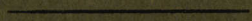


C. SIRONVAL

EXPÉRIENCES

SUR LES STADES DE DÉVELOPPEMENT
DE LA FORME FILAMENTEUSE EN CULTURE
DE *FUNARIA HYGROMETRICA* L.



IMPRIMERIE J. DUCULOT, ÉDITEUR GEMBLoux

EXPÉRIENCES SUR LES STADES DE DÉVELOPPEMENT DE LA FORME FILAMENTEUSE EN CULTURE DE *FUNARIA HYGROMETRICA* L.

par C. SIRONVAL
Licencié en Sciences Botaniques.

I. — INTRODUCTION.

Les phénomènes de morphogénèse qui accompagnent le développement des végétaux supérieurs ont fait l'objet de nombreuses recherches au cours des 20 dernières années. Peu de travaux sont consacrés aux végétaux inférieurs. Pourtant le matériel qu'ils fournissent semble propice. (Voir à ce propos Hämmerling (1934) Kühn et Moewus (1940)).

C'est pourquoi nous avons songé à aborder l'étude du développement et de la morphogénèse chez les végétaux en utilisant des organismes simples chez lesquels ces phénomènes sont bien visibles dès les 1^{ers} stades.

Monsieur le Professeur Bouillenne nous a suggéré de prendre comme matériel une Muscinée.

On sait que ces végétaux se présentent, au cours de la vie du gamétophyte, sous deux formes différentes. La germination de la spore donne un ensemble de filaments, le *protonéma*, sur lequel apparaissent plus tard *des tiges feuillées*.

Nous nous sommes fixé le but de rechercher les facteurs qui interviennent dans la formation de la tige à partir du protonéma filamenteux.

Il s'agit d'abord de connaître comment se présente le protonéma au cours de sa croissance et de repérer si certains phénomènes n'y précèdent pas la formation des tiges.

Cette partie de notre travail fait l'objet de la présente note.

Selon les auteurs, le protonéma revêt plusieurs aspects. Il y a deux écoles (Tableau I).

L'École de MULLER-THURGAU (1874) envisage l'existence d'un *sporen-vorkeim*, ensemble de filaments issus de la spore. Le *sporen-vorkeim* comprend des filaments verts à parois transversales droites (pour Müller, c'est le protonéma proprement dit)

et des filaments bruns à parois transversales obliques que MÜLLER désigne, sous le nom de rhizoïdes. Parallèlement au sporen-vorkeim, MÜLLER distingue un *zweig-vorkeim*, ensemble de filaments en connection avec les tiges. Le *zweig-vorkeim* comporte des filaments principaux à parois transversales obliques, desquels partent des ramifications disposées selon un ordre bien défini. Les filaments de protonéma sont donc classés par MULLER selon leur *origine* (*sporen* et *zweig-vorkeim*), la forme variant avec celle-ci.

TABLEAU I

MULLER-THURGAU (1874)

« Sporenvorkeim »		« Zweigvorkeim »
= tout filament issu de la spore.		= des filaments en connection avec la Tige qui lui servent de rhizoïdes, mais peuvent aussi assurer la propagation végétative.
<hr/> <i>protonéma</i> → pénètre dans le sol → <i>rhizoïdes</i> .		
1) Cloisons transversales perpendiculaires à l'axe de croissance.	1) Cloisons transversales obliques sur l'axe de croissance.	1) cloisons transversales obliques disposées d'une certaine façon (th. de Müller).
2) filaments chlorophylliens.	2) filament non chlorophyllien.	2) disposition spéciale des ramifications le long du filament.

CORRENS (1899)

Protonéma = l'ensemble de tout ce qui est filamenteux.

<i>Chloronéma.</i>		<i>Rhizoïdes.</i>
1) cloisons transversales perpendiculaires à l'axe.	Toutes les formes intermédiaires sont possibles.	1) cloisons transversales obliques sur l'axe.
2) nombreux chloroplastes bien formés.		2) très petits chloroplastes ou leucoplastes.
3) les membranes ne brunissent pas.		3) les membranes brunissent avec l'âge.

WESTERDIJCK (1907)

<i>Protonéma</i>		<i>Rhizoïdes.</i>
1) cloisons transversales perpendiculaires à l'axe de croissance.	Beaucoup de formes de passage.	1) cloisons transversales obliques par rapport à l'âge de croissance.
2) membrane non colorée.		2) les membranes se colorent en brun ou en rouge.
3) le filament entier rempli de chloroplastes.		3) les extrémités des filaments sans couleur remplis de protoplasme.
4) les ramifications de la grosseur du filament principal.		4) Leucoplastes petits et allongés.
	D'où	5) les ramifications souvent plus fines que le filament principal.
= les 2 formes extrêmes d'une même chose.		

L'autre école, celle de CORRENS (1899), contrairement à la première, ne tient aucun compte de l'origine des filaments. Ceux-ci se présentent sous deux aspects *morphologiques* bien définis : le *chloronéma*, filaments verts à parois transversales droites, et les *rhizoïdes*, filaments bruns à parois transversales obliques, entre lesquels tous les intermédiaires existent. Il n'y a pas de correspondance entre l'origine et la forme des filaments.

Les descriptions présentées par MULLER et CORRENS, ainsi que par l'ensemble des auteurs qui les suivent (WESTERDIJK 1907 ; SERVETTAZ, 1913 ; CHALAUD, 1932) sont fort imparfaites. Elles constituent certes des classifications commodes pour donner un nom à tel ou tel objet qu'on a sous les yeux ; mais elles ne permettent pas de se rendre compte du moment auquel le protonéma se présente sous tel ou tel aspect au cours de sa vie.

Ce n'est pas l'effet du hasard : cette imprécision résulte des méthodes d'observation.

Les anciens cultivent sur du terreau, les modernes sur de l'agar, mais les uns et les autres prélèvent les filaments des cultures sans noter *l'âge* de ces cultures, ni *l'endroit* où le prélèvement a été effectué. Il en résulte qu'on mêle dans une même préparation, sans s'en rendre compte, des filaments jeunes à des filaments vieux.

La seule méthode d'observation qui nous paraît rigoureuse et légitime consiste à suivre *sans rien déranger* la croissance des filaments depuis la germination jusqu'à l'apparition de la tige, dans des conditions bien déterminées.

C'est ce que nous avons fait.

Nous avons réalisé des cultures pures de FUNARIA HYGROMETRICA L (1) en boîte de Pétri et en Erlenmeyer sur gélose additionnée de la solution qu'El. et Em. Marchal mirent au point en 1906 (2). Les cultures ont été disposées en serre et nous avons observé à travers le couvercle des boîtes de Pétri la croissance des filaments. Nous avons ainsi repéré sur le vivant un certain nombre de phénomènes caractéristiques qui marquent les étapes du développement. Chaque aspect a été étudié ensuite, sur le vivant, au fort grossissement (préparation à l'eau), lorsque sa localisation dans le temps et dans l'espace avait été enregistrée. Toutes les cultures en boîtes de Pétri et en Erlenmeyer montrent les mêmes stades.

(1) Les cultures sont obtenues selon les techniques de culture de tissus mises au point par Gautheret. Les sporanges sont passés à l'alcool, on les ouvre ensuite et on ensemence aseptiquement.

(2) La solution de Marchal contient pour 1 litre d'eau distillée :

Nitrate d'ammonium	1 gr
Sulfate de potassium	0,5 gr
Sulfate de magnésium	0,5 gr
Sulfate de calcium	0,5 gr
Phosphate d'ammonium	0,5 gr
Sulfate de fer	0,01 gr

2. — LES STADES MORPHOLOGIQUES DU DÉVELOPPEMENT DE FUNARIA HYGROMETRICIA L. DE LA SPORE A LA TIGE.

Immédiatement après la germination de la spore et pendant une vingtaine de jours, le protonéma consiste en un ensemble de filaments verts, ramifiés peu abondamment et irrégulièrement. Chacun de ces filaments est issu des divisions successives d'une cellule apicale unique et est constitué de cellules identiques disposées les unes derrière les autres. Les parois qui séparent les cellules sont perpendiculaires à l'axe de croissance du filament, ou très légèrement obliques. Si on observe les cellules sur le vivant, sans coloration, les noyaux sont invisibles ou à peine discernables, même dans celles qui contiennent relativement peu de chloroplastes. Ces derniers sont gros, aplatis, elliptiques. Ils sont appliqués contre la membrane et forment une véritable gaine (fig. 1 et 2) laissant au centre un espace qui paraît être occupé par une vacuole. La membrane est hyaline.

Nous proposons d'appeler l'ensemble de ces filaments *chloronéma* du nom utilisé par CORRENS pour désigner des filaments intensément verts, qui paraissent être du même type (gros chloroplastes, parois transversales droites).

Le chloronéma est incapable de faire des tiges. On peut, dans certaines conditions, le conserver en culture jusqu'à la mort (80 jours) sans que les tiges feuillées se forment. Dans les conditions de culture normales, en serre, à la lumière naturelle, le chloronéma cesse de grandir au bout de 20 à 45 jours. A ce moment, la plupart de ses cellules dégénèrent, se vident et brunissent, les chloroplastes disparaissent (Fig. 3, 4, 5). Cependant, certaines cellules *apicales* restées vivantes et bien vertes changent de forme, puis se divisent rapidement, constituant un filament principal qui se ramifie fortement et régulièrement (Fig. 6, 7, 8, et 21).

