

# Recherches sur la morphogenèse sexuelle chez *Allomyces*

Autor(en): **Turian, Gilbert**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **67 (1957)**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-47105>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

## Recherches sur la morphogenèse sexuelle chez *Allomyces*

Par Gilbert Turian

Institut de Botanique générale, Université de Genève

Manuscrit reçu le 31 août 1957

Les espèces anisogames d'*Allomyces*, réunies dans le sous-genre *Euallomyces* par R. Emerson (8), sont caractérisées par un cycle évolutif et un développement qui les rendent propices à la recherche biologique. Parmi les avantages offerts par ces moisissures aquatiques, mentionnons:

- l'alternance de deux phases de développement indépendantes, à potentialités morphogènes bien distinctes, à savoir la phase gamétophytique haploïde et la phase sporophytique diploïde;
- la différenciation sexuelle du mycélium gamétophytique, se traduisant par la superposition, sur le même hyphe, de deux gamétanges de sexe opposé, morphologiquement et chimiquement (carotène mâle, etc.) différenciés;
- la différenciation également bien marquée des gamètes uninucléés (taille, pigmentation, corps paranucléaire, etc.), mobiles par un flagelle, s'accouplant facilement (auto-fertilité);
- la germination presque immédiate des zygotes formés à la suite de la fécondation gamétique;
- la formation, sur le mycélium sporophytique, de deux types de sporanges, les zoosporanges générateurs de zoospores diploïdes et les sporanges de résistance libérant, après méiose, des zoospores «réduites», haploïdes.

Avec sa double alternative de différenciation organogène — gamétanges mâles et femelles haploïdes, zoosporanges et sporanges de résistance diploïdes — *Allomyces* constitue donc un organisme particulièrement favorable à l'étude des problèmes de la morphogenèse végétale sous un aspect relativement simple, à la portée de l'investigation expérimentale. La culture de cette moisissure est en effet aisée et les stades successifs de la morphogenèse de ses tissus sexuels et asexuels peuvent être étudiés dans des conditions normales et dans des conditions de contrainte expérimentale.

Il est cependant surprenant de constater que fort peu de travaux (10, 12) sur le développement des organes sexuels chez *Allomyces* ont fait suite à la découverte par Kniep (13), en 1929, de la sexualité chez cet organisme. Les recherches récentes ont toutes été centrées sur

la morphogénèse des organes sporophytiques, des sporanges de résistance en particulier (9, 19, 20). Cela nous a donc engagé à diriger les nôtres sur le problème de la morphogénèse sexuelle chez *Allomyces*.

### Matériel et méthodes

Nous avons étudié deux espèces d'*Allomyces*: *A. macrogynus* Emers. (ex *A. javanicus* Kniep var. *macrogynus* Emers.), souche de Kniep de la collection D<sup>r</sup> R. Emerson, comme espèce épigyne, et *A. arbusculus* Butl., souche D<sup>r</sup> Butler de la collection Barn (Hollande), comme espèce hypogyne.

Pour leur culture sur milieu solide, nous avons fait un usage général du milieu à l'amidon d'Emerson (8) et dont nous rappelons la composition:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	1
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,5
Extrait de levure (Difco) . . . . .	4
Amidon soluble . . . . .	15
Gélose . . . . .	20
Eau distillée . . . . .	ad 1 l

C'est sur ce milieu, réparti en tubes et stérilisé, que nous avons maintenu et repiqué les deux phases de développement de chaque espèce:

1. la phase gamétophytique, isolée à partir d'une colonie formée par une zoospore haploïde ayant germé séparément à la surface du milieu d'Emerson coulé en plaque de Pétri, et
2. la phase sporophytique, provenant d'un zygote ayant aussi formé une colonie isolée en plaque de Pétri.

Pour les cultures en milieu liquide, productrices du jeune mycélium stérile indispensable à nos essais de morphogénèse induite (voir p. 461), nous avons utilisé le milieu synthétique B de Machlis (18), dont nous rappelons aussi la composition:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0,005 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	0,005 M
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0,005 M
MgCl <sub>2</sub> . . . . .	0,0005 M
CaCl <sub>2</sub> . . . . .	0,0005 M
DL-méthionine . . . . .	0,1 g/l
Aneurine . . . . .	0,15 mg/l
Oligoéléments <sup>1</sup>	
Glucose . . . . .	5,0 g/l

Ce milieu est automatiquement tamponné à pH 7,0. Le CaCl<sub>2</sub> et le glucose sont stérilisés et ajoutés séparément à la solution.

<sup>1</sup> MnCl<sub>2</sub> 0,5 p. p. m. Mn — ZnSO<sub>4</sub> 0,1 p. p. m. Zn — CuSO<sub>4</sub> 0,1 p. p. m. Cu — FeCl<sub>3</sub> 1,0 p. p. m. Fe — (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 0,2 p. p. m. Mo — CoCl<sub>2</sub> 0,2 p. p. m. Co — H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,5 p. p. m. B.



Le maintien du gamétophyte en milieu liquide a été assuré par l'addition à celui-ci d'un supplément d'acide borique *M/600* (environ  $1/10^4$ ), afin de réduire les possibilités d'essaimage de colonies secondaires sporophytiques (27). L'acide borique est incorporé séparément au milieu de *M a c h l i s*, à partir d'une solution *M/6* stérilisée par de brefs chauffages à 80—90°. En s'opposant à une différenciation rapide des gamétanges,  $H_3BO_3$  facilite la subculture du mycélium gamétophytique, répétée tous les six jours par transfert de fragments de mycélium stérile en milieu neuf. De plus, l'étude de la différenciation sexuelle nécessite, au départ, des hyphes stériles, purement végétatifs (voir plus bas).

Pour l'étude cytologique des stades de développement, nous avons fait précéder les colorations par une fixation, soit à l'alcool-formol 10 % (1 : 1) pour l'étude de la basophilie cytoplasmique, soit au fixateur osmié de *C h a m p y* pour l'étude des mitochondries selon *A l t m a n n - B e n d a* (15).

La basophilie cytoplasmique a été mise en évidence avec le bleu de toluidine à  $1/1000$ , soit acétisé (1 %) soit en tampon *M c I l v a i n e* à pH 3,5. La coloration d'*A l t m a n n* pour les mitochondries a été réalisée avec la fuchsine acide (Ciba), suivie d'une différenciation à l'acide picrique (sol. alcool. saturée). Enfin, pour les colorations vitales, nous avons utilisé le vert Janus B ( $1/1000$ ), le bleu de méthylène ( $1/1000$ ) et le rouge neutre ( $10^{-4}$ ).

Les observations microscopiques ont été faites avec le modèle 0-lux de *L e i t z*, avec montage *W i l d* pour la microphotographie. Le microscope à contraste de phase *S p e n c e r* s'est révélé très utile pour l'observation vitale des mitochondries à fort grossissement.

### **Morphogenèse des appareils sexuels de la phase gamétophytique**

La morphogenèse du gamétophyte chez *Allomyces* comprend deux grandes étapes:

1. celle qui, par germination de la zoospore haploïde initiale, conduit au mycélium dichotomique et
2. celle qui assure la transformation des hyphes mycéliens végétatifs en gamétanges fertiles (morphogenèse sexuelle).

La première étape a été parcourue lors de notre isolement monosporé initial (voir méthodes) et a conduit au mycélium gamétophytique que nous avons subcultivé depuis. Ses diverses manifestations d'ordre morphogénétique sont homologues de celles qui accompagnent la germination des zygotes de la phase sporophytique. Leur séquence comprend, dans l'ordre d'apparition: l'immobilisation de la zoospore et la perte de son flagelle (résorption?), l'émission du rhizoïde, premier signe visible de la germination, et la poussée, au pôle opposé du corps sporal, d'un hyphe de germination, futur «tronc» de l'arbre dichotomique mycélien (figure dans *E m e r s o n* [10]). La remarquable symétrie de



la plantule d'*Allomyces* (plan rhizoïde—hyphe germinatif) traduit l'existence d'une polarité dans le contenu de la zoospore ou du zygote (gradient basophile et mitochondrial?).

Ces phénomènes morphologiques sont associés à d'importants remaniements cytochimiques dont le plus spectaculaire concerne la désintégration progressive du corps paranucléaire ribonucléique (sphère post-méiotique) de la zoospore en voie de germination (29).

Nous n'insisterons pas ici sur cette première étape de la morphogenèse du gamétophyte, dont nous retrouverons l'équivalent lors de l'étude du sporophyte. Conditionnées par notre méthode des cultures successives du mycélium gamétophytique, nos recherches ont été centrées sur la seconde étape, celle de la morphogenèse sexuelle ou gaméto-genèse.

#### A. Morphogenèse sexuelle en conditions normales

Sa description sera avant tout basée sur l'étude de l'évolution des apex hyphaux («hyphal tips») de l'espèce épigyne, *Allomyces macrogynus* Emers. Elle s'applique cependant aussi, en tenant compte de la position réciproque inversée des gamétanges, à l'espèce hypogyne, *Allomyces arbusculus* Butl. Cette dernière, dont l'étude détaillée a été faite par H a t c h (12), nous a surtout servi de contrôle pour tous les cas où l'on pouvait soupçonner une distribution différentielle soit d'organites (mitochondries), soit de propriétés biochimiques (basophilie, pouvoir rédox, etc.) selon le sexe des gamétanges. La possibilité d'un tel contrôle nous a autorisé à ne considérer comme différentiels et par conséquent révélateurs d'un état de différenciation sexuelle que les caractères particuliers se retrouvant, dans les deux espèces, en association avec un gamétange de sexe déterminé, et cela, quelle que soit la position, apicale ou subapicale, de celui-ci sur l'hyphe-support (à l'exemple du carotène, uniquement associé au gamétange mâle, que ce dernier soit apical [*A. macrogynus*] ou subapical [*A. arbusculus*]).

Pour l'étude des stades successifs de la morphogenèse, nous avons fait usage de notre méthode rapide de différenciation sexuelle (27) par transfert dans l'eau distillée ou dans la solution physiologique hypotonique de M a c h l i s (17) ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,001 M;  $\text{MgCl}_2$  0,0001 M;  $\text{CaCl}_2$  0,00002 M) de fragments de mycélium gamétophytique stérile, cultivé au préalable pendant 5 à 6 jours dans le milieu synthétique liquide de M a c h l i s, boriqué M/600 (voir méthodes). Dans nos conditions de travail, à la température du laboratoire (18 à 20° C), les hyphes parcourent les différents stades morphogénétiques en 7 à 8 heures.

