

Les périthèces et les asques du *Leptosphaeria* (?) *senegalensis*

Segretain, Baylet, Darasse et Camain

I. L'ontogénie et la structure des périthèces

par A. PARGUEY-LEDUC *, S. ANDRIEU **, F. TRAORE ***
et L. LACOSTE ****

* Laboratoire de Cryptogamie, Université Pierre et Marie Curie,
9, quai Saint-Bernard, F 75005 Paris.

** Unité I.N.S.E.R.M. (U.42), Domaine du C.E.R.T.I.A.,
369, rue Jules-Guesde, Flers-Bourg, F 59650 Villeneuve-d'Ascq.

*** Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine,
15, rue de l'Ecole-de-Médecine, F 75006 Paris.

**** Laboratoire de Cryptogamie, Université des Sciences et Techniques,
F 59655 Villeneuve-d'Ascq Cedex.

RESUME. Les périthèces du *Leptosphaeria senegalensis* naissent à partir de primordiums de type stromato-glomérulaire. Dans les ébauches, des cellules carpocentrales privilégiées donnent naissance à une ou plusieurs cellules femelles (= ascogones) surmontées chacune d'un court trichogyne unicellulaire; les ascogones se transforment directement en cellules à dicaryon, sans qu'intervienne une fécondation par trichogamie et sans l'intermédiaire de vésicules pro-sporophytiques.

Le développement des parties stériles du périthèce est celui d'un Pyrénomycète ascoloculaire à carpocentre de type *Pleospora* avec formation d'une garniture péri-loculaire (ménisque sous-hyménial fugace et cloche sus-hyméniale génératrice de pseudo-paraphyses, mais non de périphyses).

***Leptosphaeria* (?) *senegalensis* Segretain, Baylet, Darasse et Camain. *Perithecia* and *asci*. I. *Perithecial ontogeny and structure*.**

SUMMARY. *Perithecia* of *L. senegalensis* develop from stromato-glomerular type primordia. One or several female cells (= ascogones), each of them topped by a trichogyne,

appear in the carpocentral mass; each ascogone directly produces dicaryotic cells without any intervening pro-sporophytic vesicle.

The development of the sterile elements is typical of an ascolocular *Pyrenomyces* with a *Pleospora* type carpocentrum: formation of a perilocular layer composed of a non persistent subhymenial meniscus and a bell-shaped suprahymenial meniscus generating pseudo-paraphyses but no paraphyses.

En 1959, Segrétain (10) et ses collaborateurs ont décrit un Ascomycète isolé des mycétomes à grains noirs du Sénégal ; ils le dénomment *Leptosphaeria senegalensis* et c'est sous ce nom qu'il est encore connu aujourd'hui. Cependant, en 1965, El-Ani (3) met en doute la valeur de cette détermination en indiquant qu'il existe autour de l'ascospore une gaine muqueuse que n'avaient pas vue les premiers auteurs. Sur cette base, El-Ani propose dans une discussion taxonomique de rattacher cette espèce au genre *Massaria*, mais le caractère hyalin de l'ascospore l'incite à proposer également le classement dans le genre *Metasphaeria*.

Enfin, l'un de nous, dans sa Thèse, à la même époque, Lacoste, en 1965 (5), critique la première dénomination donnée par les auteurs sur la base de la gaine muqueuse très large qui entoure les ascospores, et aussi parce que le *Leptosphaeria senegalensis* possède des pseudo-paraphyses bifurquées, caractère que l'on retrouve chez les Champignons du genre *Trichometasphaeria*.

De plus, il est souligné que l'ascospore n'est pas pigmentée : seuls y sont colorés en jaune des globules lipidiques, et non la paroi ou le cytoplasme. Il semble donc justifié d'éloigner du genre *Leptosphaeria* cet agent de mycétomes à grains noirs pour le rapprocher peut-être des genres : *Metasphaeria*, *Trichometasphaeria* ou *Massaria* : sa position systématique devra donc être revue après l'étude comparative des asques et ascospores.

En vue de mieux identifier cet organisme et de rechercher son possible biotope naturel, non encore découvert à ce jour, une étude morphologique et ontogénique de la fructification sexuée a été entreprise. Celle-ci a été permise par un précédent travail, qui a optimisé les conditions de la production sexuée *in vitro*.

