

F. X. SKUPIEŃSKI

Institut de Botanique Génér. de l'Univ. de Varsovie.

## INFLUENCE DU GOUDRON SUR LE DÉVELOPPEMENT DE CERTAINS CHAMPIGNONS. I. *CLADOSPORIUM HER- BARUM* LINK. PHÉNOMÈNES MORPHOLOGIQUES.

La littérature scientifique est riche en publications concernant l'influence de différents composés chimiques sur le développement des plantes tout entières ou tout au moins sur le comportement des cellules végétales en présence de ces mêmes facteurs.

Parmi les composés chimiques, employés depuis longtemps par différents botanistes (Johansen, Nemeč, Z. Wóycicki et d'autres), sont: l'éther, le chlorophorme et le chloralhydrate.

C'est surtout l'action nocive de ces composés sur la division cellulaire (caryocinèse) chez différentes espèces de plantes qui fut étudiée.

Les composés chimiques, que je viens de citer, ne manifestent qu'une légère action sur le comportement morphologique des éléments cellulaires sur lesquels ils agissent; leur action se réduit au terrain cytoplasmatique et nucléaire.

Tout autre caractère possèdent les recherches concernant l'influence du groupe —SH sur le comportement de la cellule animale vivante. Hammett (1929) a démontré que le —SH constitue le stimulant essentiel de la division cellulaire. Hammett et Reimann (1929) ont constaté l'accé-

lération de la cicatrisation des plaies chez les rats et chez l'homme sous l'influence du —SH.

Reimann (1930) a fait une série d'expériences avec des rats et des souris, ayant traité les tissus d'une portion de ces animaux avec une solution de 3% de tiocrésyle dans l'acool à 95% et d'une autre portion avec la solution de crésyle. Il a pu constater que les tissus épithéliaux des individus, frottés avec le tiocrésyle, se sont épaissis deux, trois et quatre fois en comparaison avec les mêmes tissus, traités de crésyle et les tissus non traités (de contrôle). L'épaississement du tissu épithélial fut occasionné par la prolifération des cellules. Le nombre de figures de division est beaucoup plus grand dans les tissus traités de tiocrésyle que dans les tissus non traités de ce composé chimique. Dans les tissus traités de tiocrésyle les cellules sont plus grandes, les fibres plus longues et plus épaisses et les vaisseaux plus larges. L'influence stimulatrice du groupe —SH est bien visible.

La question de la prolifération des cellules animales sous l'influence du groupe —SH touche de près la question du cancer, obtenu artificiellement par des applications du goudron sur la peau d'un animal (rat ou lapin p. ex.). Depuis Yamagiwa et Itchikawa (1914) qui les premiers ont réussi à obtenir un cancer typique de la peau du lapin par les badigeonnages répétés avec le goudron, le nombre de travaux, concernant le cancer artificiel, va en augmentant. On se posait toujours la question: quels composés chimiques dont est combiné le goudron ont la propriété cancérigène. Ce sont les trois savants anglais: Burrows, Hieger et Kenaway qui ont réussi à extraire du goudron une substance, le 1:2:5:6 dibenzanthracène, douée de pouvoir cancérigène<sup>1)</sup>. Cette substance, appliquée sur la peau ou injectée sous la peau d'un animal, provoque l'apparition d'un cancer épithélial ou d'un cancer conjonctif.

On connaît également les maladies cancéreuses dans le monde végétal. Les causes de ces maladies paraissent être différentes. La mieux étudiée est la maladie appelée „Crown-gall“ ou galle du collet, répandue surtout en Amérique. Cette

<sup>1)</sup> J'ai eu connaissance de cette découverte en lisant l'article de P. Nolf: „De la nature du cancer“, publié dans le Bull. de l'Acad. Roy. de Belgique 17, 1932. Nolf ne fournit pas de date de cette découverte.

maladie est attribuée depuis longtemps (E. Smith, 1912) à une bactérie, le *Bacterium tumefaciens*. Les tumeurs, provoquées par cette bactérie, sont d'abord molles, mais plus tard elles durcissent. Chaque tumeur est constituée de cellules irrégulières, disposées d'une façon caractéristique. Il y eu tendances de comparer ces tumeurs végétales avec celles des animaux supérieurs et de l'homme. Mais si on connaît bien à présent la cause essentielle des tumeurs végétales (*B. tumefaciens*), celle des tumeurs des animaux supérieurs n'a pu jusqu'à présent être établie. Dans les deux cas il s'agit de prolifération et d'accroissement désordonnés de cellules sous l'influence d'un stimulant quelconque. Cette prolifération est accompagnée de modifications (perturbations) d'ordre cytologique et physico-chimique des éléments en croissance.

Mais si on a pu provoquer la formation des tumeurs artificielles chez les animaux supérieurs, on n'a fait jusqu'à présent, à ma connaissance, aucune tentative de provoquer de pareils phénomènes chez les végétaux par l'application du goudron.

En étudiant l'influence toxique de différents composés chimiques sur les champignons destructeurs du bois, j'ai pu constater que parmi ces composés le goudron se distingue par des propriétés particulières. Obtenue par la distillation de la houille, il est employé actuellement en une large mesure pour la préservation (imprégnation) du bois de construction et des traverses contre les attaques de différentes espèces de champignons (*Merulius*, *Coniophora*, *Poria*, *Lentinus* et d'autres).

Le goudron seul ou mélangé avec d'autres produits chimiques (chlorure de Zn, dinitrophénol p. ex.), constitue un très bon agent de conservation des traverses. Auparavant on employait pour l'imprégnation du bois le produit global de la distillation, aujourd'hui le goudron, provenant de la distillation, est fractionné en deux parties: huiles lourdes, servant pour la fabrication de l'huile de créosote (appelée communément goudron) et des produits légers, servant à la fabrication des matières colorantes et des combustibles.

