



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



2010-2011



MASTER STVE
Sciences et Technologies du Vivant et de l'Environnement
Mention Biologie Intégrative
Spécialité Biologie des interactions plantes-environnement

Evolution de la virulence dans le cas des infections
multiples du champignon phytopathogène
Microbotryum violaceum chez son hôte *Silene latifolia*



ASCHI AMIRA

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 05/09/2011

Laboratoire d'accueil: UMR 8079 Ecologie Systématique Evolution, département Génétique et Ecologie Evolutives (CNRS-UPS-AgroParisTech bât.360 Université de Paris-Sud 91405 Orsay cedex France, Université Paris XI, ENGREF)

Responsable du laboratoire : Paul Leadley

Responsable du stage : Tatiana Giraud (mail : Tatiana.Giraud@u-psud.fr, tel : 0169155669)

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Ceux que personne ne peut compenser les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon éducation et mon bien être : mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour,

A mon âme-sœur Mehdi,

A mon cher frère Mohamed,

A ma famille,

Et à toutes les personnes que j'aime.

Amira

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens tout d'abord à exprimer mes sentiments de gratitude et de reconnaissance à mon maître de stage Madame Tatiana Giraud en me confiant ce projet, m'a apportée un témoignage de confiance et de responsabilité. Ses connaissances et ses conseils m'ont servi de guide tout au long de ces cinq derniers mois.

Je remercie vivement Monsieur Paul Leadley de m'avoir accueillie au sein de l'UMR Ecologie, Systématique et Evolution de l'Université Paris-Sud et Jacqui Shykoff pour son accueil au sein du département Génétique et Ecologie Evolutive

Je remercie l'ensemble de l'équipe pour son accueil qui a participé au bon déroulement de ce stage, en particulier Odile Jonot pour l'apprentissage des techniques et son aide dans le déroulement de mes expériences.

Je ne peux oublier d'adresser mes salutations amicales à toutes mes amies et camarades de promotion.

Résumé

Les études théoriques sur l'évolution des caractéristiques des maladies infectieuses prédisent une augmentation de la virulence avec les infections multiples et une diminution avec l'apparementement entre génotypes coexistant au sein d'un individu hôte. Le but du stage était de tester ces prédictions en utilisant le champignon *Microbotryum violaceum*, responsable de la maladie du charbon des anthères chez *Silene latifolia*. Des études précédentes avaient montré que les infections multiples étaient fréquentes dans les populations naturelles et que les plantes portaient souvent des souches de génotypes apparentées. Une population expérimentale avait été mise en place, et les souches de champignon ont été récoltées sur trois années. Celles-ci ont été génotypées à l'aide de marqueurs microsatellites afin de déterminer le nombre de souches par plante, les apparementements entre les génotypes, les taux de guérison, de nouvelles infections et de colonisations par de nouvelles souches de champignon. Au cours de ce travail, on a pu confirmer que les infections multiples étaient nombreuses et que le champignon est capable d'exclure des génotypes non apparentés. De plus, le champignon est capable de moduler sa virulence en fonction du nombre de génotypes présents dans l'hôte et de leur apparementement. Cette étude apporte donc des résultats majeurs pour comprendre l'évolution des maladies.

Présentation du laboratoire d'accueil

Laboratoire Ecologie Systématique Evolution, département Génétique et Ecologie Evolutive

L'Unité est une composante de l'IFR 87 « La plante et son Environnement » créé en 2000, qui associe les divers laboratoires du campus de Gif-Orsay travaillant sur les plantes, du niveau moléculaire à celui de l'écosystème.

Elle a pour particularité de recevoir un soutien fort de l'Université et de plusieurs institutions agronomiques (INA-PG, ENGREF, INRA) et héberge de ce fait un nombre important d'enseignants-chercheurs.

Certains aspects des travaux réalisés restent résolument dans le domaine de la science fondamentale. D'autres viennent en réponse aux questions posées par le public et les décideurs comme :

- quels sont les risques environnementaux posés par les cultures de plantes transgéniques ?
- quels seront les effets des changements globaux sur nos forêts ?
- ou quels sont les effets des polluants sur les organismes aquatiques ?

L'ensemble de ces travaux - appliqués et fondamentaux - font l'objet d'importants efforts de valorisation. En témoignent non seulement les publications produites dans les domaines de l'écologie et de l'évolution mais aussi les visites reçues par l'Unité de scientifiques réputés à l'échelle internationale ou encore l'importance que les divers médias ont accordé à ses recherches.

Les différents axes de recherche sont :

- L'**Ecophysiologie Végétale**, du fonctionnement fin de la photosynthèse et de la respiration aux échanges gazeux d'un couvert végétal en réponse aux facteurs abiotiques, avec des implications sur l'étude des changements globaux et la modélisation des réactions des plantes et des écosystèmes,
- La **Biologie Evolutive**, de la biodiversité des grains de pollen, des chromosomes ou des systèmes de reproduction dans une espèce ou un genre, jusqu'à la reconstitution de l'histoire des complexes d'espèces cultivées en Afrique ou forestières en Europe, avec des implications dans les problèmes de biologie de la conservation ou dans l'étude des interactions entre les plantes et leurs pathogènes ou pollinisateurs,
- Enfin, l'**Ecologie des Communautés**, de l'étude fine des interactions entre les plantes et les organismes du sol aux relations entre biodiversité et fonctionnement, en passant par la modélisation en dynamique des populations, avec des applications en biologie de la conservation.

Liste des figures

Figure 1 : Différentes stratégies parasitaires et leur effet sur la mort de l'hôte.	3
Figure 2 : Cycle de vie de <i>Microbotryum violaceum</i> au sein de la plante hôte <i>Silene latifolia</i>	5
Figure 3 : A) <i>Silene latifolia</i> infectée par <i>Microbotryum violaceum</i> , B) Effets sur les plantes mâles et femelles (en haut), ovaires avortés, anthères pleines de spores, (en bas), anthères pleines de spores.	6

Liste des graphiques

Graphique 1 : Dynamique des plantes et des infections sur 3 ans.....	10
Graphique 2 : Nombre d'allèles par marqueur et par année.....	10
Graphique 3 : Nombre de souches présentes en fonction du nombre de branches infectées ...	11
Graphique 4 : Pourcentage de plantes infectées en fonction du sexe.....	12
Graphique 5 : Pourcentage de plantes infectées en 2008/2009/2010 pour les traitements A, B, C et D.....	12
Graphique 6 : Pourcentage d'infections multiples en fonction du traitement parmi les plantes malades en 2008/2009/2010	13
Graphique 7 : Dynamique des infections multiples versus infections simples au cours des trois années	13
Graphique 8 : Nombre moyen de souches par plante en fonction du traitement.....	14
Graphique 9 : Nombre de souches en 2010 en fonction du nombre de souches en 2009	14
Graphique 10 : Apparement en fonction du traitement pour 2010.....	15
Graphique 11 : Apparement moyen des souches par traitement en 2008/2009/2010	15
Graphique 12: L'apparement en fonction du nombre de génotype dans la plante	16
Graphique 13 : pourcentage d'infection partielle versus infection totale en 2010 pour les plantes malades.....	16
Graphique 14: Degré de stérilisation en 2010 en fonction des traitements appliqués en 2008...	17
Graphique 15 : Degré de stérilisation en fonction du sexe.....	17
Graphique 16 : Degré de stérilisation en fonction du nombre de souche dans la plante.....	17

Graphique 17: Degré de stérilisation par génotype en fonction du nombre de génotypes pour 2010	18
Graphique 18 : Degré de stérilisation par génotype en fonction de l'apparement entre les génotypes dans la plante	18
Graphique 19: Pourcentage de guérisons en fonction du traitement (A), et du sexe de la plante (B) en 2008	19
Graphique 20 : Pourcentage de plantes mortes en fonction des traitements en 2010	20

Liste des tableaux

Tableau 1 : Régression logistique pour tester l'effet de différents facteurs sur la probabilité d'infection	11
Tableau 2: Régression logistique pour tester l'effet de différents facteurs sur la probabilité d'infections multiples <i>versus</i> infection simple parmi les plantes malades.....	12
Tableau 3: ANOVA pour tester l'effet de différents facteurs sur le nombre de souches par plante	14
Tableau 4 : ANOVA pour tester l'effet de différents facteurs sur l'apparement des souches présentes au sein d'une plante	15
Tableau 5 : ANOVA pour tester l'effet de différents facteurs sur le degré de stérilisation ...	17
Tableau 6 : ANOVA pour tester l'effet de différents facteurs sur le degré de stérilisation par souche	18
Tableau 7: régression logistique pour tester l'effet de différents facteurs sur la probabilité de guérison	19
Tableau 8: régression logistique pour tester l'effet de différents facteurs sur la probabilité de mourir	19

Sommaire

Présentation du laboratoire d'accueil

I. Introduction	1
1.1. Les infections multiples.....	2
1.2. Le pathosystème <i>Microbotryum violaceum-Silene latifolia</i>	4
1.2.1. <i>Microbotryum violaceum</i>	4
1.2.2. <i>Silene latifolia</i>	4
1.2.3. Le cycle d'infection	5
1.3. Infections multiples chez <i>M. violaceum</i>	6
II. Matériels et méthodes	7
2.1. Extraction d'ADN	8
2.2. PCR (Polymerase Chain Reaction) et marqueurs microsatellites	8
2.3. Analyse des données.....	9
III. Résultats	9
3.1. Analyse de la dynamique des infections sur 2008-2009-2010.....	9
3.2. Probabilité d'infection	11
3.3. Infections multiples	12
3.4. Nombre de souches par plante.....	13
3.5. Apparemment.....	14
3.6. Degré de stérilisation	16
3.7. Degré de stérilisation par souche au sein des plantes.....	17
3.8. Guérison	19
3.9. Mortalité	19
IV. Discussion	20
4.1. Dynamique des infections	20
4.2. Dynamique des infections multiples et apparemment	21
4.3. Effet des infections multiples et apparemment sur la virulence	22
V. Conclusion et perspectives	22
Références bibliographiques.....	24

I. Introduction

Dans la nature, les espèces vivantes sont intégrées dans des écosystèmes dont elles sont toutes dépendantes et dans lesquels elles jouent chacune un rôle spécifique nécessaire à l'équilibre global. Cependant, il existe dans la nature un grand nombre d'organismes vivants nuisibles aux végétaux, aux animaux mais aussi à l'égard de l'homme. Ce mode d'interaction plus ou moins durable est le parasitisme qui suppose l'existence de deux organismes, le parasite dont les actions sont offensives, destructrices ou toxiques et l'hôte dont les actions sont essentiellement défensives et dont la valeur sélective est réduite (Chevaugnon, 1957). La compréhension des caractères des hôtes, de leurs parasites et des mécanismes de leurs interactions et de la co-évolution représente un enjeu majeur (de Roode, 2005).

Chaque être vivant essayant de vivre dans les meilleures conditions s'adapte aux milieux qu'il colonise au fil des générations et cherche à se créer l'habitat le plus favorable possible. La théorie de la sélection naturelle permet d'expliquer et de comprendre comment l'environnement influe sur l'évolution des espèces et des populations en sélectionnant les individus les plus adaptés et constitue donc un aspect fondamental de la théorie de l'évolution. Dans cet équilibre biologique, la co-évolution s'inscrit comme étant un phénomène où la sélection naturelle favorise l'apparition de moyens de défenses chez l'hôte, alors que le parasite évolue pour continuer à pouvoir infecter et survivre, entraînant une course aux armements permanente entre hôte et parasite (théorie de la Reine Rouge). Les êtres sains au sein d'une population peuvent se développer tandis que ceux qui sont affaiblis laissent moins de descendants.