Les techniques (*) utilisées pour la présente étude ontogénique sont classiques et simples. L'observation des primordiums et des jeunes ébauches de périthèces ont été faites *in toto* ; pour cela, des fragments de très jeunes cultures (de 4 à 5 jours dans les conditions optimales précisées dans une précédente publication : Andrieu, Traore, Dujardin et Lacoste en 1980 (1) sont montés entre lame et lamelle, soit dans de l'eau, afin de distinguer les cellules à parois mélanisées, soit dans du bleu C₄B, qui colore le contenu cellulaire d'autant plus intensément que le cytoplasme est plus dense.

(*) Nous avons plaisir à remercier M. Avnaim pour sa précieuse et amicale collaboration technique.

Lorsque les ébauches grossissent et que leur structure devient par trop confuse, il faut recourir à l'observation de coupes. Des fragments de culture sont alors fixés (le fixateur le plus couramment utilisé est le Westbrook), puis inclus dans la paraffine ; on procède ensuite à la réalisation de coupes en série, que l'on colore par l'hématoxyline-éosine.

I. — Les primordiums.

Au bout de 3 jours apparaissent dans les cultures les primordiums de périthèces. Ils se différencient sur le trajet de filaments mycéliens ordinaires, généralement aux endroits où les ramifications sont les plus nombreuses (fig. 1). Parfois, deux (fig. 2) ou plusieurs (fig. 3) filaments parallèles contribuent à la formation d'un seul primordium ; dans ce cas, les cellules situées au même niveau entrent en contact et s'anastomosent, tandis que leurs parois s'épaississent et se pigmentent. De plus, ces cellules se cloisonnent horizontalement (quelquefois aussi longitudinalement, fig. 9) et s'arrondissent, ce qui aboutit à la formation d'un chapelet de cellules mélanisées (fig. 4) : ainsi se forme un nodule stromatoïde du type parenchymateux et méristogène, tel que nous l'avons défini (Parguey-Leduc en 1966 (7), c'est-à-dire « formé aux dépens de cellules mycéliennes qui se dilatent et se cloisonnent dans tous les sens ».

Puis, très rapidement, les cellules mélanisées émettent, dans des directions variées, des bourgeons qui s'allongent et se transforment en courts filaments recouvrants (fig. 4 et 5) ; certains d'entre eux continuent à s'allonger, tandis que d'autres demeurent courts et se plaquent contre le massif méristogène. Il en résulte un accroissement de volume, et également une modification de la forme du primordium qui, primitivement allongé, devient ensuite globuleux (fig. 6 et 7).

Ainsi constituées, à la fois par un massif méristogène et par des filaments recouvrants, les primordiums du *L. senegalensis* appartiennent typiquement au type stromatoglomérulaire.

A ce stade, chacun d'eux est donc entouré d'hyphes très contournées et entremêlées, ce qui rend l'observation *in toto* de plus en plus délicate. Sur les coupes sériées, les cellules du massif méristogène, génératrices des filaments recouvrants, apparaissent très intensément colorées par l'hématoxyline (fig. 8 et 9).

Au moment où le primordium devient globuleux (fig. 10), deux zones sont distinctes sur les coupes : une zone centrale, composée de cellules à cytoplasme dense, et une zone périphérique dont les cellules ont un cytoplasme beaucoup plus pauvre et vacuolisé. Une polarité à répartition concentrique commence donc à s'ébaucher : la zone centrale évolue en un carpocentre (= centre fertile), tandis que les cellules du pourtour se transforment en une paroi. Cette différenciation transforme le primordium en une ébauche de périthèce.

