



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>

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Nancy I - Henri Poincaré

Discipline : Biologie végétale et Forestière

Ecole doctorale : Ressources Procédés Produits Environnement

Département de Formation Doctoral : Sciences Agronomiques et Forestières, Biologie et
Ecologie, Biotechnologie

par

Audrey ANDANSON

Déposée le 7 Juillet 2010

Evolution de l'agressivité des champignons phytopathogènes, couplage des approches théorique et empirique

JURY

Marie-Laure Desprez-Loustau	Directrice de recherche INRA, Bordeaux	Rapporteur
Sylvain Gandon	Chargé de recherche CNRS, Montpellier	Rapporteur
Christian Lannou	Directeur de recherche INRA, Grignon	Examineur
Olivier Restif	Chercheur à la Royal Society University	Examineur
Eric Gelhaye	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I	Examineur
Samuel Alizon	Chargé de recherche CNRS, Montpellier	Membre invité
Benoît Marçais	Chargé de recherche INRA, Nancy	Directeur de thèse

Doctorat encadré par :

Fabien Halkett, UMR 1136 INRA/UHP Interactions Arbres-Microorganismes, Ecologie des
champignons pathogènes forestiers, Centre INRA de Nancy, Champenoux

et

Virginie Ravigné, UMR BGPI CIRAD/INRA/ENSAM Biologie et Génétique des Interactions
Plante-Parasite, Biologie Evolutive des Champignons Phytopathogènes, Campus international
de Baillarguet, Montpellier.

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Nancy I - Henri Poincaré

Discipline : Biologie végétale et Forestière

Ecole doctorale : Ressources Procédés Produits Environnement

Département de Formation Doctoral : Sciences Agronomiques et Forestières, Biologie et
Ecologie, Biotechnologie

par

Audrey ANDANSON

Déposée le 7 Juillet 2010

Evolution de l'agressivité des champignons phytopathogènes, couplage des approches théorique et empirique

JURY

Marie-Laure Desprez-Loustau	Directrice de recherche INRA, Bordeaux	Rapporteur
Sylvain Gandon	Chargé de recherche CNRS, Montpellier	Rapporteur
Christian Lannou	Directeur de recherche INRA, Grignon	Examineur
Olivier Restif	Chercheur à la Royal Society University	Examineur
Eric Gelhaye	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I	Examineur
Samuel Alizon	Chargé de recherche CNRS, Montpellier	Membre invité
Benoît Marçais	Chargé de recherche INRA, Nancy	Directeur de thèse

Doctorat encadré par :

Fabien Halkett, UMR 1136 INRA/UHP Interactions Arbres-Microorganismes, Ecologie des
champignons pathogènes forestiers, Centre INRA de Nancy, Champenoux

et

Virginie Ravigné, UMR BGPI CIRAD/INRA/ENSAM Biologie et Génétique des Interactions
Plante-Parasite, Biologie Evolutive des Champignons Phytopathogènes, Campus international
de Baillarguet, Montpellier.

« Au bout de tout savoir et de tout accroissement de notre savoir,
il n'y a pas un point final, mais un point d'interrogation. »

Herman Hesse (1877-1962)

Remerciements

Je souhaite remercier ici tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux encadrants, Virginie Ravigné et Fabien Halkett pour les nombreux et très enrichissants échanges que nous avons pu avoir au cours de ces trois années. Je remercie en particulier Virginie pour ses grandes qualités à dompter les équations et les logiciels mathématiques !

Je tiens également à remercier Francis Martin, Benoit Marçais, Jean-Loup Notteghem, Jean Carlier ainsi que tous les membres des UMRs IAM et BGPI pour leur accueil et leur grande sympathie.

Je souhaite remercier vivement Elisabeth Fournier et Didier Tharreau d'avoir accepté de m'encadrer dans la réalisation des expériences sur *Magnaporthe oryzae*. J'ai découvert et réalisé toutes ces manipulations en laboratoire (allant de la mycologie à la biologie moléculaire) avec un immense plaisir. Je souhaite également remercier toutes les autres personnes qui m'ont guidées, conseillées, et aidées au laboratoire et ont contribué par leur humour et leur bonne humeur à ce que j'adopte « la blouse » avec le plus grand plaisir : Joëlle Milazzo, Marie-Françoise Zapater, Henri Adreit, Christophe Tertois, Corinne Michel, Véronique Chalvon, Stelly Mississippi, Mélanie Marguerettaz, Dounia Saleh, Amandine Delteil, Juliette Doumayrou pour sa patience et ses très nombreux conseils sur la qPCR et tous les autres.

Je remercie Ludovic Mailleret et Frédéric Grognard pour leur aide précieuse sur les méthodes d'optimisation dynamique et les discussions très intéressantes que nous avons eues sur la modélisation des stratégies de vie des champignons pathogènes.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, qui ont suivi l'élaboration de ce travail et ont été de très bon conseils : Jean Carlier, Alain Franc, Christian Lannou, Manuel Plantegenest.

Je voudrais remercier tout particulièrement Marie-Laure Desprez-Loustau et Sylvain Gandon d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que toutes les personnes qui ont accepté de constituer mon jury de thèse : Samuel Alizon, Eric Gelhaye, Christian Lannou et Olivier Restif.

J'adresse de nombreuses pensées chaleureuses à tous les doctorants que j'ai eu beaucoup de plaisir à côtoyer pendant ces trois années et qui m'ont aidés par leurs conseils, leur soutien et leur inébranlable bonne humeur : Constance Xhaard, Fabrice Elegbede, Stéphanie Robert, Dounia Saleh, Mélanie Marguerettaz, Pierre-Olivier Duroy, Juliette Doumayrou...

Enfin, un immense merci à Daniel pour son soutien et sa patience tout au long de cette thèse.

Table des Matières

Remerciements	3
Table des Matières	4
1 Introduction	5
1.1 Evolution de l'agressivité des champignons phytopathogènes	5
1.2 Liens entre l'agressivité des champignons phytopathogènes et la virulence des pathogènes producteurs de spores	7
1.3 Evolution de la virulence.....	10
1.4 Marier l'expérience à la théorie	15
1.5 Projet de thèse	17
2. La virulence comme résultat d'une stratégie d'infection complexe : approche théorique	20
2.1 Introduction	20
2.2 Un modèle pour des pathogènes qui ne peuvent utiliser qu'une quantité finie des ressources de l'hôte	25
2.3 Un modèle pour des pathogènes qui peuvent potentiellement utiliser une quantité infinie des ressources de l'hôte.....	69
2.4 Conclusion.....	73
3. Confrontation des modèles mathématiques à la réalité biologique	76
3.1 Objectifs et démarche empirique.....	76
3.2 Etude expérimentale de la stratégie d'allocation des ressources entre la croissance et la sporulation chez un pathogène capable d'exploiter une quantité finie des ressources de . l'hôte.....	77
4. Conclusion générale	95
5 Références bibliographiques	102
6. Annexes	110
6.1 Développements mathématiques du « modèle 2 » (<i>cf.</i> §2.3)	110
6.2 Protocoles expérimentaux de « l'expérience nécrotrophe ».....	115
6.3 Projets empiriques en cours de réalisation	124

1. Introduction

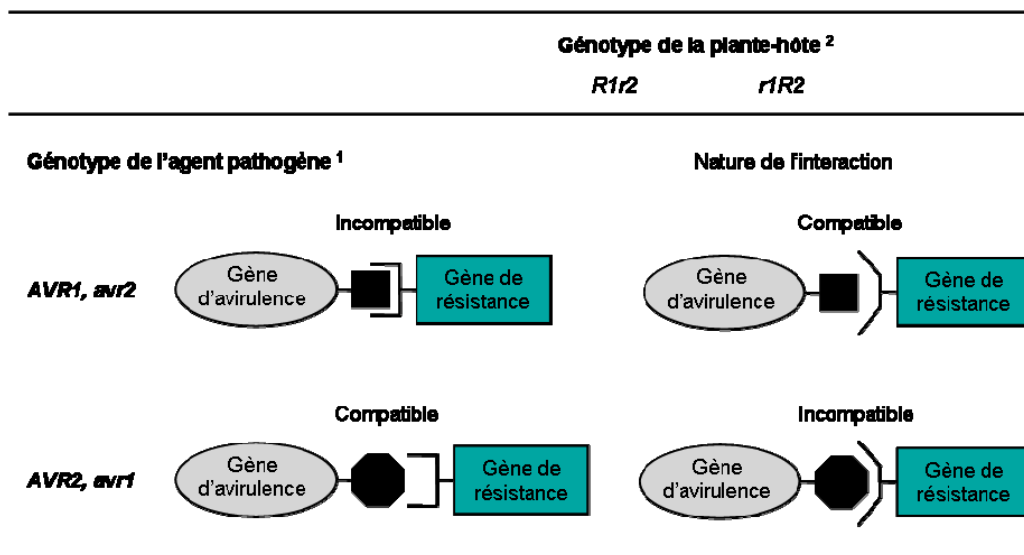
1.1 Evolution de l'agressivité des champignons phytopathogènes.....	5
1.2 Liens entre l'agressivité des champignons phytopathogènes et la virulence des pathogènes producteurs de spores.....	7
1.2.1 Agressivité et virulence.....	7
1.2.2 Des champignons phytopathogènes aux pathogènes producteurs de spores.....	8
1.3 Evolution de la virulence.....	10
1.3.1 Petit historique des recherches sur l'évolution de la virulence.....	10
1.3.2 La théorie du compromis et ses multiples développements.....	11
1.3.3 Evolution de l'histoire de vie des pathogènes.....	13
1.4 Marier l'expérience et la théorie.....	15
1.5 Projet de thèse.....	17
1.5.1 Objectifs et démarche.....	17
1.5.2 Organisation du manuscrit.....	18

Encadré 1

La Relation gène pour gène :

Le concept de la relation « gène pour gène » a été formalisé pour la première fois par Harold Henry Flor en 1946 et démontré par le même auteur sur la base de travaux de génétique réalisés sur les relations entre le lin et le champignon *Melampsora lini*, agent de la rouille du lin.

Ce concept, illustré par la Figure 1, postule qu'à chaque gène de résistance de l'hôte, correspond un gène de virulence du pathogène. Lorsqu'il y a interaction entre le produit d'un gène de résistance R de la plante et le produit d'un gène d'avirulence AVR du pathogène, la résistance de l'hôte se met en place. Elle empêche l'infection par le pathogène : la relation est alors dite incompatible et la plante résistante. Dans toutes les situations où, à un allèle AVR de l'agent pathogène ne correspond pas un allèle R de la plante, l'induction des mécanismes de défense de la plante est retardée, incomplète ou insuffisante. L'agent pathogène envahit alors la plante : la relation est dite compatible et la plante sensible. Un modèle « éliciteur/récepteur » a été proposé pour expliquer cette interaction. La formation du complexe des produits R-AVR induit un signal qui permet d'initier rapidement une cascade de signaux déclenchant les systèmes de défense de la plante tels que la production de substances nocives à l'agent pathogène (phytoalexines, enzymes lytiques telles que des chitinases ou glutanases) ou enrayant sa propagation (lignine, callose, etc...) (Lepoivre 2003).



¹ Allèle d'avirulence fonctionnel (AVR), allèle non fonctionnel (avr)

² Allèle de résistance fonctionnel (R), allèle non fonctionnel (r)

Figure 1. Interaction entre agent pathogène et plante-hôte dans le cadre de la résistance gène pour gène (Lepoivre 2003).

1 Introduction

1.1 Evolution de l'agressivité des champignons phytopathogènes

Le maintien d'une forte production agricole nécessite de savoir lutter efficacement contre les bio-agresseurs des cultures. Les champignons phytopathogènes sont, grâce à certaines caractéristiques de leur histoire de vie (comme l'asexualité partielle ou la multiplicité des cycles infectieux dans une saison épidémique), des organismes capables de s'adapter très rapidement à des modifications de leur environnement (McDonald et Linde 2002), ce qui conduit à la diminution et à la perte de l'efficacité des moyens de lutte. Les méthodes de lutte classiques contre ces pathogènes sont l'utilisation régulière et en quantité importante d'intrants. Ces méthodes sont coûteuses pour l'agriculteur et présentent des impacts négatifs importants sur les écosystèmes. Pour exemple, les pesticides utilisés pour la production céréalière en Ile de France représentent 33% des coûts de production (ONIGC, <http://www.onigc.fr/>). De plus, même si les traitements pesticides offrent globalement une protection efficace contre les maladies fongiques des cultures, leur efficacité est relativement peu durable à cause de l'adaptation rapide de ces populations pathogènes. *Mycosphaerella graminicola*, l'agent de la septoriose du blé, qui demeure une des principales contraintes dans la culture du blé, a par exemple développé des résistances à la plupart des pesticides récents (Leroux *et al.* 2007). En conséquence, on assiste à la multiplication du nombre d'applications et des types traitements utilisés dans de nombreux systèmes agricoles (par exemple de Lapeyre de Bellaire *et al.* 2009).