La nouvelle formation qui s'organise est fort différente du chloronéma : *elle est seule capable de donner naissance à des tiges* (fig. 22). Pour cette raison, nous proposons de l'appeler *Caulonéma*. La cellule apicale du filament principal de caulonéma est très chlorophyllienne, mais les chloroplastes y sont petits et ronds, toujours beaucoup plus nombreux à l'apex qu'ils bourrent (Fig. 9, 10 et 11). Le noyau est bien visible sur le vivant. Il est volumineux, muni d'un gros nucléole hyalin, et situé en général dans la partie centrale de la cellule.

Le filament principal, provenant des divisions successives de la cellule apicale, a des parois obliques sur l'axe (fig. 9 et 12). Chaque cellule est munie d'un petit nombre de chloroplastes. Le noyau, visible sur le vivant, est du même type que celui de la cellule apicale (fig. 12). Les parois brunissent avec l'âge mais on n'observe pas de phénomènes de dégénération semblables à ceux qui caractérisent le chloronéma (fig. 8).

Chaque cellule du filament principal porte une ramification située toujours contre la paroi transversale apicale (Fig. 7 et 8). Les ramifications sont beaucoup plus chlorophylliennes que le filament principal. Leurs membranes transversales sont droites en général ; les noyaux invisibles sur le vivant (fig. 13).

Elles portent elles-mêmes des ramifications secondaires qui à leur tour en portent souvent de tertiaires, toutes du même type (Fig. 8).

Le caulonéma grandit pendant deux à trois mois, couvrant souvent à partir d'un semi normal une surface de 10 à 15 cm. carrés. *Vers le 60^e jour, les tiges apparaissent.* Elles se forment dans nos conditions de culture, à partir d'une cellule bien déterminée : la cellule de base de la ramification primaire du filament principal de caulonéma (fig. 14 et 22). Les tiges ne se forment donc pas n'importe où sur le protonéma : une seule cellule du caulonéma *peut dans nos conditions de culture, leur donner naissance.*

La première manifestation visible de la formation d'une tige consiste en une hernie latérale qui gonfle fortement à partir de la cellule de base d'une ramification primaire et se sépare par une paroi (suivre sur les fig. 14, 15 et 16). La nouvelle cellule ne s'allonge pas selon un axe principal ; elle grossit et se divise par une cloison inclinée à 45 degrés sur l'axe, paroi (1). La cellule supérieure a la forme d'une calotte sphérique : elle garde cet aspect et bientôt une cloison y apparaît inclinée également de 45 degrés sur l'axe, mais faisant avec la paroi (1) un angle de 60 degrés, paroi (2). La 3^e division de la cellule supérieure se fait encore selon un plan incliné à 45 degrés sur l'axe ; ce plan fait avec chacune des parois (1) et (2) un angle de 60 degrés, paroi (3). On obtient ainsi au sommet une cellule (D) dont la paroi supérieure est sphérique et dont les trois parois inférieures, toutes inclinées sur l'axe de 45°, font entre elles des angles de 60 degrés.

Dans la suite, les cellules extérieures A', A'', B', B'', se multiplient rapidement, sans qu'il soit possible de définir de règle stricte, et forment un grand nombre de cellules fortement gonflées. En même temps, la cellule apicale se divise selon des plans parallèles aux trois parois inférieures, d'abord à la paroi (1) puis à la paroi (2) et ainsi de suite.

Le bourgeon se présente alors comme une petite boule dont la partie inférieure est constituée de grandes cellules disposées un peu au hasard, tandis que la partie supérieure, avec la cellule apicale en son centre, est formée de cellules plus petites et agencées régulièrement (fig. 16).

Bientôt, certaines cellules de la base du bourgeon s'étirent ; une division par un plan oblique se produit dans chacune d'elles, donnant des cellules apicales de filaments rectilignes, à parois transversales obliques, peu ramifiées, croissant rapidement vers le bas, mais dont la longueur ne dépasse pas 1 cm. dans nos cultures. Ces organes, qu'il serait utile d'étudier en détail, sont propres à la tige et apparaissent avec elle. Nous proposons de leur réserver exclusivement le nom de *rhizoïdes* (Fig. 16, 20 et 22).

Nos observations montrent que le développement de FUNARIA HYGROMETRICA L. de la spore à la tige comporte quatre étapes morphologiques successives : la spore, le chloronéma, le caulonéma, la tige porteuse de rhizoïdes. Au stade chloronéma, comme au stade caulonéma, la mousse revêt une forme filamenteuse à l'ensemble de laquelle nous proposons d'appliquer l'ancien terme : protonéma. Ainsi, le protonéma présente deux stades : le chloronéma, auquel succède le caulonéma. Les tiges se forment uniquement à partir du caulonéma qui joue dans le processus un rôle essentiel. Nous allons nous attacher à rechercher les conditions de la production du caulonéma par le chloronéma.

TABLEAU II

N° des cultures	Époque à laquelle la croissance du chloronéma débute, (Germination)	Surface au 6 ^e j. : après la germination mm ²	S											
			au 15 ^e j.	au 18 ^e j.	au 24 ^e j.	au 27 ^e j.	au 31 ^e j.	au 37 ^e j.	au 41 ^e j.	au 48 ^e j.	au 66 ^e j.			
		mm ²	mm ²	mm ²	mm ²	mm ²	mm ²	mm ²	mm ²	mm ²	mm ²	mm ²	mm ²	mm ²
48	6 ^e jour	3	3	12	12	12	12	12	12	12	12	26	37	170
49	6 ^e j.	2	2	16	16	16	16	16	16	16	16	33	68	164
50	6 ^e j.	2	2	10	10	10	10	10	10	10	10	21	24	130
51	6 ^e j.	3	14	14	14	14	14	14	14	14	14	46	86	197
52	3 ^e j.	5	22	54	61	61	61	61	61	61	61	313	on prélève du caulonéma	
53	2 ^e j.	8	58	78	86	86	86	86	86	86	86	219	on prélève du caulonéma	
54	3 ^e j.	5	20	36	39	36	39	36	39	36	39	138	163	213
55	3 ^e j.	3	3	18	18	18	18	18	18	18	18	48	90	212
56	2 ^e j.	3	20	30	—	—	—	—	—	—	—	120	193	497

DIAGRAMME 1

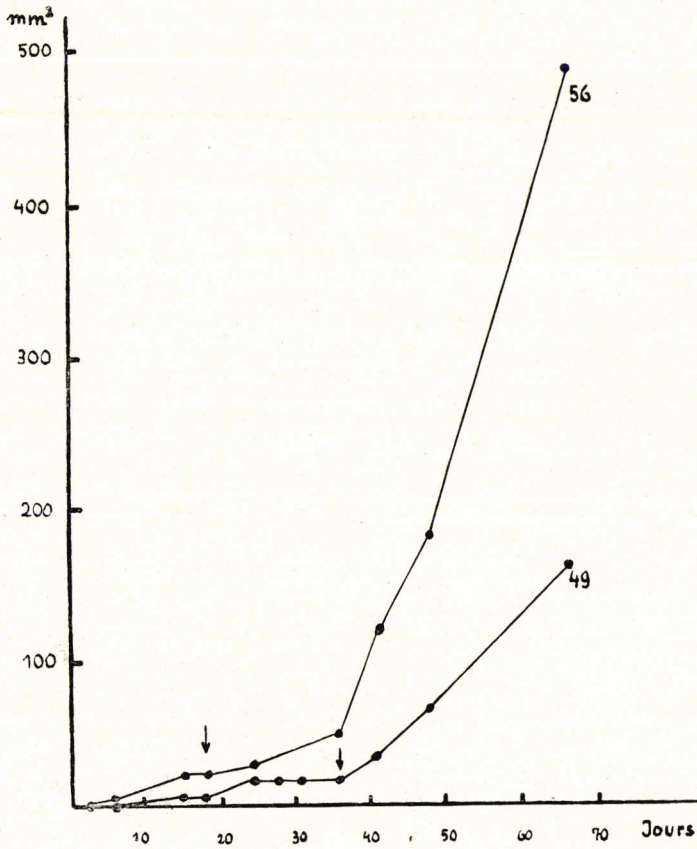


DIAGRAMME I — Courbe de croissance de deux cultures pures à la lumière naturelle.
La flèche indique le moment où apparaît le caulonéma. Juste avant la flèche, le plateau qui fait suite à la période de croissance du chloronéma.
Chaque courbe représente la croissance d'une culture (culture 56 et culture 49).

3. — RECHERCHE DES FACTEURS CAPABLES D'INFLUENCER LA PRODUCTION DU CAULONÉMA PAR LE CHLORONÉMA.

Pour déterminer le moment précis de l'apparition du caulonéma dans les cultures nous nous sommes servis des courbes de croissance du protonéma.

A la lumière naturelle, on peut établir ces courbes en mesurant à intervalles réguliers la surface occupée sur l'agar par le protonéma. Cette opération se fait à l'aide d'un papier cadrillé en mm².

A la lumière artificielle, on mesure de la même manière la croissance du caulonéma. Mais celle du chloronéma, qui, dans ces conditions, se dresse verticalement vers la source de lumière, est étudiée à l'aide d'un cathétomètre. La croissance est donnée dans ce cas, non en mm², mais en mm.