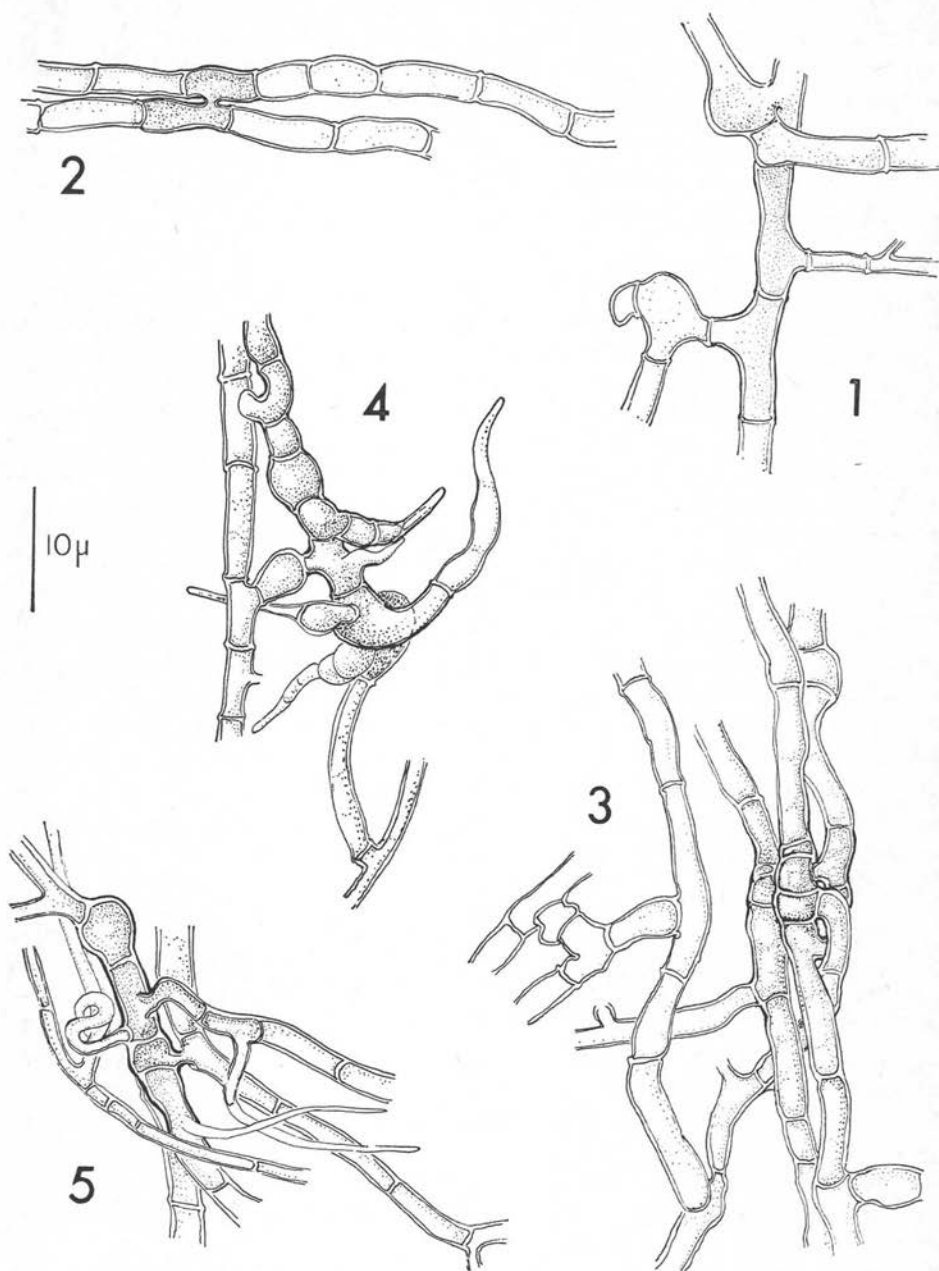
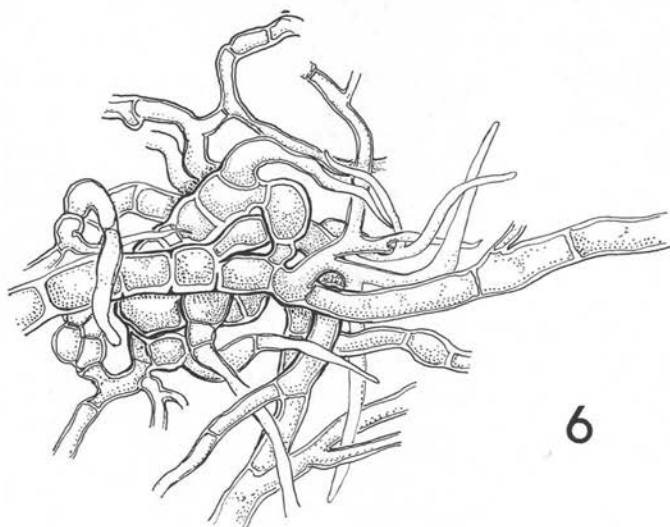


Fig. 1 à 5. Evolution des primordiums (observations *in toto* ; montage dans l'eau).