Nous avons cherché parallèlement à identifier les différents stades sur du mycélium gamétophytique cultivé sur milieu solide. Le milieu synthétique de M a c h l i s gélosé à 2 % s'est révélé peu favorable: le mycélium y est peu et tardivement fertile, d'où son aspect blanchâtre (rareté des gamétanges tant mâles à pigment orange que femelles inco-

lores). Par contre, sur le milieu d'E m e r s o n , les cultures sont très fertiles, d'aspect jaune orangé vif. Les gamétanges s'y différencient rapidement en arrière du front de progression du mycélium à la surface du milieu.

Voici la séquence des stades de la morphogénèse sexuelle chez *Allomyces macrogynus* Emers., décrits selon leur ordre d'apparition dans la solution hypotonique de M a c h l i s :

### 1. *Hyphes indifférenciés*

(figure 1, 1)

Ce stade se poursuit pendant 4 à 5 heures, pendant lesquelles les hyphes continuent à s'allonger.

Leur extrémité apicale («hyphal tip») contient un cytoplasme dense. Au contraste de phase, on y distingue de nombreuses mitochondries et, plus en retrait, plusieurs noyaux à gros nucléole suivis d'un rideau de granulations lipidiques densément réparties en position subapicale. A souligner que cette même répartition des organites cytoplasmiques se retrouve chez *A. arbusculus* Butl.

De petites vacuoles apparaissent dès la zone subapicale. De leur confluence naît, dans les portions plus âgées des hyphes, la grande vacuole centrale qui rejette le cytoplasme le long des parois hyphales.

Enfin, des noyaux en division mitotique (avec fuseau intranucléaire) peuvent être mis en évidence avec une coloration de F e u l g e n pratiquée sur les hyphes indifférenciés de jeunes colonies gamétophytiques prélevées sur milieu d'E m e r s o n .

### 2. *Disjonction tissulaire*

(figure 1, 2)

Ce stade correspond à la cessation de la croissance des hyphes par élongation et à leur renflement en une massue terminale, prélude à la séparation des tissus mâles et femelles par des cloisons (cytodiérèse). Nous avons étudié cette disjonction tissulaire sous son angle cytologique (a) et sous son aspect biochimique (b).

#### a) *Disjonction cytologique*

Elle concerne l'éventuelle répartition différentielle des organites en fonction du sexe présomptif de la zone qu'ils occupent sur l'hyphe. Pour une telle étude, il était indispensable d'envisager comparativement les deux espèces d'*Allomyces*, à position réciproque inversée des gamétanges mâles et femelles (épigynie et hypogynie).

Tous les noyaux du mycélium sexuel sont des descendants directs du même et unique noyau initial de la zoospore haploïde. Ils ne peuvent donc présenter une constitution génétique différente et, de plus, paraissent être répartis au hasard dans les hyphes. Cette constatation avait déjà conduit H a t c h (12) à rechercher parmi les autres organites



cytoplasmiques l'origine et la manifestation d'une différence responsable de la ségrégation sexuelle des gamétanges chez *Allomyces*. Son observation d'une concentration accrue des chondriosomes dans l'apex des jeunes hyphes — zone de différenciation du future gamétange femelle chez *A. arbusculus* — corroborée par la plus grande taille des corps paranucléaires (qu'il prenait pour des amas de mitochondries vésiculisées) dans les gamètes femelles, le conduisit à attribuer ce rôle aux chondriosomes.

L'observation, au microscope à contraste de phase, nous a permis de confirmer l'accumulation apicale des mitochondries chez *Allomyces arbusculus*, telle qu'elle est d'ailleurs bien connue dans les hyphes

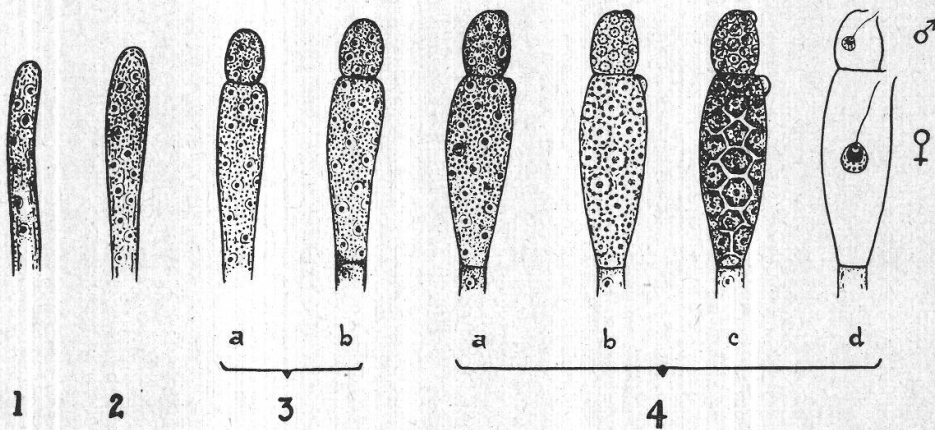


Figure 1

Séquence stadiale de la morphogenèse sexuelle chez *Allomyces macrogynus* Emers. Stades (1) des hyphes indifférenciés, (2) de la disjonction tissulaire, (3) de la cytodierèse, avec (a) cloisonnement apical et (b) subapical, (4) de la maturation, avec les étapes (a) de la granulation uniforme, (b) des couronnes lipidiques, (c) du clivage des énergides-gamètes et (d) de la libération gamétique. Fixation au Champy et coloration au bleu de toluidine

d'autres champignons, les Saprolegniales en particulier (11). Ajoutons qu'une telle concentration est plus apparente que réelle et dépend, dans cette portion des hyphes, de la fragmentation du chondriome en de nombreuses mitochondries courtes et trapues, alors que les portions plus âgées ne contiennent que de longs chondriosomes.

L'examen attentif d'*Allomyces macrogynus* — où l'épigynie aurait dû s'accompagner d'une concentration subapicale des mitochondries — nous a fourni une image de concentration apicale semblable à celle donnée par *A. arbusculus*. Il ne semble donc pas qu'une distribution quantitative des mitochondries intervienne lors de la disjonction tissulaire précédant la formation des gamétanges chez *Allomyces*.

Parmi les autres organites susceptibles de présenter une répartition différentielle, les granules lipidiques ont toujours présenté une accumulation subterminale chez les deux espèces d'*Allomyces*.



### b) Disjonction biochimique (chimiodifférenciation)

Diverses réactions ont été pratiquées sur les extrémités hyphales des deux *Allomyces*. Les colorants rédox (bleu de méthylène, thionine, etc.) ne nous ont pas permis de déceler avec certitude une différence locale de réaction, sinon la tendance habituelle des apex à réduire plus activement ces colorants. Nous n'avons pas non plus observé de différence notable avec le bleu de toluidine à pH 3,5 (après fixation à l'alcool-formol), bien que d'autres observations (voir plus bas) nous suggèrent l'existence, dès ce stade, d'un gradient potentiel de synthèse des ribonucléoprotéines — inversé selon l'espèce d'*Allomyces* — et qui ne s'actualise qu'au stade de maturation, lors de la genèse des corps paranucléaires ribonucléiques.

### 3. Cytodiérèse

(figure 1, 3)

Elle sépare, en les cloisonnant, les territoires sexuellement déterminés lors de la disjonction tissulaire et fait d'eux des gamétanges.

Chez *A. macrogynus*, les deux cloisons apparaissent dans l'ordre suivant:

- a) cloison apicale, séparant le tissu mâle du tissu femelle sous-jacent. Chez *A. arbusculus*, cette première cloison sépare aussi deux tissus sexuels, mais en position inversée;
- b) cloison subapicale, séparant le tissu femelle du tissu végétatif de l'hyphe-support (du moins dans le cas idéal, fréquent en milieu liquide, de la différenciation d'un unique couple par hyphe). Chez *A. arbusculus*, cette cloison isole le tissu mâle du tissu végétatif hyphal.

Ces cloisons se développent à la manière de diaphragmes à croissance centripète, qui finissent par se fermer complètement (contrairement aux pseudo-septa, à lumen central, des hyphes végétatifs). Elles proviennent de l'accroissement d'une carène née de la face interne des parois de nature chitineuse (12, 23).

Il est important de préciser que ce double cloisonnement sépare et répartit au hasard dans les gamétanges les noyaux initialement présents dans l'extrémité hyphale.

### 4. Maturation

(figure 1, 4 a—d)

Ce stade évolue en 1 h 1/2 environ. Il comprend les principales étapes de la gamétogenèse telle qu'elle a été décrite par H a t c h (12) chez *A. arbusculus*. Notre description concernera essentiellement le développement d'*A. macrogynus*.

### a) Etape de la granulation uniforme

(«granular stage» de H a t c h)

Les granules lipidiques sont répartis de manière homogène dans le cytoplasme des gamétanges (figures 1, 4 a, et figure 1, I, de C h o d a t et T u r i a n [6]). Il en est de même des mitochondries, visibles sur les bords des gamétanges observés en coupe optique, au contraste de phase. Dans les préparations colorées au bleu de toluidine, on distingue en outre des corpuscules métachromatiques grenats résultant de la précipitation de substances polyphosphorées intravacuolaires (6). En fin d'étape, on peut déjà discerner une légère teinte jaune, révélatrice de la synthèse des caroténoïdes, dans les granules lipidiques des gamétanges mâles.

La disjonction biochimique des tissus, achevée au stade 2 b, s'exprime de la manière la plus éloquente par la multiplication mitotique nettement accélérée des noyaux présents dans le territoire gamétangial mâle comparée à celle des noyaux répartis dans le cytoplasme du gamétange femelle. Rappelons qu'au stade 3 (cytodiérèse), ces noyaux s'étaient répartis au hasard dans les gamétanges en formation; à la fin de la cytodiérèse, il devait donc y avoir 4 fois plus de noyaux dans le gamétange femelle qui, chez *A. macrogynus*, est environ 4 fois plus volumineux que le gamétange mâle apical. Les dénombrements effectués dans des gamétanges en maturation avancée (étape 4 b, voir plus bas) ont révélé une égalité du nombre moyen des noyaux mâles et femelles. Il est donc clair que les noyaux mâles ont subi, dès le début du stade de maturation, 4 fois plus de mitoses que les noyaux femelles. Chez *A. arbusculus*, espèce chez laquelle les volumes gamétangiaux sont moins dissemblables (femelle environ 1,5 à 2 fois plus grosse), H a t c h a indiqué 2 fois plus de mitoses dans le tissu mâle.

La multiplication plus active des noyaux mâles a pour conséquence une réduction de leurs dimensions, nécessaire au maintien d'une valeur de rapport nucléoplasmique constante dans le gamétange. Chez *A. macrogynus*, leur diamètre final est égal aux deux tiers de celui des noyaux femelles, soit 2,5 à 3  $\mu$  contre 3,5 à 5  $\mu$  pour les noyaux femelles.

Nous pouvons penser que la qualité «mitogène» différentielle des territoires sexuels disjoints au stade 2 est en relation avec le gradient ribonucléoprotéique déjà mentionné.