Une alternative plus durable et plus respectueuse de l'environnement à l'utilisation massive et systématique d'intrants est de tirer parti des résistances variétales pour lutter contre les bio-agresseurs des cultures. Depuis une cinquantaine d'années, on a assisté au déploiement massif de variétés présentant une résistance complète (ou qualitative) à un agent pathogène donné. Ce type de résistance variétale repose sur un déterminisme monogénique, qui conditionne la compatibilité de l'interaction entre l'hôte et le pathogène selon une relation gène pour gène (Flor 1971) (Encadré 1 et Figure 1). Même s'il existe des exceptions, la plupart des résistances complètes des variétés ont été plus ou moins rapidement contournées par les populations pathogènes (Samborski *et al.* 1985). Un exemple marquant est l'épidémie de rouille du peuplier (Figures 2 et 3) qui a eu lieu en France entre 1995 et 1999 et qui a causé une diminution de la production sans précédent (Barrès *et al.* 2008). Avant 1995, le cultivar



Figure 2. Plantation de peupliers (cultivar Beaupré) sévèrement infectée par *Melampsora* sp., à Aoste en Isère. Photo : Pascal Frey.



Figure 3. Urédies de *Melampsora larici-populina* sur la face inférieure d'une feuille de peuplier. Photo : Pascal Frey.

nommé Beaupré, présentant une résistance complète (gène de résistance R7) à *Melampsora larici-populina*, l'agent de la rouille du peuplier, était très apprécié des populteurs du fait de ses qualités exceptionnelles de croissance et de qualité du bois, et donc très largement répandu sur le territoire. La présence de vastes plantations monoclonales de ce cultivar sur de grandes échelles spatiales a constitué une forte pression de sélection, à l'origine du contournement de la résistance complète par les populations pathogènes et a permis la propagation rapide de l'épidémie. Les programmes d'amélioration du peuplier visaient l'augmentation de la productivité, de la qualité du bois et la résistance complète à *M. larici-populina*, l'agent pathogène le plus nuisible en populture. L'hybridation interspécifique qui est la technique utilisée pour la sélection variétale, a permis de regrouper ces caractères d'intérêts chez les cultivars sélectionnés, mais a également entraîné, par rupture de certaines associations alléliques non ciblées, la perte quasi-totale de la résistance quantitative à *M. larici-populina*. Une fois le gène de résistance R7 contourné en 1995, les dégâts infligés aux plantations de peupliers par les populations pathogènes de *M. larici-populina* ont donc été très importants, les cultivars ne disposant plus des moyens nécessaires pour se défendre contre l'agresseur une fois l'infection établie.

Plus récemment, les efforts de recherche se tournent vers les mécanismes dits de résistance partielle (ou quantitative), qui présentent un déterminisme polygénique. Ce type de résistance variétale limite l'impact des bio-agresseurs sur les cultures, en diminuant la sévérité des symptômes et en ralentissant la progression des épidémies (Shaner *et al.* 1978). Les résistances partielles, du fait de leur base génétique souvent plus complexe, et du fait qu'elles pourraient exercer une pression de sélection moins forte sur les populations pathogènes, sont souvent présumées plus durables que les résistances complètes (Kolmer 1996). Elles suscitent par conséquent un intérêt croissant pour les sélectionneurs. Cependant, les connaissances sur la durabilité effective de ce type de résistance restent très limitées (Mundt 2002). L'efficacité et la durabilité des résistances partielles dépendent respectivement des caractéristiques et de l'évolution de l'agressivité au sein des populations pathogènes (McDonald et Linde 2002). L'agressivité est un caractère complexe comprenant plusieurs composantes, qui peuvent ou non être corrélées entre elles et qui sont soumises à des forces évolutives différentes. Son évolution est donc complexe à appréhender et nos connaissances actuelles ne nous permettent pas de prédire comment l'agressivité des populations pathogènes évolue en réponse aux pressions de sélection exercées par les résistances partielles et donc quelle peut être la durabilité de ces résistances.

La durabilité des résistances variétales étant un enjeu majeur pour l'utilisation des variétés en agriculture, il est important d'augmenter nos connaissances sur les capacités d'adaptations des populations pathogènes aux résistances partielles et sur les modalités de ces éventuelles adaptations. De nombreux travaux de génétique des populations (McDonald et Linde 2002, Lindhout 2002, Stuthman 2002) et de génomique évolutive (Xu *et al.* 2006, Barry *et al.* 2007, Choquer *et al.* 2007, Gout *et al.* 2007, Polakova *et al.* 2009) sont menés dans cet objectif, mais la modélisation mathématique reste comparativement, peu utilisée, alors qu'elle a prouvé son utilité dans de nombreux autres domaines de la biologie évolutive. Dans ce contexte, il nous a paru nécessaire de se rapprocher du champ de recherche sur l'évolution de la virulence en épidémiologie animale et humaine, qui présente une grande richesse en travaux de modélisation mathématique. Afin d'étudier l'évolution de l'agressivité des champignons phytopathogènes à l'aide de la modélisation mathématique, nous avons donc souhaité faire le parallèle avec les recherches sur l'évolution de la virulence des pathogènes animaux pour tirer parti de ses nombreux apports théoriques.

1.2 Liens entre l'agressivité des champignons phytopathogènes et la virulence des pathogènes producteurs de spores

1.2.1 Agressivité et virulence

Depuis les débuts de la pathologie, différentes communautés scientifiques se sont intéressées indépendamment à l'étude des interactions hôte-parasite, ce qui a conduit à une utilisation non consensuelle des termes employés pour définir des concepts similaires.

En phytopathologie, le pouvoir pathogène se décline traditionnellement en une composante qualitative, la capacité d'un agent pathogène à infecter un hôte donné et à causer une maladie et une composante quantitative, le degré de dommages infligés à l'hôte par l'infection pathogène (Van der Plank 1968). Pour la majorité des phytopathologistes européens, la composante qualitative est appelée virulence et repose sur l'interaction gène pour gène (Flor 1971). La composante quantitative est quand à elle nommée agressivité (Van der Plank 1968).

Le terme virulence est toutefois beaucoup plus largement utilisé pour définir la composante quantitative du pouvoir pathogène. Cette définition fait consensus au sein des



Figure 4. Saponaria ocymoides infectée par Microbotryum. Photo : Michael Hood.

Les étamines de cette saponaire sont noires car chargées de spores de ***Microbotryum***. Cette stratégie de vie du pathogène lui permet d'être transmis par l'intermédiaire des pollinisateurs.

évolutionnistes, des écologistes, des épidémiologistes animaux et des phytopathologistes nord-américains

(<http://www.apsnet.org/education/IllustratedGlossary/default.htm>). La composante qualitative du pouvoir pathogène est quand à elle classiquement nommée infectiosité en écologie évolutive et pathogénicité (« pathogenicity ») par les phytopathologistes nord-américains.

Au cours de mon travail de thèse, les questions qui ont été posées autour de l'interaction hôte-pathogène et les réflexions qui ont suivi pour essayer de répondre à ces questions, s'inscrivent principalement dans le contexte de la biologie évolutive. C'est pourquoi le terme virulence a été choisi pour décrire la composante quantitative du pouvoir pathogène tout au long de ce manuscrit.

1.2.2 Des champignons phytopathogènes aux pathogènes producteurs de spores

Il existe une grande diversité des cycles de vie (Agrios, 2005) au sein du groupe communément appelé champignons phytopathogènes (eumycètes et oomycètes). Tous les groupes taxinomiques de champignons comprennent des espèces pathogènes de plantes. A cette diversité phylogénétique s'ajoute une forte diversité fonctionnelle.

On rencontre de nombreuses stratégies de reproduction très différentes avec production de spores sexuées et/ou asexuées, avec possibilité d'autogamie lors de la reproduction sexuée ou nécessité d'allogamie entre types sexuels compatibles (respectivement homothallie et hétérothallie). Un ou plusieurs hôtes peuvent être impliqués dans le cycle de vie du pathogène. Le spectre d'hôte peut également être très variable, allant de pathogènes très spécialisés, à des pathogènes généralistes capables d'infecter une large gamme d'hôtes comme *Botrytis cinerea*, qui ne compte pas moins de 200 espèces hôtes connues (Choquer *et al.* 2007). Enfin, il existe une grande diversité de stratégies d'exploitation des hôtes. Certains pathogènes sont systémiques, comme *Leptosphaeria maculans*, responsable du phoma du colza (West *et al.* 2001), alors que d'autres n'infectent que les parties aériennes (comme les espèces étudiées dans mes laboratoires d'accueil, cf. ci-dessous) ou les racines. D'autres, plus rares, comme le charbon des anthères des silènes (*Microbotryum violaceum*), stérilisent leurs hôtes en transformant leurs organes reproducteurs (étamines) en machinerie de production de spores (Figure 4).

Encadré 2**Stratégies d'exploitation des champignons pathogènes :**

Nécrotrophe : tue les cellules végétales grâce à la production de toxines et d'enzymes lytiques avant d'exploiter les ressources des tissus morts en quasi-saprophyte.

Biotrophe : extrait ses ressources de cellules végétales vivantes uniquement, par l'intermédiaire de cellules spécialisées, les haustoria.

Hémibiotrophe : présente typiquement une courte phase d'exploitation biotrophe suivi d'une phase d'exploitation nécrotrophe. Les stratégies d'exploitation des pathogènes rattachés à cette classe sont relativement variables et ne sont pas toujours bien connues. Les causes évolutives de l'utilisation de ce type de stratégie mixte soulèvent également de nombreuses questions.

L'appartenance de différentes espèces à l'une de ces trois catégories n'est pas toujours consensuelle.

(Oliver et Ipcho 2004, Hammerschmidt 2006)

Les principales maladies des plantes étudiées par mes équipes d'accueil sont la rouille du peuplier (causée par *Melampsora larici-populina*), la maladie des raies noires du bananier (causée par *Mycosphaerella fijiensis*) et la pyriculariose du riz (causée par *Magnaporthe oryzae*), des maladies causées par des champignons phytopathogènes foliaires. *M. larici-populina* est un basidiomycète biotrophe (Encadré 2) qui cause des épidémies par reproduction asexuée et est capable de pratiquer une reproduction sexuée sur son hôte alternatif (le mélèze). *M. fijiensis* est un ascomycète hémibiotrophe (Encadré 2), qui peut réaliser les reproductions sexuées et asexuées sur un même hôte et peut infecter toutes les variétés de bananes cultivées (plantain et dessert). *M. oryzae* est également un ascomycète hémibiotrophe mais dont la reproduction est strictement asexuée hors de son aire d'origine. Il est un pathogène important du riz et est aussi capable d'infecter d'autres céréales cultivées et plantes sauvages apparentées.

Dans la littérature théorique, on rencontre de nombreuses approches différentes pour étudier l'évolution de la virulence. Certains auteurs choisissent des approches relativement généralistes, en appuyant leurs réflexions théoriques sur des hypothèses, qui sont applicables à de nombreux pathosystèmes (par exemple Anderson et May 1979). D'autres au contraire, choisissent des approches spécifiques, en se focalisant sur un pathosystème donné et en essayant de comprendre au mieux ses particularités, en intégrant des informations précises de sa biologie dans les réflexions théoriques (par exemple Bull 1994). Il existe d'ailleurs des débats autour de l'utilisation de ces différentes approches et de leur utilité pour les programmes de gestion de l'évolution de la virulence des maladies infectieuses (Ebert et Bull 2003, Galvani 2003, Gandon et Day 2003). Le niveau de précision nécessaire dans un modèle peut être très variable en fonction des besoins que l'on a et des objectifs qu'on souhaite atteindre.

Ce travail a pour objectif d'améliorer notre compréhension générale des processus évolutifs qui modèlent la virulence des champignons phytopathogènes, définie comme la composante quantitative du pouvoir pathogène. Dans la poursuite de cet objectif, nous avons souhaité travailler avec des modèles mathématiques qui présentent un niveau de détail suffisant pour prendre en compte certaines caractéristiques propres aux champignons phytopathogènes, tout en gardant une assez grande génécité pour apporter une compréhension qui ne soit pas limitée à un unique pathosystème. Au fil des réflexions que nous avons menées pour construire des modèles qui décrivent de façon simple le développement des champignons phytopathogènes foliaires, nous avons réalisé que le cadre

théorique que nous souhaitions développer était également adapté à de nombreux pathogènes producteurs de spores autres que les seuls champignons. Dans un but de généralité, nous parlerons donc dans la suite de ce manuscrit de pathogènes producteurs de spores quand la généralisation est possible.

1.3 Evolution de la virulence

1.3.1 Petit historique des recherches sur l'évolution de la virulence

L'étude de l'évolution de la virulence est un champ de recherche assez ancien. Les premières réflexions théoriques voient le jour au début du 20^{ème} siècle (par exemple Smith 1904). Elles donnent naissance à l'hypothèse d'avirulence (« avirulence hypothesis »), qui fût largement acceptée et rapidement renommée hypothèse de la sagesse traditionnelle (« conventional wisdom ») par Anderson et May (1982) et Ewald (1983). Cette théorie suppose que les pathogènes devraient évoluer pour devenir toujours plus inoffensifs envers leurs hôtes, car il est sélectivement avantageux pour les pathogènes, que leur hôte soit en bonne santé pour leur assurer une bonne transmission. La virulence devint ainsi clairement considérée comme un trait adaptatif. Tous les pathogènes étaient vus comme susceptibles de devenir avirulents. Le parasitisme était donc considéré comme un état évolutif transitoire devant conduire vers le commensalisme et même le mutualisme. Suivant cette théorie, les forts niveaux de virulence seraient le résultat d'interactions récentes sur l'échelle de l'évolution alors que des interactions plus anciennes devraient présenter des niveaux de virulence plus faibles.