10 μ

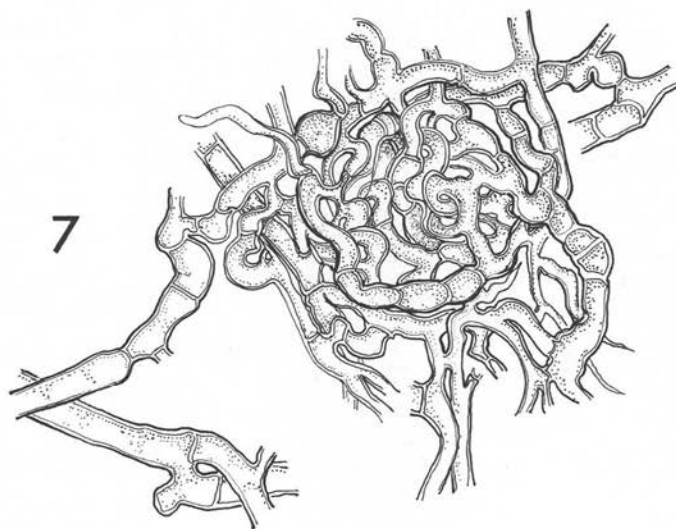


Fig. 6 et 7. Transformation du primordium en jeune ébauche (observation *in toto* ; montage dans l'eau).

II. — Les ébauches.

A partir de ce stade, alors que le volume de l'ébauche ne cesse de s'accroître, les cellules carpocentrales chromophiles subissent une évolution particulière. Leur paroi se lyse progressivement, ce qui libère les masses cytoplasmiques (*car*) dans la cavité centrale (fig. 11). Certaines de ces masses (une seule parfois, *a*, fig. 12) jouent un rôle privilégié : elles grossissent considérablement et rapidement, deviennent de plus en plus chromophiles, puis émettent, vers le haut, un bec (fig. 12) qui s'isole secondairement de la cellule-mère par une cloison. Chacune devient ainsi une cellule ascogoniale (*a*) surmontée d'un court trichogyne unicellulaire (*t*) (fig. 13).

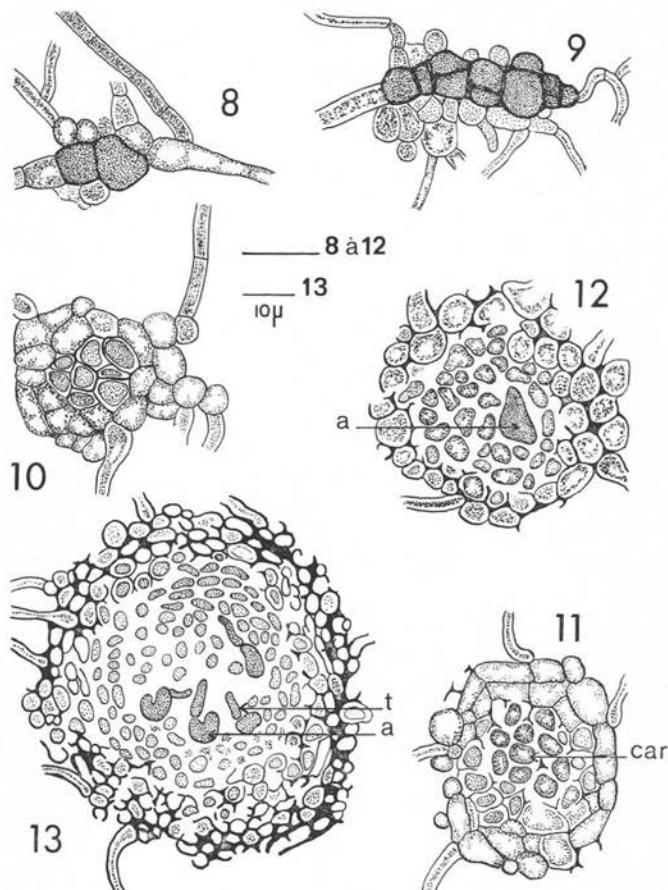


Fig. 8 et 9. Primordiums.

Fig. 10 à 13. Evolution des ébauches ; 10 et 11 : formation des cellules carpocentrales (*car*) ; 12 : apparition d'une cellule fertile femelle (*a*) ; 13 : division de chaque cellule fertile femelle en une cellule ascogoniale (*a*) et un trichogyne unicellulaire (*t*).

(Coupes colorées à l'hématoxyline ferrique-éosine).