A. Culture du protonéma à la lumière naturelle.

La courbe de croissance du protonéma, à la lumière naturelle, en serre, sur agar additionné de la solution nutritive de MARCHAL, en culture pure, présente deux cycles successifs séparés par un plateau (diagr. 1 ; Tab. II). Il y a d'abord entre le semi et la germination une période de 2 à 6 jours, puis le protonéma se met à croître, d'abord si lentement qu'il est à peine possible de noter sa croissance, puis beaucoup plus vite, jusqu'à atteindre une certaine surface (15^e jour pour les cultures 51, 52, 53, 54, 56 et 24^e jour pour les cultures 48, 49, 50, 55), à laquelle il stationne pendant 3 à 12 jours pour repartir au 18^e et au 36^e jour (Voir l'aspect des cultures âgées de 43 jours, fig. 21).

Les préparations microscopiques faites chaque jour montrent que le 1^{er} cycle correspond à la croissance du chloronéma ; le second, à celle du caulonéma.

Si on suit sur le diagramme 1, culture 56, on rencontre au départ une période de croissance lente allant de la germination au 15^e jour (1^{er} cycle : chloronéma) ; puis un court plateau ; puis au 18^e jour une brusque reprise de croissance qui correspond à la production du caulonéma (2^e cycle, flèche).

La courbe de la culture 49 du diagramme I a la même allure que la courbe de la culture 56, mais ici le plateau est très long.

Toutes les cultures à la lumière naturelle présentent les deux cycles et le plateau : *le chloronéma produit toujours du caulonéma entre le 18^e et le 36^e jour* (Tableau II).

B. Culture du protonéma à la lumière artificielle, à la cave.

a) *Première expérience. — Culture en lumière artificielle continue.*

Si la culture se fait en lumière artificielle (1) continue, dans une cave parfaitement opaque à la lumière naturelle, à une température constante de 23 degrés, sur agar

(1) On éclaire à l'aide de 6 lampes Philips de 200 Watt distantes des cultures de 75 cm.

additionné de la solution de MARCHAL, on n'obtient pas de caulonéma pour autant qu'on travaille en culture pure. Le chloronéma très phototropique, s'allonge vers les lampes (Fig. 19 et 22) ; bientôt le palier est atteint : mais il n'y a pas de reprise de croissance, il n'y a pas de caulonéma (Diagr. 2 ; Tab. III).

DIAGRAMME 2

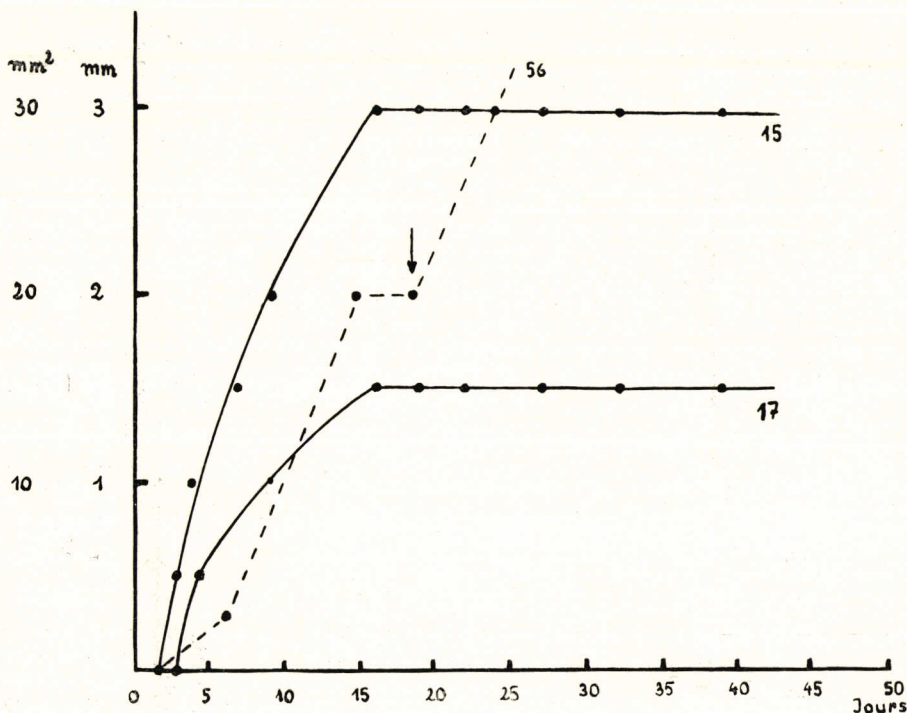


DIAGRAMME 2. — *En trait plein* : courbe de croissance des cultures pures 15 à 17 à la lumière artificielle : pas de caulonéma.

En pointillé : courbe de croissance de la culture pure 56 en lumière naturelle. Dans ce cas, (après la période de croissance du chloronéma et le plateau), reprise de croissance et apparition du caulonéma indiquée par la flèche.

L'observation microscopique confirme les conclusions tirées de la courbe.

On ne trouve jamais de caulonéma dans les cultures pures entretenues à la lumière artificielle continue.

b) *Deuxième expérience.* — *Alternance de périodes d'éclairage artificiel et de périodes d'obscurité.*

Il est possible que le caulonéma ne se forme pas dans l'expérience précédente

parce qu'on éclaire constamment les cultures. On sait que la photopériodicité joue un rôle dans certains phénomènes de développement (sexualisation, GARNER ET ALLARD, 1920). Il est donc utile de réaliser une expérience au cours de laquelle les cultures sont soumises à une alternance de 12 h. de lumière artificielle et de 12 h. d'obscurité.

Quatre Erlenmeyers ensemencés aseptiquement de spores ont été traités de cette façon. Nous n'avons pas obtenu de caulonéma (Tableau IV ; Diagr. 3).

DIAGRAMME 3

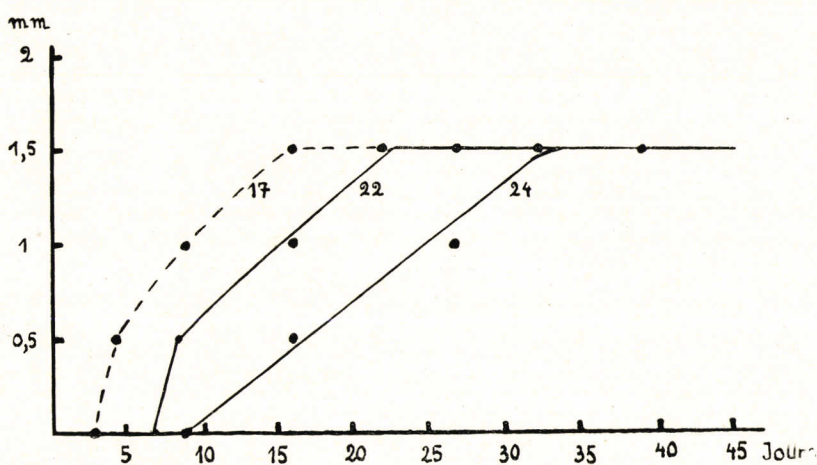


DIAGRAMME 3. — *En trait plein* : courbe de croissance des cultures pures 22 et 24 soumises à des alternances de 12 h. de lumière artificielle et de 12 h. d'obscurité.

En pointillé : courbe de croissance de la culture N° 17 exposée constamment à la lumière artificielle.

Dans les 2 cas : pas de caulonéma.

On constate que l'arrêt de croissance du chloroména se produit plus tard que dans le cas des cultures soumises à un éclairage continu (en pointillé sur le diagr. 3) ; il n'est pas suivi de reprise de croissance : *pas de caulonéma*.

c) *Troisième expérience*. — *Cultures soumises d'abord à l'éclairage naturel, ensuite à l'éclairage artificiel*.

La condition de culture : lumière naturelle en serre apparaît comme intervenant dans les processus responsables de la formation du caulonéma.

Nous nous sommes demandé s'il était nécessaire, pour obtenir du caulonéma, de laisser constamment les cultures à la lumière naturelle en serre. Il se pourrait que du chloronéma qui a grandi pendant un certain temps à la lumière naturelle ait acquis

certaines propriétés qui lui permettraient de se transformer en caulonéma, même après avoir été remis à la lumière artificielle, alors que, à la lumière artificielle, nous n'en avons jamais observé jusqu'ici. (Théorie des phases de développement de Lysenko, 1932-1934).

Nous opérons comme suit : 19 cultures pures sont placées en serre. Après 3 jours, une culture est mise en cave à la lumière artificielle ; après 6 jours, une seconde ; après 9 jours, une troisième et ainsi de suite pour 10 cultures. (Diagr. 4).

DIAGRAMME 4

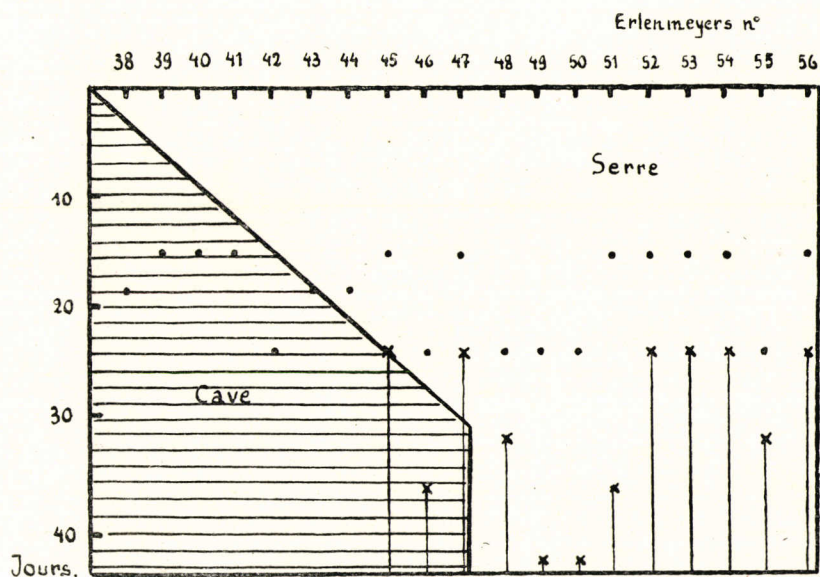


DIAGRAMME 4. — Les points correspondent à la fin de la croissance du chloronéma. L'apparition du caulonéma est indiquée par une croix.