Ces huiles contiennent un ou plusieurs composés chimiques non identifiés, doués d'un grand pouvoir toxique envers les champignons. Ces composés sont volatils car ils peuvent à distance tuer une culture de champignon, destructeur du

bois ou d'une moisissure. L'action morbide du goudron se traduit par l'arrêt de la croissance des thalles, par le changement de la couleur de ces derniers et finalement par la mort plus ou moins rapide (suivant l'espèce) du champignon en culture. D'ailleurs l'histoire plus détaillée de l'influence du goudron sur le développement des Basidiomycètes, mentionnés plus haut, sera donnée par moi dans un travail spécial. Dans cette note je veux uniquement présenter quelques détails sur les modifications morphologiques de *Cladosporium herbarum* Link, champignon du groupe des Imparfais, sous l'influence du goudron. Ce champignon, très commun, peut vivre tantôt en parasite, tantôt en saprophyte. Comme parasite il constitue l'agent de la maladie appelée „noir des Céréales“, attaquant surtout le Blé pendant l'été humide. Le mycélium abondamment cloisonné de ce parasite pénètre les feuilles, les glumes les épis et les grains. Ses fructifications peuvent se faire d'après, deux formes: forme *Hormodendron*, quand d'un petit stroma, renfermé à l'intérieur du tissu parasité, sort au dehors, par les stomates, des conidiophores portant des chainettes de conidies (Pl. XI fig. 11) et forme *Dematium pululans* quand la formation des conidies peut se faire sur toute la longueur du mycélium (Pl. XI fig. 10). Le même champignon peut vivre en saprophyte sur toute sorte de substratums organiques. Il se laisse très facilement cultiver en cultures pures sur différents substratums synthétiques comme p. ex. sur la gélose au bouillon de carotte et de pomme de terre ou sur la gélose au moût de bière. En culture pure le thalle de ce champignon, cultivé à partir de spores, est au commencement de couleur grise à bordure claire, mais il devient vite vert olive et noircit progressivement avec l'âge de la culture

C'est un pur hasard qui m'a amené à étudier ce champignon. En vérifiant un jour les cultures de *Coniophora cerebella*, cultivées en présence d'une tablette de bois de pin, imprégnée de goudron, j'ai trouvé avec surprise, sur le substratum gélosé, à proximité du thalle de ce champignon et assez loin de ta tablette goudronnée, un complexe entièrement noir et conique, rappelant un tas de coke. L'analyse microscopique m'a permis de constater que ce complexe fut composé d'éléments plus ou moins sphériques, liés entre eux et rappelant vaguement des spores d'un myxomycète (*Dydymium xanthopus*

p. ex.). Ces éléments sont tellement serrés entre eux qu'il est très difficile de définir leur grandeur et leur forme; pour cela il faut examiner le bord même du complexe où les éléments particuliers se séparent plus facilement et sont par conséquent mieux visibles. J'ai pu néanmoins constater que ces éléments sont des cellules à membrane très épaisse, stratifiée et colorée en brun foncé. L'épaisseur de cette membrane empêche de voir la structure interne de la cellule. J'ai pu également constater que les complexes cellulaires sont enveloppés par une membrane commune très épaisse et composée de couches stratifiées (Planche XI fig. 7).

Un pareil complexe est très hygroscopique car mis dans l'eau il l'absorbe avidement. Tout à fait autrement se comporte un thalle normal du champignon en question: une goutte d'eau, mise à sa surface, coule comme sur une plaque graissée et pour l'observer aisément au microscope, dans une goutte d'eau, il faut préalablement le traiter d'un peu d'alcool.

L'analyse dont je viens présenter les résultats ne m'a pas permis de deviner en présence de quel organisme je me suis trouvé. Pour sortir de l'incertitude, j'ai transplanté un fragment de complexe sur le milieu frais, composé de gélose au moût de bière à 4%. Au bout de 24 h. j'ai pu constater que ce fragment a fourni une plaque circulaire de couleur gris-verdâtre, à bordure claire, composée de mycéliums enchevêtrés (Planche X fig. 4B) et formant des conidiospores. L'analyse plus détaillée du champignon en question m'a mis en présence de *Cladosporium herbarum* Link. Il devient clair qu'une conidiospore a pu pénétrer par hasard pendant le montage de la culture de *Coniophora* et elle y a pris un développement anormal sous l'influence du goudron, contenu dans la tablette de bois.

Ayant découvert l'agent de ce curieux phénomène, j'ai monté tout de suite de nouvelles cultures pures avec les conidiospores nouvellement formées. Comme substratum j'ai utilisé encore la gélose au moût de bière à 4%. Les cultures furent divisées en trois groupes dont l'un constituait le groupe témoin, les cultures du deuxième groupe ont reçu chacune, tout de suite après l'ensemencement, quelques gouttes de goudron, déposées dans le fond du bloque de la gélose et loin de l'endroit où furent piquées les conidiospores; les cultures du troisième groupe ont reçu chacune quelques gouttes de goudron mais seulement 48 heures après l'ensemencement de