Plusieurs traits sont affectés dans la coévolution entre hôtes et parasites, dont la virulence. C'est un paramètre important dans les pathosystèmes comme celui que nous étudions « *Microbotryum violaceum-Silene latifolia* ». Elle peut être définie de plusieurs façons selon le domaine concerné. Dans notre contexte, elle représente la diminution de la valeur sélective de l'hôte provoquée par la reproduction du parasite. La principale théorie pour l'évolution de la virulence parasitaire postule qu'il y a un compromis (modèle du « Trade-off ») entre l'avantage de la reproduction du parasite au sein de l'hôte (fécondité) et l'inconvénient qu'une telle reproduction a sur la survie de l'hôte (longévité) (Lively, 2005). Cette théorie introduit un dilemme pour le parasite : s'il se transmet beaucoup, il engendre plus de nouvelles infections, mais tue rapidement son hôte, en revanche, s'il le ménage trop, il se transmet plus longtemps mais en plus faible quantité.

Les individus hôtes représentent une arène dans laquelle des pathogènes sont en compétition pour les ressources et leur transmission, ce qui a une forte implication dans l'évolution de la virulence et la structure des populations (van Baalen, 1995). Différents modèles expliquant l'évolution de la virulence chez les parasites sont capitaux pour prévoir l'effet des traitements des pathologies causées par ces derniers. Certaines vaccinations, par exemple, peuvent augmenter la virulence des maladies pour les individus non vaccinés. Dans ce cas précis, les parasites ayant moins d'hôtes potentiels évoluent afin de capter davantage les ressources dans les rares hôtes qu'ils trouvent (Gandon, 2001). Ceci a entraîné l'étude de l'évolution de la virulence et des conséquences du maintien de différents génotypes pathogènes dans l'hôte (Gold et al, 2009), que l'on appelle les infections multiples.

1.1. Les infections multiples

Lors de l'infection d'une plante hôte, le parasite est rarement seul, il est souvent concurrencé par d'autres individus de son espèce ou d'une espèce différente. Les infections multiples se caractérisent donc par l'infection d'un même individu hôte par plusieurs souches parasitaires appartenant à la même espèce. C'est un phénomène très commun dans une grande variété de maladies, comme le cas du parasite *Plasmodium* agent responsable de la malaria (de Roode, 2005), et courant aussi dans la nature pour des champignons pathogènes de plantes (López-Villavicencio *et al.* 2007). En termes d'évolution de la virulence, l'existence d'infections multiples est très important car la stratégie optimale pour la virulence n'est plus du tout la même qu'en infections simples. Des interactions complexes entre les souches d'une espèce de pathogène peuvent surgir et de nombreux scénarios sont possibles.

Le modèle classique d'étude de l'évolution de la virulence postule que, lorsque différents parasites sont en compétition pour les ressources limitées d'un hôte, le parasite le plus virulent, celui qui prend les ressources de l'hôte le plus rapidement, est sélectionné car c'est celui qui aura produit plus de descendants au moment de la mort de l'hôte, menant à une augmentation de la virulence dans la population. En effet, des stratégies plus rapides d'exploitation devraient gagner sur les stratégies « prudentes », sélectionnant ainsi les parasites causant les dommages les plus importants et la mortalité de l'hôte (Fig.1) (van Baalen, 1995). Cette compétition entre souches de parasites doit cependant être réduite si les souches sont apparentées dans ce cas de figure les souches coexistant au sein des hôtes moins à une évolution vers une plus grande virulence.

En opposition avec l'opinion largement acceptée que les coinfections sélectionnent pour une augmentation de la virulence parasitaire, d'autres modèles ont montré qu'elles favorisaient une réduction du taux de réplication pour chacun des parasites particulièrement quand les parasites ne tuent pas leurs hôtes (Brown *et al.*, 2002 ; Chao *et al.*, 2000 ; Schjorring *et al.*, 2003). En effet, si on considère la catégorie des parasites qui réduisent le taux de croissance de leur hôte et dont la transmission dépend de la taille de ce dernier, la virulence a tendance à diminuer avec les infections multiples dans la population (Schjorring *et al.*, 2003).

La virulence peut ainsi évoluer dans les populations, tout en étant fixée pour un génotype donné, mais elle peut également être un trait plastique, qui varie pour un même génotype suivant le degré d'infections multiples de l'hôte dans lequel il se trouve. Un parasite peut être ainsi plus virulent lorsqu'il est en situation de co-infection (Jensen *et al.*, 2006).

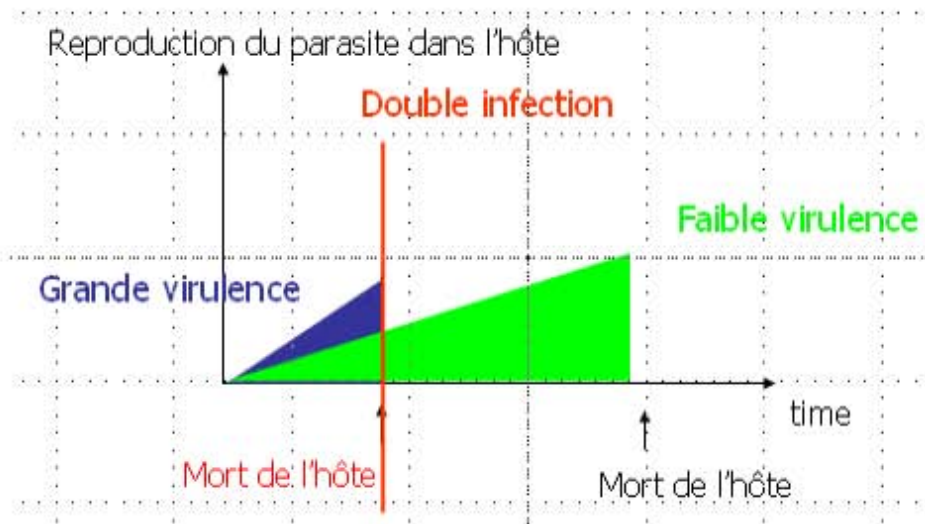


Figure 1 : Différentes stratégies parasitaires et leur effet sur la mort de l'hôte. S'il n'y a qu'un génotype par hôte, la stratégie « faible virulence » sera sélectionnée car elle permet de laisser plus de descendants (aire du triangle vert). Par contre, si deux génotypes sont présents dans un même hôte, le parasite de « grande virulence » tue l'hôte rapidement et produit plus de descendants que le parasite à « faible virulence » à la mort de l'hôte commun (aire du triangle bleu).

La virulence peut varier suivant le degré d'infection multiple simplement à cause d'interactions, synergiques ou antagonistes, entre les souches de pathogènes. La synergie entre deux pathogènes peut augmenter la virulence globale par exemple si l'un des parasites synthétise des toxines qui diminuent les défenses de l'hôte, augmentant indirectement les performances du second pathogène (Hughes et Boomsma, 2004). Il a été également observé que si deux souches en compétition produisent des toxines, leur taux de croissance et de virulence peut être réduit par rapport à celle d'une infection par une seule souche, ce qui diminuera la virulence globale (Massey *et al*, 2004).

D'un point de vue évolutif, la virulence d'un parasite peut sembler paradoxale car le parasite (par définition) a besoin de son hôte. Dès lors, pourquoi lui nuire ? Jusque dans les années 80, la théorie dominante en évolution de la virulence était donc la «sagesse traditionnelle» qui prédit que les parasites doivent tous évoluer pour devenir peu virulents. D'après cette théorie, tous les parasites virulents qui existent sont en fait mal adaptés à leur hôte.

Roy Anderson et Bob May ont été les premiers à remettre en cause cette théorie (en 1979) en postulant l'existence d'un compromis « *Trade-off* » entre virulence et transmission. L'hypothèse postule qu'il y a un compromis entre l'exploitation de l'hôte et sa survie, mais cette hypothèse ne s'applique peut-être pas aux parasites dont la virulence est causée par une stérilisation plutôt que la mort de l'hôte (Alizon *et al*, 2008).

La castration parasitaire est définie comme la réduction de la fécondité de l'hôte induite par le parasite. Pour les parasites castrateurs, le modèle du « trade-off » ne s'applique pas, car ils ne tuent généralement pas leurs hôtes. Des modèles ont été construits pour incorporer la capacité du parasite à convertir les ressources reproductives de l'hôte dans les étapes de transmission. Ces modèles prédisent que le niveau optimal de castration est une castration totale (Ebert, 2004 ; O'Keefe & Antonovics, 2002). En effet dans ce cas, l'intérêt du pathogène est d'empêcher complètement l'hôte de se reproduire pour utiliser toutes les

ressources normalement allouées à la reproduction de l'hôte pour sa propre reproduction, mais aussi de ne pas engendrer la mort de l'hôte, car cela réduirait sa propre période de survie et de transmission.

Très peu d'études expérimentales ont analysé le niveau de virulence en fonction de l'existence d'infections multiples. Certaines ont mis en évidence une augmentation de la virulence avec les infections multiples (Hodgson *et al.* 2004) et d'autres une diminution (Taylor *et al.* 1998; Davies *et al.* 2002). Encore moins d'études ont examiné l'effet de l'apparementement entre souches dans le cas des infections multiples sur la virulence, mais un article sur des trématodes a montré un effet, quoique le sens de l'effet n'était pas très clair (Lagrué *et al.* 2009). L'effet des infections multiples et de l'apparementement entre souches a également été peu testé expérimentalement chez des parasites castrateurs.

1.2. Le pathosystème *Microbotryum violaceum*-*Silene latifolia*

1.2.1. *Microbotryum violaceum*

Microbotryum violaceum compte parmi les parasites castrateurs. C'est un champignon obligatoire de plus de 400 plantes de la famille des **Caryophyllacées**, proche des pathogènes appartenant au genre *Puccinia* (Les rouilles) (Hood *et al.*, 2010).

Systématique : Il appartient au phylum des Basidiomycètes, sub-phylum des *Pucciniomycotina*, l'ordre des *Microbotryales* et à la famille des *Microbotryaceae*.

Cet organisme s'attaque aux organes de reproduction des plantes, en les détruisant et formant à la place des masses de spores de couleur foncée. Il est considéré comme une espèce modèle en écologie théorique et expérimentale, en génétique, et en étude de la transmission des maladies et des changements d'hôtes. *M. violaceum* est l'agent pathogène responsable de la maladie du charbon des anthères chez *Silene latifolia*.

1.2.2. *Silene latifolia*

Silene latifolia, dont le nom commun est le compagnon blanc, est une plante herbacée de l'ordre des Caryophyllales et de la famille des Caryophyllaceae. C'est une plante de taille moyenne portant des feuilles de forme ovale, très velues et qui mesurent à peu près 20 à 30 mm. Les fruits produits ressemblent à des petites capsules dentées.

C'est une espèce dioïque dont les individus sont strictement monosexués se distinguant ainsi en un plant male et un plant femelle. Les fleurs, blanches, peuvent être présentes en très grand nombre par pieds et sont très odorantes le soir.

1.2.3. Le cycle d'infection

Les caractéristiques structurales du tissu sporogène et des assises pariétales sont définies tout d'abord au sein des anthères saines de *Silene latifolia*. Dans les étamines parasitées par *Microbotryum violaceum*, le mycélium dicaryotique se développe en progressant entre les cellules de l'hôte, ne les pénétrant que très rarement. Le champignon interrompt l'histogenèse de l'anthère à un stade juvénile, puis détruit spécifiquement les cellules sporogènes selon deux modalités différentes de nécrose (nécrose immédiate et nécrose précédée d'hypertrophie).

Cinq étapes sont reconnues dans la progression des transformations histologiques aboutissant à la destruction des anthères. (1) Apparition du mycélium, provenant du filet, dans

les tissus de l'anthere sans que l'aspect histologique de cette dernière soit modifié. (2) Début de la nécrose du massif sporogène. Seules certaines cellules sporogènes sont affectées par cette lyse et se contractent en masses denses. (3) Accentuation du processus de nécrose à l'ensemble du massif sporogène. L'hypertrophie des cellules sporogènes liée à une forte vacuolisation précède leur destruction. (4) Les hyphes se développent abondamment au sein de la masse nécrosée des cellules sporogènes. (5) Le champignon sporule et les téliospires* formées s'accumulent dans la cavité sporangiale.

Ces téliospires diploïdes sont produites dans les anthères et transmises par les pollinisateurs aux plantes saines. Les téliospires germent, subissent la méiose et produisent des spores haploïdes. La conjugaison a lieu sur les plantes entre sporidies de types sexuels différents. Les hyphes dicaryotiques poussent dans la plante puis dans les tissus végétatifs. L'infection se fait d'une façon systémique et les fleurs produisent des téliospires à la place du pollen (Figure 2).