Chaque culture est représentée par une droite parallèle à l'ordonnée. Par exemple, pour la culture 45, le chloronéma grandit jusqu'au 15^e jour marqué par un point. Puis c'est le plateau du 15^e au 24^e jour. A ce moment, reprise de croissance sous forme de caulonéma marquée par une croix. En même temps, la culture est mise en cave, à la lumière artificielle. Elle continue à grandir sous forme de caulonéma.

Pour la culture 41, au 12^e jour, elle va à la cave ; au 15^e jour, arrêt de croissance du chloronéma (point). Pas de croix = pas de reprise de croissance = pas de caulonéma.

Le diagramme 4 montre que les Erlenmeyer N. 38 à 44 qui sont restés moins de 24 jours à la lumière naturelle ne donnent pas de caulonéma à la lumière artificielle ; tandis que les Erlenmeyer qui sont restés plus de 24 jours à la lumière naturelle, ou bien donnent du caulonéma peu avant d'être mis en cave (qui continue à grandir dans ces conditions), ou bien, comme l'erlenmeyer 46, en forment en cave (36^e jour).

Toutes les cultures témoins qui restent à la lumière naturelle produisent normalement du caulonéma.

Nous dirons que pendant les 24 premiers jours, la condition de culture : lumière naturelle en serre, peut déterminer les réajustements biochimiques ou autres nécessaires à la production du caulonéma. Cette production peut alors s'observer même en lumière artificielle. *La lumière naturelle exerce donc une action déterminante sur la production du caulonéma en culture pure.*

C. — Culture du protonéma en présence de microorganismes.

Nous avons parlé jusqu'ici de cultures pures.

L'examen de documents publiés par SERVETTAZ (1913) montre que certains microorganismes ont un effet activant sur le développement. SERVETTAZ écrit qu'« une espèce à filaments blancs très étroits... et qui paraît être un *Oospora*... a une action particulièrement activante sur la végétation de *Phascum cuspidatum* », c'est-à-dire sur la croissance. L'auteur appuie son affirmation d'une photo qui montre deux tubes à essais, l'un pur, l'autre infecté : dans le premier, on constate la présence de protonéma, tandis que l'autre montre de longues tiges bien constituées. En réalité, cette action activante sur la « végétation » l'est aussi, selon nous, sur le développement.

Nous avons vérifié cette présomption.

Nous avons laissé s'infecter un certain nombre de cultures pures en les ouvrant à l'air. Alors qu'en lumière artificielle, les cultures pures ne contiennent que du chloronéma, nous avons constaté que la plupart des cultures infectées donnent du caulonéma en lumière artificielle.

Nous avons isolé une souche de *Penicillium* particulièrement active à cet égard (Fig. 17, 18, 19, 20). En nous servant de cette souche, nous avons réalisé les expériences suivantes.

a) *Première expérience :*

Si on infecte la culture au moment où on sème les spores, le chloronéma, même en lumière artificielle, produit du caulonéma. L'apparition du caulonéma a lieu entre le 25^e et le 45^e jour de culture ; ces dates sont analogues à celles que l'on obtient en lumière naturelle (Tableau V).

Le diagramme 5 montre l'aspect de la courbe de croissance de la Culture 71, infectée, à la lumière artificielle. Il y a d'abord le cycle du chloronéma, puis le plateau, puis le cycle du caulonéma.

TABLEAU V.

AGE DU CHLORONÉMA AU MOMENT DE L'APPARITION DU CAULONÉMA.			
Cultures infectées au départ, à la lumière artificielle.		Cultures pures, à la lumière naturelle.	
N° des cultures	Age du Chloronéma	N° des cultures	Age du Chloronéma
2	29	48	41
4	42	51	36
71	32	52	24
		56	18

DIAGRAMME 5

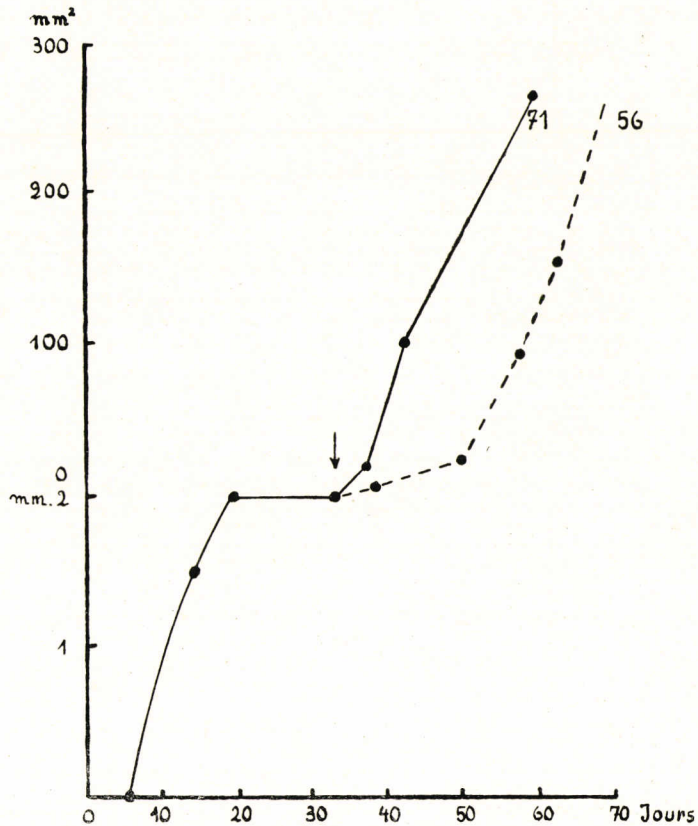


DIAGRAMME 5. — *En trait plein* : courbe de croissance de la culture 71 à la lumière artificielle en présence de Pénicillium. Jusqu'à la flèche, la croissance du chloronéma est mesurée en mm. Celle du caulonéma, qui fait suite, en mm².

En pointillé : courbe de croissance du caulonéma de la culture 56 en lumière naturelle. On voit que les courbes de croissance du caulonéma en lumière naturelle et artificielle ont à peu près même inclinaison (à peu près même vitesse de croissance).

La courbe de croissance du chloronéma de la culture 56 n'est pas indiquée.

b) *Deuxième expérience :*

Si on infecte non pas au moment du semis, mais après 9, 14, 20 etc. jours de culture, on constate que le caulonéma n'apparaît pas plus tard que lorsqu'on infecte au départ ; il se forme toujours entre le 25^e et le 45^e jour (Tableau VI). Plus on infecte tard, moins il faut de temps pour que le chloroména réponde à la présence de l'infection en produisant du caulonéma.

Le diagramme 6 montre que tout se passe comme si, entre le 25^e et le 35^e jour, le chloronéma était particulièrement sensible à la présence de la moisissure.

DIAGRAMME 6

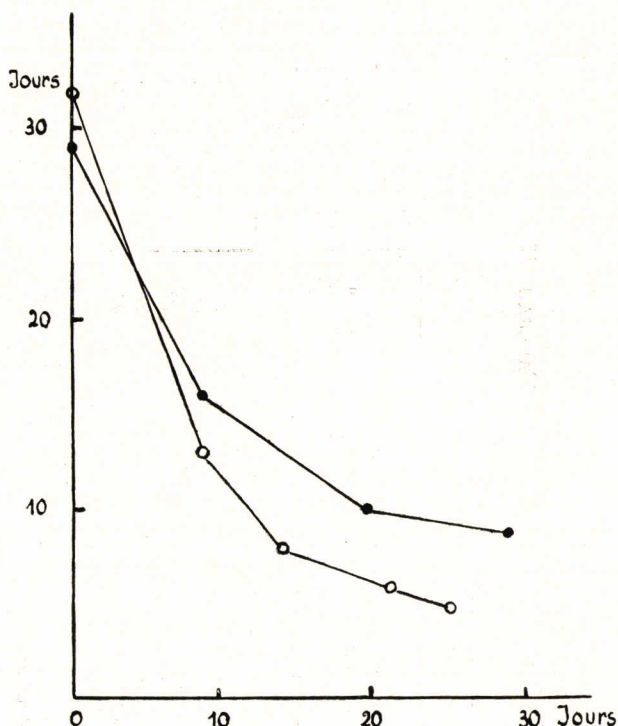


DIAGRAMME 6. — En abscisse le temps en jours pendant lequel la culture est restée pure (moment auquel on a infecté la culture, exprimé en jours). En ordonnée, le temps qu'il a fallu pour que le chloronéma réponde à l'introduction des moisissures en donnant du caulonéma. Chaque courbe correspond à une série d'expériences.

c) *Troisième expérience.*

Si on infecte un mois avant d'effectuer le semis, le caulonéma apparaît, dans les

TABLEAU VI

1 ^{re} Série + Infections diverses					2 ^{me} série + Penicillium Sp.					Témoins	
N ^o Cult.	Résultat	Age du Chloronéma lors de l'infection (A)	Époque de l'apparition du Caulonéma (B)	(B --- A)	N ^o Cult.	Résultat	Age du Chloronéma lors de l'infection (A)	Époque de l'apparition du Caulonéma (B)	(B --- A)	N ^o Cult.	Résultat
2	+	0 j.	29	29	71	+	0 j.	32 j.	32	18	—
3	+	0 j.	42	42	69	+	9 j.	22 j.	13	26	—
21	+	9 j.	25	16	70	+	14 j.	22 j.	8	27	—
4	+	20 j.	30	10	72	+	21 j.	27 j.	6	28	—
1	+	29 j.	38	9	74	+	25 j.	30 j.	5	29	—
										73	—

+ = c aulonéma.
 — = pas de caulonéma.

limites de temps normales, entre le 25^e et le 45^e jour (Tableau VII). Le séjour préalable du *Penicillium* dans le milieu ne permet pas d'obtenir du caulonéma plus rapidement.