Suite aux développements de l'écologie évolutive dans les années 60 et 70 (emmenés notamment par W. D. Hamilton, J. Maynard Smith et G. C. Williams), qui apportèrent de nouvelles perspectives de recherche, les années 80 ont vu apparaître un grand nombre de théories alternatives à l'hypothèse d'avirulence (Alizon *et al.* 2009). Anderson et May (1982) et Ewald (1983) développèrent la théorie du compromis entre la virulence et la transmission, communément appelée hypothèse du compromis (« trade-off hypothesis »). Cette théorie est basée sur l'idée que la virulence est une conséquence obligatoire de l'exploitation de l'hôte par le pathogène et que le taux de transmission du parasite est fonction du niveau d'exploitation de l'hôte. Plus le pathogène exploite son hôte, plus il peut se multiplier et donc plus son taux de transmission pourra être élevé. Cependant, plus il exploite son hôte et plus il

s'y accumule, plus il réduit l'espérance de vie de ce dernier. Les bénéfices pour la transmission du pathogène, d'une augmentation de l'exploitation de l'hôte sont donc contrebalancés par les coûts sur l'espérance de vie de son hôte. Elle prédit ainsi, qu'évoluer vers des taux de transmission plus élevés implique d'évoluer vers des niveaux de virulence plus élevés ce qui engendre des coûts pour le parasite en termes de durée de vie de l'hôte et donc en termes de durée d'infection. En conséquence, elle stipule qu'il existe un compromis évolutif entre la virulence et la transmission et que les interactions hôte-parasite devraient évoluer pour atteindre des niveaux de virulence maximisant la transmission du parasite intégrée sur toute la durée de l'infection (Figure 5).

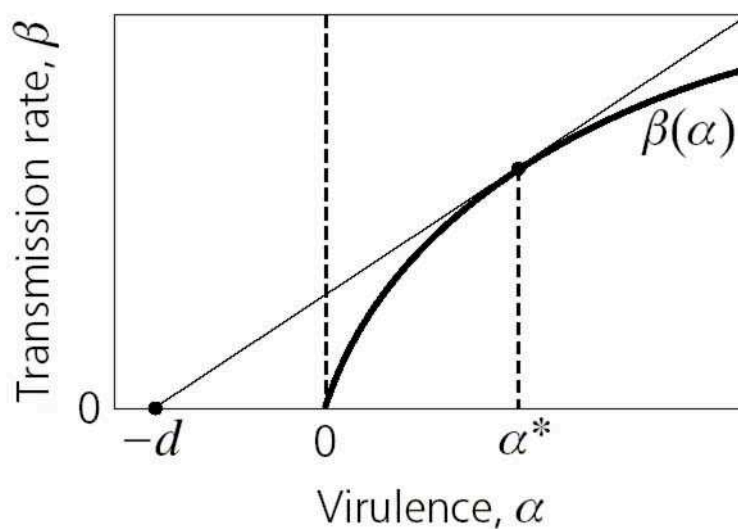


Figure 5. Courbe du compromis évolutif entre la virulence et la transmission.

d représente le taux de mortalité intrinsèque de l'hôte et α représente la virulence, définie comme le taux de mortalité additionnelle due à l'infection par le pathogène. La courbe en gras représente l'effet du niveau de virulence sur la transmission du pathogène. Le niveau de virulence optimal α^* est la valeur de la virulence pour laquelle la tangente à la courbe de compromis passe par l'abscisse $-d$. Dans cet exemple, on s'attend à ce que les pathogènes évoluent vers des niveaux de virulence intermédiaires.

1.3.2 La théorie du compromis et ses multiples développements

Depuis son apparition, l'hypothèse du compromis a fortement stimulé la recherche, tant théorique qu'expérimentale, sur l'évolution de la virulence.

La majorité des travaux théoriques sont basés sur des modèles épidémiologiques qui décrivent les aspects de la dynamique écologique de l'interaction entre l'hôte et le pathogène (Day 2001). Ils étudient la dynamique de propagation de la maladie à l'échelle de la population hôte en suivant le nombre d'hôtes sains et infectés au cours du temps. Ces modèles

ont été largement utilisés pour étudier l'évolution de la virulence, de la transmission et de la guérison, notamment dans le cas d'infections multiples (Gandon *et al.* 2002a, Alizon et van Baalen 2008) et dans le cas où la population hôte est hétérogène (Gandon 2004). Une prédiction classique des modèles d'infection multiple est que la compétition intra-hôte entre les différentes souches pathogènes favorise de plus forts niveaux de virulence par rapport au cas d'une infection par une seule souche, car la compétition intra-hôte favorise la souche qui se multiplie le plus et le plus rapidement dans l'hôte, donc celle qui est la plus virulente. Les études théoriques suggèrent que le niveau de virulence optimale varie également en fonction de la durée de vie des hôtes, du taux de rémission de l'infection (« clearance ») par le système immunitaire de l'hôte (Antia *et al.* 1994, André *et al.* 2003, Alizon 2008) ainsi que d'autres facteurs (Bull 1994, Lenski et May 1994).

L'évolution de la virulence a par ailleurs été appréhendée avec des points de vue très différents, comme l'approche centrée sur la dynamique intra-hôte (André *et al.* 2003, André et Godelle 2006), l'approche par modèles emboîtés qui relie la dynamique intra-hôte à la dynamique épidémiologique (Gilchrist et Sasaki 2002, Alizon *et al.* 2005, Mideo *et al.* 2008) ou encore l'épidémiologie évolutive qui relie les échelles épidémiologique et évolutive (Galvani 2003, Day et Gandon 2007). Il existe aussi des approches centrées sur l'histoire de vie des hôtes (Gandon et Michalakis 2000, Gandon *et al.* 2001), sur l'histoire de vie des pathogènes (Bull 2004, Caraco et Wang 2008) ou encore sur la coévolution entre hôtes et pathogènes (Restif et Koella 2003). La virulence est cependant quasiment systématiquement définie dans les études théoriques comme une augmentation du taux de mortalité ou une diminution de la valeur sélective de l'hôte. Or une maladie peut entraîner de nombreux effets négatifs sur l'hôte autres que l'augmentation de son taux de mortalité ou la diminution de sa valeur sélective (Day 2002a).

Certain des effets négatifs du parasitisme sur l'hôte peuvent ne pas diminuer, voir même favoriser la transmission du pathogène (par exemple les comportements de toux ou encore la manipulation du comportement de l'hôte, Thomas *et al.* 2005) Ainsi, il serait important de bien discriminer les effets qui altèrent la valeur sélective de l'hôte de ceux qui altèrent la valeur sélective du pathogène. Cette distinction est au cœur de plusieurs tentatives pour clarifier la définition de virulence (Shaner *et al.* 1992, Andrivon 1993, Poulin et Combes 1999, Sabelis et Metz 2002a). Les progrès en épidémiologie évolutive dépendent donc de manière cruciale de l'amélioration de notre compréhension des processus qui se déroulent à l'échelle de l'interaction entre l'hôte et son pathogène (Sabelis et Metz 2002a). Des études

théoriques prédisent par exemple que la forme du compromis entre la virulence et la transmission (linéaire, convexe ou concave), qui détermine vers quels niveaux de virulence devrait conduire l'évolution, peut être directement liée à la dynamique intra-hôte (Mideo *et al.* 2008).

Le compromis entre la virulence et la transmission joue un rôle dans l'évolution de la virulence (Messenger *et al.* 1999, Jensen *et al.* 2006, De Roode *et al.* 2008a) et est important à prendre en compte. Cependant, la virulence peut évoluer en relation avec de nombreux autres traits d'histoire de vie relatifs à la valeur sélective du parasite (Stearns et Koella 2008) et d'autres compromis entre traits sont également susceptibles d'avoir des rôles importants et méritent tout autant d'attention que le compromis entre la virulence et la transmission. Il est donc nécessaire de développer des études théoriques sur d'autres aspects des effets négatifs du parasitisme sur l'hôte. Ceci nécessite de répondre à des questions plus nombreuses et plus précises que la seule évolution de la virulence en terme de baisse de valeur sélective ou d'augmentation du taux de mortalité de l'hôte. Pour cela, il serait important d'augmenter notre compréhension des mécanismes de l'interaction entre l'hôte et le pathogène en portant une attention particulière aux stratégies de vie des pathogènes et notamment à leurs traits d'histoire de vie relatifs aux effets négatifs du parasitisme.

“To put virulence management in a more positive light, we suggest that the current paradigm is an unnecessarily narrow view of virulence, a view that might hinder progress in this exciting field by channelling research along one narrow track. We believe that there are more promising avenues to explore. First, we think that any programme of virulence management must understand how virulence relates to parasite fitness, and cannot assume that virulence follows a naive trade-off model. » (Ebert et Bull 2003)

1.3.3 Evolution de l'histoire de vie des pathogènes

La théorie de l'histoire de vie s'intéresse à l'investissement des ressources et du temps aux fonctions biologiques et aux événements majeurs du cycle de vie d'un organisme, comme par exemple la croissance, la survie, l'âge de première reproduction et la durée de la période de reproduction (Roff 1992, Stearns 1992).

Un certain nombre d'études théoriques sur l'évolution de la virulence ont été conduites en prenant en compte l'histoire de vie des hôtes (par exemple Gandon et Michalakakis 2000, Gandon *et al.* 2001, Gandon *et al.* 2002b). Par contraste, très peu d'études ont focalisé leur attention sur l'histoire de vie des pathogènes. On sait pourtant que les pathogènes forment un

groupe hétérogène qui présente une remarquable diversité d'histoires de vie (diversité des modes de transmission, des mécanismes de survie hors de l'hôte, des capacités de dispersion, etc.) et que ces différences marquées affectent les dynamiques intra-hôte, et à travers elles, les dynamiques épidémiologiques et évolutives. Etudier l'évolution de la virulence avec des approches centrées sur l'histoire de vie des pathogènes est donc important pour améliorer notre compréhension du potentiel évolutif des maladies infectieuses et des mécanismes qui dirigent leur évolution (Barrett *et al.* 2008).

Un pathogène est d'abord un organisme vivant avec une histoire de vie qui lui est propre et qui ne se résume pas uniquement à sa virulence. Prenons l'exemple du cycle de vie de *Mycosphaerella fijiensis*, champignon pathogène foliaire du bananier. Suite à la germination d'une spore sur une jeune feuille de bananier, *M. fijiensis* développe un mycélium épiphyllé. Ce mycélium peut rencontrer un ou plusieurs stomate(s) avant de coloniser l'un d'eux et de débiter l'infection (*efficacité d'infection*). Commence alors une phase de *latence*. Les symptômes sont d'abord invisibles (*durée d'incubation*). Le mycélium se développe ensuite dans la plante (*taux de croissance*), détruisant les cellules végétales pour s'en nourrir et générant ainsi une lésion visible. Au terme de cette phase de *latence* (environ 2-3 semaines), le champignon produit des conidiophores chargés de spores asexuées, qui vont pouvoir infecter les feuilles de bananier les plus proches (*taille et nombre de conidies, kernel de dispersion*). La lésion croît de plus en plus et éventuellement finit par coalescer avec une lésion voisine. Si celle-ci est causée par un individu compatible (*hétérothallisme*), il y a reproduction sexuée environ 1 mois après l'infection (*latence de la phase sexuée*), production de périthèces (*taille, et nombre*) chargés d'ascospores, spores sexuées qui vont assurer une dispersion à plus longue distance (*taille et nombre d'ascospores, kernel de dispersion*). Sur ce pathosystème, la virulence (composante quantitative du pouvoir pathogène) est estimée expérimentalement à travers des mesures telles que les temps d'incubation et de latence, le taux de croissance des lésions et la quantité de spores asexuées produites. Ces traits d'histoire de vie sont couramment mesurés chez les champignons phytopathogènes. Ils sont pour la plupart, variables au sein des populations et une héritabilité positive a été mesurée pour plusieurs d'entre eux (Pariaud *et al.* 2009). Ces traits sont donc susceptibles de répondre à la sélection mais ils sont très peu étudiés théoriquement par modélisation.

Etudier les stratégies de vie des pathogènes par modélisation à travers des traits traditionnellement mesurés par les expérimentateurs pourrait faciliter les applications empiriques relatives aux études théoriques sur l'évolution de la virulence, qui posent encore

aujourd'hui de nombreuses difficultés (Day 2002a, Ebert et Bull 2003). La virulence telle qu'elle est définie dans la plupart des études théoriques, est en effet souvent difficilement accessible par l'expérience. De ce fait, il n'est pas rare de rencontrer dans la littérature empirique, de nombreuses mesures différentes de traits, utilisés comme proxys de la virulence (quelques exemples pris chez les champignons phytopathogènes : diminution de la surface foliaire photosynthétique (Doumayrou *et al. in prep*), diminution du poids total des graines produites pendant une saison (Salvaudon *et al.* 2007), des indices composites prenant en compte plusieurs traits du pathogène (Montarry *et al.* 2008)). Ces proxys sont classiquement choisis par rapport à la biologie du pathosystème étudié, au niveau de connaissances que l'on en a, aux techniques exploitables pour son étude ainsi qu'à leur coût (à la fois en terme de temps et d'argent). Ils peuvent cependant être soumis à des contraintes évolutives différentes de celles qui s'appliquent sur la virulence telle qu'elle est définie théoriquement, ce qui peut conduire à trouver des patrons surprenants (Salvaudon *et al.* 2007) et éventuellement à remettre en cause le bienfondé d'une prédiction théorique sur la base de mauvais arguments. Modéliser des traits de vie des pathogènes plus facilement accessibles par l'expérience, pourrait ainsi rendre le dialogue entre empiristes et théoriciens plus facile et les collaborations plus fructueuses.

1.4 Marier l'expérience à la théorie

"Theoretical statements help us order our thinking. However, with regard to their practical implications, they should be interpreted as no more than hypothesis, as the extent to which the theoretical conditions are fulfilled in a concrete situation is not fully clear in advance." (Sabelis et Metz 2002b).