*téliospires : spore de dissémination à l'origine de la production de basidiospores chez les Ustilaginales (classe des Basidiomycètes).

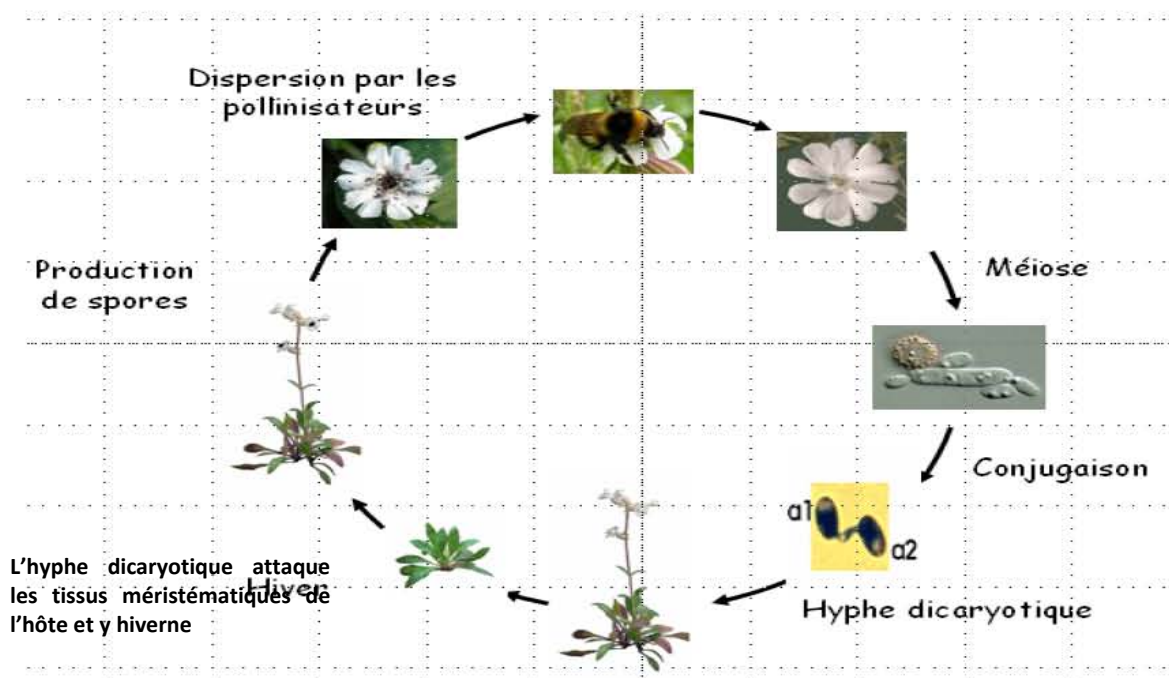


Figure 2. Cycle de vie de *Microbotryum violaceum* au sein de la plante hôte *Silene latifolia*

Généralement, ces plantes infectées sont totalement stérilisées: le pollen de toutes les fleurs est remplacé par ces spores (chez les plantes dimorphes, les pieds femelles produisent des anthères et leurs ovaires avortent, nous verrons cependant dans la suite de nos études que toutes les plantes ne sont pas complètement stérilisées) (Figure 3).



Figure 3 : A) *Silene latifolia* infectée par *Microbotryum violaceum*, B) Effets sur les plantes mâles et femelles (en haut), ovaires avortés, anthères pleines de spores, (en bas), anthères pleines de spores.

1.3. Infections multiples chez *M. violaceum*

Les infections multiples par *M. violaceum* avaient longtemps été considérées comme négligeables mais ont été observées à grande fréquence dans des expériences d'inoculations artificielles (mais la pression et la diversité des inocula sont alors supérieures aux populations naturelles ; López-Villavicencio *et al*, 2005). Une étude des populations naturelles de *Silene latifolia* (près d'Orsay, en France) utilisant des marqueurs génétiques pour identifier chaque souche, a mis en évidence que les infections multiples étaient extrêmement fréquentes et présentaient un degré d'apparement important ; 70 % des plantes malades comportaient plusieurs souches différentes du champignon (López-Villavicencio *et al*, 2007 ; Thrall *et al*, 2003).

L'apparement avait été estimé comme la probabilité de partage des mêmes allèles entre des individus par rapport à la probabilité au hasard étant données les fréquences alléliques dans les populations (López-Villavicencio *et al*, 2007). Cette étude suggérait donc qu'il pouvait exister une exclusion conditionnelle des souches au sein d'une plante, qui dépendrait de l'apparement.

Une étude expérimentale a renforcé cette idée, en examinant les effets de l'apparement entre des souches de *M. violaceum* sur la probabilité d'obtenir des infections multiples chez *S. latifolia*, après des inoculations consécutives. Une augmentation significative des infections multiples a été observée lorsque les souches étaient apparementées, renforçant l'idée de l'existence de mécanismes d'exclusion compétitive qui sont conditionnelles aux caractéristiques génotypiques des souches impliquées (Koskella *et al*, 2006).

Les études de populations naturelles n'ont pas permis de déterminer si les infections multiples étaient stables dans le temps. Un jardin a donc été créé durant l'été 2008 en partant de 1000 Silènes. Ces dernières ont été inoculées au stade plantule avec différents mélanges de souches de *M. violaceum*. L'opération conduite a pour but d'optimiser et maximiser la probabilité d'obtenir des infections multiples et de tester en même temps l'effet de l'apparement chez ces pathogènes. Quatre traitements avaient été réalisés à deux dates : les 17 et 28 juillet 2008. Une goutte du mélange (réalisé en mêlant 14 ml d'eau pure avec deux cuillères de sporidies

par souche), a été inoculée par méristème disponible. Les traitements réalisés ont été les suivants:

- **Traitement A** : Combinaisons de souches non apparentées: 375 plantes : 4 combinaisons de souches différentes x 94 plantes : A1, A2, A3 et A4.
- **Traitement B** : Combinaisons de souches apparentées: 375 plantes : 4 combinaisons de souches différentes x 94 plantes : B1, B2, B3 et B4.
- **Traitement C** : Souches isolées (1 seule souche inoculée par plante) : 200 plantes : 13 souches x 15 plantes : de C1 à C13
- **Traitement D** : Plantes sans inoculations, uniquement infections naturelles : 50 plantes

Durant les deux années 2008 et 2009, les souches du champignon ont été génotypées et il semble que *M. violaceum* est capable d'exclure des compétiteurs non apparentés et de moduler son niveau de virulence (nombre de spores par fleur et pourcentage de branches stérilisées) en fonction du nombre de souches dans son hôte et de leur degré d'apparement. D'après l'étude de Lopez *et al.* (2011) les infections multiples augmentent globalement la virulence (nombre de spores par fleur et pourcentage de branches stérilisées), et ce d'autant plus que le nombre de génotypes dans l'hôte est élevé. Il a été montré aussi que la compétition entre souches de *Microbotryum* au sein des plantes a un effet négatif sur la colonisation de la plante par chaque génotype, mais que cet effet s'amenuise avec un apparement croissant : chaque génotype occupe moins de branches dans une plante avec infections multiples, mais d'autant plus que les souches sont moins apparementées. Il semble donc qu'il existe de l'interférence entre souches de *Microbotryum* au sein d'une plante, mais d'autant moins qu'elles sont plus apparementées.

Au cours de mon stage, j'ai suivi la dynamique dans ce jardin des infections multiples, sur les années de récoltes 2008 à 2010, de l'apparement des souches au sein des plantes, et j'ai aussi étudié leurs effets sur la virulence. J'ai estimé la virulence par la probabilité de rester infectée d'une année sur l'autre (c'est-à-dire la non guérison), par la mortalité, par le degré de stérilisation global de la plante (pourcentage de branches stérilisées) et par le degré de stérilisation par souche de pathogène (pourcentage de branches stérilisées par génotype). Nous essaierons de répondre plus spécifiquement aux questions suivantes:

- Y a-t-il une baisse ou une hausse du nombre de souches par plante d'une année sur l'autre ?
- Est-ce que l'apparement joue sur la coexistence de souches au sein des plantes
- Quels sont les taux de guérison, de stérilisation, de nouvelles infections et de colonisations par de nouvelles souches d'une année sur l'autre?
- Quel est l'effet des infections multiples sur la virulence ?
- Quels sont les effets de l'apparement sur la virulence ?

II. Matériel et méthode

Un bouton par branche a été récolté sur toutes les plantes malades au printemps 2010. Un total de 56 plaques est obtenu après triage des plantes infectées obtenues pour le « jardin 2010 ».

2.1. Extraction d'ADN

Chaque bouton floral des plantes infectées du jardin 2010 avait été placé dans des sacs en papier, placés à leur tour dans des sacs hermétiques contenant du gel de silice (Silicagel bleu 2-5 mm Prolabo), qui permet d'absorber l'humidité. Ce gel a une coloration bleue quand il est sec et devient rose/jaune lorsqu'il s'humidifie.

Une dissection de ce bouton est réalisée afin de prélever une anthère infectée contenant les spores du champignon. Ces dernières sont mises chacune dans un puits d'une microplaque de 96 puits qu'on laisse 20 min (minimum) au congélateur à -80°C.

Pour extraire l'ADN, il faut préchauffer du chelex* (de 5 à 20%, Chelex 100, forme sodium, Bio-Rad) dans un bain mairé à 96°C durant une heure. L'alcalinité de la suspension et le processus d'ébullition perturbe la membrane cellulaire, détruit les protéines cellulaires, et dénature l'ADN.

Par la suite, la plaque, sortie du congélateur, est placée à son tour dans le bain marie. Un volume de 100µL de Chelex est ajouté dans chaque puits. Afin d'optimiser cette extraction, on vortex la plaque trois fois en la plongeant 10 min à 96°C entre chacune de ces opérations. Un choc thermique est provoqué en mettant la plaque dans la glace pendant 5 min suivie d'une centrifugation à 6000 rpm pendant 10min. L'ADN ainsi préparé est dilué dans l'eau de la solution de chelex à 5%, alors que les billes de la résine captent les impuretés protéiques. Il sera donc très important par la suite de veiller à ne pas prendre de billes de résine pour réaliser les expériences sur l'ADN. Une dilution au 10^{ème} est réalisée dans une nouvelle plaque, en prélevant le surnageant contenant l'ADN à utiliser pour les PCR avec les différents microsattellites.

2.2. PCR (Polymerase Chain Reaction) et marqueurs microsattellites

PCR : La réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*) est une technique de réplique ciblée in vitro. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. En gros, la PCR permet à une simple séquence d'ADN d'être copiée des millions de fois, ou d'être altérée par des moyens prédéterminés.

- Préparation des plaque de PCR : 1µl d'ADN, amorces F et R à [10µM], tampon 2X (pour 1mL : 14µL de mix dnTP (mélange A, T, G, C) à 5mM, 20µL de BSA à 10mg/mL (Bovine Serum Albumine), 100µL de détergent W1 1%, 200µL de tampon 10X, QSP avec de l'eau ultra pure stérile (eau désionisée), ADN polymérase à 5U/µL. Les marqueurs microsattellites suivant ont été utilisés : SL9, SL19, SVG5, E14, E17 et SL16 (Bucheli *et al*, 1998; Giraud *et al*, 2008).
- Coulage des Gels d'acrylamide : On ajoute à environ 60ml d'acrylamide 8%*, 80µL de TEMED (Tetra Methyl ethylène Diamine) et 800µL d'APS (Peroxydisulfate d'ammonium). On coule le gel et on le laisse polymériser 1h30 à température ambiante.
- La migration dure environ une heure à 70Watts dans du tampon de migration (100ml de TBE 5X pour 500mL d'eau désionisée). Pour chacun des marqueurs l'amorce forward est marquée au fluorochrome Hex, ce qui permet de visualiser les fragments amplifiés à l'aide d'un scanner à fluorescence (FMBIO II, Hitachi). Les fragments sont discriminés par leur taille et donc par leur vitesse de migration.