Tous ces faits peuvent s'interpréter en admettant :

- 1) que les infections, et en particulier la souche de *PENICILLIUM* isolée, fournissent au milieu une ou plusieurs substances qui favorisent la production du caulonéma ;
- 2) que le chloronéma est particulièrement sensible à l'égard de ces substances entre le 25^e et le 35^e jour à cause de la présence dans le chloronéma de cet âge exclusivement d'une ou plusieurs autres substances indispensables à la production du caulonéma.

L'expérience suivante semble confirmer cette interprétation :

d) *Quatrième expérience.*

Nous ensemençons 10 Erlenmeyer aseptiquement et nous les plaçons à la lumière artificielle. Le chloronéma se développe jusqu'à la mort sans donner de caulonéma.

Au 82^e jour, nous infectons deux de ces Erlenmeyer, contenant du chloronéma mort, à l'aide de *PENICILLIUM* et nous laissons se développer ce dernier pendant un mois. A ce moment, nous semons des spores (Tableau VIII, 2^e Série : (Chl + Pen + S) ; six autres Erlenmeyer reçoivent des spores et du pénicillium simultanément (Tableau VIII, 3^e Série (Chl) + Pen + S). Les deux Erlenmeyer restant reçoivent des spores seulement (Tableau VIII, 1^{re} Série : (Chl) + S).

Les résultats montrent que là où le *PENICILLIUM* est resté pendant un mois en contact avec l'agar sur lequel du chloronéma avait grandi jusqu'à la mort, le nouveau chloronéma semé donne du caulonéma au bout de six jours (Tableau VIII, 2^e Série). Lorsque l'infection a lieu au moment du second semis le caulonéma apparaît au 15^e et au 17^e jour (Tableau VIII, 3^e Série). Le chloronéma mort en culture pure ne provoque pas le passage du chloronéma à l'état de caulonéma (Tableau VIII, 1^{re} Série)

Ainsi, dans les cultures où le *PENICILLIUM* se trouve en présence de chloronéma mort, le passage du chloronéma jeune au stade caulonéma s'effectue beaucoup plus tôt que normalement. Le meilleur résultat est obtenu dans le cas où le *Penicillium* a séjourné 1 mois en présence du chloronéma mort avant le second semis de spores (Tableau VIII, 2^e série).

Il faut admettre que, dans ce cas, le chloronéma jeune a d'emblée à sa disposition tous les éléments nécessaires à sa transformation en caulonéma. Certains de ces éléments proviennent du *PENICILLIUM* ; d'autres sont fournis par le chloronéma. Cette interprétation confirme celle que nous émettons plus haut sur la base des résultats des trois premières expériences réalisées en présence de microorganismes : le chloronéma fournit entre le 25^e et le 35^e jour une ou plusieurs substances indispensables à la production de caulonéma.

La quatrième expérience précise que ces substances diffusent dans l'agar (ou à sa surface) et s'y maintiennent même après la mort du chloronéma.

TABLEAU VIII.

N° des Cult.	Temps séparant les 2 semis	Résultat	Age du Chl. lors de l'app. du Caulo
[(Chl) + S] 1 ^{re} série			
62	113 j	—	
31	113 j	—	
[(Chl + Pen) + S] 2 ^e série			
22	113 j	+	6 j
24	113 j	+	6 j
[(Chl) + Pen + S] 3 ^e Série.			
26	113 j	+	17 j
27	113 j	+	15 j
29	113 j	+	15 j
30	113 j	+	17 j
32	113 j	+	17 j
61	113 j	+	15 j

TABLEAU VII.

[(Pen) + S]		
N° des Cult.	Temps de séjour du Pen.	Age du Chl. lors de l'app. Caulo
1L	31 j	32 j
21	31 j	27 j
31	31 j	36 j

+ = Caulonéma.
— = pas de caulonéma.

D. — Cultures du protonéma en présence de glucose, d'acides aminés et de diverses vitamines et hormones.

Quels sont ces substances ?

Nous avons essayé d'obtenir du caulonéma à la lumière artificielle en culture pure en additionnant du glucose, des acides aminés ou diverses vitamines et hormones au milieu de MARCHAL (voir p. 50).

L'aneurine, l'extrait de levure, peut-être l'acide ascorbique, agissent favorablement sur la croissance du chloronéma (Tableau IX ; diagr. 7).

DIAGRAMME 7

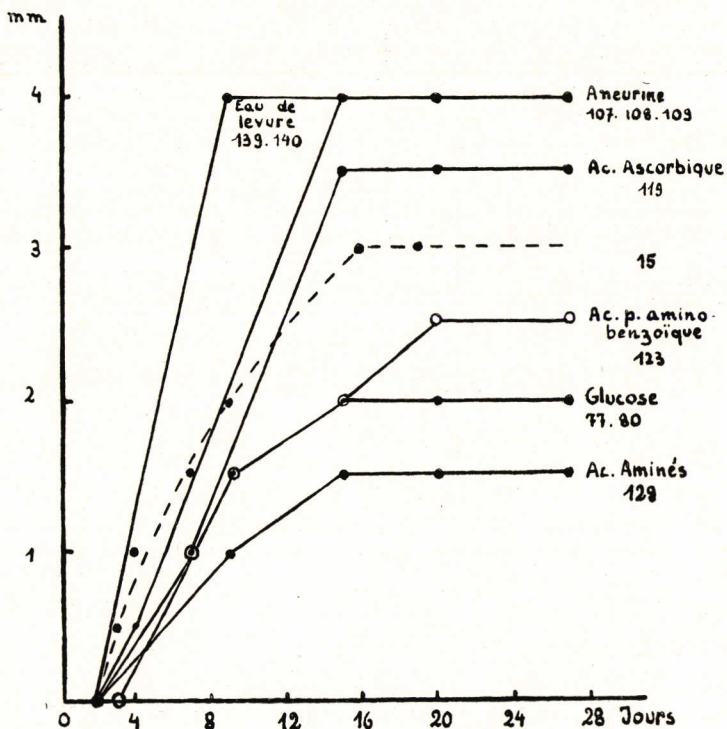


DIAGRAMME 7. — *En trait plein* : courbes de croissance du chloronéma à la lumière artificielle sur milieu de Marchal en présence de diverses substances.

En pointillé : courbe de croissance du chloronéma à la lumière artificielle sur milieu de Marchal seul. Nous avons reproduit la courbe de la culture 15 qui représente la croissance maximum que nous avons jamais observé en lumière artificielle sur milieu de Marchal seul.

On voit que en présence d'eau de Levure, d'Aneurine et peut-être d'acide ascorbique, la croissance est accélérée. Les autres substances utilisées n'ont pas d'effet activant. Les courbes ont l'allure normale (Cf. diagramme 2).

En aucun cas, on n'observe de reprise de croissance après l'établissement du plateau = *pas de caulonéma*.

TABLEAU IX.

Produit	N° de l'erenmeyer	Date de la germination	Hauteur	H	H	H	H	Caulonéma
			au 4 ^e J. après la germination mm	9 ^e j. mm	15 ^e j. mm	20 ^e j. mm	27 ^e j. mm	
+ Glucose	77	2 ^e jour	—	1,5	2	2	2	—
	78	2 ^e j	—	1	1,5	1,5	1,5	—
	80	2 ^e j	—	1,5	2	2	2	—
+ Aneurine	107	2 ^e j	0,5	2	4	4	4	—
	108	2 ^e j	—	2	4	4	4	—
	109	2 ^e j	0,5	2	3,5	3,5	3,5	—
+ Ac. nicotinique	110	3 ^e j	—	1,5	2,5	2,5	2,5	—
	111	3 ^e j	—	1,5	2	2	2	—
+ Adénine	114	2 ^e j	—	—	1	2,5	2,5	—
	115	2 ^e j	0,5	—	1,5	1,5	1,5	—
+ Ac. Ascorbique	119	2 ^e j	—	1,5	3,5	3,5	3,5	—
	121	3 ^e j	—	0,5	1			—
+ Ac. p. amino benzoïque	123	3 ^e j	—	1,5	2	2,5	2,5	—
+ Heteroauxine	136	3 ^e j	—	2	3	3	3	—
	137	3 ^e j	—	2	3	2,5	(2,5)	—
+ Ac. aminé	129	2 ^e j	—	1	1,5	1,5	1,5	—
+ Riboflavine	141	2 ^e j	—	1,5	2,5	2,5	2,5	—
+ Extrait de levure.	139	2 ^e j	—	4	Mort.			—
	140	2 ^e j	—	4	Mort.			—

(Comparer au témoin, Tableau III).