Les études théoriques nous aident à structurer les questions très diverses qu'on peut se poser à propos de l'évolution de la virulence et des maladies infectieuses en général. Elles sont un outil indispensable pour améliorer notre compréhension des processus complexes de l'évolution et aider au développement de nouvelles hypothèses.

On compare souvent de manière métaphorique un modèle mathématique avec une carte géographique. Chacun d'eux est une représentation simplifiée de la réalité, réalisée dans le but d'obtenir une vision globale d'un phénomène complexe. Les modèles mathématiques ayant pour but d'améliorer notre compréhension des systèmes biologiques ne permettent pas de

prendre en compte toute la complexité inhérente à la plupart des phénomènes biologiques. Mais là se trouve l'essence des modèles 'explicatifs'. En simplifiant les phénomènes observés, en choisissant quels sont les aspects qu'il est important de considérer et quels sont ceux qui peuvent être négligés, et en fournissant des prédictions dont la pertinence peut être évaluée par confrontation avec la réalité biologique, ils nous aident à tester si notre compréhension des processus sous-jacents aux phénomènes complexes observés est bonne (Sabelis et Metz 2002b, Barton *et al.* 2007, Kokko 2007).

“Taken to the extreme, if the ultimate goal was to include all the details of the forest in the map, our poor hiker would have to carry the whole landscape with her. Even if this was physically possible, the gain from doing so would be zero: if lost in a forest, she would not become any wiser by looking at a too vastly detailed map than by staring at the original forest. Such maps indeed deserve to be left rotting in the rain. This, of course, is exactly the reason why models are ‘not real’. [...] A good and useful model will still appear ‘false’ in the sense that many aspects of reality are necessarily ignored, and here one must be able to judge if the assumptions nevertheless capture the essence of the biological arguments. [...] This is the art of modelling: to know which aspect of reality one can sacrifice, and which one are crucial to retain.” (Kokko 2007)

Les modèles n'ont donc pas vocation à être utilisés seuls, hors d'un contexte biologique. Ils ne peuvent être considérés comme suffisants pour étudier un processus donné dans son ensemble. C'est le mariage des développements théoriques et empiriques qui permet de réelles avancées de compréhension. La théorie appelle l'empirisme pour une confrontation à la réalité biologique et l'empirisme appelle la théorie pour aider à clarifier des phénomènes qui peuvent sembler, à première vue, incompréhensibles de part leur niveau de complexité. Il est par conséquent important d'essayer d'allier réflexions théoriques et empiriques, même si de nombreuses difficultés peuvent rendre cette démarche contraignante, voir même parfois infructueuse (Day 2002a, Alizon *et al.* 2009).

We argue that current progress in evolutionary epidemiology hinges crucially on a better empirical insight into the underlying processes (Sabelis et Metz 2002b).

Les modèles d'optimisation en particulier, se prêtent bien à la validation empirique. Lorsque les résultats théoriques et empiriques sont congruents, cela suggère que l'on a bien décrit le processus à l'origine du patron observé et que les hypothèses réalisées lors de la modélisation sont pertinentes. Si au contraire les résultats théoriques et empiriques ne sont pas congruents, cela peut être dû à une mauvaise formulation du modèle, au fait que les hypothèses ou contraintes spécifiées comme importantes dans le modèle ne sont pas celles qui

déterminent les patrons observés, à un mauvais choix de la mesure de valeur sélective ou encore au fait que d'autres processus évolutifs peuvent interférer avec la sélection naturelle (Maynard Smith 1978, Barton *et al.* 2007).

1.5 Projet de thèse

1.5.1 Objectifs et démarche

Les travaux réalisés pendant ma thèse font partie d'un ensemble de projets ayant comme objectif commun d'améliorer notre compréhension des processus qui modèlent l'évolution de la virulence des populations de champignons phytopathogènes (définie comme la composante quantitative du pouvoir pathogène), pour atteindre à terme, les connaissances nécessaires pour développer des stratégies durables de déploiement des résistances variétales quantitatives. La question centrale autour de laquelle se sont articulés mes travaux est : comment modéliser l'évolution de la virulence chez les champignons phytopathogènes ?

Nous avons tout d'abord dû choisir un cadre théorique pour étudier l'évolution de la virulence des champignons phytopathogènes. Pour améliorer notre compréhension de l'interaction hôte-pathogène dans le but de mieux évaluer les capacités d'adaptation des pathogènes, nous avons choisi une approche centrée sur l'histoire de vie des pathogènes. Nous avons pour cela utilisé des modèles mécanistes d'allocation des ressources qui décrivent bien le cycle de vie du pathogène dans son hôte et permettent d'étudier l'évolution de traits d'histoire de vie du pathogène, dont certains relatifs à la virulence (telle que définie par les écologistes et évolutionnistes).

Nous avons ainsi cherché à déterminer, pour les champignons phytopathogènes foliaires et plus largement pour les pathogènes producteurs de spores, les stratégies optimales d'allocation des ressources ponctionnées à l'hôte, entre la croissance intra-hôte et la production de spores. Nous avons voulu comprendre comment variaient ces stratégies optimales en fonction de la nature de l'interaction entre l'hôte et le pathogène (plus ou moins résistante) et en fonction des conditions écologiques.

Choisir une approche centrée sur l'histoire de vie des pathogènes nous a permis d'obtenir des prédictions accessibles par l'expérimentation en laboratoire. Le deuxième grand objectif de ce travail de thèse a donc été de confronter certaines des prédictions théoriques issues de l'étude des modèles à la réalité biologique. Nous avons tout d'abord voulu savoir si les stratégies optimales d'allocation des ressources entre la croissance intra-hôte et la production

de spores prédites par les modèles étaient effectivement réalisées dans la nature. Pour répondre à cette question, nous avons mis au point un protocole expérimental adapté aux champignons phytopathogènes foliaires. Nous avons ensuite voulu étudier empiriquement les déterminants évolutifs de la période de latence, un trait d'histoire de vie des pathogènes producteurs de spores dont l'évolution est étudiée dans nos modèles mathématiques et qui a des implications importantes pour les capacités d'adaptation des ces pathogènes. Une analyse comparative des déterminants de la période de latence chez les champignons phytopathogènes à été conduite dans ce but.

1.5.2 Organisation du manuscrit

La première partie de ce manuscrit est consacrée à la présentation des travaux théoriques qui ont été réalisés pendant ma thèse. Nous avons étudié le développement d'un pathogène producteur de spores à l'intérieur de son hôte, en suivant principalement la variation des valeurs de traits d'histoire de vie du pathogène au cours de l'infection et en étudiant les relations qui peuvent exister entre ces traits. Dans une première sous-partie, nous présenterons un modèle adapté à des pathogènes qui ne peuvent exploiter qu'une quantité finie et limitée des ressources de leur hôte, qui est établie au début de l'infection en fonction des caractéristiques de virulence du pathogène et de résistance de l'hôte. Dans une seconde sous-partie, nous présenterons un modèle tout à fait comparable au premier dans sa construction, mais qui s'intéresse à des pathogènes capables d'exploiter les ressources de leur hôte en continu sans jamais les épuiser. Ce deuxième modèle correspond mieux à des pathogènes qui n'induisent pas de fortes réactions de résistances et n'impactent pas ou peu la survie des hôtes. En conclusion de cette partie, les apports théoriques de ces deux modèles seront comparés et discutés en relations avec les hypothèses réalisées pendant les étapes de construction des modèles.

La deuxième partie de ce manuscrit présentera le projet le plus avancé du volet empirique de mes travaux, l'expérience visant à étudier la stratégie d'allocation des ressources entre la croissance intra-hôte et la production de spores, chez un pathogène capable d'exploiter une quantité finie et limitée des ressources de l'hôte (volet expérimental en relation avec le modèle 1). Cette expérience a été menée sur le pathosystème *Magnaporthe oryzae* – *Oryza sativa*, dont la biologie semble bien correspondre aux hypothèses du modèle. Une description biologique du pathosystème sera tout d'abord fournie, suivie des détails du mode opératoire

que nous avons mis en place, ainsi que des principaux résultats obtenus. Nous discuterons ensuite de la pertinence de ces résultats, de ce qu'ils nous ont apporté de nouveau dans notre compréhension du pathosystème étudié et de leur congruence avec les résultats théoriques.

J'ai voulu faire apparaître dans ce manuscrit l'intégralité des réflexions empiriques que nous avons développé durant cette thèse, même si pour certains projets les travaux ne sont pas finalisés. Les deux projets empiriques en cours de réalisation seront présentés en annexe à travers les rapports des deux stagiaires qui ont porté ces projets (Céline Morineau et Manuella Noreskal). Le premier a pour but d'étudier la stratégie d'allocation des ressources entre la croissance intra-hôte et la production de spores, chez un pathogène capable d'exploiter un flux continu des ressources de l'hôte sans les épuiser (volet expérimental en relation avec le modèle 2). Cette expérience a été menée sur le pathosystème *Melampsora larici-populina* – *Populus* sp. , dont la biologie semble bien correspondre aux hypothèses du modèle. Le deuxième projet empirique présenté en annexe porte sur l'analyse comparative des déterminants de la période de latence chez les champignons phytopathogènes.

Pour conclure ce manuscrit, je discuterai de nos principaux résultats théoriques en relation avec nos résultats empiriques et présenterai quelques unes des perspectives envisagées à ce travail.

2. La virulence comme résultat d'une stratégie d'infection complexe : approche théorique

2.1 Introduction.....	20
2.1.1 Les pathogènes producteurs de spores.....	20
2.1.2 Etudes existantes sur la virulence des pathogènes producteurs de spores.....	21
2.1.3 Implications de l'existence des spores pour les compromis dans l'allocation des ressources.....	23
2.1.4 Etudier l'évolution de l'histoire de vie par une approche d'optimisation.....	24
2.2 Un modèle pour des pathogènes qui ne peuvent utiliser qu'une quantité finie des ressources de l'hôte.....	25
Article : <i>Optimal life-history reaction norms of a spore-producing pathogen: a resource allocation model.</i>	
2.3 Un modèle pour des pathogènes qui peuvent potentiellement utiliser une quantité infinie des ressources de l'hôte.....	69
2.3.1 Introduction.....	69
2.3.2 Formalisation du problème.....	70
2.3.3 Retour à la biologie.....	71
2.4 Conclusion.....	73

La virulence comme résultat d'une stratégie d'infection complexe : approche théorique

2.1 Introduction

2.1.1 Les pathogènes producteurs de spores

Les pathogènes producteurs de spores (« spore-producing pathogens ») sont des pathogènes dont l'histoire de vie inclut une forme de vie libre, généralement appelée spore, qui présente des adaptations anatomiques et physiologiques assurant sa persistance en dehors des tissus de l'hôte. La transmission de ces pathogènes se fait par l'intermédiaire des spores plutôt que par contact direct entre un hôte infectieux et un hôte sain. Ces pathogènes peuvent ainsi persister pendant des épisodes de faible densité en hôtes ou de conditions environnementales non favorables.

Les pathogènes producteurs de spores sont représentés dans de nombreux groupes phylogénétiques et parasitent des espèces végétales aussi bien que des espèces animales. On peut les séparer en deux sous-groupes distincts.

D'une part, les macroparasites (pluricellulaires) qui produisent un grand nombre de spores tout au long de leur développement à l'intérieur de l'hôte. On peut citer nombre d'helminthes pathogènes d'importance médicale ou vétérinaire comme les ténias, l'*Echinococcus* responsable de l'échinococcose chez l'homme, les ankylostomes ou encore les schistosomes. Les helminthes sont une des principales causes de maladies chez les jeunes enfants et les adultes dans le monde, avec une nette prédominance dans la ceinture inter-tropicale, où les verminoses représentent un problème sanitaire considérable. Ce groupe est également représenté par les champignons pathogènes d'animaux et de l'homme comme les dermatophytes, responsables d'infections cutanées ou comme *Aspergillus fumigatus*, responsable d'infections broncho-pulmonaires sévères chez l'homme et l'oiseau. Il contient également les champignons phytopathogènes, qui ont pour la plupart d'importantes répercussions socio-économiques au travers de leur impact agronomique (Anderson *et al.* 2004). On peut citer par exemples les rouilles du blé (*Puccinia* sp.), la pyriculariose du riz (*Magnaporthe oryzae*), principale maladie fongique du riz, la pourriture des cabosses du cacaoyer (*Phytophthora megakarya*), qui provoque 40% de pertes dans les cacaoyères d'Afrique, ou encore la maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa (*Microcyclus ulei*) qui

a joué un rôle majeur dans l'effondrement de la production de caoutchouc en Amérique du Sud.