* acrylamide 8% :200mL de TBE 5X avec 100mL d'eau désionisée, chauffé quelques minutes au micro-onde. On y ajoute 420g d'urée, puis on fait une thermo-agitation pendant environ ¼ d'heure jusqu'à dissolution complète de l'urée. On laisse refroidir un peu avant d'ajouter 200mL d'acryl bisacryl, et on complète jusqu'à 1000mL avec de l'eau désionisée.

Lors des analyses réalisées, six marqueurs microsatellites ont été utilisé mais la quantité de données collectées est différente car au cours des expériences, on a eu un problème technique relatif à la réalisation des PCR.

2.3. Analyse des données

- *Calcul d'apparement avec le logiciel « RE-RAT »* : Les informations des allèles aux marqueurs microsatellites peuvent être utilisées pour déterminer dans quelle mesure les individus au sein des plantes sont apparementés l'un à l'autre par rapport à toutes les souches présentes génotypées chaque année. L'apparement est une estimation de la probabilité de partage des mêmes allèles entre des individus par rapport à la probabilité au hasard étant données les fréquences alléliques dans la population de référence (<http://people.musc.edu/~schwacjh/>).
- *Tests de l'effet des facteurs avec le logiciel « JMP »* : Tous les tests statistiques présentés ont été réalisés avec le logiciel JMP, le seuil de significativité choisi est de 0,05. Les variables à expliquer sont la probabilité d'infection, le nombre de génotypes par plante, le statut infection simple *versus* infections multiples, l'apparement des souches au sein d'une plante, le degré de stérilisation (pourcentage de branches malades), et la probabilité de guérison. Pour chaque variable à expliquer, il a été initialement réalisé une analyse avec un modèle complet comprenant en variables explicatives tous les facteurs a priori pertinents. Cependant une absence de significativité peut être due à une perte du pouvoir du modèle à cause d'un trop grand nombre de facteurs testés. Un modèle facteur par facteur a donc aussi été testé dans certains cas. Pour les variables à expliquer de type nominal (comme le statut « infecté » ou non d'une plante), des régressions logistiques ont été réalisées.

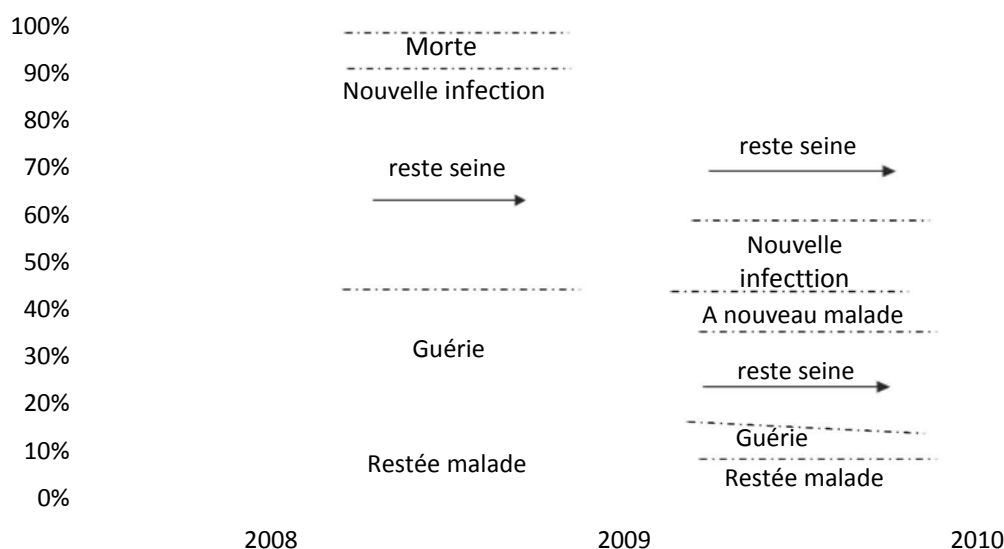
Pour les variables à expliquer de type quantitatives, des ANOVA ont été réalisées pour les modèles complets, et des Chi2 ou des corrélations dans les modèles à un facteur, suivant si la variable explicative était nominale ou quantitative, respectivement. Pour toutes les analyses, les interactions entre facteurs ont aussi été testées, mais comme aucune n'était significative, elles ne sont pas présentées (<http://www.logilabo.com/prods/jmp.html>).

III. Résultats

3.1. Analyse de la dynamique des infections sur 2008-2009-2010

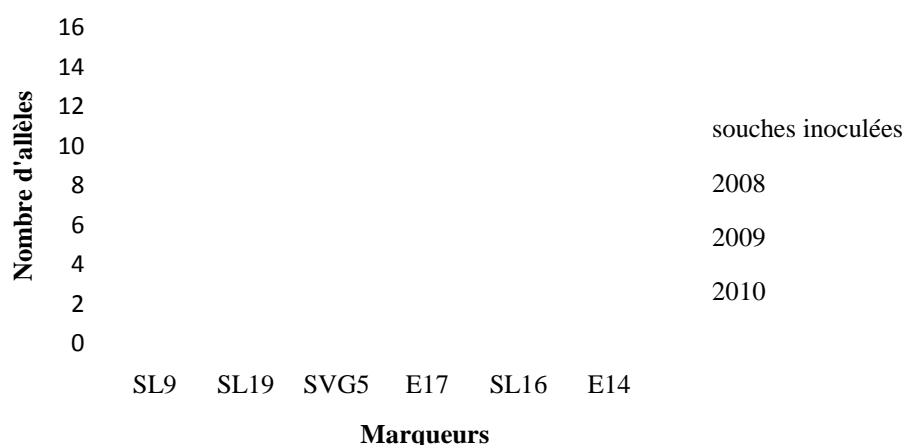
En comparant les plantes entre les années 2008, 2009 et 2010, on a observé de forts taux de guérison et des plantes nouvellement infectées (de façon naturelles, car de nouvelles inoculations n'ont pas été réalisées) (Graphique 1, voir infections en pourcentage plus loin).

Graphique 1 : Dynamique des plantes et des infections sur 3 ans



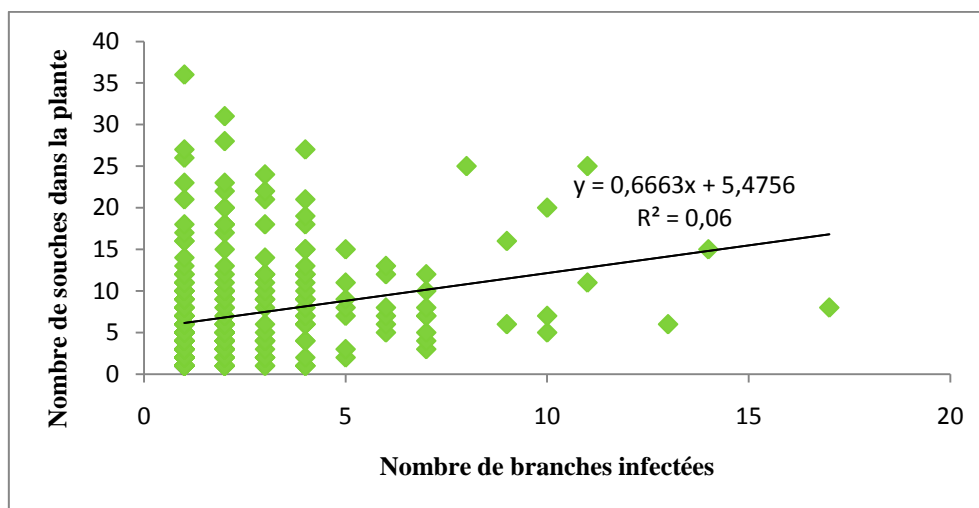
Les souches infectant les plantes ont été identifiées en génotypant les spores récoltées pour chaque branche infectée à l'aide de 6 marqueurs microsatellites. Une augmentation du nombre d'allèles a été observée pour certains marqueurs entre les souches inoculées de départ et les souches génotypées à l'issue de la première année d'infection (2008). Ce nombre d'allèles avait encore augmenté pour certains marqueurs entre 2009 et 2010, indiquant la présence de nouvelles souches qui n'étaient pas dans les souches inoculées (c'est-à-dire des infections de populations naturelles) (Graphique 2). Cependant, on constate une baisse du nombre d'allèles pour d'autres marqueurs, ce qui peut traduire un phénomène d'exclusion et la disparition de certaines souches.

Graphique 2 : Nombre d'allèles par marqueur et par année (SL16 n'avait pas été génotypé sur les souches inoculées)



Il existait une corrélation significative entre le nombre de branches infectées et le nombre de génotypes présents dans les plantes ($R^2 = 0,06$; $P < 0,001$) (Graphique 3).

Graphique 3 : Nombre de souches présentes en fonction du nombre de branches infectées



3.2. Probabilité d'infection

Les facteurs « traitements » et « souche » (c'est-à-dire l'identité des souches inoculées au départ) n'ont pas d'effet significatif sur la probabilité d'être infectée en 2010 (Tableau 1) ; seul le sexe de la plante a un effet sur la probabilité d'être infecté en 2010. Ainsi, les mâles sont significativement plus infectés que les femelles, ce qui était déjà le cas les années précédentes (Graphiques 4 ; A et B). Le fait d'avoir été infecté en 2009 prédit aussi significativement le fait d'être infecté en 2010 (Tableau 1).

Le traitement initial (A, B, C, D) n'influence pas la probabilité d'infection pour 2010. Si les inoculations multiples (traitements A et B) ont donné de plus forts pourcentages d'infections la première année que les cas d'inoculation simple (traitement C) ou l'absence d'inoculation (traitement D), les pourcentages de plantes infectées se sont égalisés en 3 ans (Graphique 5).

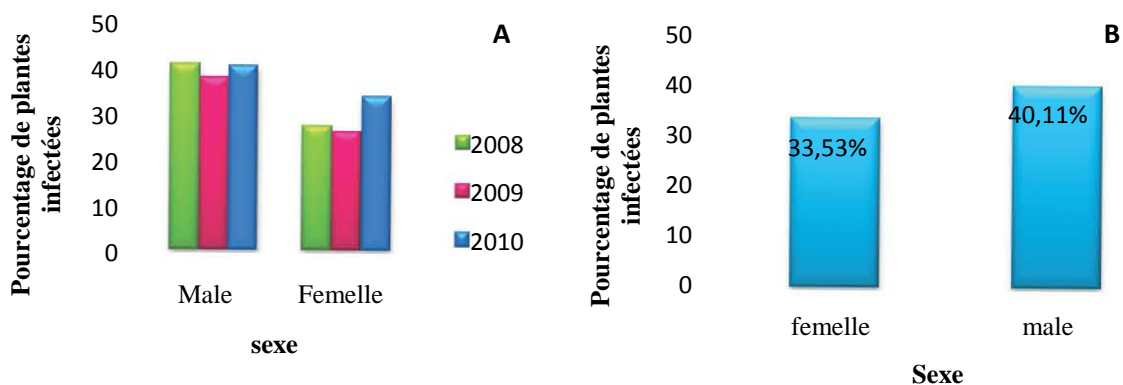
Tableau 1 : Régression logistique pour tester l'effet de différents facteurs sur la probabilité d'infection ; modèle complet $R^2 = 0,048$. L'effet « souche » est l'identité de la ou des souches inoculées, et il est hiérarchisé dans l'effet « traitement » (groupes de souches plus ou moins apparentées, ou souches inoculées seules, ou sans inoculations A,B,C,D).