Les masses cytoplasmiques qui ne se transforment pas en cellules ascogonales subissent des destinées différentes suivant leur localisation dans la cavité carpocentrale (fig. 13) ; dans la partie centrale, elles subissent simplement une lyse, jouant ainsi probablement un rôle nourricier lorsque l'ascogone engendre l'appareil sporophytique ; dans les parties périphériques, elles demeurent au contraire chromophiles et constituent une garniture périloculaire ; celles du fond de la cavité carpocentrale forment le ménisque sous-hyménial de cette garniture ; celles de la partie supérieure constituent la cloche sus-hyméniale.

De cette disposition des formations résulte une nette symétrie axiale et bipolarisée et l'ébauche se transforme progressivement en un jeune périthèce.

III. — Les jeunes périthèces.

Malgré l'acquisition de cette symétrie, le périthèce conserve une forme grossièrement globuleuse, mais il devient de plus en plus volumineux (fig. 14). L'enveloppe périthéciale (*p*) s'épaissit légèrement ; ses cellules perdent progressivement leur contenu, tandis que leurs parois s'épaississent et se pigmentent.

La différenciation des formations carpocentrales s'accroît. La garniture périloculaire entoure très nettement la cavité centrale, qui augmente de volume, du fait de la lyse des cellules nourricières. Le ménisque sous-hyménial (*m*) occupe le tiers inférieur de la locule ; il est constitué par des cellules isolées, mal définies et plus ou moins en voie de désorganisation. La cloche (*cl*) sus-hyméniale, conique, joue au contraire désormais un rôle très actif. Ses cellules bordant la cavité deviennent paraphyses, par un mécanisme classique (Parguey-Leduc 1966 (7), 1973 (8), 1978 (9) ; pour cela (fig. 15), après avoir subi une division transversale, elles émettent vers le bas un bec ; celui-ci s'allonge en un court filament, rapidement séparé de la cellule génératrice par une cloison ; ce filament s'allonge et de nouvelles cloisons s'y forment. On aboutit ainsi à la formation de pseudo-paraphyses descendantes (*pp*), qui s'allongent de plus en plus et parfois s'anastomosent ; elles finissent par atteindre, en passant entre les cellules à dicaryon (*cp*), le ménisque sous-hyménial, dans lequel elles pénètrent et se fixent (fig. 14). Si la cloche sus-hyméniale produit ainsi vers le bas, selon la règle, des pseudo-paraphyses, par contre chez le *L. senegalensis* elle ne produit vers le haut aucune périphyse.

Lorsque les pseudo-paraphyses ont envahi toute la cavité, les cellules fertiles sont repoussées vers le bas (fig. 17). Celles-ci (*cp*) proviennent directement des cellules ascogonales sans qu'apparemment se soit produite une fécondation par trichogamie ; en effet, aucune cellule mâle n'a pu être reconnue et les trichogynes n'ont qu'une existence très éphémère. Les cellules sporophytiques sont relativement grosses et disposées en courtes colonnes (fig. 16). Cette disposition résulte du fait que chaque cellule ascogonale se divise plusieurs fois transversalement. Les cellules sporophytiques ainsi disposées sont très chromophiles et contiennent généralement chacune un dicaryon,