D'autre part, les microparasites correspondent plutôt à des formes de multiplication unicellulaires capables de se multiplier dans l'hôte qui vont chacune s'enkyster ou se métamorphoser, pour devenir une forme de transmission résistante dans le milieu extérieur. Ce groupe est représenté par de nombreux protozoaires entomopathogènes comme par exemple *Plasmodium* sp. responsable du paludisme, *Leishmania* sp. responsable des leishmanioses ou encore *Ophryocystis elektroscirrha* pathogène des papillons monarques (*Danaus plexippus*). Il renferme également un ensemble de bactéries pathogènes (« endospore-forming bacteria »), appartenant aux genres *Bacillus*, *Clostridium* et *Sporosarcina*, causant de nombreuses maladies nosocomiales grâce à leurs spores résistantes à de nombreux traitements désinfectants. On peut citer comme exemple *Bacillus anthraci*, l'agent responsable de la maladie du charbon, *Bacillus thuringiensis* pathogène d'insectes nuisibles en agriculture et qui est l'agent insecticide le plus utilisé au monde en agriculture biologique ou encore *Pasteuria* spp. pathogène de crustacés comme *Daphnia magna*, qui est un pathosystème largement utilisé dans les études empiriques d'évolution de la virulence (par exemple Ben-Ami *et al.* 2008, Ebert *et al.* 1996). Les virus du groupe des Baculovirus peuvent être considérés comme appartenant à cette catégorie – même si les virus sont des pathogènes un peu particuliers dans le sens où ils ont besoin de la machinerie cellulaire de l'hôte pour se multiplier et se transmettre – car dans une phase tardive de leur transmission, ils se différencient en formes d'occlusions résistantes dans le milieu extérieur (Caraco et Wang 2008).

Les deux modèles présentés dans ce chapitre s'appliquent aux champignons phytopathogènes en particulier, aussi bien que plus généralement à tous les pathogènes producteurs de spores.

2.1.2 Etudes existantes sur la virulence des pathogènes producteurs de spores

Comme nous l'avons vu précédemment, un grand nombre de pathogènes d'importance écologique ou socio-économique produisent des spores pour assurer leur transmission. En accord avec la théorie du compromis entre la virulence et la transmission (cf. § 1.3.1), il a été suggéré que des pathogènes capables de produire des formes de transmission persistantes en

dehors de l'hôte, devraient évoluer vers de forts niveaux de virulence (définie dans ces modèles comme l'augmentation du taux de mortalité de l'hôte dû au parasitisme). En effet, le fort taux de survie du pathogène hors de l'hôte diminuerait le coût d'une forte exploitation de l'hôte car le succès reproducteur du pathogène serait en partie découplé de la survie de son hôte. L'hypothèse que l'augmentation de la longévité des spores sélectionnerait pour une virulence plus élevée a été nommée l'hypothèse de la malédiction du Pharaon (« The curse of Pharaoh hypothesis ») (Bonhoeffer *et al.* 1996, Gandon 1998), en référence à la mort mystérieuse de Lord Carnarvon qui survint rapidement après sa visite du tombeau de Toutânkhamon (Coreli 1923 cité dans Gandon 1998). Cette mort inexpiquée pourrait s'expliquer par une infection due à une spore de très grande longévité en dormance dans la tombe et issue d'un pathogène hautement virulent. La grande majorité des études théoriques sur l'évolution de la virulence chez les pathogènes producteurs de spores ont porté leur attention sur l'hypothèse de la malédiction du Pharaon (Bonhoeffer *et al.* 1996, Gandon 1998, Day 2002b, Kamo et Boots 2004, Caraco et Wang 2008). La plupart des modèles étudiés décrivent les processus à l'échelle de la population et trouvent des résultats concordant avec les prédictions de la théorie de la malédiction du pharaon.

Contrairement aux études théoriques, les études expérimentales utilisant les pathogènes producteurs de spores comme modèle biologique sont assez nombreuses et diversifiées. Certaines se sont concentrées sur la recherche du compromis entre la virulence et la transmission (Salvaudon *et al.* 2005, Jensen *et al.* 2006, De Roode *et al.* 2008a) ou entre la virulence et d'autres traits d'histoire de vie du pathogène ou de l'hôte (Davies *et al.* 2000) ou encore entre la virulence et l'environnement ou la condition de l'hôte (Bedhomme *et al.* 2004, De Roode *et al.* 2008b, Seppälä *et al.* 2008). D'autres études portent sur les conséquences des infections multiples (Lopez-Villavicencio *et al.* 2007, Ben Ami *et al.* 2008). D'autres encore ont étudié les interactions génotype spécifiques ou l'héritabilité de certains traits relatifs à la pathogénie en réalisant des expériences d'infections croisées (Carius *et al.* 2001, Nidelet et Kaltz 2007, Salvaudon *et al.* 2007) ou des expériences d'évolution expérimentale (Lehmann et Shanner 1997).

Les modèles qui seront présentés dans ce chapitre se placent en marge du contexte théorique existant. Ils tentent de se rapprocher des études empiriques, en considérant les processus à l'échelle intra-hôte et permettent d'étudier les stratégies de vie optimales des parasites en fonction de la spécificité de l'interaction hôte-pathogène et des conditions écologiques, au travers des valeurs de traits du pathogène, qui sont couramment mesurées par

les expérimentateurs (ex : densité intra-hôte/charge parasitaire, quantité de spores produites, durée de différents stades de l'infection).

2.1.3 Implications de l'existence des spores pour les compromis dans l'allocation des ressources

Les organismes vivants acquièrent leurs ressources à partir de leur environnement et les allouent à différentes fonctions telles que leur développement, leur survie et leur reproduction (Roff 1992, Stearns 1992). Le problème auquel doivent faire face la grande majorité des organismes, est que la quantité de ressources dont ils peuvent disposer est limitée. Cette limitation peut être due à la présence de compétiteurs, de perturbations environnementales, de forte prédation, etc. De ce fait, les organismes sont contraints de faire des choix, des compromis, lorsqu'ils allouent leurs ressources à leurs différentes fonctions vitales. L'organisme parfait qui pourrait maximiser à la fois sa croissance, sa survie et sa reproduction, « le démon darwinien », ne peut exister. La sélection naturelle favorise ainsi, les individus qui adoptent des patrons d'allocation des ressources qui maximisent leur valeur sélective sachant ces contraintes (Roff 1992, Stearns 1992).

Chez les pathogènes transmis par contact direct entre hôte infecté et hôte sain, les formes de multiplication intra-hôte sont utilisées pour la transmission. Multiplication et transmission ne sont donc pas antagonistes, sauf en considérant l'impact de la transmission sur la survie de l'hôte. A l'inverse, chez les pathogènes producteurs de spores, les formes de transmission sont distinctes des formes de multiplication intra-hôte. Cette particularité du cycle de vie de ces pathogènes crée une nouvelle contrainte sur le partage des ressources : à chaque instant, chaque unité de ressource extraite de l'hôte peut être allouée à la multiplication intra-hôte ou à la production de spores. Cela implique l'existence d'un compromis dans l'allocation des ressources entre la multiplication intra-hôte et la production de spores.

L'existence de ce compromis pourrait avoir des conséquences sur les pressions de sélection qui font évoluer la virulence. De plus, il est admis que les compromis dans l'allocation des ressources façonnent le développement de l'individu et ont des conséquences sur les stratégies de vie (Roff 1992, Stearns 1992), et donc pour des pathogènes, sur les stratégies d'infection. Ils sont donc importants à prendre en compte pour améliorer notre compréhension de l'interaction entre l'hôte et son pathogène.

Au travers de notre approche théorique, nous avons voulu comprendre comment ce compromis peut influencer l'histoire de vie des pathogènes à spores. Pour cela, nous avons utilisé des modèles d'allocation des ressources qui permettent de décrire de manière dynamique, comment le pathogène choisit à chaque instant, d'allouer ses ressources entre sa croissance intra-hôte et sa production de spores. Nous avons ensuite utilisé une méthode d'optimisation dynamique pour déterminer quelle est la stratégie d'allocation des ressources entre la multiplication intra-hôte et la production de spores qui confère la meilleure valeur sélective à un pathogène producteur de spore.

2.1.4 Etudier l'évolution de l'histoire de vie par une approche d'optimisation

Les questions que l'on se pose quand on étudie l'évolution de l'histoire de vie peuvent être vues comme des problèmes d'optimisation (Barton *et al.* 2007) : quelle histoire de vie confèrerait la meilleure valeur sélective à tel organisme ?

Les méthodes d'optimisation supposent que les valeurs des traits d'histoire de vie des organismes varient librement dans des relations contraintes par des compromis simples, ce qui permet de négliger les bases génétiques et moléculaires de l'évolution phénotypique. Elles se basent sur l'idée que différents phénotypes sont associés à différents coûts ou bénéfices sur la valeur sélective et font l'hypothèse que l'évolution est dominée par la sélection naturelle qui maximise la fitness et optimise les fonctions que l'on étudie (Barton *et al.* 2007). De nombreux caractères des organismes peuvent être vu comme presque optimaux, c'est-à-dire qu'ils maximisent le succès reproducteur ou une composante du succès reproducteur. Cette idée reste cependant relativement simpliste et il existe de nombreuses exceptions, comme par exemple quand l'interaction entre individus (par exemple la compétition) joue un rôle important sur la sélection (Barton *et al.* 2007), ou plus généralement dans tous les cas où la sélection individuelle dépend de la composition génétique de la population.

Dans nos modèles, nous avons considéré le cas où un pathogène est seul à infecter son hôte et où la sélection est fréquence-indépendante. Comme notre pathogène évolue en milieu isolé, nous supposons que la stratégie optimale peut être atteinte par évolution mais également par plasticité phénotypique.

2.2 Un modèle pour des pathogènes qui ne peuvent utiliser qu'une quantité finie des ressources de l'hôte

Optimal life-history reaction norms of a spore-producing pathogen: a resource allocation model

Authors: Audrey Andanson^{1,2,*}, Virginie Ravigné^{2,*}, Frédéric Grognaud³, Ludovic Mailleret⁴, Jean Carlier², Fabien Halkett¹

Affiliations:

1: INRA-Nancy Université, UMR 1136 Interactions Arbres-Microorganismes, F-54280 Champenoux, France

2: CIRAD, UMR BGPI, F-34398 Montpellier, France

3. INRIA, Comore Project-team, F-06902 Sophia Antipolis, France

4. INRA, UR 880, URIH, F-06903 Sophia Antipolis, France

*: these authors contributed equally to the work

Corresponding Author:

Fabien Halkett

INRA-Nancy Université, UMR 1136 Interactions Arbres-Microorganismes, F-54280 Champenoux, France

Phone: 33 (0) 3 80 39 40 55

Email: halkett@nancy.inra.fr

Key words: virulence evolution, disease life history trait, timing, latency, bang-bang strategy.

Soumis à *Evolution* le 09 juillet 2010

Abstract:

Most models of virulence evolution consider simplistic pathogen life histories. Here we point out that understanding the evolution of virulence in spore-producing pathogens requires modeling the resource allocation dilemma between within-host multiplication and host-to host transmission. Applying tools from optimal control theory to a mechanistic resource allocation model in the context of a spore-producing pathogen, we proved, under various ecological settings, that the optimal resource allocation strategy is “bang-bang”, that is, the pathogen should first invest only in growth (which results in a latency period) and then switch to the exclusive production of spores (infectious period). Summarizing the variation in optimal infection strategy along ecological settings—by means of several measurable disease life-history traits—revealed complex disease reaction norms, with non-linear variations in most traits (including latency). Interestingly, the same level of pathogen fitness can be achieved through radically different infection strategies (brief and damaging vs long lasting and host saving) depending on the ecological conditions. Moreover, no obvious co-variation patterns among disease life-history traits emerged, in spite of the trade-off between multiplication and transmission that is at the core of our modeling assumptions. We discuss the implication of these results for both theoretical and empirical studies on pathogen virulence evolution.

Introduction

Deciphering how and why pathogens harm their hosts is a central topic in evolutionary biology (Bull 1994; Read 1994). Most models of the evolution of parasite infection strategies rely on the negative feedback between virulence (i.e., parasite-induced decrease in host fitness) and parasite transmission (Bull 1994; Read 1994; Ebert and Herre 1996; Levin 1996; Day and Proulx 2004). A high rate of transmission requires intensive host exploitation (e.g., through a high rate of within-host multiplication) and thus induces a large decrease in host survival, which in turn reduces the time-window for transmission. Maximal parasite fitness is therefore attained at intermediate virulence levels. This so-called 'trade-off hypothesis' has fostered numerous attempts to reveal this virulence-transmission trade-off empirically (reviewed in Alizon et al. 2009). Yet there remains a serious lack of empirical evidence (Ebert and Bull 2003; Koella and Turner 2007; Alizon et al. 2009, but see de Roode et al. 2008), which has led some authors to question the generality of the trade-off hypothesis (Lipsitch and Moxon 1997; Weiss 2002; Ebert and Bull 2003; Ganusov and Antia 2003). It can be argued that, although seminal, this framework may have over-simplified the complexity and diversity of parasite infection strategies (Day 2003; Ebert and Bull 2003; Caraco and Wang 2008).

As for any other organism, pathogen fitness results from the integration of a number of life-history characteristics, such as infection efficiency, growth trajectory, within-host multiplication strategy, timing of propagule production, quantity and size of propagules and infection length / within-host pathogen lifetime. Empirical studies have reported large variability in many of these disease life-history traits (Thomas et al. 2002; Salvaudon et al. 2007; Pariaud et al. 2009a). Such variability can have a genetic basis (Salvaudon et al. 2005; Pariaud et al. 2009b), result from phenotypic plasticity (Kaltz and Koella 2003; Hall et al.

2009a), or both (Carius et al. 2001; Salvaudon et al. 2007; Lazzaro and Little 2009). In addition, host and pathogen genotypes may interact in the determination of infection traits (Restif and Koella 2003; Salvaudon et al. 2008; Lazzaro and Little 2009). In all cases, such variability is likely to reflect pathogen adaptation to an environment that encompasses the diversity in host genetic backgrounds and physiological states as well as the spatio-temporal variability in abiotic factors (Thomas et al. 2002; De Roode et al. 2008; Hall et al. 2009b). From a theoretical perspective, a few studies have shown that taking into account the variability in disease life-histories can have profound implications on both epidemiological and evolutionary processes, e.g., on disease emergence potential (Antia et al. 2003; André and Day 2005) and on the evolution of virulence (Caraco and Wang 2008). It is therefore essential that a proper theory of pathogen evolution should account for the existence of complex pathogen life-histories and their sources of variability.