Sur le plan morphologique, cette étape marque l'apparition, sur le pourtour des gamétanges, des papilles de déhiscence, au nombre de 1 à 2 (à 3) sur le gamétange mâle, de 1 à 4 sur le gamétange femelle. Ces papilles sont formées d'un bouchon dont la nature pectique nous a été révélée par sa belle coloration avec le rouge de ruthénium. Le bouchon pectique est encastré dans la membrane chitineuse (21, 23) des gamétanges, colorée en bleu vif par la coloration secondaire au bleu de méthylène.



**b) Etape des couronnes lipidiques ou des initiales gamétiques (6)**

(«gamete origin stage» de H a t c h) (figure 1, 4 b)

Les noyaux sont disposés à la périphérie du cytoplasme, contre la paroi gamétangiale. Leur position est bien signalée, sans qu'il soit nécessaire de les colorer, par les couronnes de granules lipidiques soudanophiles et caroténifères (mâles) qui les entourent. Ces granules contenant des phosphatides (6, 23) révèlent des propriétés réductrices spécialement accusées dans les gamétanges femelles: réduction du vert Janus en diéthylsaffranine rose, réduction de l' $\text{OsO}_4$  avec brunissement corrélatif, réaction plasmale de Feulgen après fixation au  $\text{HgCl}_2$  (6).

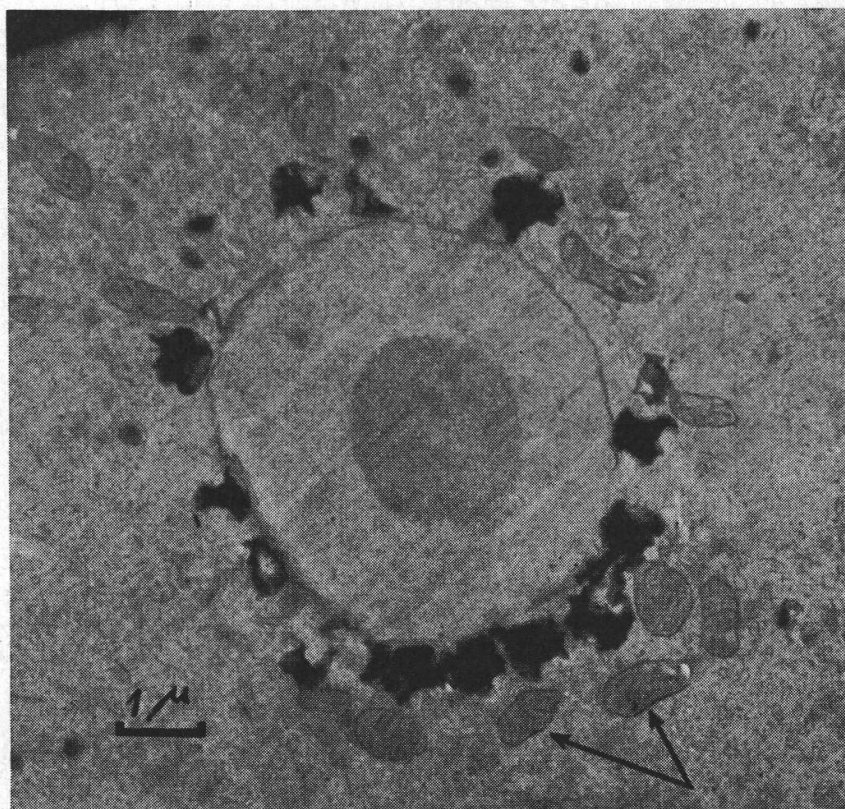


Figure 1bis

Coupe ultra-mince d'un gamétange d'*Allomyces macrogynus* Emers., au stade des couronnes lipidiques. Au centre, nucléole (foncé) dans le noyau (clair) entouré des granules lipidiques (noirs) et des mitochondries (→).

× 8000

(préparation Dr B. Blondel)

Dans les gamétanges mâles, leur richesse en  $\gamma$ -carotène (7) et autres polyènes (34) leur confère une teinte jaune orangé vif.

Lors de cette étape, les noyaux exercent un effet *organisateur* à l'égard des autres composants cytoplasmiques, les granules lipidiques en particulier. Les mitochondries, plus courtes qu'aux stades précédents, sont aussi visibles dans le cytoplasme entourant les couronnes lipidiques (examen sur coupes optiques, au contraste de phase). L'ensemble du noyau-organisateur et de son cytoplasme à organites en disposition concentrique peut être considéré comme une initiale gamétique ou énergide-gamète.

Dans le cadre de recherches en cours avec B. Blondel sur les stades de la gamétogenèse d'*Allomyces* étudiés par la microscopie élec-



tronique, nous venons de vérifier la disposition cyto-topographique des organites dans les gamétanges au stade des couronnes lipidiques. Ces derniers, fixés à l'OsO<sub>4</sub> tamponné (pH 6,3), deshydratés à l'acétone et inclus dans le polyester selon Kellenberger, Schwab et Rytter (Experientia 12, 421, 1956), ont été débités en coupes de 200 Å et observés au microscope électronique (RCA type EMU 2 D).

La figure 1<sup>bis</sup> illustre une coupe traversant une portion de gamétange au niveau d'un énergide-gamète. Elle montre clairement la position réciproque des organites entourant le noyau: les granules lipidiques osmiophiles, disposés en couronne sur le pourtour de ce dernier, et les mitochondries, identifiables à leurs membranes internes (cristae), dispersées au-delà, dans le cytoplasme.

Les couronnes lipidiques, bien mises en évidence par coloration avec un agent chimique réductible tel que l'OsO<sub>4</sub> du fixateur de Champy, nous ont servi de critère de présence des noyaux, plus difficilement repérables. Il nous a ainsi été facile de procéder à des dénombrements de noyaux dans les gamétanges. En choisissant les couples standards (les plus nombreux lors de la différenciation en solution hypotonique: gamétanges femelles 3 à 4 fois plus longs que les mâles), nous avons pu dénombrer une moyenne de  $35 \pm 5$  gamètes tant dans les femelles que dans les gamétanges mâles.

Cette étape des couronnes lipidiques représente un état d'attente pour les gamétanges différenciés sur milieu solide et sec. Cet état peut se prolonger jusqu'à l'autolyse et la mort des gamétanges, si ces derniers ne sont pas mis au contact de l'humidité indispensable à la poursuite de leur gamétogenèse. Mais il suffit de plonger dans une goutte d'eau (sur lame, en chambre humide) les couples de gamétanges trapus obtenus sur milieu d'Emerson pour pouvoir assister, en l'espace d'une heure, aux étapes finales (c et d) de la morphogenèse sexuelle. Par contre, il est clair que les gamétanges obtenus par la méthode rapide, en milieu liquide hypotonique, ne présentent pas cet arrêt de développement.

#### **c) Etape du clivage des énergides-gamètes**

(«disappearance and cleavage stages» de Hatch)

(figure 1, 4 c)

Dès l'instant où des gamétanges prélevés sur milieu solide sont plongés dans l'eau, leurs couronnes lipidiques se disloquent et les noyaux gagnent la profondeur du cytoplasme gamétangial. On assiste ainsi à la disparition (d'où la distinction par Hatch d'un «disappearance stage») des initiales gamétiques. De plus, les mitochondries ne sont plus visibles, ce que Ritchie (23), dans les zoosporanges, et nous-mêmes, dans les gamétanges, avons pu vérifier.

Mais selon nos observations, cette disparition des couronnes lipidiques (dispersion des granules) est contemporaine de la progression,

à partir de la grande vacuole centrale, des sillons de clivage centrifuges qui commencent à découper le cytoplasme gamétangial en unités gamétiques (figure 2). Il nous est donc apparu plus rationnel de fusionner les deux stades de H a t c h, le fait essentiel de l'étape globale résultante étant l'imbibition et l'extension du système vacuolaire sous forme de sillons de clivage.

Ces sillons progressent dans un cytoplasme devenu entre temps très fortement basophile. Cette basophilie, telle que la révèle une coloration au bleu de toluidine ( $pH\ 3,5$ ) après fixation à l'alcool-formol, est nettement plus accusée dans les gamétanges femelles d'*A. macrogynus*. Cela se vérifie encore plus aisément lorsque la matière basophile, en se

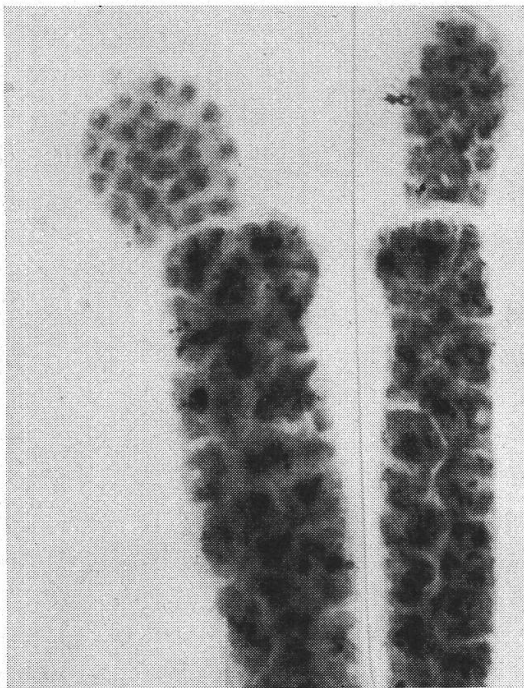


Figure 2

Couples de gamétanges d'*Allomyces macrogynus*. Stade du clivage des énergides-gamètes. Fixation au C h a m p y, coloration à la fuchsine acide selon A l t m a n n - B e n d a. Mitochondries et granules lipido-phosphatidiques sont confondus dans la préparation (coloration rouge foncé)  $\times 716$

concentrant, forme des corps paranucléaires (voir plus bas) beaucoup plus gros dans les gamètes femelles que dans les mâles (28)<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Il nous a été possible d'évaluer que le gamétange femelle sous-apical d'*Allomyces macrogynus* contient environ 2 fois plus d'acide ribonucléique dans l'ensemble de ses corps paranucléaires que le gamétange mâle apical. Nos mesures ont en effet montré que le corps paranucléaire femelle est env. 2 fois plus épais que le même organite mâle. Le volume du corps paranucléaire femelle est donc 8 fois (2<sup>3</sup>) plus important que celui du mâle. Par contre, le rapport des volumes gamétangiaux n'est, en moyenne, que de 4 : 1 en faveur de la femelle (à nombre égal de gamètes, c'est-à-dire de corps paranucléaires). Il est donc clair, qu'à *volume égal*, et en admettant un degré égal de condensation de la substance basophile dans les organites des deux sexes, le gamétange femelle est 2 fois plus riche en acide ribonucléique que le gamétange mâle.