spores et quand celles-ci ont déjà fourni d'abondant mycéliums, formant un disque circulaire. Les résultats, au bout de 72 heures, depuis l'ensemencement de conidiospores, sont très différents dans les trois groupes de cultures. Les cultures témoins présentent des disques mycéliens de couleur gris-vergâtre à bordure claire et mesurant environ 3 mm de diamètre. Ces disques *sont plats* et présentent des plis radiaux et un plis circulaire, entourant le centre. Dans le deuxième groupe de cultures, dans lesquelles le goudron fut introduit tout de suite après l'ensemencement de conidiospores, j'ai constaté deux catégories de faits: une partie de cultures ne présente aucun développement du champignon, tandis que quelques cultures ont fourni au lieu des disques plats et circulaires, comme dans les cultures témoins, des conglomerats noirs dont je viens de parler plus haut. Il est bien entendu difficile de comprendre pourquoi dans certaines cultures il se forme des conglomerats décrits plus haut, tandis que les autres cultures ne donnent aucun signe de vie. Les cultures du troisième groupe présentent au bout du même temps et 24 heures après l'introduction du goudron, l'aspect tout à fait différent. Très vite, après l'introduction du goudron, les plaques mycéliennes ternissent, se rétractent et leurs bords s'enfoncent dans le substratum. Au bout de trois jours, après l'introduction du goudron, les plaques mycéliennes se soulèvent, s'ouvrent dans le centre et il se forme progressivement un anneau de couleur noire qui se remplit petit à petit par les cellules proliférées.

Si on introduit l'huile de goudron dans une culture âgée de plusieurs jours, (quand le thalle occupe toute la surface du substratum), à la surface de celui-ci apparaissent de nombreux points noirs, qui grossissent progressivement et deviennent des complexes décrits plus haut (Pl. X fig. 1).

Au cours de mes longues observations j'ai pu établir les faits suivants: Les cultures de *Cladosporium*, montées sur un substratum pauvre en substances nutritives (gélose au moût de bière à 0,5%) ne donnent jamais, après l'introduction du goudron, de phénomènes de prolifération des cellules (complexes noirs). Les cellules mal nourries meurent tout simplement assez vite sous l'influence de ce facteur. Quand je dépose le goudron directement dans le fond du substratum (gélose au moût de bière à 4%), dans les tubes à essai, deux

cas peuvent se présenter: quand il y a de l'eau de condensation au fond du tube le goudron introduit tombe dans le fond et il reste complètement couvert par cette dernière; dans ce cas la germination de spores et le développement du thalle ne subissent qu'une légère perturbation. Celui-ci pousse presque normalement, sa couleur habituelle ne change pas. Quand l'eau de condensation est retirée avant l'introduction du goudron et celui-ci est en contact avec l'air, l'évolution du champignon est dirigée vers la formation de complexes, décrits plus haut. Il est donc clair que l'eau de condensation arrête la substance qui provoque la multiplication irrégulière des cellules.

Il se pose maintenant la question quelle est la nature des corps (ou du corps) qui provoquent la prolifération des cellules? Ces corps ne sont certainement pas toxiques car ils ne tuent pas les cellules mais seulement ils agissent d'une façon mystérieuse sur leur état d'équilibre physiologique, pareillement à ce qui a lieu dans les cancers d'animaux. Mais j'ai pu constater également que tous les échantillons de goudron que j'ai eu à ma disposition ne fournissent pas les mêmes résultats: certains échantillons n'impriment aucune influence sur le développement du champignon; celui-ci pousse aisément sur toute la surface du substratum sans changer ni sa couleur normale ni sa forme; en présence des autres échantillons le champignon meurt tout simplement asphyxié par leurs produits volatils; en présence enfin des autres échantillons le champignon se transforme en conglomerat, décrit ci-dessus. Cela prouve que le corps (ou les corps), provoquant la formation de ce dernier, n'existent pas dans toutes les fractions du goudron, obtenues par la distillation fractionnée de la matière première, tirée de la houille. La majorité de composés contenant le soufre (Thiophène, Thioxène, Thiitolène, Sulfure de Carbone) se trouvent dans la fraction légère du goudron dont le poids spec. est égal à 0,91 — 0,95. Mais comme la fraction en question n'est pas employée pour l'imprégnation du bois (et dont je n'ai eu par conséquent jamais d'échantillons) l'influence directe des composés chimiques, énumérés ci-dessus, sur la production des conglomerats doit être écartée. On peut néanmoins admettre que pendant la distillation certaines quantités de composés énumérés plus haut et contenus dans la fraction légère peuvent passer dans les fractions plus lourdes et provoquer la prolifération irrégulière.

gulière de cellulés du champignon. Autrement on ne pourrait pas s'expliquer pourquoi certains échantillons de la même fraction, mais provenant de différentes distilleries, provoquent la formation de congglomérats et les autres n'en provoquent pas.

Mais en présence du fait, que les proliférations irrégulières de cellules sont provoquées par un ou plusieurs composés volatils, on se demande si elles sont vraiment provoquées par des composés contenant du soufre ou par d'autres, dépourvus de ce corps? Ce problème, extrêmement délicat et hérissé de difficultés d'ordre technique, sera, je l'espère, à force de patience, résolu positivement.

Observations vitales de la structure des cellules, constituant les complexes est, comme je viens de dire plus haut, entièrement impossible à cause de l'extrême grosseur de leurs membranes qui masquent complètement la structure du protoplasme. L'unique observation possible de ces cellules est après la fixation préalable du matériel et coloration d'après les méthodes cytologiques courantes. Un essai préliminaire de la fixation d'un fragment de complexe avec le mélange de Nawachine et coloration avec l'hématoxyline ferrique m'a permis de constater que chaque complexe est formé d'agglomération de cellules enveloppées d'une grosse membrane et que ces cellules sont à l'état de divisions actives qui se passent en différentes directions, tout à fait comme dans les tissus cancéreux animaux.

L'analyse chimique et l'origine de la grosse membrane, le caractère de la division des cellules en prolifération, constituant l'essence des questions touchant au problèmes des cancers, feront l'objet d'une prochaine publication spéciale.