La plupart des substances utilisées font se multiplier la cellule apicale du chloronéma qui construit des formations spéciales (fig. 23) ; *mais en aucun cas nous n'avons obtenu de caulonéma.*

Les produits utilisés activent la division cellulaire ; *ils n'ont pas d'effet sur le développement.*

4. — DISCUSSION.

La théorie classique enseigne que le cycle biologique des Mousses comprend trois stades de développement de la spore à la tige : la spore, le protonéma, la tige.

Les observations que nous avons effectuées nous permettent d'affirmer l'existence de quatre stades au moins : la spore, le chloronéma, le caulonéma la tige porteuse de rhizoïdes. Le chloronéma est incapable de donner naissance à des tiges : celles-ci se forment uniquement sur le caulonéma (schéma de la fig. 24).

Il est difficile de se rendre compte des relations exactes à faire entre les formes protonémiques décrites par les auteurs et celles que nous observons. Ainsi la forme dite chloronéma de CORRENS peut désigner pour cet auteur aussi bien les filaments

verts caractéristiques du 1^{er} stade du développement que les ramifications du caulonéma.

Nous nous proposons de faire un exposé de ces relations dans un article ultérieur.

SERVETTAZ (1913) semble s'être rendu compte de l'existence du caulonéma. Il distingue une forme rampante et une forme dressée du protonéma, mais la distinction qu'il fait se borne à cela. En fait, SERVETTAZ exprime ainsi les divergences de comportement vis-à-vis de la lumière du chloronéma et du caulonéma. (voir p 55.).

A un autre endroit de son travail SERVETTAZ constate que chez *Phascum cuspidatum* les tiges apparaissent d'abord sur le protonéma qui entoure l'endroit où on a effectué le semis, à une certaine distance de ce semis. Il reproduit une photo de ce phénomène. Il l'explique en invoquant l'effet de la lumière, plus forte, dit-il, sur les bords. Il est à noter que la culture se fait en boîte de Pétri. En réalité, au centre se trouve le chloronéma et sur les bords, le caulonéma. (Cf fig. 22).

* * *

Les résultats des expériences sur les facteurs qui influencent la production du caulonéma par le chloronéma, nous autorisent à formuler les hypothèses suivantes :

1) **la transformation du chloronéma en caulonéma est un phénomène complexe qui précède la formation des tiges et la prépare. Ce phénomène est réglé par la présence de deux complexes de substances (ou de deux substances) au moins.** (§ C, exp. 1, 2, 3, 4).

2) **Tous deux sont synthétisés à la lumière naturelle par le chloronéma** (§ A et § B exp. 3).

3) **A la lumière artificielle l'un d'entre eux n'est pas synthétisé par le chloronéma. Il peut être dans ce cas fourni par certaines moisissures** (§ B exp. 1 et 2, et § C exp. 1).

4) **Ils diffusent dans l'agar de nos cultures** (§ C, exp. 4).

Une cinquième hypothèse se dégage de nos observations. Elle résulte du fait que la production de caulonéma a lieu, dans chacune des conditions expérimentées, à une époque bien déterminée. La voici :

5) **Ces complexes de substances (ou ces substances) n'entrent en action que lorsqu'ils ont atteint tous deux une certaine concentration dans les cellules.** Cette concentration est obtenue pour la ou les substances provenant du chloronéma entre le 25^e et le 45^e jour ; en un temps plus court (10 jours?) pour celles qui proviennent de la moisissure.

Ces cinq hypothèses expliquent l'ensemble des faits que nous avons observés, en particulier, les expériences concernant l'action des moisissures sur la formation du caulonéma (§ C) :

1^{re} expérience. La ou les substances manquant en lumière artificielle sont fournies par des moisissures. Il faut attendre 25 à 45 jours pour que la ou les substances synthétisées par le chloronéma soient en concentration utile.

2^e expérience. La ou les substances manquant en lumière artificielle sont fournies par la moisissure en un temps très court et utilisées par le chloronéma immédiatement (le tout en 5 jours et 9 jours au minimum). On peut introduire la moisissure fort tard, le caulonéma apparaît dans les limites de temps normales.

3^e expérience. La ou les substances synthétisées par le chloronéma ne sont en concentration utile qu'entre le 25^e et le 45^e jour.

4^e expérience.

dans la 1^{re} série : [(Chl) + S], la ou les substances provenant de la moisissure sont absentes.

dans la 2^e série : [(Chl + Pen) + S], la ou les substances provenant du chloronéma et celles provenant de la moisissure sont présentes d'emblée.

dans la 3^e série : [(Chl) + Pen + S], la ou les substances provenant de la moisissure sont absentes au début. Elles ne sont à la concentration désirée qu'au bout de 15 à 17 jours.

On remarque que dans la 2^e expérience, la concentration utile des substances provenant de la moisissure est obtenue en cinq jours dans une série et en 9 dans une autre, alors que dans la 3^e série de la 4^e expérience, il faut attendre 15 à 17 jours.

Il est évident qu'une étude approfondie, quantitativement très précise de ces phénomènes doit être entreprise.

Nous tenons à remercier vivement Monsieur le Professeur BOUILLENNE pour l'aide précieuse et les conseils qu'il ne nous a pas épargnés au cours de la réalisation de ce travail.

*Laboratoire de physiologie végétale
de l'Université de Liège — 1946.*

LITTÉRATURE

1. CHALAUD G., *Germination des spores et phase protonémique*. Manual of Byology, p. 89-108, 1932.
 2. CORRENS C., *Untersuchungen über die Vermehrung der Laubmoose durch Brutorgane und Stecklinge*. Jena 1899.
 3. GARNER et ALLARD, *Effect of the relative length of day and night on flowering and fruiting of Plants*. Smithsonian report : p 569-588, 1920.
 4. GAUTHERET R. J., *Manuel technique de Culture des tissus végétaux*. Paris 1942.
 5. HÄMMERLING J., *Entwicklungs physiologische und genetische Grundlagen der Formbildung bei der Schirmalge Acetabularia*. Naturwissenschaften **22**, 1934.
 6. KUHN R. et MOEWUS F., *Naturwis.* **73**, 547, 1940.
 7. LYSENKO, *Fundamental results of research on vernalisation of agricultural plants*. Bull. Jarovizacii **4**, 1-57, 1932 :
LYSENKO, *Physiology of Plant development in Breeking work*. Semenovadstro, **2**, 20-31, 1934.
 8. MARCHAL EL. et EM., *Recherches expérimentales sur la sexualité des spores chez les mousses dioïques*. Mém. Ac. Sc. Nat. Bruxelles 1906.
MARCHAL EL. et EM., *Aposporie et sexualité chez les Mousses*. Bull. Acad. Roy. Belg. I 1907. II 1909. III 1911.
 9. MULLER THURGAU H., *Die Sporenvorkeime und Zweigvorkeime*. Arbeiten der Bot. Instituts in Würzburg. 1^o. Band, p. 475-499.
 10. SERVETTAZ C., *Recherches expérimentales sur le développement et la nutrition des mousses en milieu stérilisé*. Annales des Sc. Nat. 9^e Série : **17** : 111-223, 1913.
-

EXPLICATION DES FIGURES

FIG. 1 : *Cellule apicale de chloronéma*. 500 X.

Le noyau n'est pas visible. En pointillé, les chloroplastes appliqués contre la membrane inférieure, vus de face. En traits pleins, les chloroplastes, vus de côté. En A. B. C. et D. des chloroplastes qui se divisent ou viennent de se diviser.

Les chloroplastes du plan supérieur ne sont pas représentés. La paroi transversale est perpendiculaire à l'axe de croissance (Cf. fig. 9).

FIG. 2 : *Filaments de chloronéma et la spore dans une culture de 10 jours*. 150 X.

La germination de la spore S a donné trois filaments de chloronéma. Le filament de droite subit une dégénérescence marquée (qui s'étendra au 20^e jour à tous les filaments).

Toutes les parois transversales sont perpendiculaires à l'axe de croissance. Pas de noyaux visibles. Gros chloroplastes bien visibles et peu nombreux.

FIG. 3 : *Cellules de chloronéma dont le contenu s'altère*. 210 X.

On voit en (A) les chloroplastes qui dégénèrent.

FIG. 4 : *Cellule apicale de chloronéma vidée de son contenu*. 210 X.

FIG. 5 : *Cellule de chloronéma en train de brunir*. 210 X.

A gauche et à droite, les deux cellules adjacentes sont vides, mais ne brunissent pas.

On voit nettement en (A) des taches plus brunes dans la membrane. En (B) le pigment se concentre contre la paroi.

Plus de structures intracellulaires visibles.

FIG. 6 : *Production de Caulonéma par le Chloronéma*. 56 X.

Dans le coin inférieur gauche, un amas de filaments de chloronéma (a). Un de ces filaments se ramifie en (B) et donne un grand nombre de filaments dont un va vers la droite (C) : il s'agit d'un filament principal de caulonéma ; on voit très bien les ramifications (R) très chlorophylliennes. (Cf. fig. 8).