In this paper, in order to better understand how disease life-histories evolve, we place the emphasis on the two basic processes at the core of pathogen infection success, namely within-host multiplication and transmission. Although these two fitness-related functions are ensured by different states of the pathogen, they are tightly interconnected. For instance, early transmission can be advantageous as it allows infection of new healthy hosts but it is also costly as it prevents further parasite multiplication inside the initial host, hence potentially impeding future transmission. Considering such a trade-off converts classical models of parasite evolution into scheduling dilemmas involving the allocation of resources towards either within-host multiplication or transmission—the relevant question being not simply how much to transmit but also when to transmit.

An appropriate method of examining this type of schedule allocation problem is to apply optimal control theory (Iwasa and Roughgarden 1984; Kozlowski 1992; Perrin and Sibly 1993) to the study of the evolution of pathogen infection strategies. This modeling framework

is a particularly suitable tool with which to investigate optimal life-histories under a variety of environmental conditions (i.e., optimal reaction norms). In this respect, optimal control theory has, for instance, helped gain much insight into the evolution of age and size at reproductive maturity (e.g., Iwasa and Roughgarden 1984; Kozłowski 1992; Perrin and Sibly 1993; Iwasa and Levin 1995; Day and Taylor 1997; Iwasa 2000). While it is likely that schedules of resource allocation are key characteristics of pathogen evolutionary dynamics, very few theoretical studies account for this (but see models on the optimal timing of phage lysis, e.g., Bull 1994).

In this paper, we aim to fill this gap for a wider class of pathogens, namely spore-producing pathogens. These are pathogens that are transmitted indirectly via free-living infective stages, and for which within-host multiplication and transmission are carried out by two different functional forms: a growth form dedicated to within-host multiplication, and a free-living stage (spore) ensuring transmission and persistence outside host tissues. For instance, in many plant pathogenic fungi, considering as the host the leaf tissue that is available for pathogen development, within-host multiplication relies on mycelium growth within foliar lesions and transmission is achieved through the production and the discharge of spores. Spore-producing pathogens encompass a large number of parasites causing major human, animal or plant diseases, including *e.g.* *Plasmodium* species responsible for malarial disease, pathogenic Helminthes such as *Taenia* and *Echinococcus*, and all pathogenic fungi such as the Pucciniales that cause rust diseases on a large variety of plant species.

Since conversion of multiplication forms into transmission forms (and vice versa) is impossible in spore-producing pathogens, the energy acquired at the expense of host resources over the course of an infection has to be allocated directly toward the production of either the within-host multiplication form or the transmission form. Assuming that the energy supplied

by the host is limited implies that both forms compete in such a way that promoting within-host multiplication could result in disadvantaging transmission and vice versa.

More specifically, the aim of this paper was to investigate the ultimate determinants of the life-history of spore-producing pathogens. For this purpose, we formalize the interaction between a spore-producing pathogen and its host during the course of an infection. We define pathogen fitness—measured as lifetime reproductive success (Day 2001)—as a function of pathogen resource allocation schedule under ecological or genetic constraints such as mortality and the limited efficiency of resource absorption. We then use optimal control theory to derive the optimal resource allocation schedule (*i.e.*, that which maximizes pathogen fitness) between within-host multiplication and transmission forms. This allows us to show that, under a wide range of conditions, the optimal resource allocation strategy is “bang-bang”, *i.e.*, a latency period with no spore production, followed by an infectious period with no allocation to within-host multiplication.

We then examined the consequences of this finding for disease life-histories by studying pathogen optimal reaction norms in four major disease life-history traits associated with such bang-bang strategies (latency period, infectious period, maximal density of pathogen multiplication forms, and maximal sporulation rate), using a measure of pathogen fitness (total spore production) and a measure of pathogen effect on host (resource depletion rate), as a response to varying mortality rates and efficiencies of resource absorption and use. Finally, the results are discussed in relation to other theoretical studies on virulence and existing experimental works on spore-producing pathogens, with the aim of providing some guidelines for further studies on the evolution of pathogen infection strategies.

The model

Modeling within-host pathogen dynamics

The model considered here refers only to spore-producing pathogens. These are pathogens producing resilient free-living propagules (hereafter referred to as spores) that allow pathogen dissemination in the absence of direct contact between susceptible and infected hosts.

We assume that contamination of a healthy host occurs following ingestion of a spore in an animal species, or following the deposit of a spore on a leaf in a plant species, i.e., the healthy host is assumed to be infected only by a single pathogen genotype. Multiple infections are not considered in our model.

The model describes the following infection scenario. A spore initially contains a given amount of energy $M(0)$ that is used for germination. The pathogen then starts exploiting host resources, which are limited in quantity $R(0)$, and multiplies asexually. The dynamics of infection can then be described by three state variables: R , the amount of resource left; M , the density of pathogen multiplication forms; and S , spore density. In order to develop, multiplication forms absorb host resources with efficiency ε . Resources are extracted at a rate proportional to the within-host density of pathogen multiplication forms (M) and the density of remaining resources. Extracted resources can be allocated instantaneously in any proportion either to the production of additional multiplication forms, or to spore production. The amount of extracted resources allocated to spore production through time is determined by the resource allocation function $u(a)$, where a is the time since infection. Note that $u(a)$ is not constrained and can take any shape provided that this function lies between 0 and 1. The extracted resources (figuring energy) are converted into multiplication forms with efficiency c_1 , or into spores with efficiency c_2 . The pathogen is subjected to a mortality rate acting at a constant rate (γ) on the density of multiplication forms. Under these assumptions, the dynamics of infection can be formulated as follows:

$$\frac{dR}{da} = -\varepsilon RM \quad (1)$$

$$\frac{dM}{da} = c_1 \varepsilon RM(1 - u(a)) - \gamma M \quad (2)$$

$$\frac{dS}{da} = u(a)c_2 \varepsilon RM \quad (3)$$

which is mathematically equivalent to the model of growth and sporulation of saprophytic fungi proposed by Gilchrist et al. (2006).

Pathogen fitness

Assuming epidemiological equilibrium, and in the absence of within-host competition between pathogen genotypes (i.e., no multiple infection), maximizing pathogen reproductive output Φ , is given by:

$$\Phi = \int_0^{+\infty} \beta(a)I(a)da, \quad (4)$$

where $\beta(a)$ is the pathogen transmission rate at infection age a (here defined as the number of spores produced at age a), and $I(a)$ the probability that the infection lasts until age a is the best (evolutionary stable) infection strategy (Sasaki and Iwasa 1991; Day 2001, 2003; Gilchrist and Sasaki 2002; André et al. 2003; André and Gandon 2006). Here we consider a constant infection extinction risk, μ , so that $I(a) = e^{-\mu a}$. Note that the pathogen reproductive output Φ is classically defined as the expected number of new infections caused by a single infection *per capita* of susceptible hosts (Frank 1996; Day 2003; Alizon et al. 2009); Φ is a measure of pathogen fitness and corresponds to lifetime reproductive success (Sasaki and Iwasa 1991; Day 2001). In the present model, it is given by the total amount of effective spores that will be produced during the course of an infection.

Using the equations of the infection dynamics (Equations 1-3) it follows that:

$$\Phi = \int_0^{+\infty} u(a)c_2\varepsilon R(a)M(a)e^{-\mu a} da . \quad (5)$$

Applicability of the model

The model applies to systemic as well as focal spore-producing pathogens, depending on parameter interpretation. Systemic spore-producing pathogens notably include a number of parasitic helminthes (*e.g.* hookworms and schistosomes). In such cases, the initial amount of available resources $R(0)$ must be understood as the amount of energy that can be taken from the host before it dies (because host death is not explicitly modeled here). Focal spore-producing pathogens are well exemplified by fungi that cause focal lesions on the host surface (*e.g.* foliar pathogenic fungi for plants or dermatophytes for animals and humans). For these, $R(0)$ will preferably represent the amount of resources locally available to the focal development of the pathogen.

The five parameters of the model reflect pathogen mortality rates (γ and μ) and resource exploitation efficiencies (ε , c_1 and c_2). Nonetheless, as they characterise the interaction between the pathogen and its host, their values can be interpreted as the result of both pathogen infectious potential on the one hand, and host physiological state and defenses on the other hand. Therefore, higher mortality rates or lower exploitation efficiencies may equally be considered to mimic either weak pathogen efficiency or strong host resistance.

Analysis

It should be noted that the model and fitness measure described above are formally equivalent to those analyzed by Gilchrist et al. (2006) in their study of the growth of saprophytic fungi. In their paper, however, optimal exploitation strategies were solved in a non-dimensional way. Here, we followed the same methodology but took the variation of all parameters into

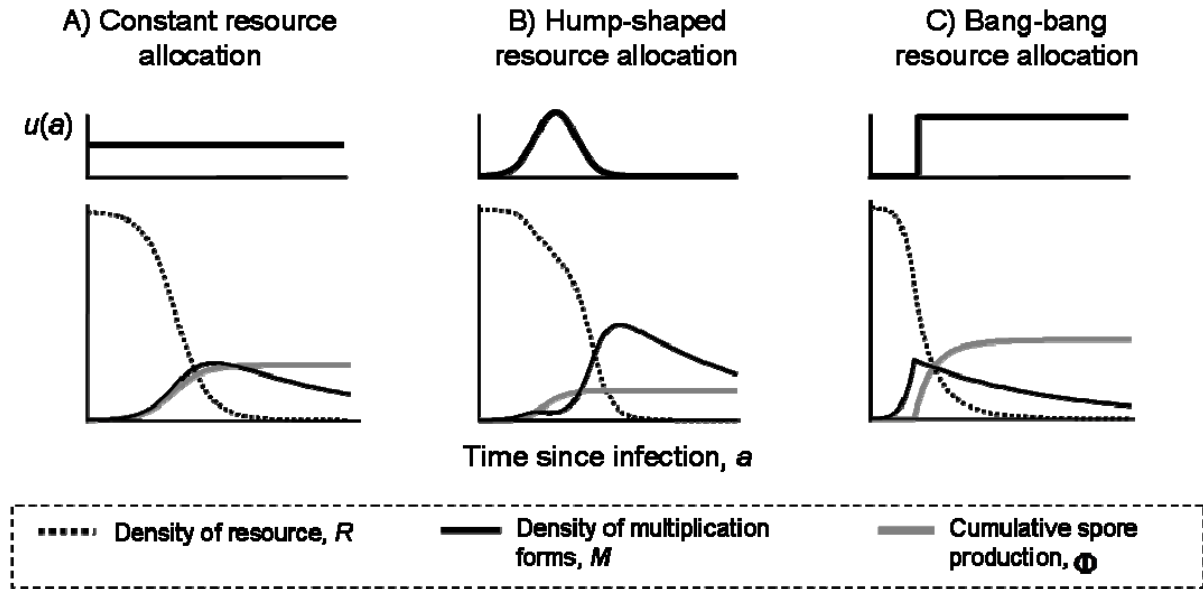


Figure 1 : Consequences of various non-necessarily optimal resource allocation strategies on the system dynamics. Top graphics show resource allocation strategies. Bottom graphics show the dynamics of resources (dotted lines), density of multiplication forms (black lines) and cumulative spore production (grey lines) over time. Allocation to spore production is (A) constant, (B) hump-shaped, (C) “bang-bang”. The dynamics of resources, multiplication forms and spores produced are strongly affected by the resource allocation strategy of the pathogen, $u(a)$. In all cases, the model shows a constant decrease of available resources over time as the pathogen consumes them. Note that resources do not necessarily fall down to zero and that spore production continues until death of the pathogen or full resource depletion, even if it is less and less effective. For bang-bang strategies (C), which are optimal, the system dynamics is as follows. Before latency, the pathogen shows an exponential growth and no spore is produced. At the optimal latency as^* , $u(a)$ shifts to one, the pathogen attains its maximal density and spores begin to be produced. After latency, pathogen multiplication is stopped and within-host parasite density decreases because of the mortality rate.

account as this can have interesting biological meaning. The following analysis thus differs substantially from that of Gilchrist et al. (2006) by looking for optimal reaction norms of resource allocation strategies relative to mortality rates and exploitation efficiencies rather than at the consequences of the optimal allocation schedule for pathogen population dynamics. Moreover, we succeed in providing a full proof that the bang-bang strategy exhibits only one switch.

The optimal resource allocation strategy

The precise schedule of resource allocation, determined by $u(a)$, can drastically alter the dynamics of infection (Figure 1) and thus pathogen fitness. At this point, we sought to answer the following question: how should a spore-producing pathogen allocate resources between within-host multiplication and transmission (spore production) at each point in time in order to maximize fitness?

To find this optimal allocation schedule, $u^*(a)$, we use Pontryagin's maximum principle (Pontryagin et al. 1964)—an analytical method derived from optimal control theory that has emerged as the most convenient technique to tackle allocation problems in a continuous-time setting (Perrin and Sibly 1993). This method aims to find the trajectory of a given dynamic system that optimizes a chosen criterion (here fitness Φ), taking into account the inherent constraints of the system (here the infection dynamics described by equations 1-3). To facilitate reading of the main text, the full details of the mathematical analysis are presented in the Appendix.

