129
2) Deuxième série expérimentale - Filtres interférentiels.....	131
3) Troisième série expérimentale - Monochromateur.....	132
4) Discussion.....	133

III. COMPARAISON DES SPECTRES D'ACTIVITE SEXUEE ET D'ABSORPTION DU MYCELIUM.....	134
1) Spectres d'absorption <i>in vivo</i>	135
2) Spectres d'absorption d'extraits aqueux. Dosage des flavines totales.....	135
3) Spectres d'absorption d'extraits éthéro pétroliques. Recherche des caroténoïdes.....	138
IV. CONCLUSIONS.....	139

QUATRIEME PARTIE. REPRODUCTION SEXUEE ET METABOLISME DU
N. GALLIGENA 141

CHAPITRE I. MYCOSPORINE (P310) ET PHOTOINDUCTION SEXUÉE DU N. GALLIGENA. 145

A- MYCOSPORINE (P310) : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 146

I. MISE EN EVIDENCE DES MYCOSPORINES. PROBLEME DE LEUR PHOTOINDUCTIBILITE.....	146
II. LOCALISATION ET DISTRIBUTION DES MYCOSPORINES.....	147
1) Localisation dans le champignon.....	147
2) Distribution.....	148
III. STRUCTURE DES MYCOSPORINES.....	149
1) La cyclohexénone.....	149
2) La nature de l'acide aminé.....	150
VI. ROLE DES MYCOSPORINES.....	153
1) P310 : photorécepteur ?.....	153
2) P310 : facteur morphogène photomimétique ?.....	153
3) P310 : agent photoprotecteur ?.....	154
4) P310 : substance de réserve ?.....	155
5) P310 : composé de désintoxication ?.....	155

B- PRESENCE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE DU P310 CHEZ LE
N. GALLIGENA..... 157

I. MISE EN EVIDENCE, PURIFICATION ET STRUCTURE CHIMIQUE DU P310..	157
1) Mise en évidence.....	157
2) Purification du P310.....	158
3) Structure chimique du P310 B.....	162
II. CONDITIONS LUMINEUSES DE LA FORMATION DE MYCOSPORINE.....	163
1) Conditions générales d'étude.....	163
2) Influence de la durée de l'éclairement.....	164
a) influence du nombre de photopériodes (12hL/jour)....	164
b) influence de la durée d'un photostimulus unique....	167
3) Influence de la valeur de l'éclairement.....	168
4) Influence de la qualité de la lumière.....	170
DISCUSSION.....	172

III. INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS D'INHIBITION SEXUEE SUR LA BIO-SYNTHESE DU P310.....	174
IV. LOCALISATION ET DEVENIR DU P310.....	178
1) Localisation	178
2) Devenir du P310. Germination des ascospores du <i>N. galligena</i>	179
V. ACTIVITE MORPHOGENE DU P310.....	181
CHAPITRE II. MÉTABOLISME DU <u>N. GALLIGENA</u> EN FONCTION DU DÉTERMINISME DE SA REPRODUCTION SEXUÉE, RÔLE DE LA MYCOSPORINE.....	187
INTRODUCTION.....	187
A- ETUDE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES <i>IN VITRO</i>	189
I. ETUDE DES RELATIONS ENTRE LES ACTIVITES ENZYMATIQUES ET LES EFFETS DE L'ECLAIREMENT.....	190
1) Conditions culturelles.....	190
2) Résultats.....	190
a) influence des conditions lumineuses.....	190
b) influence de la mycosporine incorporée au milieu.....	194
3) Discussion.....	196
II. INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS D'INHIBITION SEXUEE SUR LE RAPPORT IDH/IL.....	197
Discussion.....	201
B- VARIATIONS DES STEROLS LIBRES EN FONCTION DES EFFETS DE L'ECLAIREMENT ET DE LA MYCOSPORINE SUR L'INDUCTION SEXUEE DU <i>N. GALLIGENA</i>	202
I. CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	203
II. RESULTATS.....	204
1) Observations biologiques.....	204
2) Composition stérolique.....	205
a) contenu stérolique global.....	205
b) analyse qualitative et quantitative des stérols libres.....	206
3) Discussion.....	207
III. CONCLUSIONS.....	209
CONCLUSIONS DE LA QUATRIEME PARTIE.....	210
CONCLUSIONS GENERALES.....	213
BIBLIOGRAPHIE.....	215