Les mêmes calculs, basés sur les mesures de H a t c h (12), nous ont donné un rapport d'acide ribonucléique de 1,5 : 1 en faveur du gamétange femelle apical chez *Allomyces arbusculus*.

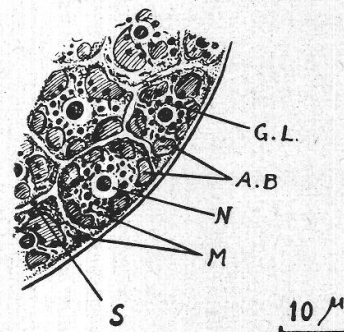


Le fait que cette basophilie accrue du gamétange femelle se retrouve aussi chez l'espèce hypogyne, *A. arbusculus*, nous a conduit à postuler l'existence, dès le stade de disjonction tissulaire (chimiodifférenciation, voir 2 b), d'un gradient ribonucléoprotéique dans l'extrémité hyphale en voie de différenciation. Ce gradient serait inversé selon l'espèce, épigyne ou hypogyne d'*Allomyces*.

La matière basophile se concentre toujours plus fortement autour des noyaux et les sillons de clivage qui séparent les énergides répartissent également cette matière basophile entre les futurs gamètes (figure 3). Rappelons ici que ce processus de clivage peut être perturbé par divers agents physiques (température, etc.) et chimiques, en particulier par l'acide borique; celui-ci pourrait complexer l'acide ribonucléique (ponts tétraboriques sur les o-dihydroxyles) et perturber ainsi la progression normale des sillons de clivage au travers de la matière basophile. Cette action de l'acide borique a pour effet de produire

Figure 3

Genèse des corps paranucléaires basophiles dans une portion de gamétange femelle d'*Allomyces macrogynus*. Fixation de Champy, coloration au vert de méthyle-pyronine. GL = granules lipidiques. AB = amas basophiles. N = noyaux. M = mitochondries (au contraste de phase). S = sillon de clivage



la libération de gamètes géants contenant la matière basophile de plusieurs unités gamétiques (30).

Dans les conditions normales, la matière basophile est également répartie entre les divers gamètes en formation. Elle finit par se condenser en un organite semi-lunaire, coiffant le noyau, constituant ainsi le corps paranucléaire («nuclear cap» de Hatch [12], «food body» de Barrett [1]), riche en acide ribonucléique (Turian [28, 32]).

Hatch considérait le corps paranucléaire comme résultant de l'agglomération des mitochondries devenues vésiculeuses lors du stade de clivage (12). Nos recherches nous ont conduit à une tout autre interprétation des faits: la «disparition» des mitochondries au début du clivage cytoplasmique (voir plus haut) n'est qu'apparente; elle est due à une perte momentanée de chromaticité de ces organites à l'égard des colorants basophiles, perte qui trouve sa contre-partie dans l'accroissement rapide de la basophilie cytoplasmique. Cette matière basophile, tout d'abord dispersée dans le cytoplasme, ne tarde pas à se rassembler en petits amas périnucléaires (les « mitochondries vésiculisées » de Hatch) qui, par fusion, se confondent en un corps paranucléaire bien organisé et entouré d'une membrane double, à l'instar du noyau (pour



l'ultra-structure du corps paranucléaire, voir Turian et Kellenberger [35]).

Lors des processus de condensation de la matière ribonucléoprotéique, les mitochondries restent mêlées aux granules lipidiques, dans le cytoplasme périphérique des gamètes en différenciation; elles peuvent y être repérées par l'observation minutieuse, au contraste de phase, des gamètes formés en bordure des gamétanges. Il est plus étonnant que, dans les gamètes libres ou sur le point d'être libérés, les mitochondries aient échappé à un observateur qualifié comme Hatch. Il est vrai qu'elles y sont encore difficiles à colorer (en comparaison avec celles des hyphes végétatifs) et qu'il a fallu le microscope à contraste de phase pour nous donner le premier indice sérieux d'une séparation spatiale entre mitochondries et corps paranucléaire, notion définitivement confirmée par l'examen des coupes ultra-minces de gamètes au microscope électronique (35).

Il ressort de ces données nouvelles qu'une relation d'échanges réciproques de matières basophiles (acide ribonucléique en particulier) entre mitochondries et corps paranucléaire est donc très vraisemblable. Cette notion est renforcée par l'examen des hyphes de germination des jeunes plantules, dans lesquels la matière basophile s'est complètement dispersée dans un cytoplasme riche en gros chondriosomes aisément colorables (vert Janus et autres colorants basiques).

Mais il ne faut pas non plus perdre de vue le rôle éventuel du noyau, en particulier du nucléole, dans la genèse de la matière basophile paranucléaire, car là aussi des relations de réciprocité se font jour: noyaux et surtout nucléoles nettement plus volumineux et colorables (basophilie) dans les hyphes en croissance active que dans les gamètes exhibant leur corps paranucléaire basophile.

La fin des processus de clivage est marquée par les premiers mouvements autonomes des gamètes mûrs dans les gamétanges. Ces gamètes se voient dotés d'un flagelle d'origine cytoplasmique.

#### **d) Etape de libération gamétique**

(figure 1, 4 d)

Elle a été décrite avec beaucoup de détails par Hatch chez *A. arbusculus* (12) et bien illustrée par Emerson chez *A. macrogynus* (10).

Cette libération débute par la gélification-dissolution du bouchon pectique des diverses papilles d'émergence, suivie de la sortie des gamètes qui se bousculent et se pressent autour des orifices ainsi ménagés dans les gamétanges.

Nous avons observé, comme Hatch chez *A. arbusculus*, que les gamétanges mâles d'*A. macrogynus* sont souvent les premiers à décharger leurs gamètes (légère protandrie). Toutefois, leur plus grande sen-

sibilité à l'égard de la moindre influence externe nocive (variation brusque de la température, lumière [25], changement de pH, impuretés chimiques, etc.), de même que le vieillissement de la culture gamétophytique utilisée (cas du prélèvement des gamétanges sur milieu solide d'E m e r s o n), suffisent à déterminer chez eux un retard voire une inhibition de la libération.

La copulation des gamètes intervient rapidement, au plus tard dans les 30 minutes qui suivent leur libération. A la suite de K n i e p (13, 14), de S ö r g e l (25), d'E m e r s o n (8), nous avons observé le fréquent développement parthénogénétique des gamètes femelles non fécondés. Par contre, aucun cas d'éphérogenèse n'a pu être relevé (à l'exception d'un gamète mâle géant provenant d'une libération en milieu boriqué!). Nous avons été tenté de mettre en relation la capacité de développement parthénogénétique des gamètes femelles avec leur plus grande richesse en acide ribonucléique paranucléaire (31). Cet acide joue en effet un rôle primordial lors de la germination des zygotes d'*Allomyces* (29).

#### B. Morphogenèse sexuelle en conditions de contrainte expérimentale

Nous avons cherché à influencer le cours de la morphogenèse, en exposant les hyphes gamétophytiques indifférenciés (stade 1) à l'action de divers agents chimiques choisis parmi les inhibiteurs connus du métabolisme ou parmi les substances à forte activité biologique.

Ces agents chimiques ont été incorporés, à la concentration désirée, à la solution hypotonique de M a c h l i s (voir A), distribuée à raison de 5 ml dans de petits cristallisoirs à couvercle. Chaque cristallisoir a reçu une touffe d'hyphes indifférenciés prélevés sur une jeune culture gamétophytique âgée de 5 à 6 jours au maximum. Un cristallisoir a toujours été réservé comme témoin pour contrôler la qualité morphogène des hyphes utilisés lors de chaque série d'essais.

Pour les courts délais d'observation (12 à 18 heures), nous n'avons pas pris de précautions spéciales de stérilité, l'état du mycélium témoin servant de critère. Par contre, pour des délais atteignant et dépassant 24 heures, nous avons utilisé de la solution hypotonique stérile. La marche plus ou moins rapide de la morphogenèse en présence des diverses substances étudiées a pu être aisément contrôlée en plaçant, à intervalles réguliers, les cristallisoirs sous l'objectif faible du microscope. Nous avons ainsi pu stopper le développement des gamétanges à leurs différents stades en vue de leur fixation et coloration.

Sur la base de leur action sur la morphogenèse sexuelle chez *Allomyces*, les agents étudiés se sont rangés en deux groupes principaux: 1. les inhibiteurs et 2. les modificateurs de la morphogenèse.

Les inhibiteurs n'ont provoqué qu'un simple blocage des processus de différenciation, accompagné uniquement de lésions d'ordre cyto-



pathologique. Ces agents doivent donc exercer une action toxique primaire sur les processus de la disjonction tissulaire, de la chimiodifférenciation en particulier, éventuellement aussi de la cytodierèse.

Quant aux modificateurs, leur action toxique s'exerce d'une manière plus graduelle, en fonction de leur concentration, avec effets aussi bien morpho- que cytopathologiques. Leur action morphogénétique est la conséquence, soit (2 A) d'une modification précoce des processus de disjonction tissulaire et/ou de cytodierèse, soit (2 B) d'une perturbation des phénomènes de maturation des gamétanges formés.

### 1. Inhibiteurs de la disjonction tissulaire et de la cytodierèse

Parmi les nombreuses substances dépourvues d'effets morphogénétiques, à action essentiellement cytopathologique, nous n'avons retenu que les plus intéressantes.

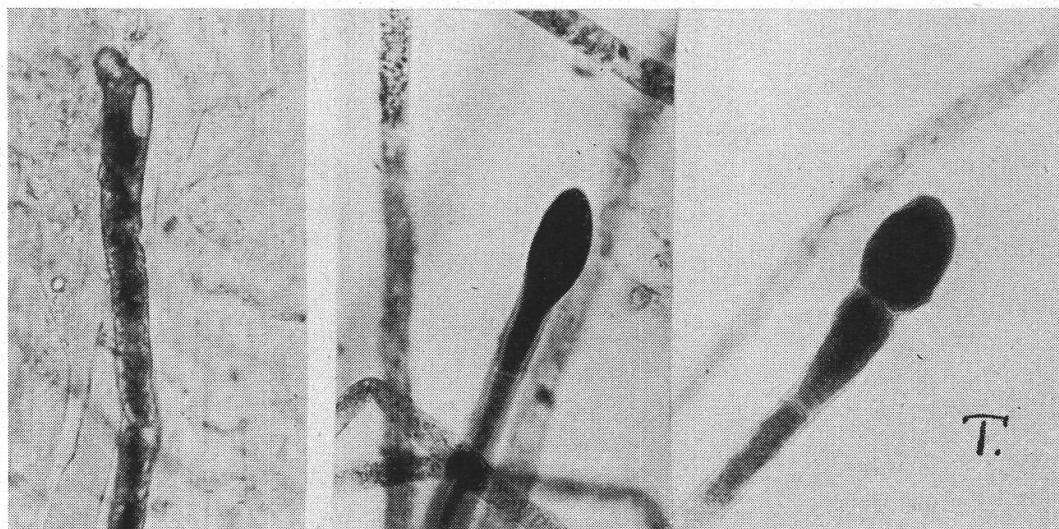


Figure 4

Action de l'actidione sur la différenciation sexuelle chez *Allomyces*. A gauche, hyphe d'*A. macrogynus* «différencié» 24 h en présence de  $2 \cdot 10^{-6}$  d'actidione. Noter la grosse vacuole lipidique en position subterminale. A droite, renflement en massue d'un hyphe fertile d'*A. arbusculus* plongé 18 h dans  $5 \cdot 10^{-7}$  d'actidione. Comparer avec couplet témoin T (18 h, sol. Machlis). Colorations au bleu de toluidine après fixation au formol 10 % salé (NaCl).  $\times 326$

### *Actidione (Cycloheximide)*

Cet antibiotique antifongique présente la remarquable propriété de pouvoir transformer le mycélium sporophytique d'*Allomyces* en mycélium gamétophytique (36).