Les phénomènes de la prolifération irrégulière des cellules de *Cladosporium* possèdent, en présence des faits annoncés par Hammett, Reimann, Burrows, Hieger, Kenneway et d'autres, bien des points communs avec les phénomènes qui se passent pendant la formation des tissus cancéreux chez les animaux. Mais il y a également une différence dans le mode d'obtention de cancers artificiels chez les animaux et la prolifération cancéreuse de cellules de *Cladosporium*: dans le premier cas on applique directement le goudron ou ses extraits contre le tissu de l'animal et dans le deuxième

cas ce sont les substances volatiles seules qui suffisent pour provoquer cette prolifération.

Je considère que cette découverte de l'action à distance du goudron sur un organisme vivant, même que ce soit un champignon imparfait, doit constituer une indication précieuse dans les recherches sur le cancer.

### R é s u m é.

1. Le goudron, obtenu par la distillation de la houille, constitue un des meilleurs agents, employés dans la lutte contre les champignons destructeurs du bois.

2. Les différentes espèces de champignons réagissent de différentes manières sur la présence du goudron: les uns sont tués dans un court délai, les autres arrêtent leur développement sans perdre leur vitalité et les autres enfin ne réagissent que très faiblement en conservant toujours leur pouvoir de croissance normale.

3. *Cladosporium herbarum* se comporte d'une façon spéciale en présence du goudron. Ses cellules qui, dans les conditions normales, se divisent dans une seule direction en formant des myceliums le long desquels il se forme les bouquets de conidiophores, portant des conidiospores ou des spores isolées, se multiplient en présence du goudron dans plusieurs direction en donnant des agglomérations de cellules, autour desquelles il se forme une forte membrane stratifiée. La croissance de cette agglomération au lieu de se faire en sens horizontal (comme dans la croissance sans goudron) se fait en sens vertical tout pareillement comme dans la prolifération des tissus cancéreux animaux. Il n'y a pas de formation ni de myceliums ni de conidiospores.

4. La modification du plan de la multiplication des cellules de *Cladosporium* se fait sous l'influence d'un ou de plusieurs composés volatils non identifiés jusqu'à présent. D'après les recherches de Hammett et de Reimann ce sont les composés chimiques, contenant le groupe —SH dans leur structure qui constituent les stimulans essentiels de la multiplication plus forte des cellules animales. Burrows, Hieger et Kannaway ont réussi à extraire du goudron une sub-

stance à l'état pur: le 1:2:5:6 dibenzanthracène qui provoque la croissance irrégulière des cellules animales.

5. La prolifération irrégulière des cellules sous l'influence du goudron a lieu seulement sur un substratum riche en substance nutritive (gélose au moût de bière à 4%) et elle est nulle sur un substratum pauvre en substances nutritives (le moût de bière à 0,5%).

## Bibliographie.

1. Arnaud Gabriel et Madeleine. (1931) — Traité de Pathologie végétale. Encyclopédie mycologique. Paul Lechevalier et Fils, Paris.
2. Hammett F. S. (1929) The chemical stimulus essential for growth by increase in cell number. *Protoplasma*, **7**, 297—322.
3. — (1931) — The proliferative reaction of the skin to sulfhydryl and its biological significance, **13**, 331—347.
4. Hammett F. S. and Reimann S. P. (1929) — Cell proliferation response to sulfhydryl in mammals. *Journ. Exp. Med.* **50**, 445 — 448.
5. Nolf P. (1931) — De la nature du Cancer. *Bull. de la Classe des Sciences de l'Académie r. de Belgique.* 5 Série. **18**, 1177 — 1203.

## Explication des planches.

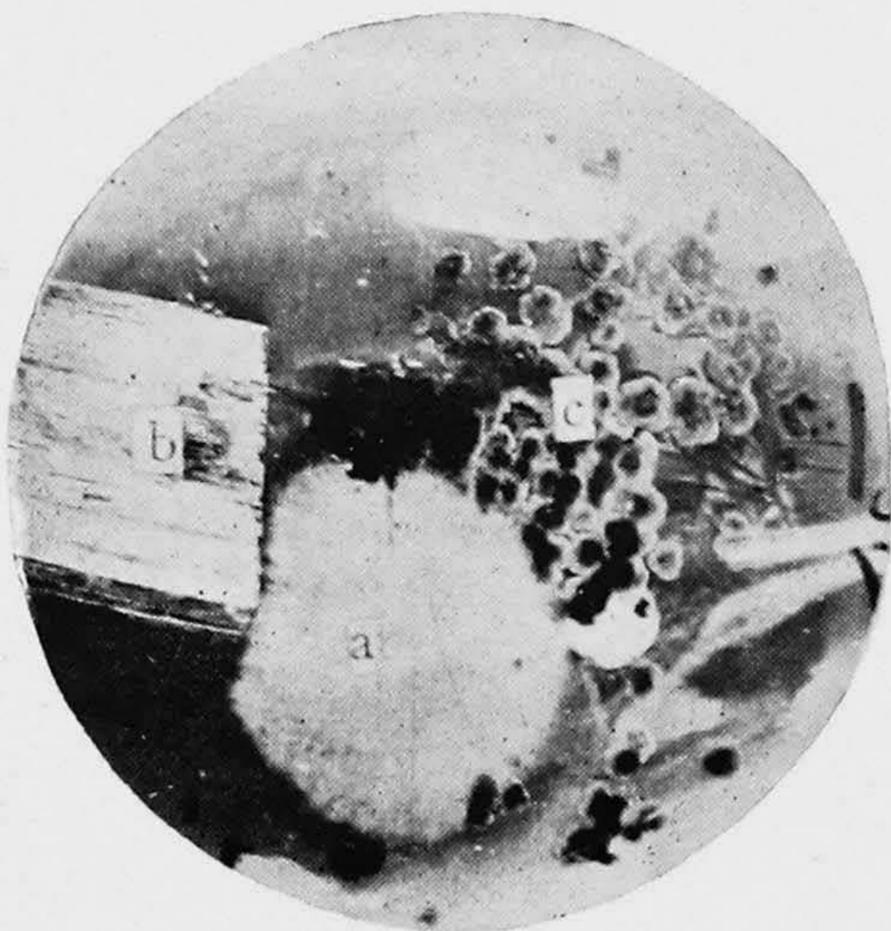
### PLANCHE X.