On remarque que les cellules des filaments de chloronéma (a) sont pour la plupart vides de leur contenu — certaines sont gonflées (A).

Bien que la photo a été prise à travers l'agar, sans qu'aucun filament soit dérangé, on constate que le filament de chloronéma qui s'est ramifié en (B) est cassé en deux endroits (E) et (F). On voit en (D) qu'une substance diffuse dans l'agar à partir du chloronéma qui brunit. Cette substance est brune.

FIG. 7 : *Deux extrémités de filament principal de Caulonéma*. 75 X.

Photographie faite à travers l'agar.

Les ramifications du filament principal sont disposées très régulièrement. Chaque cellule du filament principal porte une ramification ; cette ramification est d'autant plus longue que la cellule qui lui a donné naissance est plus âgée.

On voit que les deux filaments se présentent de la même façon.

FIG. 8 : *Filament principal du Caulonéma (P) et ses ramifications (R) (partie moyenne du filament principal)*. 75 X.

FIG. 9 : *Dessin de la cellule apicale d'un filament principal de Caulonéma (à comparer avec la Fig. 1)*. 500 X.

(N) = le noyau. En (A), (B) et (C), figures de divisions de chloroplastes ; on remarque qu'elles sont voisines du noyau.

FIG. 10 : *Cellule apicale d'un filament principal de Caulonéma*. 175 X.

On voit en (A) que la membrane transversale est oblique.

En (N) le noyau avec son gros nucléole particulièrement bien visible.

Les chloroplastes, si petits qu'on les devine à peine, sont concentrés vers l'avant.

FIG. 11 : *Extrémité d'une cellule apicale de filament principal de Caulonéma*. 210 X.

On voit le nucléole (N) bien visible et les chloroplastes très nombreux et ronds.

FIG. 12 : Cellule du filament principal du Caulonéma voisine de la cellule apicale. 175 X.

En N, le noyau bien visible.

Petit nombre de chloroplastes, concentrés contre la paroi apicale. Membrane transversale apicale visible et oblique. En (A) et (B) hernies caractéristiques d'une ramification qui se forme à partir du filament principal.

FIG. 13 : Ramification du filament principal de Caulonéma (cellule apicale) 680 X.

La forme trapue et le grand nombre de chloroplastes sont très typiques. Le noyau est invisible. La membrane transversale est perpendiculaire à l'axe de croissance.

FIG. 14 : Schémas de la formation du Bourgeon.

Explications dans le texte.

FIG. 15 : Bourgeon au stade représenté en 3 sur la fig. 14.

Les lettres affectées aux cellules correspondent à celles de la fig. 14. On constate que le bourgeon est inversé par rapport à cette figure.

FIG. 16 : Bourgeon au moment de la formation des rhizoïdes.

P = filament principal de Caulonéma

R = sa ramification

C = rhizoïdes

D = cellule apicale de la tige.

FIG. 17 : Culture pure à la lumière artificielle continue âgée de 40 jours.

On voit les filaments de chloronéma dressés en pinceaux vers la source fixe de lumière.

FIG. 18 : Culture obtenue dans les mêmes conditions que celle de la fig. 17 et du même âge, mais infectée.

En (A), on voit les filaments de chloronéma dressés.

En (B), le Caulonéma qui s'étend à la surface de l'agar et grimpe sur les parois. Il est déjà porteur de bourgeons de tiges en (C).

FIG. 19 : Trois tubes à essais contenant des cultures pures âgées de 75 j. élevées à la lumière artificielle continue.

On ne voit que du Chloronéma dressé vers la lumière.

FIG. 20 : Trois tubes à essais contenant des cultures de même âge que celles de la fig. 19, élevées dans les mêmes conditions, mais en présence de *Penicillium*.

Les tiges sont fortement développées. On voit un filament principal de Caulonéma en (A) portant une tige avec ses rhizoïdes (R) dirigés en faisceau divergent vers le bas.

FIG. 21 : Aspect d'une culture pure à la lumière naturelle, âgée de 43 jours.

Au centre (A) le chloronéma, d'où partent des filaments rayonnant (B) de Caulonéma.

FIG. 22 : Caulonéma porteur de Bourgeons qui évoluent en tige. 7,5 X.

En (A) l'emplacement du Chloronéma d'où partent les filaments principaux (P) de Caulonéma.

En (B) un Bourgeon de tige. On voit très bien qu'il est placé contre le filament principal (sur la cellule de base d'une ramification). A sa base, des filaments rectilignes qui divergent en faisceaux : les rhizoïdes. La même chose se présente en (C), en (D), etc...

FIG. 23 : Formations spéciales obtenues en présence de différentes substances.

37 : acide ascorbique 2 mgr $\frac{0}{100}$

38 : acide nicotinique 1 mgr $\frac{0}{100}$

39 : glucose 1,5 gr %

40 : riboflavine 1 mgr $\frac{0}{100}$

41 : aneurine 1 mgr $\frac{0}{100}$

sur la fig. 37 : S = spore

C = filament de chloronéma.

FIG 24 : Schéma représentant les stades de développement de la spore à la tige chez *Funaria Hygro-métrica*. L.

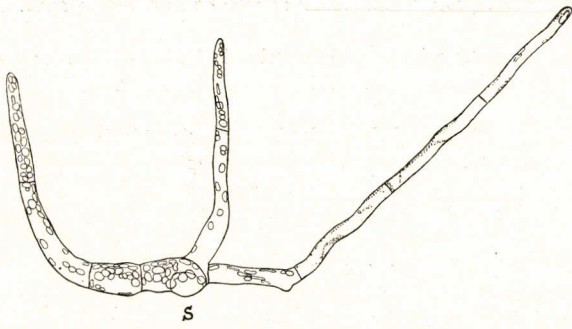


FIG. 2.

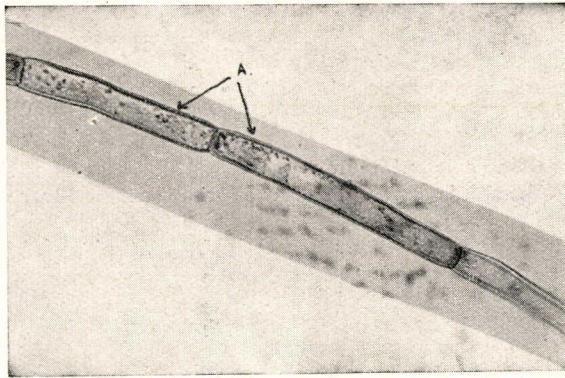


FIG. 3.

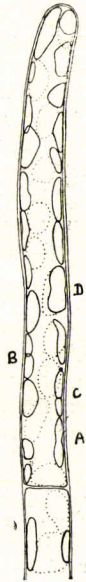


FIG. 1.

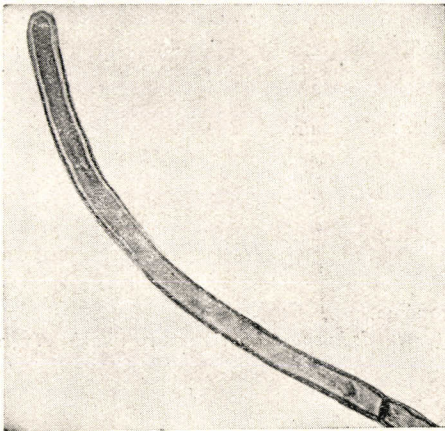


FIG. 4.

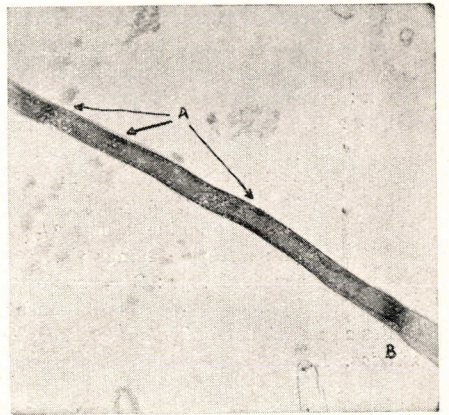


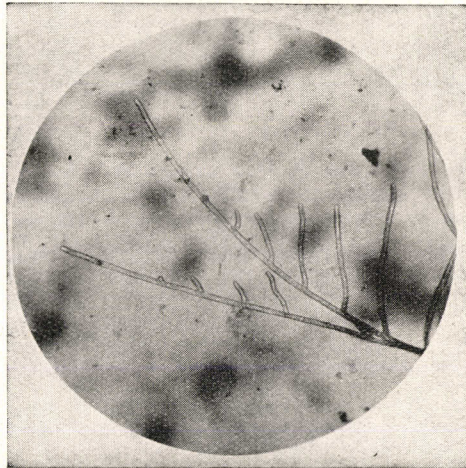
FIG. 5.



← FIG. 6.



← FIG. 8.



← FIG. 7.

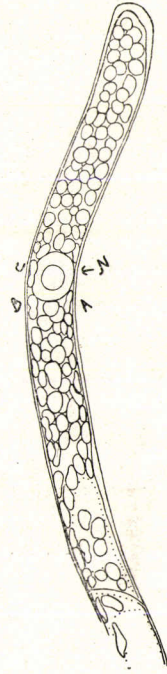


FIG. 9.