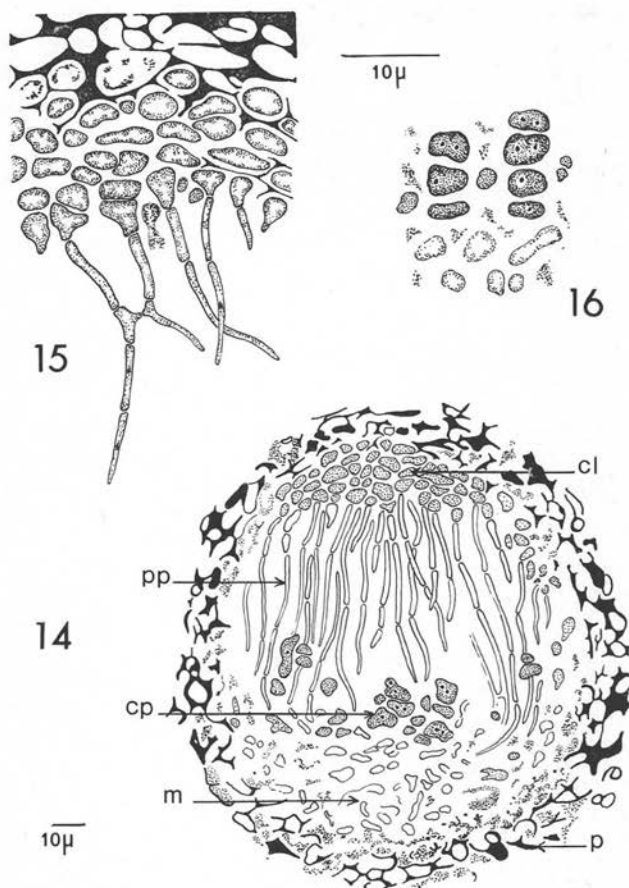


Fig. 14 à 16. Jeune périthèce ; 14 : coupe longitudinale d'un jeune périthèce (*cl* : cloche sus-hyméniale, *m* : ménisque sous-hyménial, *cp* : cellules à dicaryon, *p* : enveloppe périthéciale, *pp* : pseudo-paraphyses) ; 15 : détail montrant la différenciation des pseudo-paraphyses descendantes à partir de cellules de la cloche sus-hyméniale ; 16 : détail des cellules à dicaryon disposées en colonnes (voir le texte).
(Coupes colorées à l'hématoxyline ferrique-éosine).

ce qui permet de les assimiler à des cellules carposporales, sensu Chadeaud, 1960 (2). Il semblerait donc que, chez cette espèce, les cellules ascogoniales produisent directement les cellules carposporales à dicaryon, sans qu'il y ait eu auparavant passage par une phase pro-sporophytique plurinucléée.

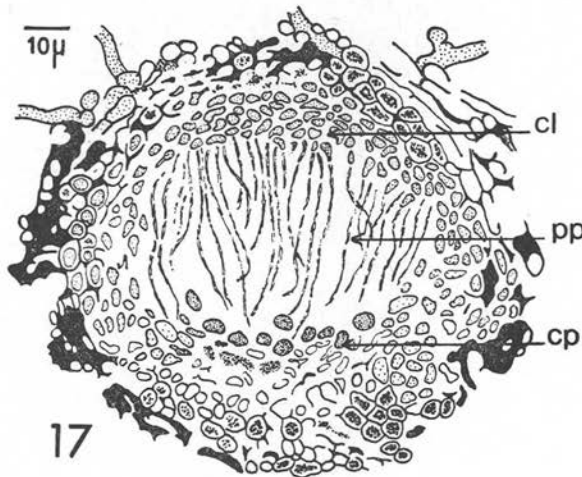


Fig. 17. Périthèce au stade intermédiaire (*cl* : cloche sus-hyméniale ; *pp* : pseudo-paraphyses ; *cp* : cellules à dicaryon).
(Coupes colorées à l'hématoxyline ferrique-éosine).

IV. — Le stade adulte.

Lorsqu'il atteint sa maturité, le périthèce conserve toujours sa forme grossièrement globuleuse et sa symétrie axiale-bipolaire demeure bien nette (*fig. 19*). L'enveloppe périthéciale (*p*) s'est assez peu épaissie ; elle est formée de trois ou quatre couches de cellules polygonales brunes, presque vides de tout contenu.

La cloche sus-hyméniale (*cl*), arrivée au terme de sa fonction paraphysogène et désormais non fonctionnelle, se lyse progressivement, d'où résulte la formation du canal du col ; ce dernier demeure d'ailleurs peu développé et à peine proéminent extérieurement ; il est dépourvu, comme nous l'avons dit plus haut, de périphyses.

Les pseudo-paraphyses (*pp*) occupent maintenant la totalité de la cavité périthéciale. Celles de la partie axiale du périthèce pendent verticalement et forment un faisceau dense. Celles de la périphérie se dirigent d'abord horizontalement vers l'axe de la locule (*pp*, *fig. 18*), puis elles se coudent et deviennent verticales et descendantes. Toutes ces pseudo-paraphyses rejoignent la base de la locule, où elles sont pratiquement fixées à la paroi périthéciale même, le ménisque sous-hyménial ayant à ce stade pratiquement disparu. Par contre, elles se rompent près de leur base (*fig. 18*, flèche), au moment de la lyse de la cloche sus-hyméniale ; elles simulent de ce fait des paraphyses vraies, ascendantes, et leurs bases rompues ressemblent quelque peu à des périphyses. Cette disposition et cette évolution des pseudo-paraphyses rappellent fortement celles observées chez diverses Nectriales [Strikmann et Chadefaud, 1961 (11) ; Parguey-Leduc, 1966 (7)].