Facteur	d.d.l.	Chi ²	P
Sexe*	1	6,261	0,0123
Traitement	2	3,794	0,1500
Infectée en 2009*	1	16,148	0,0001
Souche [Traitement]	18	17,426	0,2876

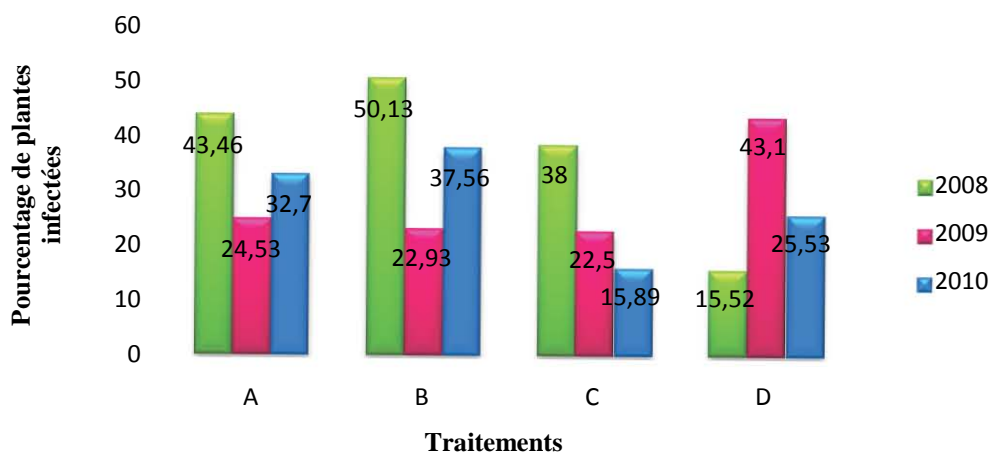
Sont indiquées en gras et avec un astérisque les valeurs significatives ou marginalement significatives

Le pourcentage de plantes infectées a diminué de moitié environ pour les traitements A, B et C entre 2008 et 2009. L'effet inverse, c'est-à-dire une augmentation, est observé pour les témoins D, qui n'avaient pas été inoculés (Graphique 5). Cependant, il n'y a pas d'interaction significative entre les facteurs année et traitement, sûrement parce qu'en 2010, on remarque une ré-augmentation des infections essentiellement pour les deux modalités A et B (Graphique 5).

Graphique 4 : Pourcentage de plantes infectées en fonction du sexe



Graphique 5 : Pourcentage de plantes infectées en 2008/2009/2010 pour les traitements A, B, C et D



3.3. Infections multiples

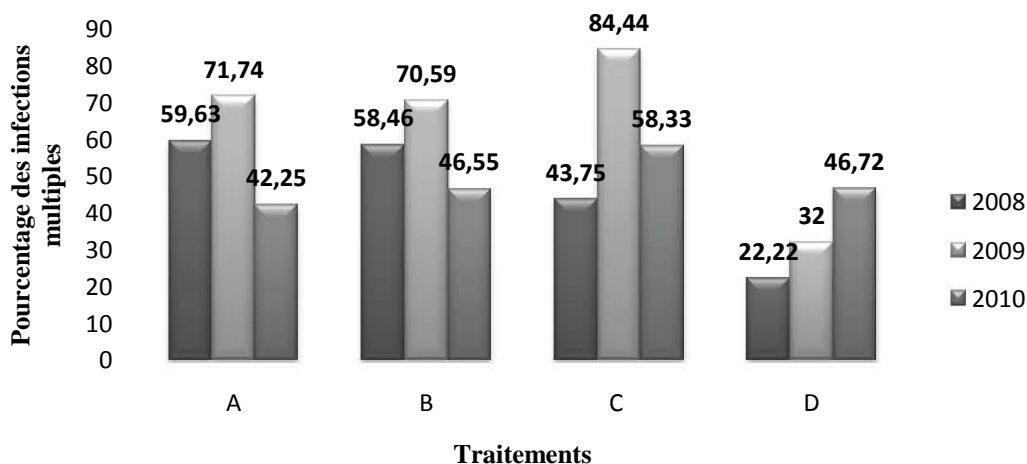
Seul le nombre de branches infectées en 2009 a un effet significatif sur la probabilité d'infections multiples versus infection par une seule souche pour 2010. En 2010, les traitements A, B et C présentent un pourcentage plus faible d'infections multiples que celui enregistré les années précédentes alors le pourcentage d'infections multiples sur les plantes témoins D ont augmenté (Tableau 2 et Graphique 6). Le fait d'avoir eu des infections multiples en 2009 ne prédit pas significativement sur le fait d'avoir des infections multiples en 2010. Le Graphique 7 montre effectivement une dynamique assez importante des infections multiples entre les années.

Tableau 2: Régression logistique pour tester l'effet de différents facteurs sur la probabilité d'infections multiples versus infection simple parmi les plantes malades; modèle complet $R^2 = 0,075$. L'effet « souche » est l'identité de la ou des souches inoculées, et il est hiérarchisé dans l'effet « traitement » (groupes de souches plus ou moins apparentées, ou souches inoculées seules).

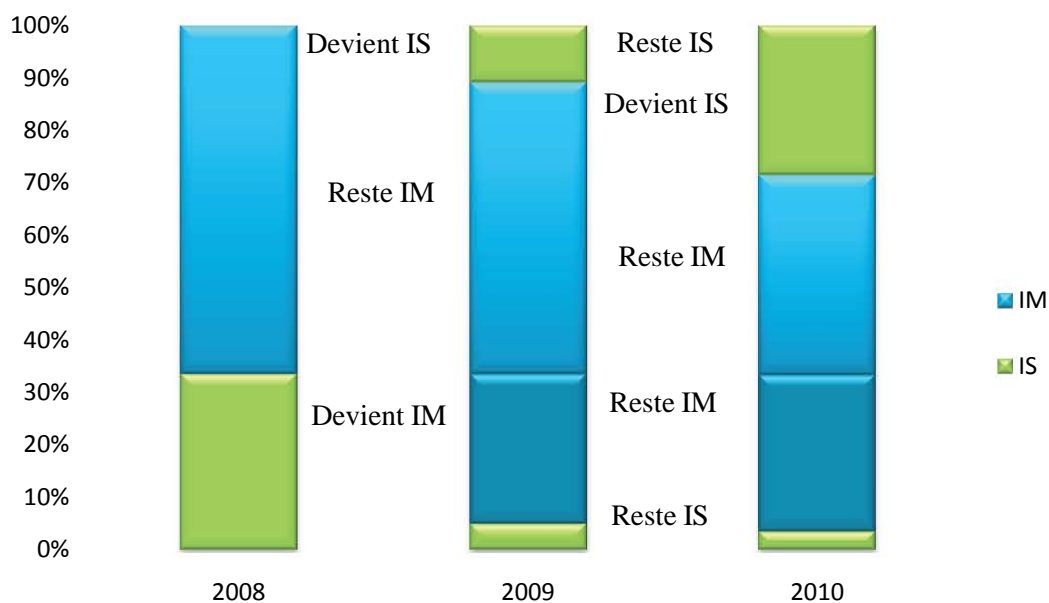
Facteur	d.d.l.	Chi ²	P
Sexe	1	0,0963	0,7562
Traitement	2	2,6650	0,2638
Nombre de branches infectées en 2009*	1	4,5541	0,0328
Infections multiples 2009	1	0,1175	0,7317

Sont indiquées en gras et avec un astérisque les valeurs significatives ou marginalement significatives

Graphique 6 : Pourcentage d'infections multiples en fonction du traitement parmi les plantes malades en 2008/2009/2010



Graphique 7 : Dynamique des infections multiples versus infections simples au cours des trois années



IM : Infections Multiples ; IS : Infections Simples

3.4. Nombre de génotypes par plante

Les facteurs « Nombre de branches infectées en 2010 », « Nombre de branches infectées en 2009 » et « Traitement » ont un effet significatif sur le nombre de génotypes par plante (Tableau 3).

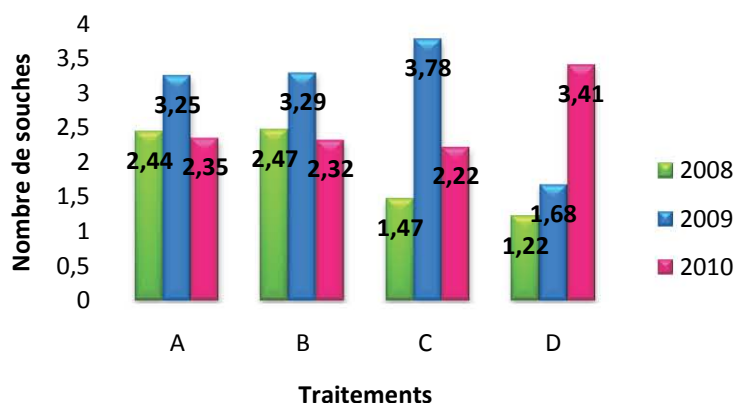
En 2009, le nombre moyen de souches par plante était supérieur à celui pour 2008 pour tous les traitements tandis qu'en 2010, les trois traitements A, B et C enregistrent une valeur moins importante et seule la modalité D présente une hausse du nombre de génotypes par plantes, pour se rapprocher, et même dépasser, celle des autres traitements (Graphique 8). Les nombres de souches en 2009 et 2010 étaient significativement corrélés ($R=0,24$; $P=0,015$, Graphique 9).

Tableau 3: ANOVA pour tester l'effet de différents facteurs sur le nombre de géotypes par plante ; modèle complet $R^2 = 0,64$. L'effet « souche » est l'identité de la ou des souches inoculées et il est hiérarchisé dans l'effet « traitement » (groupes de souches plus ou moins apparentées, ou souches inoculées seules).

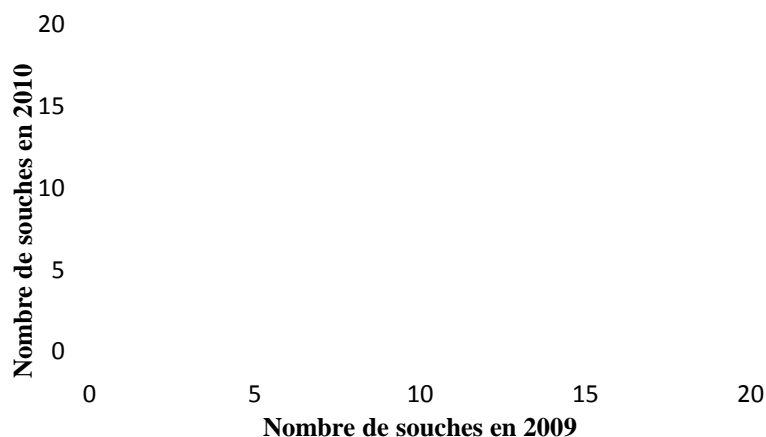
Facteur	d.d.l.	Somme des carrés	P
Nombre de branches infectées en 2010*	1	5,497	0,0017
Nombre de branches infectées en 2009*	1	9,568	<0,0001
Nombre de géotypes en 2009	1	0,168	0,671
Traitement*	2	6,584	0,0339
Souche [traitement]	17	9,006	0,903

Sont indiquées en gras et avec un astérisque les valeurs significatives ou marginalement significatives

Graphique 8 : Nombre moyen de géotypes par plante en fonction du traitement



Graphique 9 : Nombre de géotypes en 2010 en fonction du nombre de géotypes en 2009



3.5. Apparentement

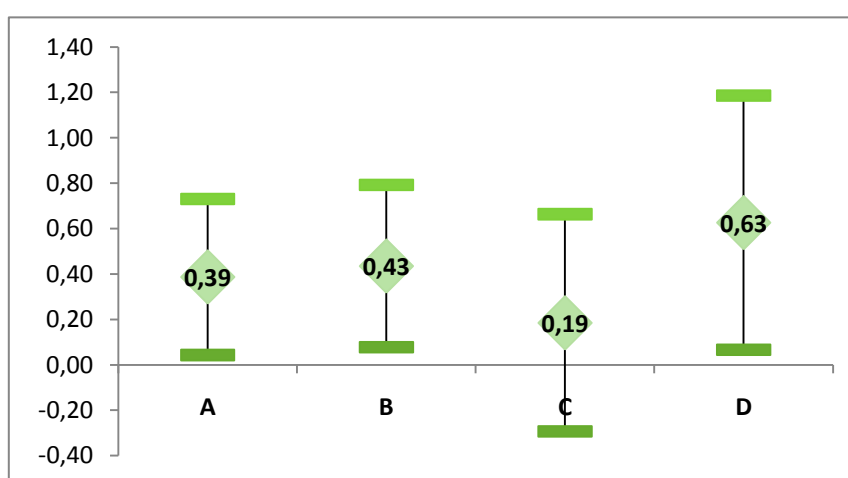
Seules le facteur « infections multiples en 2009 » a un effet marginalement significatif sur l'apparentement mesuré entre les géotypes d'une même plante à l'aide des marqueurs microsatellites (Tableau 4). Les plantes présentant des infections multiples en 2009 ont plus de géotypes apparentés que ceux avec des infections simples. On observe un apparentement moyen décroissant pour les traitements dans l'ordre D, B, A et C (Graphique 10). Les facteurs « sexe » et « traitements » sont non significatifs.