Il s'est montré aussi toxique à l'égard des processus de différenciation sexuelle que pour la germination des zygotes et zoospores (inhibition à  $10^{-6}$ ). En présence de  $4 \cdot 10^{-6}$  d'actidione, les hyphes d'*A. macrogynus* sont restés stériles, même après 24 heures d'exposition au toxique.



Leur cytoplasme présente une forte basophilie d'aspect homogène. Il est parsemé de grosses vacuoles de nature lipidique, ainsi que le prouve leur coloration par le Soudan III. Il y a là un indice précieux quant au mode d'action, encore mystérieux, de cet antibiotique. L'actidione provoque en effet dans les hyphes d'*Allomyces* l'équivalent d'un phénomène de lipophanérose, c'est-à-dire de démasquage des lipides normalement fixés à des protéines, conséquence probable d'une rupture des cé-napses lipoprotidiques.

Après 24 heures de séjour en présence de  $2 \cdot 10^{-6}$  M d'actidione, seuls quelques apex hyphaux d'*A. macrogynus* ont pu amorcer un début de différenciation, se manifestant par le renflement en massue, caractéristique du stade de disjonction tissulaire. Mais aucune cloison n'est venue séparer l'apex «mâle» du tissu sous-jacent (figure 4).

En présence de  $10^{-6}$ , nous n'avons pu observer que quelques couples gamétangiaux, d'apparence normale mais à contenu indifférencié, à basophilie homogène cernant de petites vacuoles lipidiques et les noyaux groupés. Ces gamétanges n'ont pas accompli leur maturation (inhibition au début stade 4 a).

Il a fallu descendre à  $2,5 \cdot 10^{-7}$  d'actidione pour que nous puissions observer une évolution complète de la morphogenèse avec libération finale de quelques gamètes d'apparence normale.

*A. arbusculus* s'est révélé un peu plus sensible à l'action toxique de l'actidione que l'espèce épigyne. En présence de  $5 \cdot 10^{-7}$  (18 heures), ses hyphes n'ont différencié que des renflements en massue, fortement basophiles (figure 4). Avec  $2,5 \cdot 10^{-7}$ , quelques gamétanges bloqués au stade indifférencié (4 a).

#### Acide $\beta$ -indolylacétique

Cette hétéroauxine, dont nous avons observé, à  $10^{-4}$  M, l'action stimulante sur la germination des zygotes d'*Allomyces* (29), inhibe la différenciation des hyphes dès la concentration  $10^{-3}$  M. Fixés au Carnoy et colorés au bleu de toluidine, ces hyphes renflés en massue terminale exhibent de curieux amas fortement basophiles, se détachant en bleu violacé sur un fond cytoplasmique bleu homogène (figure 5).

En présence de  $10^{-4}$  M d'acide  $\beta$ -indolylacétique, des couples normaux de gamétanges se sont formés; ceux-ci ont libéré des gamètes qui se sont agglutinés sur le pourtour des jeunes papilles d'émergence (l'acide  $\beta$ -indolylacétique peut déterminer un effet d'autoagglutination des jeunes gamètes d'*Allomyces*).

#### Hydrazide maléique

Cette molécule à activité anti-auxinique chez les plantes supérieures (22) s'est révélée peu toxique à l'égard des phénomènes de différenciation chez *Allomyces*. En présence de  $10^{-2}$  M, des couples de gamétanges ont encore pu se former normalement. Seule leur matière basophile

donne l'impression d'être inégalement dispersée dans le cytoplasme (figure 5).

#### *P-chloromercuribenzoate de Na*

Cet inhibiteur notoire des groupes -SH a fait preuve d'une haute toxicité. Aucune différenciation n'a pu être notée en présence de  $10^{-4}$  M de ce produit.

#### *Proflavine*

Cette acridine inhibe la différenciation jusqu'à des doses voisines de  $10^{-5}$ . Ce composé agit sur le cytoplasme qui présente, dans les apex bloqués et les hyphes stériles, un aspect coagulé teinté en jaune.

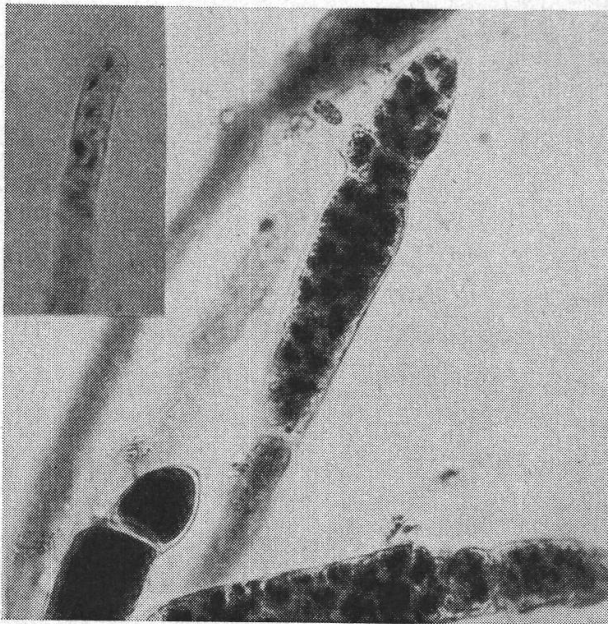


Figure 5

A gauche, en haut, hyphe d' *Allomyces macrogynus* traité 18 h par  $10^{-3}$  M d'acide  $\beta$ -indolylacétique. Noter les amas basophiles. Fixation au Carnoy, coloration au bleu de toluidine.  $\times 326$

A droite, gamétanges différenciés dans  $10^{-2}$  M d'hydrazide maléique (18 h). Même préparation.  $\times 326$

#### *Ions $Cu^{+2}$*

Sous forme de  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ , ce métal oxydo-réductible s'est montré très toxique, mais sans effets morphogénétiques appréciables.

En présence de  $10^{-5}$  M de  $Cu^{+2}$ , aucun signe de différenciation n'est encore visible. Avec  $10^{-6}$  M, par contre, quelques gamétanges ont libéré des gamètes apparemment normaux. Seuls les bouchons pectiques exagérément gonflés et difficilement éliminés ont pu constituer une entrave à la libération normale de ces gamètes.

Parmi les autres inhibiteurs du développement, signalons encore: la cystéine ( $2,5 \cdot 10^{-3}$  M), le KCN ( $5 \cdot 10^{-3}$  M), le NaF ( $5 \cdot 10^{-2}$ ), le 2,4-dinitrophénol ( $10^{-3}$ ).

Avec  $5 \cdot 10^{-4}$  de dinitrophénol, nous avons observé des couples de gamétanges atrophiés, ne libérant que peu de gamètes.



## 2 A. Modificateurs de la disjonction tissulaire et/ou de la cytodièrese

Ce sont des agents chimiques qui, à certaines concentrations, perturbent précocement les processus du développement chez *Allomyces*. L'expression morphologique d'une telle action perturbatrice se manifeste au niveau gamétangial a) par la régression ou l'absence des gamétanges mâles, résultat de l'action d'agents «féminisants» (gynogènes); b) par la régression ou l'absence des gamétanges femelles, action d'agents «masculinisants» (androgènes).

### a) Agents «féminisants»

Des substances aussi différentes que les ions  $Mn^{+2}$  et les alcools aliphatiques ont sélectivement entravé la morphogénèse des gamétanges mâles.

#### $Mn^{+2}$

Ces ions ont été introduits de préférence sous forme de  $MnCl_2$  ou de  $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$ .

Avec  $Mn^{+2}$  à  $10^{-4} M$ , les hyphes d'*A. macrogynus* ou d'*A. arbusculus* traités 24 heures ont différencié des couples de gamétanges normaux capables de libérer des gamètes mobiles.

Par contre,  $Mn^{+2}$  à  $10^{-3} M$  a provoqué en 24 heures chez *A. macrogynus* des effets morphogènes très marqués: gamétanges mâles atrophiés, soit en «boudins» allongés et amincis, soit en petites boules coiffant le gamétange femelle d'apparence normale. Le cas extrême d'une absence complète du gamétange mâle est fréquent et se manifeste par l'apparition à l'apex des hyphes d'un unique gamétange, dont le sexe femelle est attesté à la fois par sa taille, l'absence de pigment jaune et le diamètre de ses couronnes lipidiques.

Dans les couples à gamétange mâle atrophié, on observe une pénétration «en cône» de la cloison, souvent épaissie, ainsi que du cytoplasme du gamétange femelle dans le volume déjà restreint du gamétange mâle (figure 6). Les bouchons pectiques sont fréquemment gonflés comme en présence du  $Cu^{+2}$  (voir plus haut). Notons enfin que le petit gamétange mâle présente une pigmentation jaune pâle.

Chez *A. arbusculus*, c'est aussi le gamétange mâle qui, malgré sa position subapicale, est touché par l'action des ions  $Mn^{+2}$ . C'est donc la preuve d'une action sélective de ce métal sur la différenciation du tissu mâle. En présence de  $2 \cdot 10^{-3} M$  de  $Mn^{+2}$ , de nombreux hyphes de cette espèce hypogyne n'ont différencié à leur apex qu'un unique gamétange femelle (figure 7).

#### Alcools

En présence de 4 % d'éthanol, on observe une nette atrophie des gamétanges mâles, tant chez *A. macrogynus* que chez *A. arbusculus*.

Chez les deux espèces, de nombreux gamétanges femelles se différencient isolément par suite de l'avortement complet des gamétanges mâles (figure 8). Là aussi l'action du toxique se révèle sélective et indépendante de la position réciproque des gamétanges différenciés sur l'hyphe.

Avec 2 % d'éthanol, des couples de gamétanges normaux peuvent se former, alors que dès 6 % les hyphes se vacuolisent et aucun développement ne se produit.