TABLE DES TABLEAUX

Tab. 1- Chronologie des phases essentielles du développement parasitaire du <i>N. galligena</i> sur pommier.....	27
Tab. 2- Caractères distinctifs du <i>N. galligena</i> et du <i>N. ditissima</i>	45
Tab. 3- Cultures mono -et bi- ascospores du <i>N. galligena</i>	48
Tab. 4- Production périthéciale du <i>N. galligena</i> sur divers substrats solides.....	58
Tab. 5- Influence de la composition minérale et vitaminique du milieu nutritif sur le développement du <i>N. galligena</i>	63
Tab. 6- Influence de la nature des sources de carbone sur le développement du <i>N. galligena</i>	68
Tab. 7- Influence de la nature des sources d'azote sur le développement du <i>N. galligena</i>	71
Tab. 8- Influence des variations des concentrations en carbone et en azote du milieu nutritif sur le développement du <i>N. galligena</i> .	78-79
Tab. 9- Influence de la concentration initiale en ions hydrogène du milieu nutritif sur le développement du <i>N. galligena</i>	88
Tab.10- Influence de la température sur les développements végétatif et sexué de divers Ascomycètes (Bibliographie).....	93
Tab.11- Influence de la température sur l'initiation et la maturation des ascocarpes chez divers Ascomycètes. (Bibliographie).....	96
Tab.12- Influence de la température sur la production périthéciale du <i>N. galligena</i>	99
Tab.13- Influence de la durée d'un pré-séjour à 18°C et d'une incubation finale à 25°C sur la reproduction sexuée du <i>N. galligena</i> ...	102
Tab.14- Influence de la qualité de la lumière (Première série expérimentale) sur la reproduction sexuée du <i>N. galligena</i>	130
Tab.15- Influence des longueurs d'onde lumineuse (filtres interférentiels) sur la reproduction sexuée du <i>N. galligena</i>	131
Tab.16- Influence de la qualité de la lumière sur la reproduction sexuée et la teneur en mycosporine I du <i>N. galligena</i>	170
Tab.17- Influence de divers facteurs (génétique, thermique, nutritif, chimique) sur la teneur en P310 et le développement du <i>N. galligena</i> ..	176
Tab.18- Activité morphogène des mycosporines I et II sur la reproduction sexuée du <i>N. galligena</i>	183
Tab.19- Quantité de stérols libres du <i>N. galligena</i> cultivé dans différentes conditions.....	205
Tab.20- Nature et pourcentage relatifs des stérols libres isolés du <i>N. galligena</i>	206



TABLE DES FIGURES

Fig. 1- Croissance et reproduction, <i>in vitro</i> , du <i>N. galligena</i>	30
Fig. 2- Primordium de périthèce du <i>N. galligena</i>	32
Fig. 3- Protopérithèces.....	33
Fig. 4- Ebauche périthéciale agée.....	34
Fig. 5- Transformation d'une ébauche périthéciale en périthèce sub-adulte.....	35
Fig. 6- Périthèces sub-adultes.....	36
Fig. 7- Périthèce sub-adulte. Evolution des pseudo-paraphyses.....	37
Fig. 8- Périthèce sub-adulte. Phénomène de vésiculation des pseudo-paraphyses.....	38
Fig. 9- Périthèce adulte.....	39
Fig.10- Asques et ascospores.....	41
Fig.11- Influence de la variation des teneurs carbonées et azotées sur la production périthéciale du <i>N. galligena</i>	81
Fig.12- Influence des teneurs carbonées et azotées, définies par un rapport C:N constant, sur le développement du <i>N. galligena</i> ...	83
Fig.13- Influence des variations de la concentration en azote ou en carbone sur le développement du <i>N. galligena</i> cultivé en présence, respectivement, d'une teneur constante en carbone ou en azote.....	85
Fig.14- Influence des températures sur la croissance mycélienne et la date d'apparition des ébauches périthéciales du <i>N. galligena</i> cultivé sur milieu synthétique liquide.....	98
Fig.15- Dépendance spectrale de la sexualisation des Ascomycètes.....	113
Fig.16- Influence de la durée de l'éclairement journalier sur la reproduction sexuée du <i>N. galligena</i>	120
Fig.17- Influence de la durée d'un pré-séjour des cultures à l'obscurité sur la reproduction sexuée du <i>N. galligena</i>	121
Fig.18- Influence de la durée d'un pré-séjour éclairé sur la reproduction sexuée du <i>N. galligena</i>	122
Fig.19- Influence d'un nombre limité de photopériodes (12hL/jour) sur la reproduction sexuée du <i>N. galligena</i>	123
Fig.20- Influence du moment d'application d'un éclairage unique de 12 heures sur la reproduction sexuée du <i>N. galligena</i>	125
Fig.21- Influence de la valeur de l'éclairement sur la reproduction sexuée du <i>N. galligena</i>	126