Tableau 4 : ANOVA pour tester l'effet de différents facteurs sur l'apparement des génotypes présentes au sein d'une plante ; modèle complet $R^2 = 0,27$.

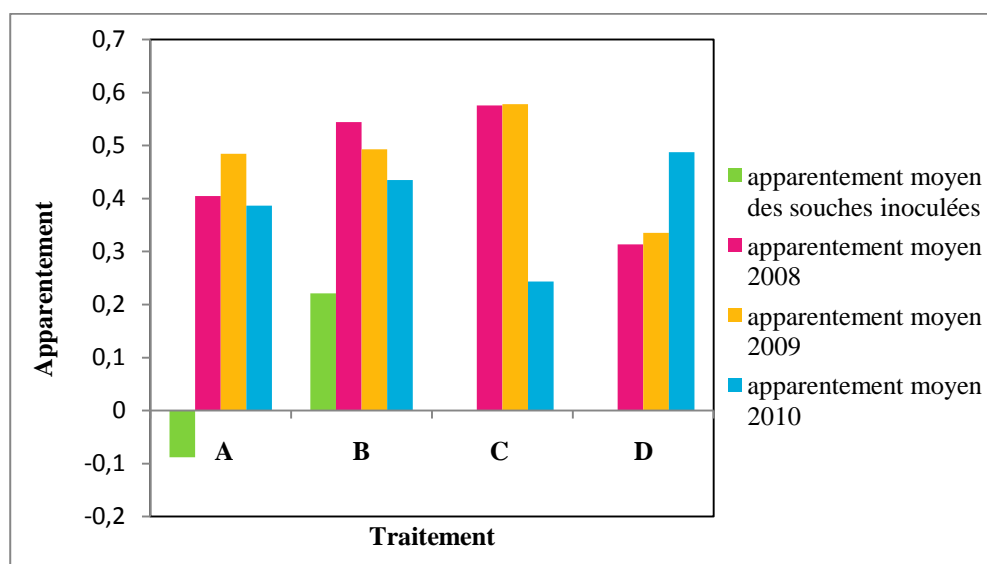
Facteur	d.d.l.	Somme des carrés	P
Nombre de génotypes 2009	1	0,0743	0,4957
Nombre de génotypes en 2010	1	0,0357	0,6357
Sexe	1	0,0400	0,6162
Traitement	3	0,0497	0,9551
Infection multiple 2009*	1	0,6019	0,0614

Sont indiquées en gras et avec un astérisque les valeurs significatives ou marginalement significatives

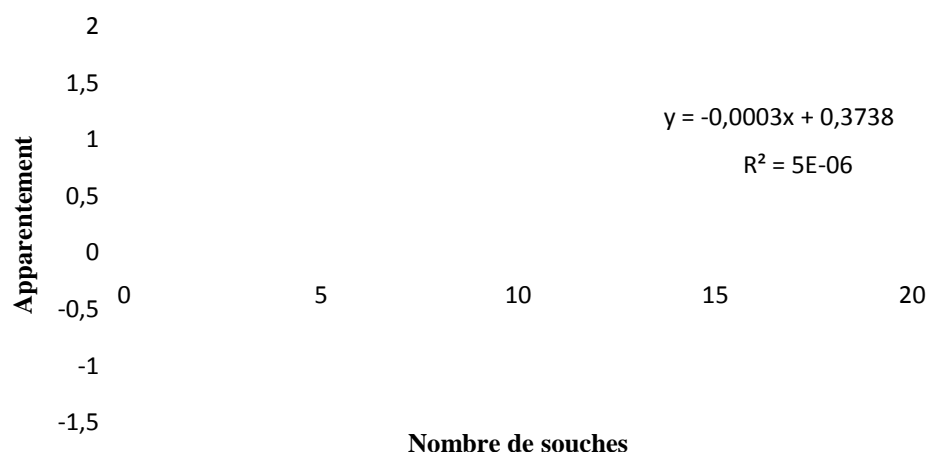
Graphique 10 : Apparement en fonction du traitement pour 2010



Graphique 11 : Apparement moyen des génotypes par traitement en 2008/2009/2010



Graphique 12: L'apparement en fonction du nombre de génotypes dans la plante



L'apparement moyen des génotypes au sein des plantes était positif pour tous les traitements et toutes les années, même pour le traitement A pour lequel les souches inoculées étaient moins apparementées (les souches inoculées au départ avaient un apparement négatif) (Par définition, l'apparement moyen entre tous les génotypes du jardin est de 0 et l'apparement d'un génotype avec lui-même est de 1) (Graphique 11). L'apparement décroît légèrement avec le nombre de génotypes par plante (Graphique 12) mais l'effet n'est pas significatif.

3.6. Degré de stérilisation

Parmi les plantes malades, les plantes totalement stérilisées représentaient seulement 47% (Graphique 13). Le degré de stérilisation (pourcentage de branches infectées) n'a été mesuré qu'en 2009 et 2010. Le facteur « Infectée en 2009 » a un effet significatif sur le degré de stérilisation en 2010: les plantes sont d'autant plus stérilisées qu'elles étaient déjà infectées en 2009. Certains traitements apparaissent donner des plantes plus ou moins stérilisés en 2010 mais l'effet n'est pas significatif (Graphique 14). Le facteur « sexe » est non significatif, traduisant que les plantes males sont autant stérilisés que les plantes femelles (Graphique 15, Tableau 5). Le degré de stérilisation a tendance à augmenter avec le nombre de souches présentes dans la plante mais l'effet n'est pas significatif (Graphique 16).

Graphique 13 : pourcentage d'infection partielle versus infection totale en 2010 pour les plantes malades

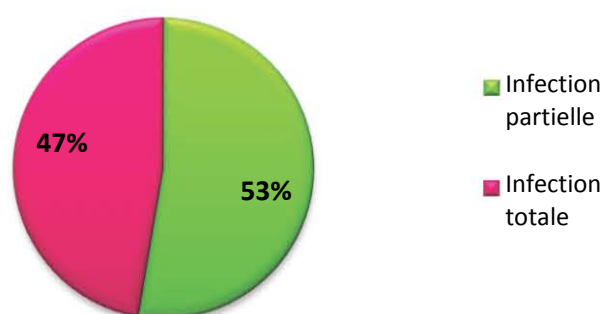
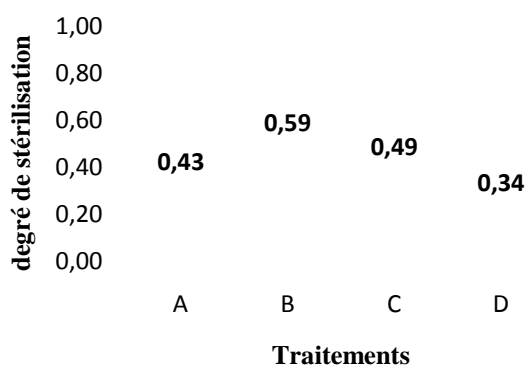


Tableau 5 : ANOVA pour tester l'effet de différents facteurs sur le degré de stérilisation ; modèle complet
 $R^2 = 0,10$

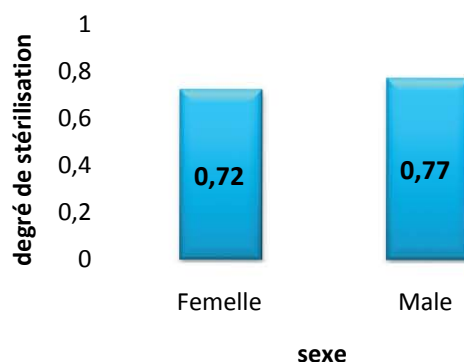
Facteur	d.d.l.	Somme des carrés	P
Sexe	1	0,2016	0,1176
Traitement	3	0,2057	0,4734
Infectées en 2009*	1	0,3314	0,0452
Nombre de souches	1	0,0031	0,3540
Infections multiples	1	0,0704	0,8448

Sont indiquées en gras et avec un astérisque les valeurs significatives ou marginalement significatives

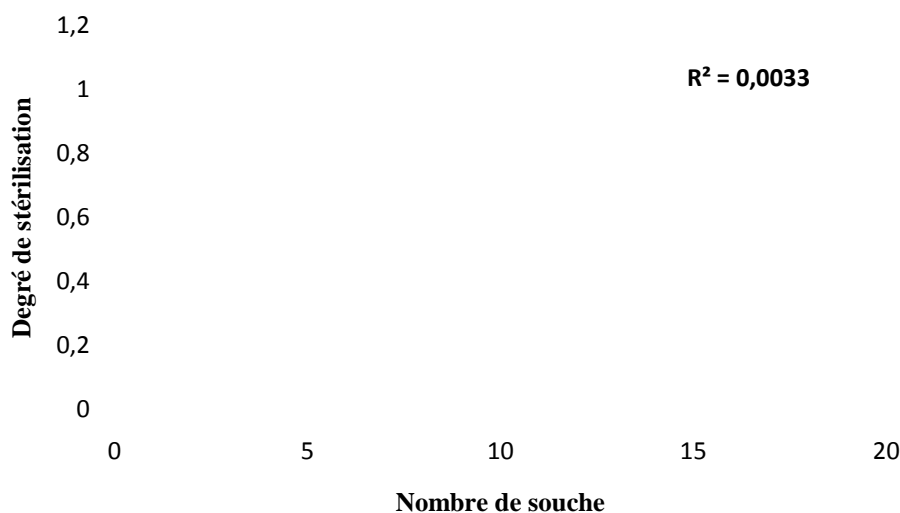
Graphique 14: Degré de stérilisation en 2010 en fonction des traitements appliqués en 2008



Graphique 15 : Degré de stérilisation en fonction du sexe



Graphique 16 : Degré de stérilisation en fonction du nombre de géotypes dans la plante



3.7. Degré de stérilisation par géotype au sein des plantes

Pour analyser si la virulence de chaque souche change avec les infections multiples, nous avons testé l'effet des différents facteurs sur le degré de stérilisation par géotype dans les plantes (pourcentage de branches infectées par géotype). L'ANOVA montre que le degré de stérilisation *par géotype* diminue significativement dans les infections multiples, et aussi diminue avec le nombre de géotypes par plante (Tableau 6 et Graphique 17).

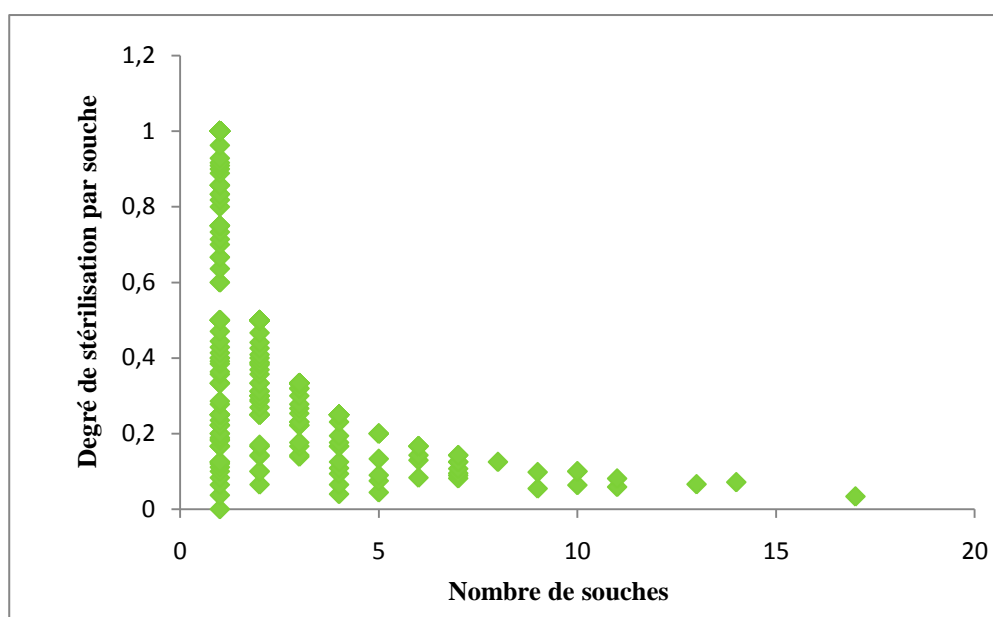
L'apparement n'avait pas d'effet significatif, même si la tendance était la même qu'en 2009, avec une augmentation de la stérilisation par génotype avec l'apparement (Graphique 18).