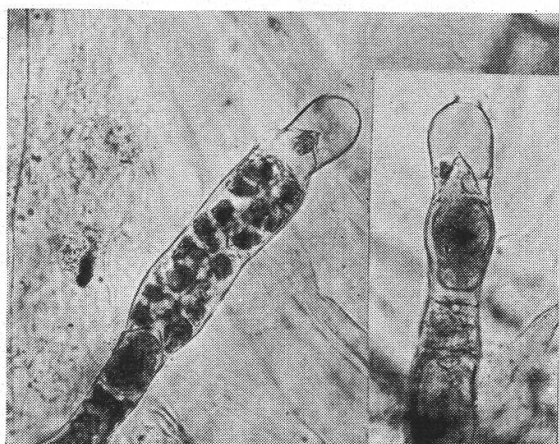


Figure 6

Gamétanges d'*Allomyces macrogynus* différenciés en présence de  $10^{-3}$  M de  $Mn^{+2}$  (24 h). Observer la pénétration «en cône» du gamétange femelle dans le gamétange mâle déjà vidé. Fixation alcool-formol, coloration bleu de toluidine.  $\times 326$

Le méthanol est également toxique à 6 %. Par contre, ses effets morphogènes à 4 % se sont révélés moins marquants qu'avec la même dose d'éthanol.

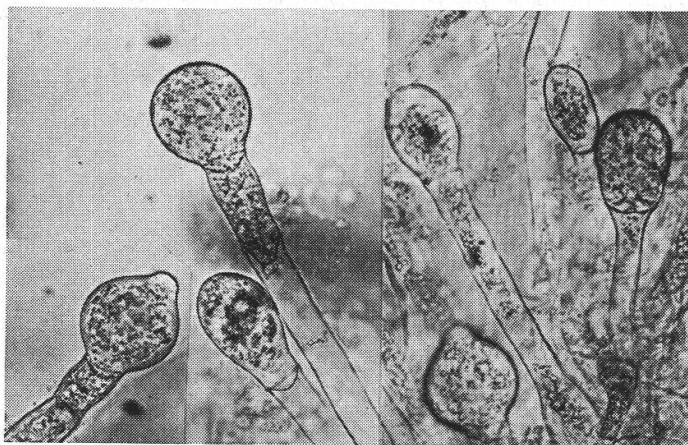


Figure 7

Action «féminisante» du  $Mn^{+2}$  à  $2 \cdot 10^{-3}$  M (48 h) sur le gamétophyte d'*Allomyces arbusculus*. Gamétanges mâles subterminaux atrophiés (à gauche) ou absents. Noter l'épaississement de la cloison basale d'un gamétange femelle (tout à droite). In vivo,

$\times 326$

Quant au *n*-butanol, 1 % suffit pour déterminer la formation de nombreux gamétanges isolés, de caractère femelle (taille, absence de pigmentation, couronnes lipidiques), présentant fréquemment un double ou triple cloisonnement interne supplémentaire. Cette particularité se retrouve, bien que plus rarement, en présence d'éthanol à 4 % (figure 8).

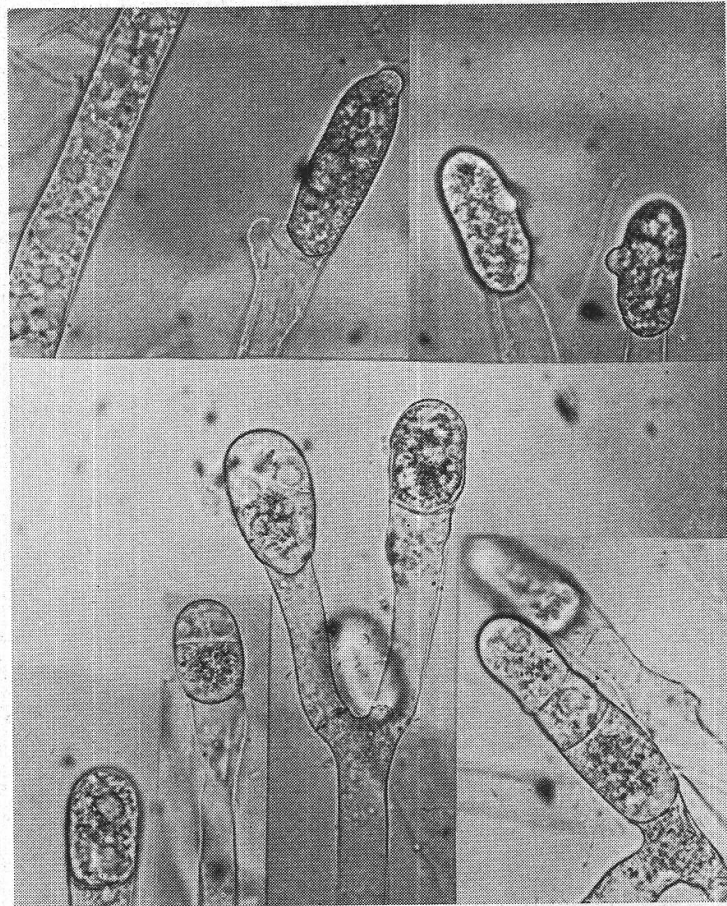
Mentionnons ici que nous n'avons pas pu obtenir d'effets morphogènes comparables à ceux des alcools avec le toluol (saturation aqueuse) ou le chloroforme (1 %).



## Diphénylamine

Cet agent anticaroténogène (26), nettement féminisant lorsqu'il agit sur des cultures gamétophytiques en croissance active sur milieu solide (33), n'a exercé qu'un faible effet sur la différenciation des hyphes transférés en milieu liquide hypotonique.

Figure 8  
Action «féminisante» de l'éthanol à 4% (18 h) sur le gamétophyte d'*Allomyces macrogynus*. En haut, les papilles d'émergence ont pu se former sur les gamétanges femelles isolés. En bas, effets cytopathologiques plus accentués, cloisonnement supplémentaire des gamétanges.  
In vivo,  $\times 326$



Dans une solution aqueuse de diphénylamine à  $1/2$  saturation (environ  $1/70\,000$ ), des couples de gamétanges étroits, avec gamétange mâle plus particulièrement atrophié, ont cependant été observés.

### b) Agents «masculinisants»

Seul parmi les inhibiteurs expérimentés, l'arsénite de Na a manifesté une action répressive et sélective sur la différenciation des gamétanges femelles. C'est avec  $10^{-4} M$  de  $\text{NaAsO}_2$  que nous avons observé, après 24 heures de traitement, l'atrophie et la vacuolisation de nombreux gamétanges femelles chez *A. macrogynus*. En présence de  $2 \cdot 10^{-4} M$  et après 36 heures, quelques gamétanges mâles isolés à l'apex des hyphes ont pu être notés.

Chez *A. arbusculus*, nous avons retrouvé le même effet androgène de l'arsénite, se manifestant parfois par la prolifération d'un deuxième gamétange mâle associé latéralement au premier ( $2 \cdot 10^{-4} M$ ).

Quelques cas de différenciation simultanée, sur le même hyphe, de gamétanges mâles et de sporanges de résistance, en présence de  $10^{-4}$  M d'arsénite, méritent aussi d'être signalés. En effet, Sörgel (24, 25) avait déjà observé des cas spontanés d'une telle association d'organes dans certaines de ses cultures d'*Allomyces* et avait suggéré une parenté de nature entre les gamétanges mâles et les sporanges de résistance, normalement sporophytiques, mais capables d'apparaître parfois sur le gamétophyte (25). Plus récemment, Cantino (3 à 5) a montré chez *Blastocladiella* que la déviation métabolique qui conduit à la différenciation des sporanges de résistance détermine aussi la formation de thalles oranges (équivalents des gamétanges mâles d'*Allomyces*). On peut donc penser que l'arsénite (un inhibiteur du cycle de Krebs) favorise aussi cette déviation morphogène du métabolisme chez *Allomyces*.

## 2 B. Modificateurs de la maturation gamétangiale

### Substances capables

- a) à fortes doses de perturber les processus aboutissant à la concentration de la matière basophile en corps paranucléaires indépendants dans les unités gamétiques;
- b) à plus faibles doses, de provoquer l'arrêt précoce de la maturation du gamétange femelle et sa dédifférenciation. Le gamétange émet alors un hyphe latéral végétatif, capable de se différencier à son tour en un nouveau couple de gamétanges, greffé sur le premier. On assiste en fait à une stimulation de la morphogenèse sexuelle (voir acide ribonucléique et figure 10).

### *Streptomycine*

En présence de  $1/10\,000$  à  $1/20\,000$  de cet antibiotique, les hyphes d'*A. macrogynus* ont différencié, en 18 heures, de nombreux couples de gamétanges. Les gamétanges mâles ont formé leur pigment jaune et certains ont même libéré leurs gamètes. Par contre, plusieurs gamétanges femelles, d'apparence chétive (parois latérales parallèles), n'ont pas mûri sexuellement et ont germé en un hyphe latéral (figure 9). On peut observer, au contraste de phase, la migration du cytoplasme femelle dans le nouvel hyphe.

Avec  $1/5\,000$  à  $1/10\,000$  de streptomycine, les gamétanges qui peuvent encore se former présentent, après fixation à l'alcool-formol et coloration au bleu de toluidine (à pH 3,5), des amas basophiles irréguliers, inégalement répartis entre des unités gamétiques dont nous n'avons pas observé la libération. En outre, chez *A. macrogynus*, les gamétanges mâles se sont fréquemment différenciés en position oblique sur l'apex des gamétanges femelles.



Enfin, en présence de  $1/2000$  à  $1/5000$ , les apex des hyphes restés stériles contiennent de nombreux amas basophiles (voir aussi cas acide  $\beta$ -indolylacétique, figure 5).

#### *Acide ascorbique*

Très peu toxique. En présence de  $1/1000$  de cette vitamine, *A. macrogynus* a différencié, en 24 heures, de nombreux couples de gamétanges normaux capables de libérer leurs gamètes. Cependant, quelques gamétanges femelles ont proliféré latéralement. L'hyphe végétatif s'est fréquemment redifférencié à son tour en un nouveau couple de gamétanges, greffé sur le premier.



Figure 9

Végétatisation du gamétange femelle d'*Allomyces macrogynus* en présence de streptomycine ( $10^{-4}$ , 1 nuit). In vivo, contraste de phase,  $\times 667$

#### *Acide nucléique de levure*

A la dose de  $1/10000$ , cet acide nucléique (essentiellement constitué d'acide ribonucléique) a manifesté une certaine toxicité, traduite par l'absence de différenciation de nombreux hyphes encombrés de matière basophile. Les couples gamétangiaux, morphologiquement normaux, présentent un contenu cytoplasmique désorganisé par l'accumulation de gros amas basophiles inégalement distribués entre les unités gamétiques.