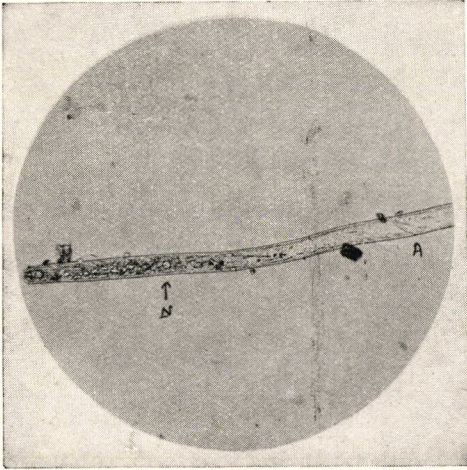


FIG. 10.

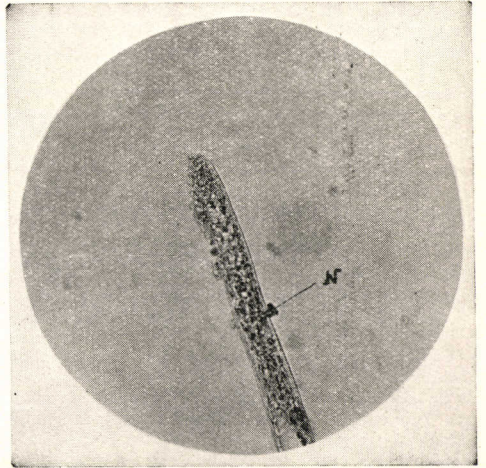


FIG. 11.

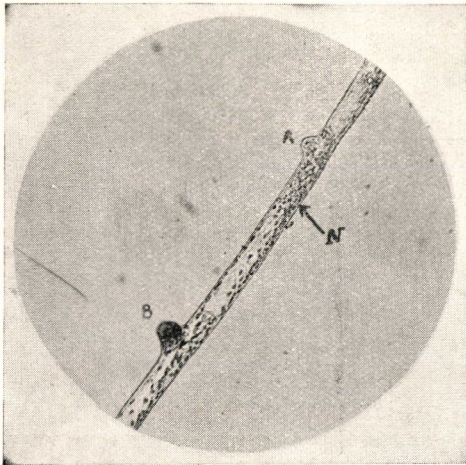


FIG. 12.



FIG. 13.

FIG. 14.

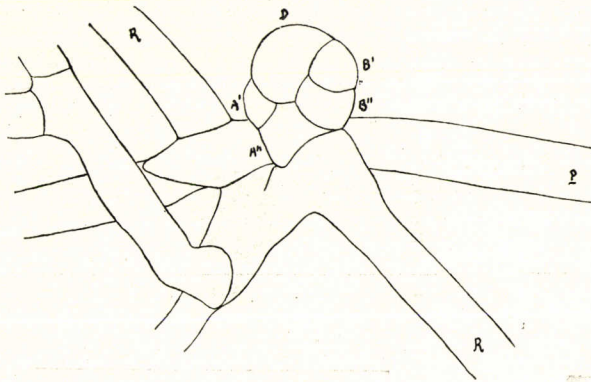
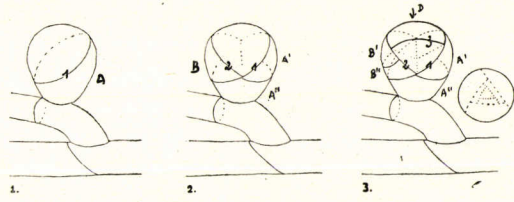
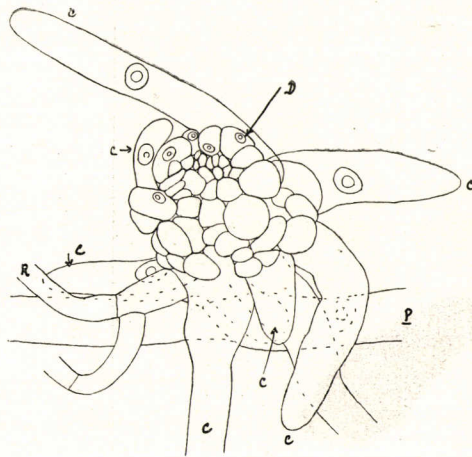


FIG. 15.

FIG. 16.



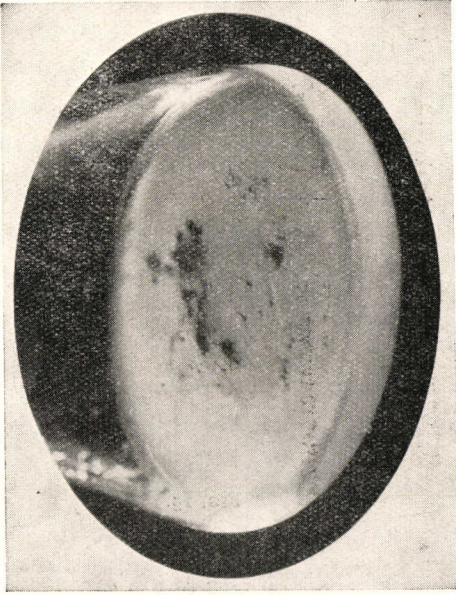


FIG. 17.

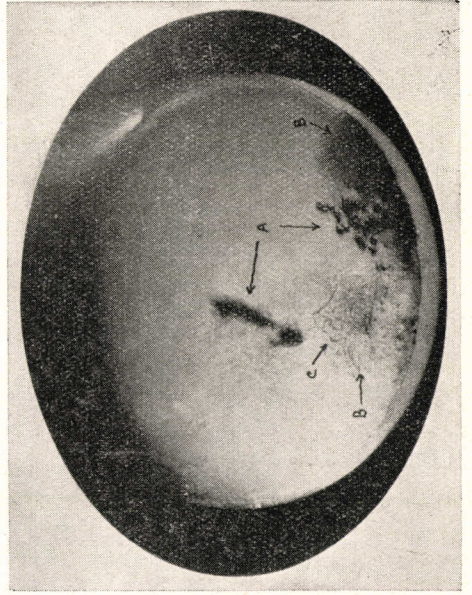


FIG. 18.

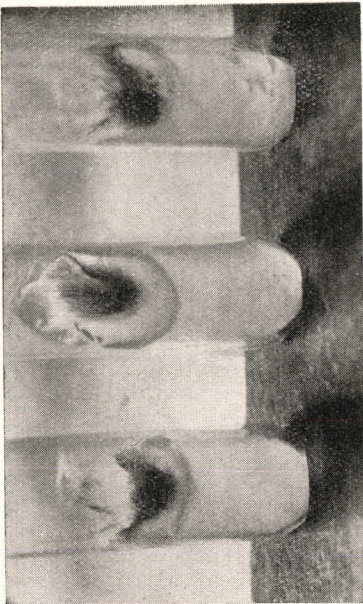


FIG. 19.

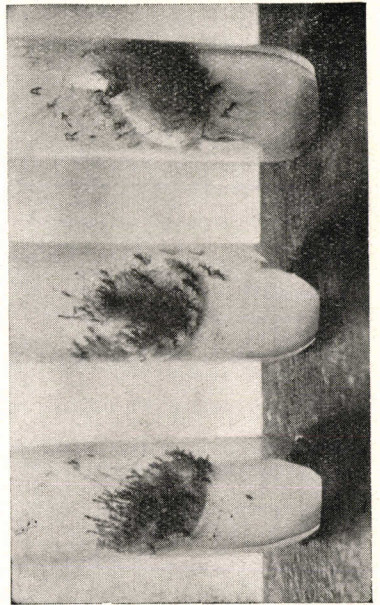


FIG. 20.

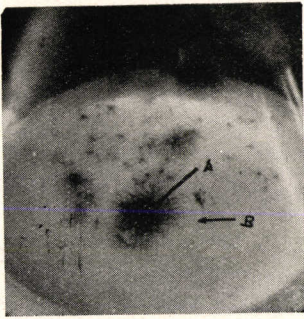


FIG. 21.

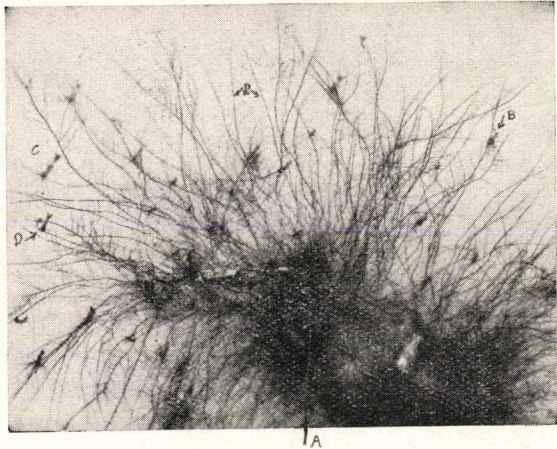


FIG. 22.

FIG. 23.

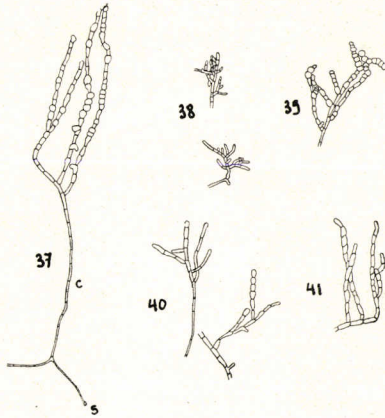


FIG. 24