The results indicate that the optimal resource allocation schedule consists either of a constant and full allocation to spore production, or a “bang-bang” allocation (illustrated in Fig. 1C, see proof in Appendix A and B). Under such a bang-bang allocation, the pathogen starts by allocating all the extracted resources to within-host multiplication ($u^*(a) = 0$). Since

switching occurs at values of $R \geq \frac{\mu + \gamma}{c_1 \varepsilon}$ (B18), multiplication forms thus grow continuously and no spores are produced. Then, at a critical point in time, denoted a_s^* , the pathogen definitively stops multiplying within the host and switches to allocating all extracted resource to spore production ($u^*(a) = 1$) (Appendix B). At this time, the pathogen reaches its maximal density, and the density of multiplication forms begins to decrease because of the mortality rate (γ), which is no longer compensated for by energy uptake.

Interpreted biologically, this bang-bang allocation describes a pathogen whose life-cycle is composed of a latency period, where only growth occurs, followed by a transmission period dedicated exclusively to spore production. Time a_s^* corresponds to the optimal latency, i.e., the time during which a pathogen should allocate resources toward growth only in order to maximize its fitness, Φ . As shown in Appendix B, no analytical expression of the optimal latency could be obtained, but the moment of switching was clearly identified as the time at which the trajectory reaches the switching curve (see equation B17) in the (R,M) space. Knowledge of the analytical expression of the switching curve allows us to develop the following results, either through a mathematical analysis of the curve or through numerical simulations taking its form into account.

Conditions for the existence of a latency period

We now describe the sets of ecological conditions (characterizing the host-pathogen interaction) that promote the existence of a positive optimal latency.

Time horizon

The existence of an optimal latency seems critically determined by the time available for the infection to take place. Two parameters limit the time horizon of the infection: the infection

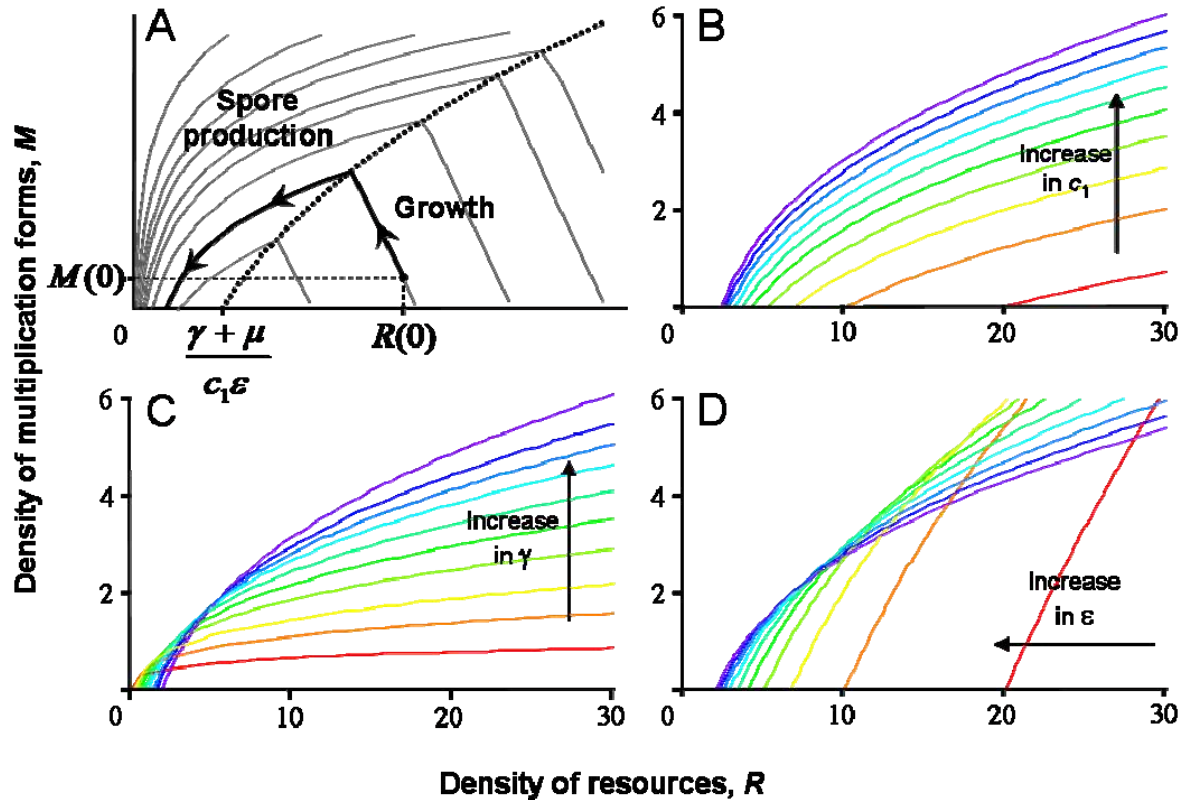


Figure 2 : Determinants of the optimal latency. (A) Trajectories of resource density and multiplication forms density in the phase plane defined by R and M for a pathogen following an optimal resource allocation strategy (grey curves). All trajectories abruptly change their direction when attaining, at optimal latency, the optimal switching curve between allocation to growth and reproduction (dotted line – defined by equation B17). (B-D) How the optimal switch curve is affected by the compatibility of host-pathogen interaction, measured in terms of resource conversion efficiency c_1 (B), within-host mortality γ (C) and resource absorption efficiency ε (D). From red to purple, the considered parameter ranges from 0.1 to 1 by steps of 0.1. It can be seen that when the energy contained in the initial spore $M(0)$ is very low (close to the x-axis), more efficient pathogens require less initial resources ($R(0)$) to start investing into growth before producing spores. (B) For a given amount of resource, an increase in the efficiency to convert the extracted resource c_1 mainly increases the rate of within-host multiplication. It becomes then possible to produce a bigger within-host multiplication structure in a shorter time. The threshold size of within-host multiplication structure therefore strictly increases with conversion efficiency. (C) A major effect of within-host mortality γ is to speed the decay of within-host multiplication structures after latency, which critically determines the amount of spores that will be produced. Maintaining a good fitness therefore requires that bigger within-host multiplication structures are produced when within-host mortalities are higher. This is however only possible when resource is not limiting, otherwise increasing within-host mortality reduces so much within-host pathogen growth that investing into within-host multiplication is no longer advantageous. (D) Pathogen resource absorption efficiency (ε) has a non-monotonic effect on the threshold within-host multiplication size. Starting from low efficiencies, improving resource absorption allows a faster within-host multiplication and therefore authorizes the production of a bigger within-host multiplication structure. However, increasing further absorption efficiency is such that even a small within-host multiplication form becomes sufficient to extract enough resource to ensure subsequent spore production. Parameter values: (B) $\varepsilon = \gamma = \mu = 1$, (C) $c_1 = \varepsilon = \mu = 1$, (D) $c_1 = \gamma = \mu = 1$.

extinction risk, μ , which may interrupt infection at any moment; and the mortality rate, γ , which limits the duration of infection by lowering the density of multiplication forms.

Assuming that the pathogen does not suffer any mortality (it lives indefinitely, $\gamma = \mu = 0$) always leads to $a_s^* = 0$ (Appendix C). Under such conditions, the optimal infection strategy involves extracting all host resources from the limited amount of multiplication forms $M(0)$ initiating the infection and converting them directly into spores, without wasting part of their resources in growth investment (since the pathogen can undisputedly consume host resources, the energy contained in the initial spore is sufficient to extract all resources, even if it takes an eternity).

On the contrary, when the time available for pathogen development is limited (μ or $\gamma \neq 0$), depending on other ecological conditions (see below), it may be more advantageous to first invest in building an efficient exploitation structure, through within-host multiplication, before initiating spore production (Perrin and Sibly 1993). This is proved by the existence of a switching curve when μ or γ are different from 0 (see equation B17 when μ and γ are different from 0, equation B17' when $\mu \neq 0$ but $\gamma = 0$, and equation C1 when $\mu = 0$ but $\gamma \neq 0$).

Initial conditions

Figure 2A shows that the existence of a latent period depends critically on both the initial available amount of resources ($R(0)$) and the initial inoculum (i.e., the amount of multiplication forms at the onset of infection $M(0)$). From equation 2, it can be seen that, right after infection, if no energy is allocated to spore production ($u(0) = 0$), entry into the growth phase can occur only if the growth rate of multiplication forms is positive

$$\left(\frac{dM}{da} \right)_{a=0} > 0 \text{ when } u(a) = 1, \text{ which leads to:}$$

$$R(0) > \frac{\gamma + \mu}{c_1 \varepsilon}. \quad (6)$$

Hence, if the initial available amount of resources, $R(0)$, is too low, pathogen growth is impossible, or at least too hazardous (for μ large), and the infection fails whatever the initial inoculum size. In that case, the “less bad” strategy is to invest no energy into within-host multiplication and to escape this host by directly producing some spores (i.e., $a_s^* = 0$). For higher initial amounts of available resources, ($R(0) > \frac{\gamma + \mu}{c_1 \varepsilon}$), a latency period may be advantageous depending on the initial inoculum ($M(0)$, Fig 2A). Above a threshold value of $M(0)$ (i.e., above the switching curve in Fig 2A, defined from equation B17), the infection starts with enough multiplication forms to efficiently extract and convert into spores the amount of resources initially available ($R(0)$). There is then no need for a latency period. Investing in additional multiplication forms would even compromise future spore production by depleting too much resource. On the other hand, if $M(0)$ is less than this threshold value (i.e., under the switching curve in Fig 2A), the pathogen has first to invest the consumed resources in establishing an efficient exploitation structure to ensure profitable spore production afterwards (i.e., after a_s^*).

Pathogen exploitation efficiency

First, it can be seen from Equation B17 (Appendix B) that the optimal latency is unaffected by the efficiency of conversion of resources into spores (c_2). This conversion rate is only a scaling parameter that determines how many spores will be produced with a given amount of energy, and has no consequence on the dynamics of infection.

Second, assuming that infections start with a very low inoculum ($M(0)$ close to 0) and a given amount of resource, a latent period will be advantageous only if the mortality rate (γ)

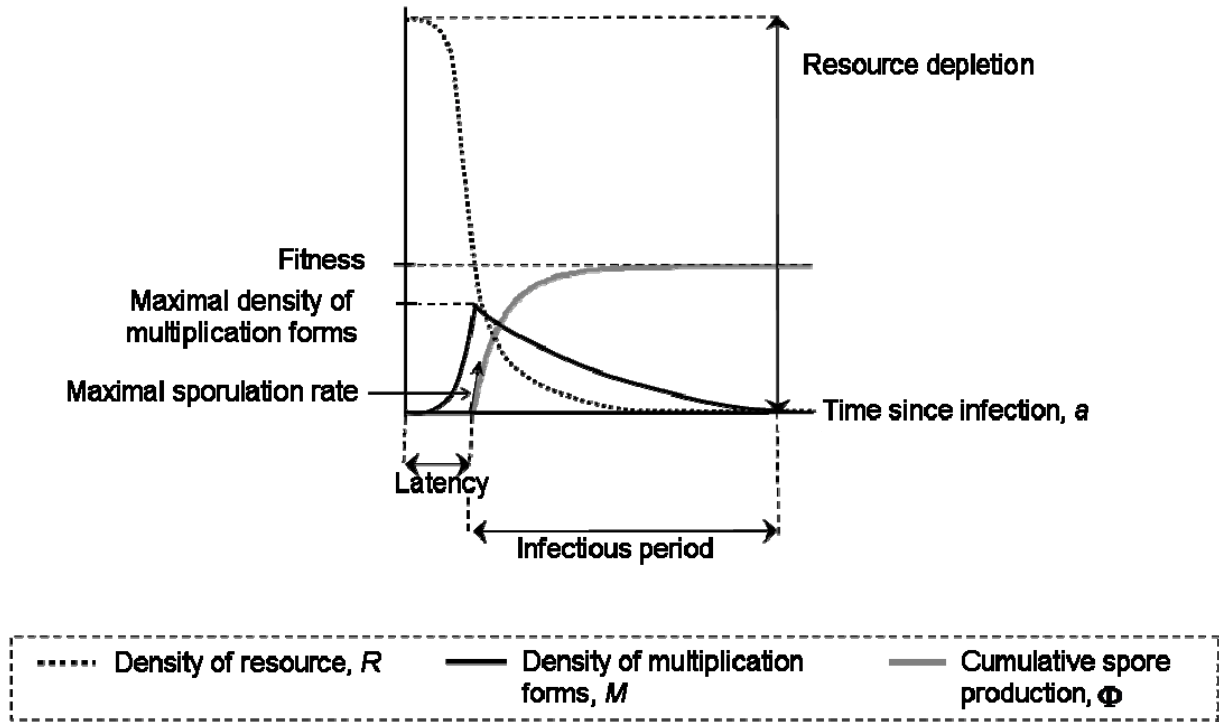


Figure 3: Typical infection dynamics with a bang-bang resource allocation strategy and disease associated life-history traits studied at the optimal allocation strategy. The latency period is the lag time between infection and the onset of sporulation. Latency is followed by the infectious period, defined as the time lag between the onset and end of spore production. Here we arbitrarily considered that spore production ends when less than 10^{-2} spore is produced per unit time. This relatively simple model also enables the maximal density of multiplication forms, which is always reached at latency, $M_{\max} = M(a_s^*)$, to be reported. Depending on the type of pathogen (systemic **vs.** focal), $M_{\max}$ may be interpreted as maximal parasitemia or as the maximal size of the multiplicative form, respectively. Moreover, since the fitness Φ (defined above as lifetime reproductive success, equation 5) cannot reflect variations in spore production rate through time (Brommer et al. 2002), we additionally report the maximal instantaneous sporulation rate ($\lambda_{\max}$, also occurring at latency):

$$\lambda_{\max} = \left. \frac{dS}{da} \right|_{a_s^*} = c_2 \varepsilon M(a_s^*) R(a_s^*). \text{ The final disease trait reported is the resource depletion rate,}$$

defined as the proportion of initially available resources actually consumed at the end of

$$\text{infection } (R_{dep} = 1 - \left. \frac{R(a)}{R(0)} \right|_{a \rightarrow \infty} = 1 - \frac{R(a_s^*) e^{-\varepsilon/\gamma M(a_s^*)}}{R(0)}, \text{ see appendix C for details}).$$

Note that this trait is the only one to reflect the injury to the host caused by pathogen development.

or the infection extinction risk (μ) are low enough, and pathogen efficiency to absorb (ε) and convert (c_1) resources into growth are high enough, to ensure the initial growth of the pathogen (Eq. 6 and Fig. 2B-D). Otherwise, in the case of an inefficient pathogen on a very resistant host, building a within-host multiplication structure is impossible and latency would therefore be selected against.