En présence de  $1/20000$ , les couples différenciés en 18 heures sont plus nombreux et l'on peut observer de nombreux cas de prolifération latérale de nouveaux couples gamétangiaux. Nous avons pu observer jusqu'à 3 couples unis en cyme unipare par leurs gamétanges femelles (figure 10). Dans d'autres cas, il y a dédoublement dichotomique régulier du gamétange femelle, chaque branche étant couronnée d'un gamétange mâle. Enfin, l'hyphe peut aussi différencier à son apex un verti-

cille de 3 à 4 couples de gamétanges. Tous ces gamétanges libèrent des gamètes normaux.

#### *Acide borique*

Son action est très différente selon son mode d'application. Dans un milieu nutritif de croissance, il suffit de  $M/600$  d'acide borique pour retarder la différenciation des hyphes gamétophytiques (voir méthode de culture). Par contre, avec la solution hypotonique de différenciation, il en faut  $M/300$  à  $M/150$  pour empêcher la formation des gamétanges. Enfin, les étapes finales de la maturation se déroulent même en présence de  $M/20$  d'acide borique (gamétanges prélevés au stade des couronnes lipidiques, sur milieu d'Emerson), mais avec les anomalies déjà

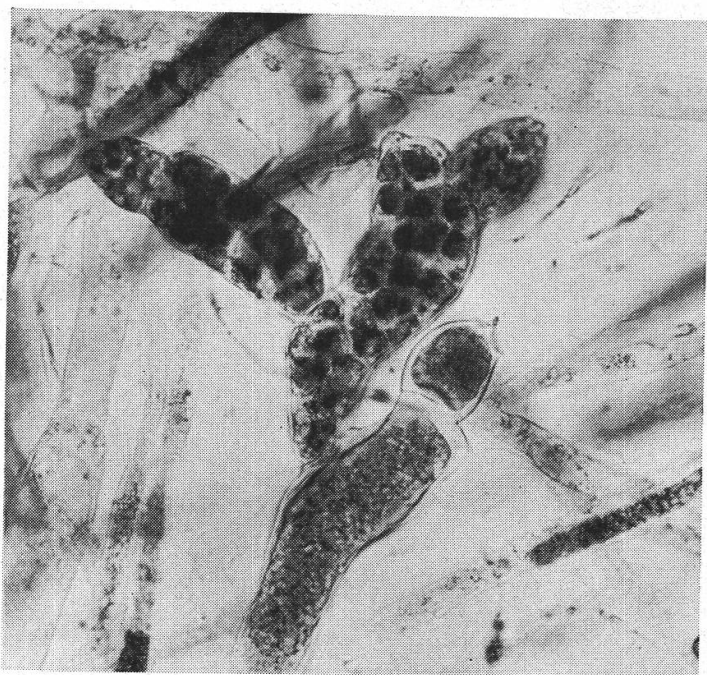


Figure 10

Prolifération latérale (cyme unipare) des gamétanges femelles d'*Allomyces macrogynus* différenciés 22 h en présence de  $1/20\ 000$  d'acide nucléique de levure (acide ribonucléique). A noter que le gamétange initial (momentanément dédifférencié pour bourgeonner latéralement) présente un développement retardé. Fixation à l'alcool-formol et coloration au bleu de toluidine.  $\times 667$

décrites (voir p. 469 et [30]) dans les processus du clivage de la matière basophile.

### Discussion

L'étude de l'évolution normale de la morphogenèse sexuelle (gamétogenèse) chez *Allomyces* nous a permis de préciser les stades successifs déjà décrits par Hatch (12) chez *Allomyces arbusculus* et de proposer une séquence stadiale plus complète, basée sur l'examen détaillé d'un *Allomyces* épigyne, *A. macrogynus*, et de l'espèce hypogyne, *A. arbusculus*. Hatch s'était en effet surtout attaché à la description des stades avancés de la gamétogenèse, que nous avons groupés en un stade global dit de maturation, lui-même subdivisé en quatre étapes (4 a—d). Nous avons par contre fait ressortir l'importance des stades prélimi-



naires (1—3) de la morphogenèse et plus particulièrement celle d'un stade, à peine distinct morphologiquement, celui de la disjonction tissulaire (stade 2), au cours duquel s'opèrent les subtils changements cytophysiologiques qui établissent la *détermination* des territoires cytoplasmiques en vue de leur différenciation morpho-physiologique en gamétanges sexuellement distincts. Ces changements se traduisent avant tout par l'existence d'une polarité sexuelle — inversée selon l'espèce, épigyne ou hypogyne — dans les apex des hyphes fertiles.

De l'étude génétique des produits de l'hybridation, *A. macrogynus* (épigyne,  $N = 28$  chromosomes)  $\times$  *A. arbusculus* (hypogyne,  $N = 16$ ), E m e r s o n (9, 10) a pu conclure que l'arrangement des gamétanges, correspondant à l'existence d'une polarité sexuelle dans les hyphes fertiles, est contrôlé par des gènes polymères. Un tel contrôle n'est donc pas simple et laisse la place à la manifestation complémentaire de propriétés cytoplasmiques autonomes.

Sur le plan cytologique, nous n'avons pu confirmer l'hypothèse de H a t c h (12), qui assignait aux mitochondries, en distribution quantitative différentielle dans les apex, un rôle prépondérant dans l'expression morphologique des sexes. Nous n'entendons cependant pas exclure la possibilité d'une action qualitative, d'ordre physiologique, de ces organites lors de la différenciation sexuelle chez *Allomyces*. Par contre, nos observations nous ont conduit à admettre l'existence et le rôle déterminant d'un gradient basophile correspondant à la distribution différentielle des ribonucléoprotéines dans les extrémités hyphales fertiles d'*Allomyces* (voir p. 469). Un tel gradient serait l'expression visible (après coloration basique) de la polarité sexuelle fondamentale, elle-même contrôlée par le génôme gamétophytique de l'espèce (épigyne ou hypogyne). Les données récentes de la biochimie des acides nucléiques (voir l'excellente revue de B r a c h e t [2]) nous autorisent à penser que les ribonucléoprotéines, en distribution gradientielle, peuvent diriger la synthèse de protéines spécifiques et, par là même, d'enzymes exerçant une activité (ou un degré d'activité) différente dans les territoires cytoplasmiques respectivement mâles et femelles.

Les modifications, tant morphologiques (raccourcissement) que cytochimiques (chromaticité), des mitochondries au cours du déroulement des stades morphogénétiques, méritent d'être retenues. Nous envisageons de les étudier à l'aide du microscope électronique.

L'étude de la morphogenèse sexuelle en conditions de contrainte expérimentale nous a permis de rattacher les divers cas morphopathologiques et cytopathologiques observés au cadre de la séquence stadiale de la gamétogenèse normale. Elle nous a révélé qu'il n'existe que peu d'agents chimiques capables de perturber sélectivement cette évolution. Les cas de l'action «féminisante» du  $Mn^{+2}$ , d'une part, et «masculinisante» de l'arsénite, d'autre part, ont spécialement retenu notre atten-

tion. En effet, ces deux agents peuvent intervenir dans le fonctionnement du cycle de *Krebs*, le  $Mn^{+2}$  en tant qu'activateur métallique de plusieurs enzymes (décarboxylases, etc., voir *McElroy* et *Nason* [16]) l'arsénite comme inhibiteur des décarboxylations oxydatives intervenant dans ce cycle (3). Nous pouvons donc admettre, chez *Allomyces*, que les substances activant le déroulement du cycle de *Krebs* ( $Mn^{+2}$ , alcools [?], etc.) peuvent exercer un effet «féminisant» (ou inhibiteur du sexe mâle), alors que les substances l'inhibant (arsénite,  $Cu^{+2}$ , etc.) favorisent la différenciation dans le sens mâle (effet androgène). Ces données cadrent bien avec les faits établis par *Cantino* (3—5) chez *Blastocladiella*: l'arsénite provoque la formation de sporanges de résistance au lieu de gamétophytes (tendance femelle) chez cet organisme apparenté à l'*Allomyces*.

Nous devons enfin signaler que plusieurs substances, morphogénétiquement actives lorsqu'elles sont incorporées au milieu de culture du gamétophyte, ne le sont que peu ou pas à l'égard des hyphes végétatifs transférés directement dans le milieu hypotonique de *Machlis*. C'est le cas de la diphénylamine (voir p. 477) et des ions  $Cu^{+2}$ . Par contre, les ions  $Mn^{+2}$  présentent le phénomène inverse: l'inhibition marquée de la différenciation des gamétanges mâles en milieu liquide ne se vérifie pas sur milieu solide (couples normaux). Mais dans ce cas, on peut incriminer la précipitation inévitable du  $Mn^{+2}$  dans le milieu solide complexe d'*Emerson* (forte teneur en phosphates), ce qui entraîne nécessairement un affaiblissement du taux actif de cet élément.

Quant aux ions  $Cu^{+2}$ , très toxiques à l'égard des hyphes végétatifs préformés (p. 474), ils ont exercé un puissant effet morphogénétique sur le gamétophyte cultivé sur milieu d'*Emerson* contenant  $2 \cdot 10^{-3} M$  de  $Cu^{+2}$  (sulfate). Sur un tel milieu, les hyphes poussent lentement et différencient, après huit jours de culture, des séries de gamétanges terminaux. Parmi ces derniers, les gamétanges mâles prédominent nettement, mêlés à de nombreux sporanges de résistance (!) conférant une teinte brunâtre à la colonie gamétophytique. Il y a là un bel exemple de «déviations morphogénétiques» d'organes (les sporanges de résistance) normalement sporophytiques en organes gamétophytiques. Nous reviendrons sur ce cas et sur celui de l'arsénite, qui provoque la même déviation en milieu liquide (p. 478), lors d'une prochaine étude sur la morphogénèse sporophytique chez *Allomyces*.

### Résumé

Les aspects morphologiques, cytologiques et cytochimiques des quatre stades successifs de la morphogénèse sexuelle normale ont été décrits chez *Allomyces macrogynus* (espèce épigyne) et contrôlés chez *Allomyces arbusculus* (hypogyne): stades des hyphes indifférenciés, de



la disjonction tissulaire (avec chimiodifférenciation), de la cytodiérèse et de la maturation. Ce dernier stade comprend quatre étapes de différenciation progressive aboutissant à la libération des gamètes.

La basophilie accrue des gamétanges femelles (corps paranucléaires plus volumineux que ceux des mâles) dépend de l'établissement d'un gradient ribonucléoprotéique lors de la disjonction tissulaire dans les apex des hyphes fertiles. Ce gradient basophile est inversé selon l'arrangement — épigyne ou hypogyne — des gamétanges.

Les mitochondries subissent des modifications morphologiques et cytochimiques lors de l'évolution morphogénétique.