Les cellules de l'appareil sporophytique se divisent de nombreuses fois et deviennent de ce fait beaucoup plus petites. Elles s'étalent désormais sur le fond de toute

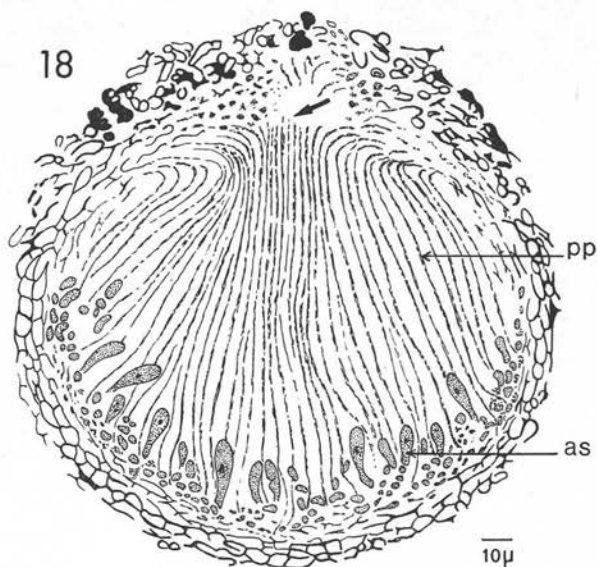


Fig. 18. Périthèce au stade intermédiaire ; les pseudo-paraphyses (*pp*) atteignent le ménisque sous-hyménial, puis la paroi ; en même temps, elles se rompent à leur base (flèche) ; *as* : jeunes asques.
(Coupes colorées à l'hématoxyline ferrique-éosine).

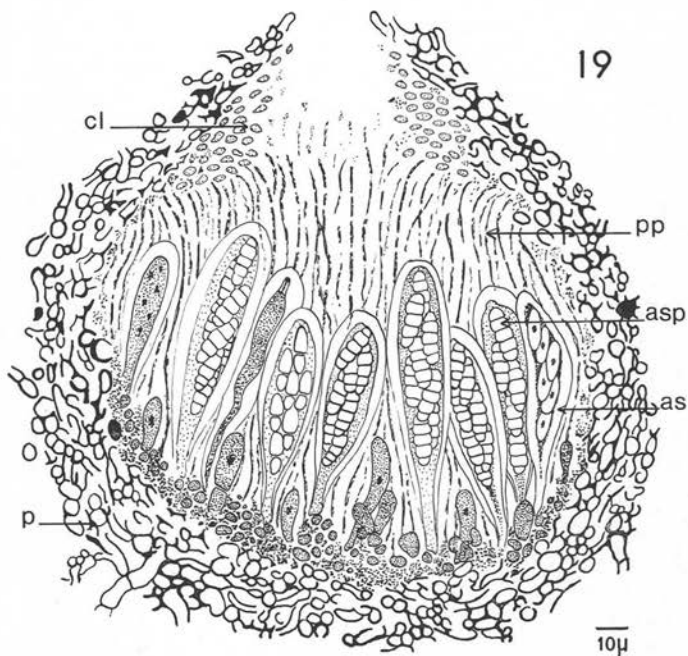


Fig. 19. Périthèce au stade adulte ; *as* : asque contenant des jeunes ascospores ; *asp* : ascospore adulte ; *cl* : cloche sus-hyméniale ; *p* : paroi ; *pp* : pseudo-paraphyses.

la moitié inférieure de la locule (fig. 18) et donnent naissance aux asques (as), mais cela non synchroniquement (fig. 19). Certains des asques sont en effet encore au stade uninucléé, tandis que plusieurs autres contiennent déjà des ascospores adultes (asp).

L'étude de ces asques et de ces ascospores fera l'objet d'une prochaine publication.