- Fig. 1. Culture de *Coniophora cerebella* (a) en présence d'un morceau de bois imprégné de goudron (b). A côté de *Coniophora* il y a de nombreux points noirs (c) — ce sont des agglomérations de cellules, provenant de la modification des mycéliums normaux de *Cladosporium* sous l'influence du goudron. Grandeur natur.
- Fig. 2. Développement d'une agglomération dans la boîte de Petri, à partir des spores et en présence du goudron. Grandeur natur.
- Fig. 3. Développement d'une agglomération dans une éprouvette sur la gélose au moût de bière à 4% et en présence du goudron: (A) vu de face et (B) vu de profil. Grandeur natur.
- Fig. 4. Cultures normales de *Cladosporium* sur gélose au moût de bière à 4%, âgée de 6 jours: (A) à partir de spores et (B) à partir d'un fragment de conglomerat. Grandeur natur.
- Fig. 5. Fragment de conglomerat en préparation microscopique. Grossi env. 528 fois.

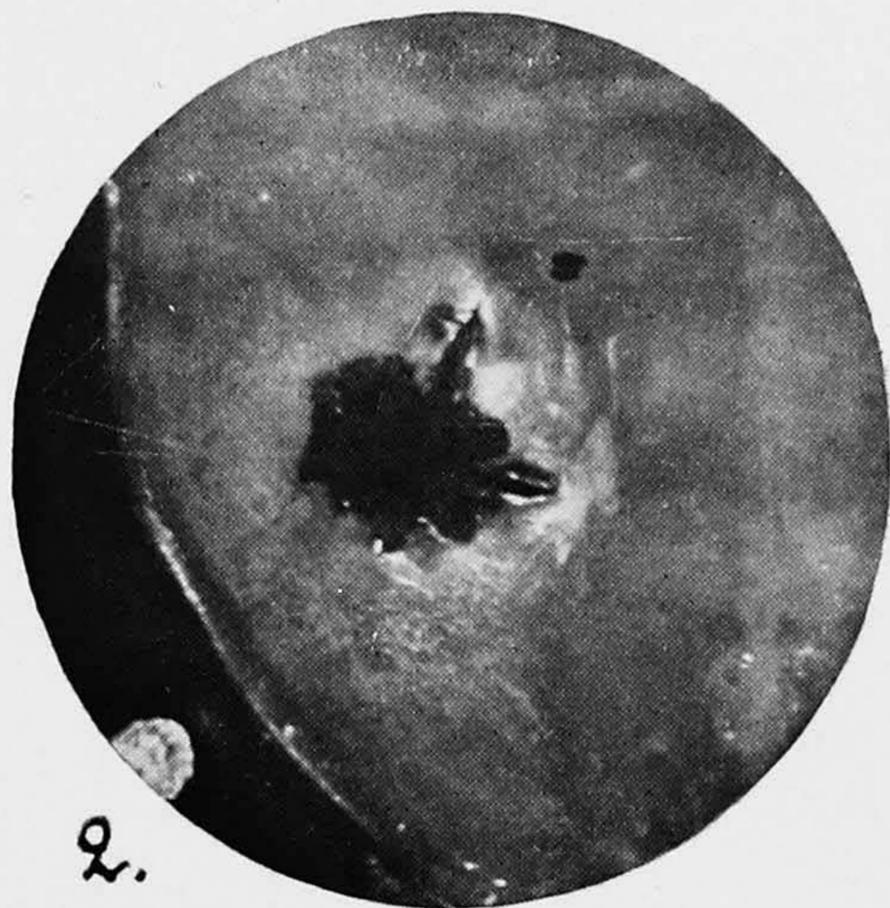
### PLANCHE XI.

- Fig. 6. Fragment d'un autre conglomerat, sur lequel on distingue la grosse membrane externe, enveloppant les cellules proliférées. Grossi env. 528 fois.