La différenciation des gamétanges peut être perturbée aux différents stades de la séquence de développement. Nous avons distingué des agents simplement inhibiteurs de la différenciation et des agents modificateurs (morphogènes) qui agissent plus sélectivement sur certains stades.

Parmi les inhibiteurs, l'actidione à faibles doses a provoqué l'inhibition complète de la différenciation et l'accumulation de vacuoles lipidiques dans les hyphes stériles.

Parmi les agents modificateurs, certains ont dû intervenir dès la disjonction tissulaire des hyphes plongés dans la solution hypotonique différenciatrice: le  $Mn^{+2}$ , les alcools et la diphénylamine (en milieu solide) ont ainsi exercé une action «féminisante» (inhibition sélective des gamétanges mâles), l'arsénite et le  $Cu^{+2}$  (milieu solide), une action «masculinisante». D'autres substances, l'acide nucléique de levure, l'acide borique, interviennent plus tardivement, lors de la maturation des gamétanges.

### Zusammenfassung

Morphologie, Zytologie und Zytochemie der vier nacheinanderfolgenden Stadien der normalen sexuellen Morphogenese sind bei *Allomyces macrogynus* (epigynous) beschrieben und bei *Allomyces arbusculus* (hypogynous) kontrolliert worden: undifferenzierte Hyphen, Gewebetrennung (Chemodifferenzierung), Zytodieresis und Maturation (Reifung). Dieses letzte Stadium besteht aus vier nacheinanderfolgenden Differenzierungsstufen, die mit der Befreiung der Gameten enden.

Die erhöhte Basophilie der weiblichen Gametangien (Nebenkerne umfangreicher als bei den männlichen) ist von einem ribonukleoproteinen Gradienten abhängig, der bei Gewebetrennung in den Spitzen der fertilen Hyphen eingesetzt ist. Dieser basophile Gradient ist gemäß der Ordnung — epigynous oder hypogynous — der Gametangien umgekehrt.

Die Mitochondrien sind der morphologischen und zytochemischen Veränderung während der morphogenetischen Entfaltung unterworfen.

Die Gametangien-Differenzierung kann an verschiedenen Stadien der Entwicklung gestört werden. Wir haben einfache Differenzierungshemmungsfaktoren von den morphogenetischen Agenten, die mehr selektiv auf bestimmte Stadien wirken, unterschieden.

Unter den Hemmungsfaktoren hat Actidione (cycloheximide) in sehr verdünnten Lösungen eine vollständige Differenzierungshemmung und eine Anhäufung von fettigen Vakuolen in den sterilen Hyphen hervorgerufen.

Unter den morphogenetischen Agenten sollten schon verschiedene während der Gewebetrennung eingreifen (Hyphen eingetaucht in eine hypotonische Differenzierungslösung nach eigener Methode):  $Mn^{+2}$ , Alkohole und Diphenylamine (in fester Nährlösung) haben auf diese Weise eine «verweiblichende» Wirkung (selektive Hemmung der männlichen Gametangienbildung), Arsenite ( $AsO_2Na$ ) und  $Cu^{+2}$  (in fester Nährlösung) eine «vermännlichende» Tätigkeit. Andere Substanzen, wie Hefe-Nukleinsäure und Borsäure, greifen später, während der Gametangienreifung, ein.

### Summary

Morphological, cytological and cytochemical aspects of the 4 successive stages of the normal sexual morphogenesis have been described in *Allomyces macrogynus* (epigynous) and controlled in *Allomyces arbusculus* (hypogynous): non-differentiated hyphae, tissue disjunction (with chemodifferentiation), cytodieresis and maturation stages. Maturation includes itself 4 steps of progressive differentiation ending in the discharge of the gametes.

Increased basophily in the female gametangia (larger RNA nuclear caps than in the males) is depending on the establishment of a ribonucleoproteinic gradient at the tissue disjunction stage in the fertile hyphal tips. This basophilic gradient is inverse according to the arrangement—epigynous or hypogynous—of the gametangia.

Mitochondria undergo morphological and cytochemical modifications during the morphogenetic evolution.

Gametangial differentiation can be disturbed at the different stages of the developmental sequence. We have considered separately non specific inhibitory agents and modificatory (morphogenetical) agents which act more selectively on a special stage of the development.

Among the inhibitors, actidione (cycloheximide) at low doses has induced complete inhibition of differentiation and accumulation of lipid vacuoles in the hyphae.

Among the morphogenetical agents, some must have interfered already with the tissue disjunction in the hyphae (which are dipped in the hypotonic solution of M a c h l i s for quick differentiation according



to the method described):  $Mn^{+2}$ , alcohols and diphenylamine (in solid medium) have shown a "female-inducing" effect (selective inhibition of the male gametangia), arsenite and  $Cu^{+2}$  (in solid medium), a "male-inducing" effect. Other substances such as yeast nucleic acid and boric acid have interfered later, with the gametangial maturation.

*Nous remercions vivement M. le prof. F. Chodat pour les nombreux entretiens qu'il a bien voulu nous accorder. Ce travail est financé par le Fonds national suisse de la Recherche scientifique, auquel va toute notre gratitude.*

---

### Bibliographie

1. Barrett, J. T. The development of *Blastocladia strangulata* n. sp. Bot. Gaz., **54**, 353, 1912.
2. Brachet, J. Les facteurs d'activation et d'inhibition de la synthèse des protéines. Exposés actuels de Biologie cellulaire (Biocytologia). Masson et Cie, Paris, 1—38, 1956.
3. Cantino, E. C. Metabolism and morphogenesis in a new *Blastocladia*. Antonie van Leeuwenhoek, **17**, 59, 1951.
4. — and Hyatt, M. T. Further evidence for the role of the tricarboxylic acid cycle in morphogenesis in *Blastocladia Emersonii*. J. Bact., **66**, 712, 1953.
5. — — Carotenoids and oxidative enzymes in the aquatic Phycomycetes *Blastocladia* and *Rhizophlyctis*. Amer. J. Bot., **40**, 688, 1953.
6. Chodat, F., et Turian, G. Nouveaux signes biochimiques de la différenciation sexuelle chez *Allomyces*. Bull. Soc. bot. suisse, **65**, 519, 1955.
7. Emerson, R., et Fox, D. L.  $\gamma$ -carotene in the sexual phase of the aquatic fungus *Allomyces*. Proc. Roy. Soc. London, **B**, **128**, 275, 1940.
8. — An experimental study of the life cycles and taxonomy of *Allomyces*. Llyodia, **4**, 77, 1941.
9. — Current trends of experimental research on the aquatic Phycomycetes. Ann. Rev. Microbiol., **4**, 169, 1950.
10. — The Biology of water molds. Aspects of synthesis and order in growth. Princeton University Press (Ed. D. Rudnick), 171, 1955.
11. Guillaumond, A., Mangenot, G., et Plantefol, L. Traité de cytologie végétale, Paris, 1933.
12. Hatch, W. R. Gametogenesis in *Allomyces arbuscula*. Ann. Bot., **49**, 623, 1935.
13. Kniep, H. *Allomyces javanicus* n. sp., ein anisogamer Phycomycet mit Planogameten. Ber. Deutsch. Bot. Ges., **47**, 199, 1929.
14. — Über den Generationswechsel von *Allomyces*. Zeitschr. f. Bot., **22**, 433, 1930.
15. Langeron, M. Précis de microscopie. Masson et Cie, Paris 1934.
16. McElroy, W. D., and Nelson, A. Mechanism of action of micronutrient elements in enzyme systems. Ann. Rev. Plant Physiol., **5**, 1, 1954.

17. Machlis, L. Growth and nutrition of water molds in the subgenus *Euallomyces*. I. Growth factor requirements. Amer. J. Bot., **40**, 189, 1953.
18. — Idem. II. Optimal composition of the minimal medium. Ibid., **40**, 450, 1953.
19. — and Ossia, E. Maturation of the meiosporangia of *Euallomyces*. I. The effect of cultural conditions. Amer. J. Bot., **40**, 358, 1953.
20. — — Idem. II. Preliminary observations on the effect of auxins. Ibid., **40**, 465, 1953.
21. Nabel, K. Über die Membran niederer Pilze, besonders von *Rhizidiomyces bivellatus* nov. spec. Arch. Mikrobiol., **10**, 515, 1939.
22. Pilet, P.E. Emploi de l'hydrazide maléique en physiologie végétale. Phyton, **6**, 275, 1956.
23. Ritchie, D. The formation and structure of the zoospores in *Allomyces*. J. Elisha Mitchell Sci. Soc., **63**, 168, 1947.
24. Sörgel, G. Über heteroploide Mutanten bei *Allomyces Kniepii*. Nachr. Gesell. Wiss. Göttingen, Math.-Phys.Kl., N. F. Fachgr. 6, Biol., **2**, 155, 1936.
25. — Untersuchungen über den Generationswechsel von *Allomyces*. Zeitschr. f. Bot., **31**, 401, 1937.
26. Turian, G. Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un bacille paratuberculeux. III. Inhibition de la pigmentation par la diphénylamine. Helv. Chim. Acta, **33**, 1988, 1950.
27. — Culture de la phase gamétophytique d'*Allomyces javanicus* en milieu synthétique liquide. C. R. Acad. Sci., **240**, 1005, 1955.
28. — Sur la nature ribonucléoprotéique du corps paranucléaire et ses relations avec la différenciation du sexe chez *Allomyces*. C. R. Acad. Sci., **240**, 2343, 1955.
29. — Activation concomitante par l'hétéroauxine de la résorption du corps paranucléaire ribonucléique et de la germination des zygotes chez *Allomyces*. Experientia, **12**, 24, 1956.
30. — Le corps paranucléaire des gamètes géants d'*Allomyces javanicus* traité à l'acide borique. Protoplasma, **47**, 135, 1956.
31. — Relation entre la basophilie accrue des gamètes femelles d'*Allomyces* et leur capacité de germination parthénogénétique? Inédit, 1956.
32. — Détection cytochimique de l'acide ribonucléique dans les chromosphères pré- et postméiotiques des sporanges de résistance d'*Allomyces*. Experientia, **13**, 315, 1957.
33. — Recherches sur l'action anticaroténogène de la diphénylamine et ses conséquences sur la morphogenèse reproductive chez *Allomyces* et *Neurospora*. Physiol. Plantarum, **10**, 667, 1957.
34. — et Haxo, F. T. Minor polyene components in the sexual phase of *Allomyces javanicus*. Bot. Gaz., **115**, 254, 1954.
35. — et Kellenberger, E. Ultrastructure du corps paranucléaire, des mitochondries et de la membrane nucléaire des gamètes d'*Allomyces macrogynus*. Exper. Cell Research, **11**, 417, 1956.
36. Whiffen, A. J. The effect of cycloheximide on the sporophyte of *Allomyces arbusculus*. Mycologia, **43**, 635, 1951.