Tableau 6 : ANOVA pour tester l'effet de différents facteurs sur le degré de stérilisation par génotype; modèle complet $R^2 = 0,49$

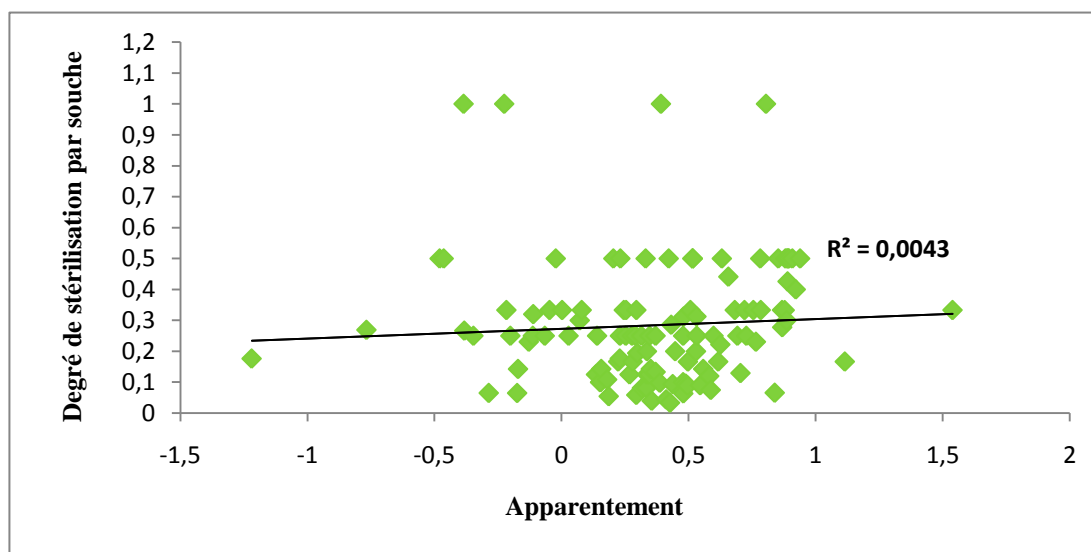
Facteur	d.d.l.	Somme des carrés	P
Sexe	1	0,0123	0.4496
Traitements	3	0,0128	0,8961
Nombre de génotypes	1	0,7044	<0.0001
Infections multiples*	1	0,2022	0.0030
Apparement	1	0,0206	0,3297

Sont indiquées en gras et avec un astérisque les valeurs significatives ou marginalement significatives

Graphique 17: Degré de stérilisation par génotype en fonction du nombre de génotypes pour 2010



Graphique 18 : Degré de stérilisation par génotype en fonction de l'apparement entre les génotypes dans la plante



3.8. Guérison

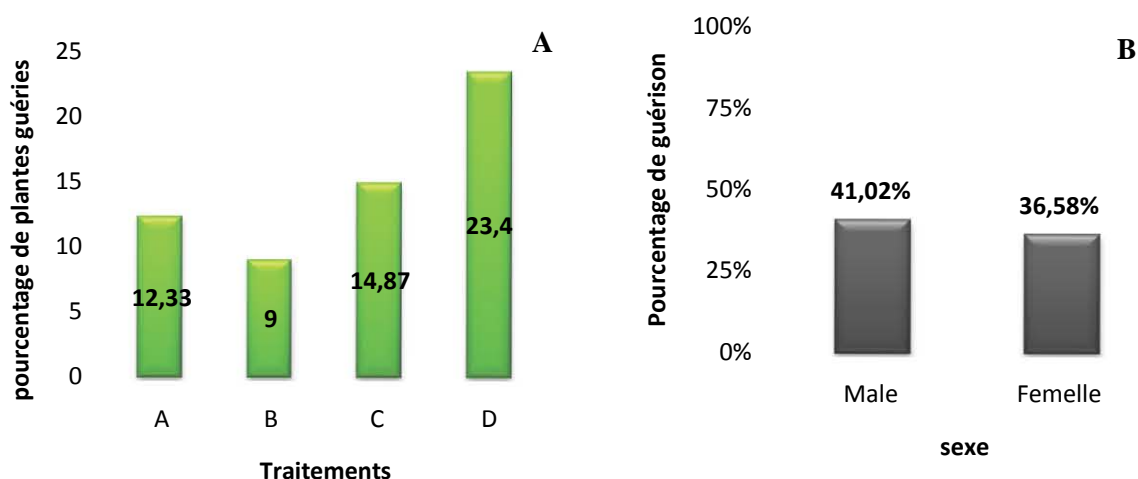
D'après le modèle complet, les facteurs « sexe » et « nombre de **génotypes** » n'ont pas d'effet significatif pour expliquer la guérison (Tableau 7). Le traitement présente un effet significatif. Ainsi, le traitement des témoins naturels D guérit plus que les trois autres traitements (de A à C) infectés par inoculation (Graphique 19, A). L'apparement, le sexe (Graphique 19, B) et le degré de stérilisation en 2009 n'ont pas d'effet sur la guérison des Silènes.

Tableau 7: régression logistique pour tester l'effet de différents facteurs sur la probabilité de guérison ; modèle complet $R^2 = 0,18$.

Facteur	d.d.l.	Chi ²	P
Sexe	1	0,6462	0,4215
Traitement*	3	10,7910	0,0129
Infections multiples en 2009	1	0,0104	0,9188
Nombre de génotypes en 2009	1	0,1012	0,7503

Sont indiquées en gras et avec un astérisque les valeurs significatives ou marginalement significatives

Graphique 19: Pourcentage de guérisons en fonction du traitement (A), et du sexe de la plante (B) en 2008



3.9. Mortalité

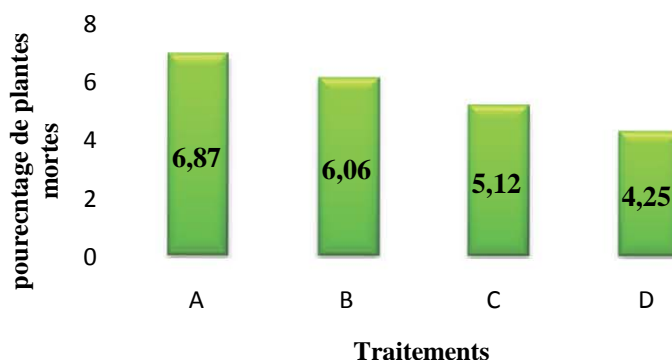
Lors de la récolte des plantes infectées en 2010, un taux de mortalité entre 4 et 6% a été observé (62 silènes mortes : 6,06% de mortalité pour les plantes du traitement B, 6,87% pour les plantes du traitement A, 5,12% pour les plantes du traitement C et 4,25% pour les plantes du traitement D). Selon le test effectué, seul le fait d'être infectée en 2009 a un effet significatif sur la probabilité de mourir des plantes. Les traitements A et B semblent avoir une plus grande mortalité, mais l'effet n'est pas significatif (Graphique 20, Tableau 8).

Tableau 8: régression logistique pour tester l'effet de différents facteurs sur la probabilité de mourir ; modèle complet $R^2 = 0,023$.

Facteur	d.d.l.	Chi ²	P
Traitement	3	1,8046	0,6139
Infectée en 2009*	1	4,4922	0,0340

Sont indiquées en gras et avec un astérisque les valeurs significatives ou marginalement significatives

Graphique 20 : Pourcentage de plantes mortes en fonction des traitements en 2010



IV. Discussion

Nous avons examiné la dynamique des infections multiples du champignon *Microbotryum violaceum*, qui cause l'infection systémique connue sous le nom de la maladie du charbon des anthères dans la plante *Silene latifolia*, ainsi que l'effet des infections multiples et de l'apparement sur la virulence. Pour cela, nous avons déterminé à l'aide de marqueurs microsatellites, dans un jardin où des plantes avaient été inoculées expérimentalement, le nombre de souches par plante sur trois années, les apparements entre souches, les taux de guérison, nouvelles infections, colonisations par de nouvelles souches et nous avons estimé la virulence à travers le degré de stérilisation.

4.1. Dynamique des infections

En 2010, un fort taux de guérison, de nouvelles infections, des réinfection (plantes infectées en 2008, classée comme étant saines en 2009 et infectées en 2010) ainsi que de nombreuses plantes qui n'étaient pas complètement stérilisées (qui possédaient des branches saines et infectées) ont été observées. Ces observations étaient inattendues étant donné ce que l'on pensait connaître sur *Microbotryum*, et elles paraissent en désaccord avec la théorie sur les parasites castrateurs qui prédit que le niveau optimal de castration est une castration totale (Ebert *et al*, 2004 ; O'Keefe and Antonovics, 2002). Dans les populations naturelles de *S. latifolia*, les plantes sont considérées comme complètement stérilisées.

Il se peut que le degré de stérilisation ait été mal estimé dans les populations naturelles, ou que les plantes dans le jardin deviennent complètement stérilisées dans quelques années. Il faudra continuer à suivre le degré de stérilisation dans le jardin sur plusieurs années pour comprendre ce phénomène. Mais la castration incomplète et le pourcentage de guérison non négligeable valide nos paramètres d'estimations de la virulence. Le degré de stérilisation est directement lié au nombre de branches permettant à l'hôte de se reproduire, et donc à sa valeur sélective.

Une diminution du nombre de génotypes par plante a été observé en comparaison avec les années précédentes essentiellement pour les traitements A et B tandis que le traitement D présente une augmentation de ce paramètre trois ans de suite. Le nombre d'infections multiples enregistre des baisses importantes entre 2009 et 2010 mais cela peut être dû au fait qu'on a moins de données par marqueur (due à un problème technique survenu au cours du stage) et moins de marqueurs. Les plantes non inoculées présentent des taux d'infections

multiples assez faibles au départ qui augment à fur et à mesure des années. Ces résultats montrent que de nombreuses infections se sont produites, par dispersion des spores par les pollinisateurs, le vent et la pluie, comme il était recherché dans cette expérience, pour étudier la dynamique des infections. Ces taux de nouvelles infections élevés sont également surprenants étant donné les taux d'infection annuels observés en populations naturelles (Antonovics *et al.* 1994). Cela est peut-être dû à des densités et fréquences très élevées de plantes malades dans notre population expérimentale.

Nos résultats ont montré que les plantes mâles sont plus infectées que les *Silene* femelles et cela était aussi vrai pour les deux années précédentes (2008-2009). Des études d'infections expérimentales (Kaltz et Shykoff, 2001; Giraud *et al.*, 2005) ont montré le même effet. Les auteurs suggéraient que cela était dû au fait que les plantes mâles produisent beaucoup plus de fleurs, contenant plus de nectar sucré, et donc qu'elles reçoivent plus de visites de pollinisateurs que les femelles et sont mieux exposées à l'infection. Cependant, une autre étude à travers plusieurs populations naturelles de *S. latifolia* montrait une prévalence de la maladie plus élevée chez les femelles (Shykoff *et al.*, 1996), ce qui peut s'expliquer par une guérison plus fréquente chez les mâles, comme nous l'avons observé.

Nous avons montré que le traitement sans inoculations artificielles (D) donne moins de plantes malades que les traitements avec inoculations : les inoculations artificielles ont bien augmenté la probabilité d'infection, ce qui était attendu étant donné le grand nombre de spores inoculées par rapport au nombre de spores dispersées naturellement.