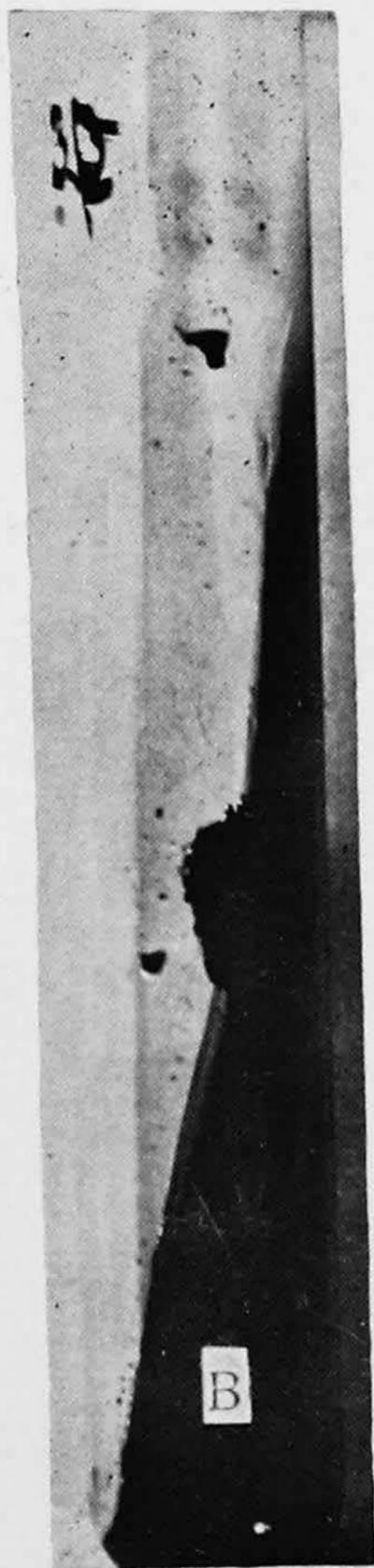
- Fig. 7. Point (A) de la figure précédente grossi env. 2.300 fois. On voit la stratification de la grosse membrane.
- Fig. 8. Coupe microtomique d'un fragment de conglomérat, présentant des alvéoles formées par la grosse membrane, sous l'influence du goudron, dans lesquelles se trouvent les cellules irrégulières en prolifération. Grossi env. 220 f.
- Fig. 9. Mycéliums en plein développement normal. Grossi env. 528 f.
- Fig. 10. Filaments mycéliens formant des conidies. Grossi env. 528 fois.
- Fig. 11. Fructifications normales de *Cladosporium herbarum*. Grossi env. 220 fois.
-



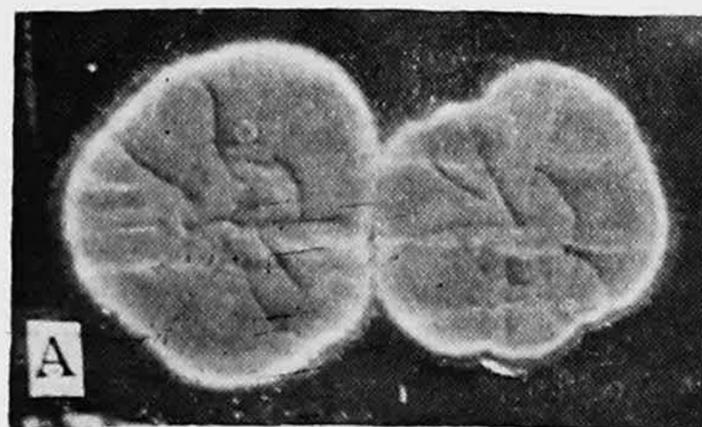
1.



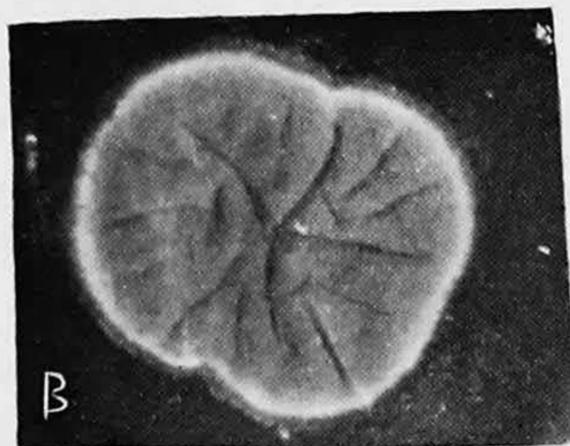
2.