Conclusions

L'étude ontogénique des périthèces du *L. senegalensis* montre que cette espèce appartient typiquement aux Pyrénomycètes ascoloculaires ; en effet :

— les primordiums, de type stromato-glomérulaire, ont une origine purement mycélienne : le massif méristogène dont ils dérivent se différencie sur le trajet de filaments mycéliens et produit ensuite des filaments « recouvrants ». Ceux-ci ne sont d'ailleurs pas de véritables filaments recouvrants, puisqu'ils ne proviennent pas du pied de l'archicarpes comme chez les Pyrénomycètes ascohyméniaux, et par conséquent n'engendrent pas une ascothécie : l'enveloppe périthéciale du *L. senegalensis* est donc uniquement de nature stromatique ;

— le carpocentre appartient au type *Pleospora* et non au type *Dothidea*. En effet, les cellules carpocentrales périphériques, au lieu de se lyser comme c'est le cas pour les cellules carpocentrales du type dothidéen, se transforment en une garniture périloculaire ; celle-ci comprend : 1) un ménisque sous-hyménial, qui supporte l'appareil sporophytique, puis tend à disparaître ; 2) une cloche sus-hyméniale, qui produit des pseudo-paraphyses, mais n'engendre pas de paraphyses ;

— les filaments stériles interascaux sont des pseudo-paraphyses, descendantes, issues de la cloche sus-hyméniale, et non des paraphyses vraies, ascendantes, comme pourrait le faire croire la seule observation du stade adulte. En effet, à ce stade, elles sont implantées dans le ménisque sous-hyménial, voire même dans la paroi, d'où elles semblent provenir, tandis qu'elles deviennent libres dans leur partie basale, lysée en même temps que la cloche sus-hyméniale.

Il faut noter ici que la seule observation du stade adulte du *L. senegalensis*, tel qu'il est représenté sur la figure 19, pourrait laisser croire qu'il s'agit d'un Ascohyménial ; en effet, la garniture périloculaire a pratiquement disparu à la suite d'une lyse progressive et les filaments interascaux simulent des paraphyses ascendantes (= paraphyses vraies). Une étude ontogénique complète est donc indispensable pour conclure de façon valable que le *L. senegalensis* appartient bien aux Ascoloculaires.

Mais il est difficile de savoir, à la suite de cette étude ontogénique, si le *L. senegalensis* est réellement un *Leptosphaeria* car, comme nous l'avons déjà dit [Parguey-Leduc, 1966 (7)], « à l'intérieur même du genre *Leptosphaeria*, l'évolution des péri-

thèces a été polyphylétique, et il n'existe pas un type unique de développement périthécial ».

Par contre, nous verrons, dans un prochain article, que des différences notables apparaissent au niveau des ascospores, ce qui nous entraînera à rediscuter la position systématique du *L. senegalensis*.

Bibliographie

1. Andrieu S., Traore F., Dujardin L., Lacoste L. : *Leptosphaeria senegalensis* : facteurs optimums de sa sexualisation. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1980, 55, 135-144.
 2. Chadeauf M. : Les Végétaux non vasculaires (Cryptogamie). — Tome I du Traité de Botanique de M. Chadeauf et L. Emberger. *Masson*, Paris, 1960, 1 vol. de XV + 1018 p., 713 fig.
 3. El-Ani A. S., Gordon M. A. : The ascospore sheath and taxonomy of *Leptosphaeria senegalensis*. *Mycologia*, 1965, 57, 275-278.
 4. Holm L. : Etudes taxonomiques sur les Pléosporacées. *Symb. Bot. Upsal.*, 1957, 14, 188 p.
 5. Lacoste L. : Biologie naturelle et culturale du genre *Leptosphaeria* Cesati et de Notaris. Déterminisme de la reproduction sexuelle. *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Toulouse, 1965.
 6. Munk A. : Danish-Pyrenomycetes. A preliminary flora. *Dansk. Bot. Arkiv.*, 1957, 17, 491 p.
 7. Parguey-Leduc A. : Recherches sur l'ontogénie et l'anatomie comparée des ascocarpes des Pyrénomycètes ascoloculaires. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 12^e série, 1966-1967, 7, 505-690 et 8, 1-110.
 8. Parguey-Leduc A., Dehorter B. : Les ascocarpes et les asques du *Nectria galligena* Bres. *Le Botaniste*, 1973-1974, 56, 157-175.
 9. Parguey-Leduc A. : Les périthèces et les asques du *Delitschia myriaspora* Breton et Faurel. I. L'ontogénie et la structure des périthèces. *Bull. Soc. Myc. Fr.*, 1978, 94, 409-419.
 10. Segretain G., Baylet J., Darasse H., Camain R. : *Leptosphaeria senegalensis* n.sp. agent de mycétome à grains noirs. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1959, 3730-3732.
 11. Strikmann E., Chadeauf M. : Recherches sur les asques et les périthèces des *Nectria* et réflexions sur l'évolution des Ascomycètes. *Rev. Gén. Bot.*, 1961, 68, 725-770.
-