4.2. Dynamique des infections multiples et apparentement

Les infections multiples étaient globalement fréquentes dans le jardin, en accord avec les observations en populations naturelles (López-Villavicencio *et al.*, 2007), et dans des expériences précédentes d'inoculations artificielles (Giraud *et al.*, 2005). Les infections multiples étaient moins fréquentes dans le traitement D sans inoculations et dans le traitement C avec une seule souche inoculées que dans les traitements A et B en 2009 alors qu'en 2010, les pourcentages observés sont totalement inversés, avec plus d'infection pour D et C que pour A et B mais cela est peut être due au manque de données.

La corrélation positive entre le nombre de branches infectées et le nombre de souches est attendue et déjà trouvée dans l'étude faite par López-Villavicencio *et al.* en 2007 dans les populations naturelles, où les plantes avec le plus de tiges ont une plus grande probabilité de porter différents génotypes fongiques. Cette corrélation est en accord avec le fait que les plantes avec le plus de fleurs sont plus souvent visitées par les pollinisateurs (Shykoff and Bucheli, 1995) et que les différentes branches d'une plante peuvent être a priori plus facilement indépendamment infectées par des génotypes parasites distincts.

En 2010, dans les plantes avec infections multiples en 2009, les souches étaient significativement apparentées entre elles au sein des plantes, même pour les plantes du traitement A, malgré que les souches inoculées au départ avaient été choisies pour être très différentes génétiquement (avec un apparentement négatif, c'est-à-dire des souches moins similaires qu'attendu par hasard étant données les fréquences alléliques dans le jardin). Même

dans le traitement B de combinaisons de souches similaires, l'apparement au sein des plantes était finalement encore plus élevé que celui des souches inoculées.

Tous ces résultats confirment que des souches très différentes génétiquement ne peuvent pas coexister ensemble dans une plante, car finalement seules des souches apparentées arrivent à infecter la même plante. Ceci est en accord avec une étude menée en populations naturelles (López-Villavicencio, 2007) et une étude d'inoculations expérimentales (Koskella *et al.*, 2006) qui supportaient l'idée de l'existence de mécanismes d'exclusions compétitives conditionnels à l'apparement des souches impliquées. Cette exclusion pourrait venir de la production de toxines contre les compétiteurs, ou de mécanismes d'incompatibilité végétative comme la mort des cellules hyphales après la fusion de deux génotypes génétiquement différents.

L'apparement n'a pas augmenté entre les années 2008 et 2009 mais il enregistre une baisse en 2010 essentiellement pour les deux traitements C et D. Les différences de nombres de génotypes entre 2008, 2009 et 2010 n'étaient pas significatives, ce qui suggère que ce niveau d'apparement au sein des plantes peut être stable.

Il paraît surprenant que le nombre de génotypes par plante soit corrélé négativement avec l'apparement. Une explication pourrait être que, si l'on considère les plantes qui portent les souches les moins apparentées, il est logique qu'il s'agisse des plantes qui portent également le plus grand nombre de souches : la probabilité que des souches moins apparentées arrivent à s'établir dans une plante pourrait augmenter avec le nombre de souches qui arrivent à infecter la plante.

4.3. Effet des infections multiples et apparement sur la virulence

Nous avons ensuite mesuré différents paramètres estimant la virulence du champignon (degré de stérilisation globalement et par génotype), pour déterminer si la virulence augmentait en infections multiples. Le degré de stérilisation augmente avec le nombre de génotypes par plante, mais ceci est peut être juste un effet additif de la virulence des différentes souches, et pas une augmentation de la virulence au niveau de chaque souche individuellement. Le degré de stérilisation par génotype (pourcentage de branches infectées par génotype) diminuait en effet avec le nombre de souches par plante : plus il y a de souches dans les plantes, moins elles parviennent chacune à infecter un grand nombre de branches, probablement par des effets de compétition. Le degré de stérilisation par souche augmentait avec l'apparement entre souche, ce qui est compatible avec une compétition moins forte entre apparentés. Nous mettons donc en évidence une augmentation globale de la virulence en infection multiple mais des effets antagonistes entre différentes souches au sein des plantes, et d'autant plus forts que les souches sont moins apparentées.

V. Conclusion et perspectives

L'étude réalisée apporte des informations sur les dynamiques des infections multiples du système *Silene - Microbotryum* en populations naturelles et sur les facteurs qui influencent ces dynamiques. Il est vraiment intéressant de trouver un système si dynamique avec de nombreuses guérisons et de nouvelles infections chaque année. Etant donné le degré de

variabilité dans le degré d'infections multiples en populations naturelles (López-Villavicencio, 2007), on pouvait s'attendre à ce qu'il y ait eu une évolution vers une plasticité dans la virulence du champignon en fonction du nombre de souches par plante.

M. violaceum est capable d'exclure des compétiteurs non apparentés et de moduler son niveau de virulence en fonction du nombre de souches dans son hôte et de leur degré d'apparentement, dans le sens des prédictions théoriques. Nous avons montré que la compétition entre souches de *Microbotryum* au sein des plantes semble avoir un effet négatif sur la colonisation de la plantes, mais que cet effet s'amenuise avec un apparentement croissant : chacun des génotypes peut occuper moins de branches dans une plante avec infections multiples, et d'autant moins que les souches sont moins apparentées.

Il s'agit d'une des très rares études qui arrivent à montrer expérimentalement que les infections multiples augmentent la virulence, et ce d'autant plus que le nombre de génotypes dans l'hôte est élevé, et que l'apparentement au sein d'un même hôte au contraire diminue la virulence des parasites. Notre étude est également une des rares à montrer un effet de la compétition entre souches de pathogènes au sein d'un hôte qui dépende de l'apparentement. Nos résultats sont donc très importants pour comprendre l'évolution de la virulence des maladies en général.

Pour compléter notre travail, il serait intéressant de continuer à suivre les plantes multi-infectées sur plusieurs années afin de suivre leur dynamique d'une année sur l'autre, déterminer si les plantes vont être à terme complètement stérilisées, si les infections multiples vont se stabiliser ou même décroître, et continuer à étudier les effets des infections multiples et de l'apparentement sur la virulence. Il pourrait également être intéressant d'étudier les infections multiples chez d'autres espèces de plantes infectées par des espèces de *Microbotryum*, comme *Silene vulgaris*. Cette espèce de plante serait particulièrement intéressante dans la mesure où 3 espèces différentes de *Microbotryum* la parasitent, et l'étude pourrait donc être étendue au niveau de la compétition inter-spécifique.

Listes des références bibliographiques

- Alizon S., Hurford A., Mideon N. & Van Baalen M., 2008. Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology*. **22** : 245- 259.
- Antonovics J., Thrall P.H., Jarosz A.M., & Stratton D., 1994. Ecological genetics of metapopulations: the *Silene-Ustilago* plant-pathogen system. In: *Ecological Genetics*, (Real, L.A., ed.): 146-170. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Brown S. P., Hochberg M. E. & Grenfell B. T., 2002. Does multiple infection select for raised virulence? *Trends in Microbiology*, **10**: 401-405.
- Chao L., Hanley K. A., Burch C. L., Dahlberg C. & Turner P. E., 2000. Kin selection and parasite evolution: Higher and mowser virulence with hard and soft selection. *Quartly Review of Biology*, **75**: 261-275.
- Chevaugnon J., 1957. Revue de phytopathologie, mode d'action des champignons parasites. *Bulletin de la société botanique de France*. **104** : 57-101.
- Davies C. M., Fairbrother E. & Webster J. P., 2002. Mixed strain schistosome infections of snails and the evolution of parasite virulence. *Parasitology*, **124**: 31-38.
- De Roode J. C., Helinski M. E. H., Anwar M.A. & Read A.F., 2005. Dynamics of multiple infection and within-host competition in genetically diverse malaria infections. *The American Naturalist*, **168**: 121-126.
- Ebert D., 2004. The evolution of virulence when parasites cause host castration and gigantism. *The American Naturalist*, **164**: 19-32.
- Gandon S., Mackinnon M. J., Nee S. & Read A. F., 2001. Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. *Nature*. **414**: 751-755.
- Giraud T., Yockteng R., Lo'pez-Villavicencio M., Refre'gier G. & Hood M. E., 2008. Mating System of the Anther Smut Fungus *Microbotryum violaceum*: Selfing under Heterothallism. *Minireviews Eukaryotic Cell*. **7** : 765-775.
- Gold A., Giraud T. & Hood M.E., 2009. Within-host competitive exclusion among species of the anther smut pathogen. *BMC Ecology*. **9**: 11-20.
- Hodgson D. J., Hitchman R. B., Vanbergen A. J., Hails R. S., Possee R. D. & Cory J. S., 2004. Host ecology determines the relative fitness of virus genotypes in mixed-genotype nucleopolyhedrovirus infections. *Journal of Evolutionary Biology*. **17**: 1018-1025.
- Hugues W. O. H. & Boosma J. J., 2004. Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. *Proceedings of the Royal Society B London*. **271**: S104-S106.
- Jensen K. H., Little T., Skorping A. & Ebert D., 2006. Empirical support for optimal virulence in a castrating parasite. *Plos Biology*, **4**: 197-202.
- Kaltz O. & Shykoff J. A., 2001. Male and female *Silene latifolia* plants differ in per-contact risk of infection by a sexually transmitted disease. *Journal of Ecology*. **89**: 99-109.
- Koskella B., Giraud T. & Hood M. E., 2006. Pathogen relatedness affects the prevalence of within-host competition. *The American Naturalist*, **168**: 121-126.
- Lagrue C., Poulin R. & Keeney D. B., 2009. Effects of clonality in multiple infections on the life-history strategy of the trematode *Coitocaecum parvum* in its amphipod intermediate host. *Evolution*. **63**: 1417-1426.
- Lively C. M., 2005. Evolution of virulence: coinfection and propagule production in spore-producing parasites. *BMC Evolutionary Biology*. **5**: 64-75.

- Lo´pez-Villavicencio M., Enjalbert J., Hood M. E., Shykoff J. A., Raquin C. & Giraud T., 2005. The anther smut disease on *Gypsophila repens*: a case of parasite sub-optimal performance following a recent host shift. *Journal of Evolutionary Biology*. **18**: 1293-1303.
- López -Villavicencio M., Enjalbert J., Hood M. E., Shykoff J. A., Raquin C. & Giraud T., 2007. Multiple infections by the anther smut pathogen are frequent and involve related strains. *Plos Pathogens*, **3**: 176-181.
- Lo´pez-Villavicencio M., Courjol F., Gibson A. K., Hood M. E, Jonot O., Shykoff J. A. & Giraud T., 2011. Competition, cooperation among kin, and virulence in multiple infections. *Evolution*. **2**: 1-10.
- Massey R. C, Buckling A. & French-constant R., 2004. Interference competition and parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society B London*. **271**: 785-788.
- O’Keefe K. J. & Antonovics J., 2002. Playing by different rules: The evolution of virulence in sterilizing pathogens. *The American Naturalist*, **159**: 597-605.
- Schjorring S, & Koella J.C., 2003. Sub-lethal effects of pathogens can lead to the evolution of lower virulence in multiple infections. *Proceedings of the Royal Society B London*, **270**: 189-193.
- Shykoff J.A., Bucheli E. & Kaltz O., 1996. Flower life span and disease risk. *Nature*, **379**: 779-783.
- Shykoff J. A. & Bucheli E., 1995. Pollinator visitation patterns, floral rewards and the probability of transmission of *Microbotryum violaceum*, a venereal disease plant. *Journal of Ecology* **83**: 189-198.
- Taylor L. H., Mackinnon M. J. & Read A. F., 1998. Virulence of mixed clone and single-clone infections of the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Evolution*, **52**: 583-591.
- Thrall P.H., Biere A. & Antonovics J., 2003. Plant life-history and disease susceptibility-The occurrence of *Ustilago violacea* on different species within the Caryophyllaceae. *Journal of Ecology*, **81**: 489-498.
- Van Baalen M. & Sabelis W. S., 1995. The dynamics of multiple infection and the evolution of virulence. *The American Naturalist*, **146** : 881-910.