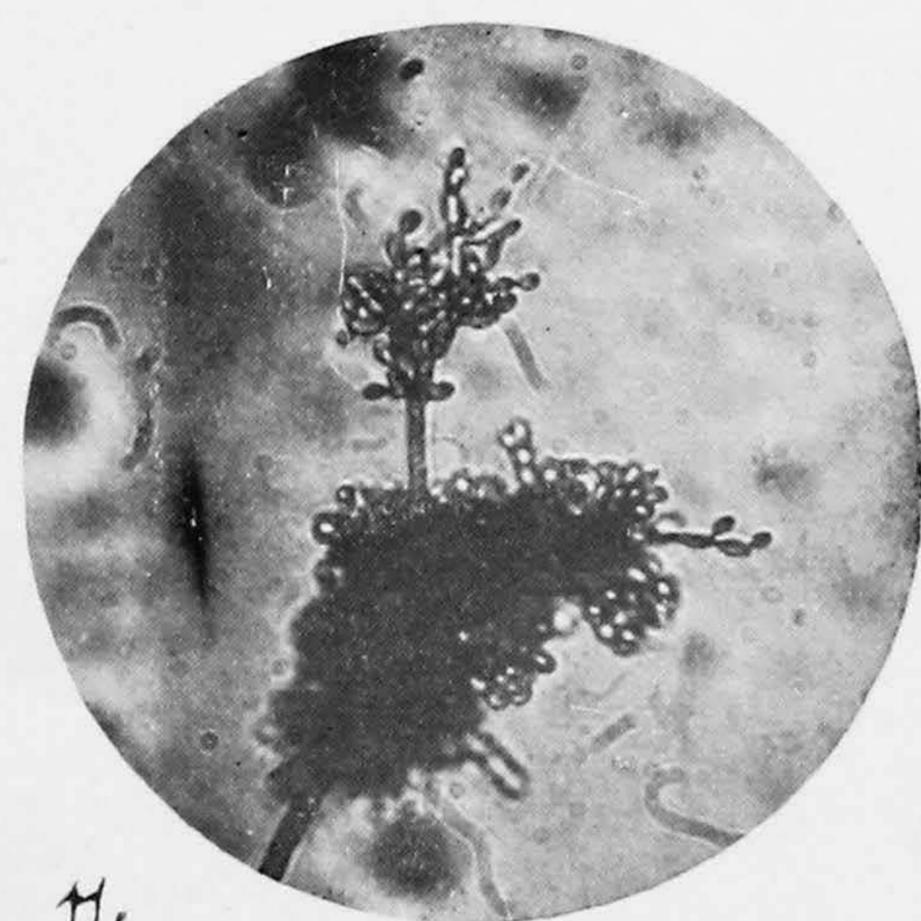
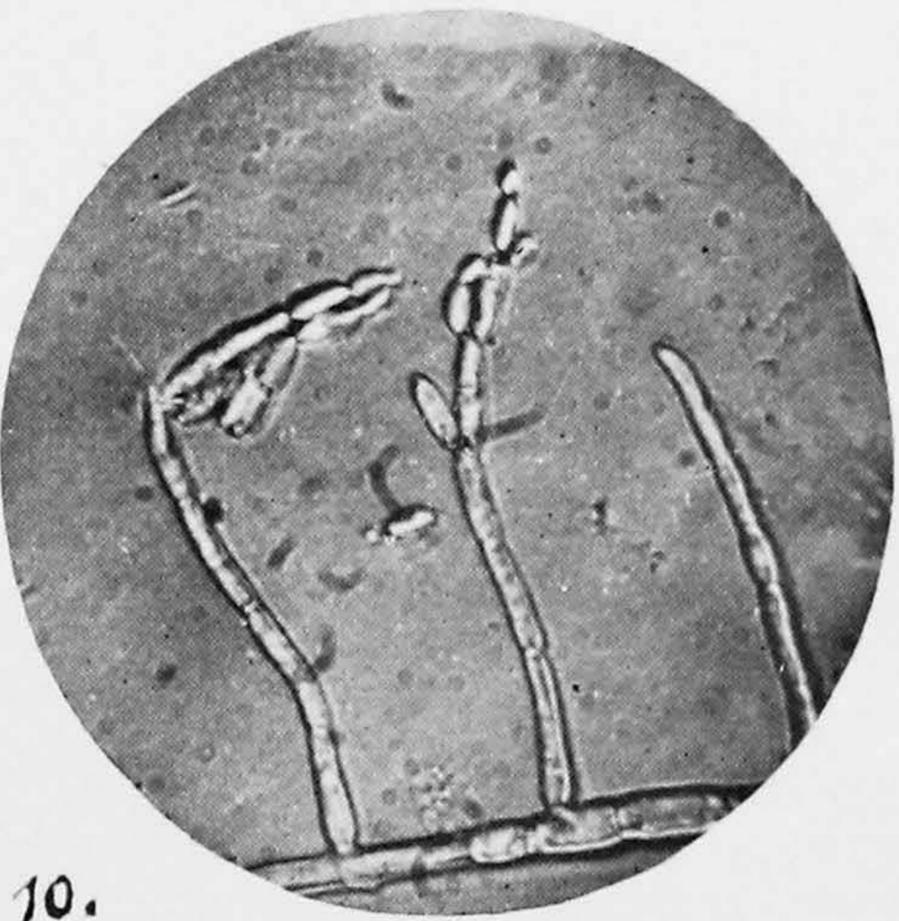
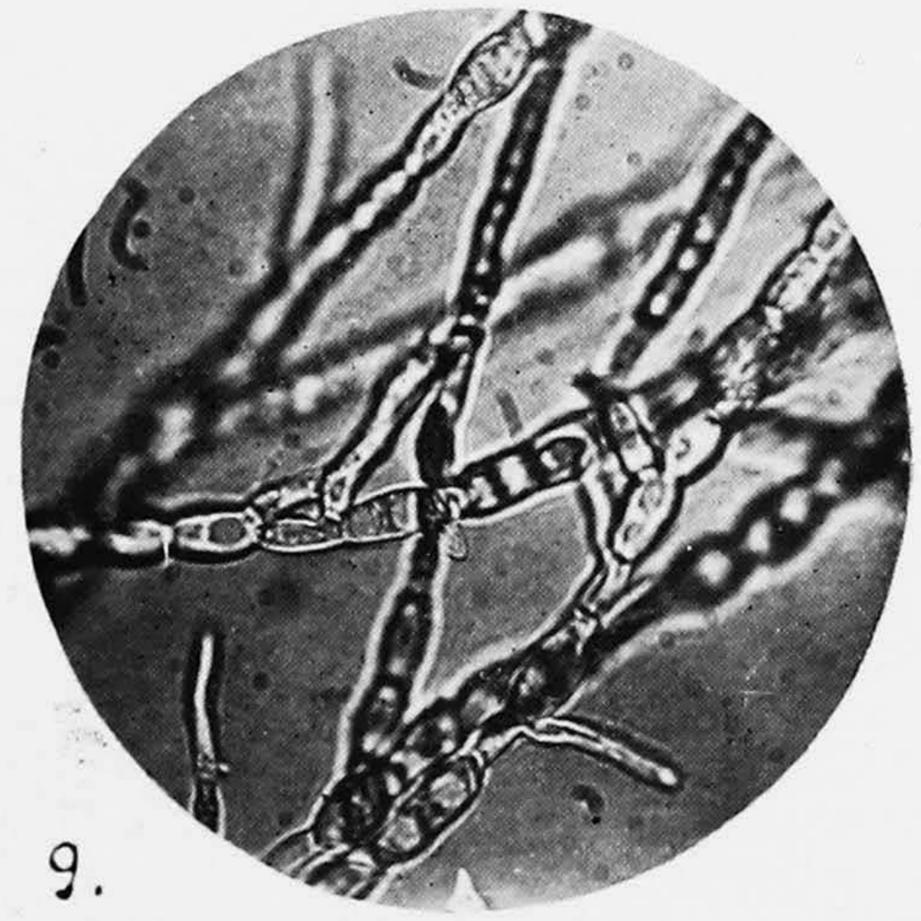