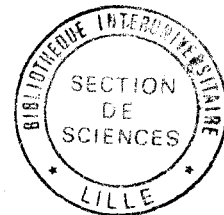
Fig.22- Influence de la qualité de la lumière (monochromateur) sur la reproduction sexuée du <i>N. galligena</i>	132
Fig.23- Spectres de la photoinduction sexuée et d'absorption du mycélium chez le <i>N. galligena</i>	136
Fig.24- Contenu en flavines totales du mycélium du <i>N. galligena</i>	137
Fig.25- Structure de la cyclohexénone.....	150
Fig.26- Structure des mycosporines - sérine et sérinol.....	150
Fig.27- Structure des mycosporines -acide glutaminique et glutamicol..	151
Fig.28- Structure des mycosporines- glutamine, glutaminol et glutaminol glucosylée.....	151
Fig.29- Structure de la mycosporine - glycolle.....	152
Fig.30- Spectres d'absorption d'extraits aqueux des mycéliums du <i>N. galligena</i>	158
Fig.31- Diagramme d'élution chromatographique d'extraits aqueux de mycéliums photoinduits du <i>N. galligena</i>	160
Fig.32- Structure du P310 B du <i>N. galligena</i>	162
Fig.33- Influence du nombre de photopériodes (12hL/jour) sur la croissance mycélienne, la production et la teneur en mycosporine des cultures irradiées du <i>N. galligena</i>	165-166
Fig.34- Influence de la durée d'une seule photopériodes sur la teneur en mycosporine I du mycélium du <i>N. galligena</i>	167
Fig.35- Influence de l'éclairage sur la reproduction sexuée et la teneur en mycosporine I du <i>N. galligena</i>	169
Fig.36- Influence des longueurs d'onde lumineuse sur la teneur en mycosporine I et la reproduction sexuée du <i>N. galligena</i>	171
Fig.37- Relation linéaire entre le nombre de périthèces et le taux de mycosporine I photoproduits chez le <i>N. galligena</i>	173
Fig.38- Evolution de la teneur en P310 des ascospores du <i>N. galligena</i> lors de leur germination à l'obscurité.....	180
Fig.39- Structures chimiques des mycosporines I et II.....	181
Fig.40- Evolution des activités, <i>in vitro</i> , de la succinate deshydrogénase et de la fumarate hydratase relevée chez le <i>N. galligena</i> en fonction de son développement à la lumière, à l'obscurité ou en présence de mycosporine incorporée au milieu.....	192
Fig.41- Evolution des activités <i>in vitro</i> de l'isocitrate deshydrogénase et de l'isocitrate lyase relevée chez le <i>N. galligena</i> en fonction de son développement à la lumière, à l'obscurité ou en présence de mycosporine incorporée au milieu nutritif....	192

Fig.42- Variations du rapport entre les activités de l'isocitrate deshydrogénase et de l'isocitrate lyase, mesurées *in vitro*, chez le *N. galligena*..... 193

Fig.43- Evolution de la concentration de la mycosporine incorporée au milieu nutritif du *N. galligena*..... 194

Fig.44- Evolution des activités de l'isocitrate deshydrogénase et de l'isocitrate lyase, mesurées *in vitro*, chez le *N. galligena* cultivé dans des conditions optimales ou inhibitrices de sa reproduction sexuée..... 198

Fig.45- Variations du rapport des activités de l'isocitrate deshydrogénase et de l'isocitrate lyase, mesurées *in vitro*, chez le *N. galligena* en fonction de conditions optimales ou inhibitrices de sa reproduction sexuée..... 200



L'obtention du cycle sexué de l'Ascomycète Nectria galligena Bres. a permis de déterminer, outre les conditions génétiques indispensables à sa bonne réalisation, l'équilibre harmonieux des facteurs nutritifs et physiques (température, lumière) nécessaire à la formation des ascocarpes.

Il en est résulté une étude de l'ontogénie des périthèces, la mise au point d'un milieu de culture synthétique conduisant à une connaissance précise des besoins en matière de l'organisme et à une définition complète des conditions optimales de température et d'éclairément favorisant la sexualisation.

L'étude de la photoinduction des ascocarpes permet de conclure à l'activité principale de cinq radiations proches UV et bleues (320, 370, 420, 450 et 480 nm). Par confrontation de ces résultats avec les spectres d'absorption du mycélium *in vivo* ou de ses extraits, sont discutées certaines hypothèses relatives à la nature du système photorécepteur. Simultanément, il a été détecté, exclusivement dans les thalles irradiés fertiles, un composé dénommé P310 et identifié, chez le N. galligena, à la mycosporine sérinol.

Les diverses relations : teneur en mycosporine des mycéliums, similitude des exigences lumineuses de la biosynthèse du P310 et de la reproduction sexuée, activité morphogène photomimétique du P310, démontrent que la mycosporine représente un des facteurs internes du déterminisme sexué. Cette recherche, complétée par la mesure *in vitro* de certaines activités enzymatiques et par l'analyse du contenu stéroïdique du champignon, précise le métabolisme différent des thalles sexués photoinduits comparé à celui des cultures demeurant stériles. A ce niveau, la mycosporine qui, additionnée au substrat nutritif du champignon maintenu à l'obscurité, restaure partiellement la fertilité de celui-ci, provoque également (répression de la synthèse de l'isocitrate-lyase, réduction du pool des stéroïdes libres) des changements métaboliques dont l'orientation rappelle l'effet de la lumière. Ainsi peut être établi le rôle de la mycosporine en tant que relais métabolique entre l'énergie photonique captée et la reproduction photodépendante du champignon.

MOTS-CLEFS

Pyrénomycète. Nectria galligena. Reproduction sexuée. Déterminisme. Photoinduction. Mycosporine. Métabolisme. Stéroïdes.