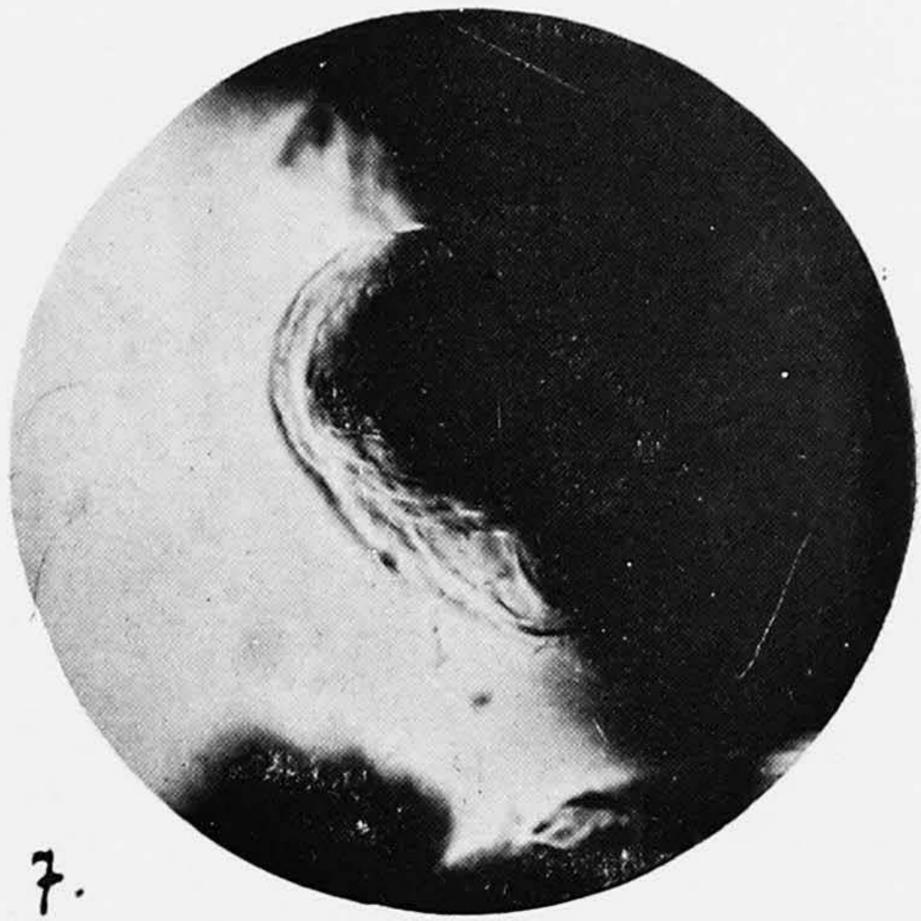
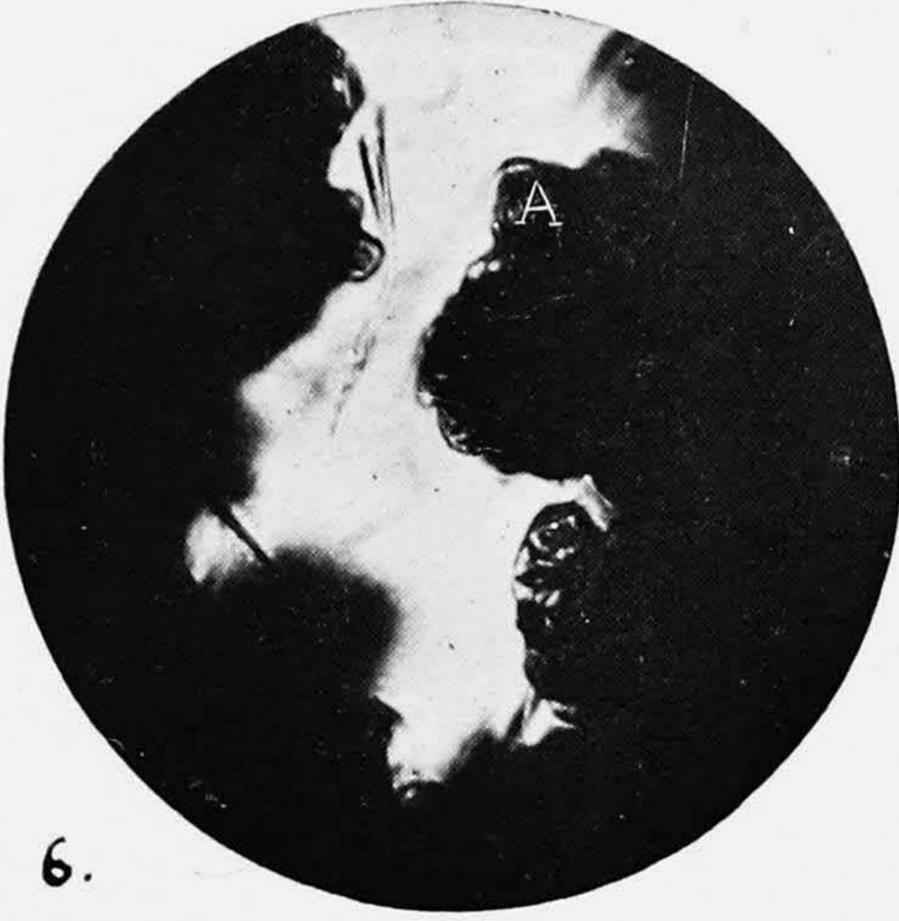
3.



4.



5.



6.

7.

8.

9.

10.

11.

F. X. Skupiński.