Typology of infection strategies

In this section, we will focus on how patterns of resource allocation shape pathogen infection strategies, and how disease-associated life-history traits (Fig. 3) can vary depending on the environmental constraints (in terms of infection extinction risk μ) and interaction type (defined by γ and ε) (Fig. 4, 5).

Two radically different ecological conditions lead to very brief infections. The first occurs when a weakly efficient pathogen faces harsh host defenses (low absorption efficiency, ε , and high within-host mortality, γ , corresponding to the upper left-hand corners of the contour plots in Figures 4 and 5) leading to infection failure. The second corresponds to very efficient pathogens infecting very susceptible hosts (high ε and low γ , bottom right-hand corner of contour plots in Figures 4 and 5). In both situations, all resources are consumed and pathogen fitness is highest without the need to build a large exploitation structure (maximal density of multiplication forms is low).

Between these two extreme cases, the longest duration of infection (highest latency and infectious period) occurs for the lowest values of γ and ε (bottom right-hand corner of contour plots), especially when $\mu = 0$. Since the time horizon is long (limited only by within-host mortality, γ) the sporulation rate can be low. Conversely, when γ is high, the infectious period is shortened (whatever the value of ε), and the maximal sporulation rate increases when

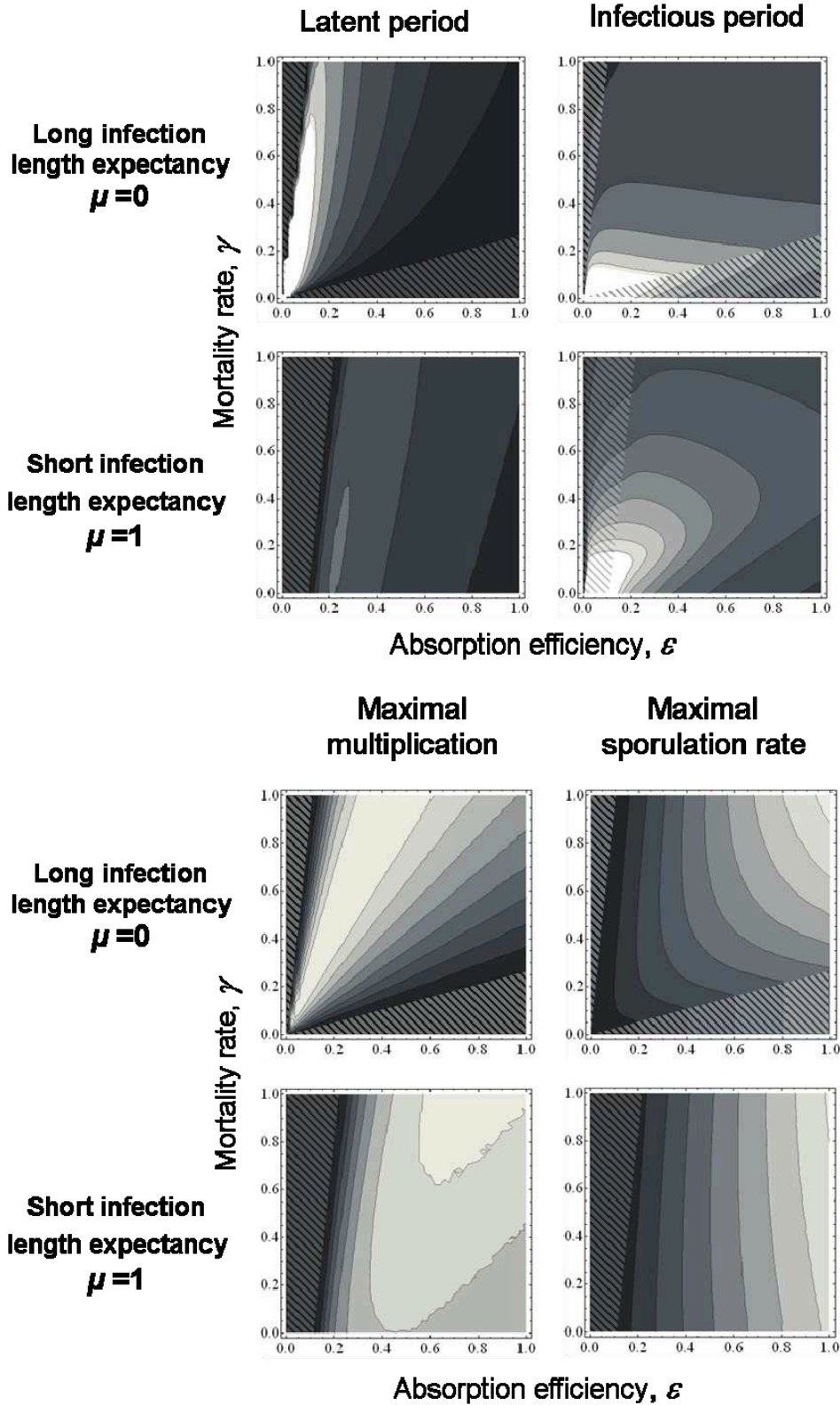


Figure 4 : Variation of disease life-history traits as a function of resource absorption efficiency ε and mortality rate γ , with or without external mortality (infinite or short infection length expectancy, $\mu=0$ or $\mu=1$). The optimal reaction norms are presented as contour plots for optimal latency and infectious period, maximal density of multiplication forms (here denoted maximal multiplication) and maximal sporulation rate. The lighter the color, the higher the value is. A shaded (dashed) area corresponding to

pathogen exploitation efficiency ε increases. It is therefore noteworthy that the highest fitness levels do not coincide with either the highest maximal sporulation rates or the maximal densities of multiplication forms.

Considering a higher extinction risk of the infection as a whole ($\mu=1$) amounts to reducing the time horizon available for pathogen development within the host. In all cases, the duration of infection is thus shorter, and the area reflecting infection failure is larger. Globally, the effect of an increase in mortality rate γ is less pronounced. This is especially true for the maximal sporulation rate, which becomes nearly insensitive to γ for $\mu = 1$. Conspicuously, this more risky environment splits two contrasting infection strategies for intermediate values of relative exploitation efficiency (ε/γ ratio, first bisecting line of the plots). For low values of both γ and ε , the best infection strategy is to begin sporulation early (and hence not invest in within-host multiplication) but also to delay sporulation over a very long infectious period. In this case, resource depletion remains quite low. Conversely, for high values of both γ and ε , a large exploitation structure is built. This seems counterintuitive, as multiplication forms suffer a high mortality rate γ , but this is the price to pay for shortening the infectious period (because of extinction risk) and to quickly convert the remaining host resources into spores. Hence, around the same fitness level can be achieved by two radically different infection strategies depending on the strength of the mortality rate γ .

From Figures 4 and 5, it can be seen that these complex patterns of trait values do not lead to any congruent variations across disease life-history traits (except between fitness and resource depletion, see below). Hence, expected between-trait correlations may be positive, negative or null depending on the parameter space considered.

parameter space of null optimal latency is superimposed on each graph. Note that the left-up corner dashed area correspond to infection failure (fitness $< M(0)$). Initial conditions are $R(0) = 10$ and $M(0) = 1$, other parameter values: $c_1=c_2=1$.

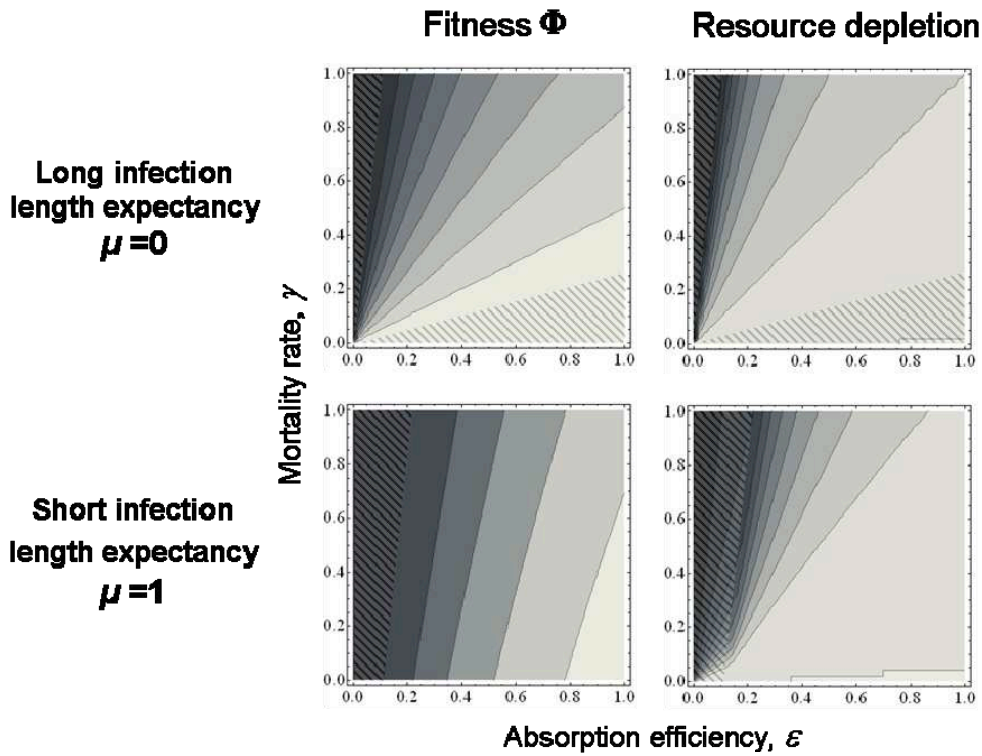


Figure 5 : Variation of fitness and resource depletion as a function of resource absorption efficiency ε and mortality rate γ , with or without external mortality (infinite or short infection length expectancy, $\mu=0$ or $\mu=1$). The lighter the color, the higher the value is. The shaded (dashed) areas correspond to parameter space of null optimal latency. The left area correspond to infection failure (fitness $< M(0)$). Initial conditions are $R(0) = 10$ and $M(0) = 1$, other parameter values: $c_1=c_2=1$.

Consequences for damages suffered by the host

First, it should be noted that resources may not be fully depleted at the end of the infection (*cf.* the intersections of the optimal trajectories with the M axis on Figure 2A and Appendix C; see also Gilchrist et al. 2006), while no direct constraint restricts resource availability. Levels of resource depletion rely mostly on the relative exploitation efficiency of the pathogen.

Assuming $\mu = 0$, the expression of R_{dep} can be simplified to $R_{dep} = 1 - \frac{\gamma}{c_1 \varepsilon R(0)}$ (Appendix C).

Interestingly, when $\mu = 0$, fitness parallels resource depletion (Fig. 5), as Φ is also a decreasing function of $\frac{\gamma}{\varepsilon}$ (Appendix C). This match is no longer available when extinction risk is taken into account ($\mu > 0$). Hence, for a given pathogen fitness, host resources can be more or less depleted depending on the within-host mortality rate, γ . This is biologically realistic, as a reduced host defense level will result in higher injury to the host.

Discussion

Optimal allocation is bang-bang

Much of the theoretical work on pathogen evolution is based on epidemiological models that describe aspects of the ecological dynamics of the host-parasite interaction (Day 2001; Day and Proulx 2004). A number of these models assume a fixed relation of proportionality between within-host multiplication (or parasitemy) and transmission (e.g. Alizon et al. 2005; André and Gandon 2006) or various functions linking these two life-history traits (e.g., Sasaki and Iwasa 1991). The within-host model presented here does not assume any such correlation but instead allows the optimal allocation strategy between these two physiological functions to be defined as a by-product of the interactions between host, pathogen and environment.

Applying optimal control theory to the timing of transmission, our model revealed that optimal infection strategies should generally be “bang-bang” under the assumptions considered here: the pathogen first has to allocate all resources extracted from host to growth, and then, after a critical time—referred to as latency—to switch to the exclusive production of spores. This drastic allocation schedule, which contrasts with how transmission is traditionally modeled (e.g., as a fixed proportion of within-host multiplication forms) is a classical result in optimal control theory when conflicting interests exist (Cohen 1971; 1976). Because transmission negatively impacts on multiplication, a time delay in the onset of spore production enables a more efficient exploitation structure to be built that may allow more and faster spore production in the future. Conversely, delaying spore production too much can reduce the time horizon available for transmission and reduce the amount of resources left for transmission. The optimal switch time (which defines optimal latency) occurs when the pay-off from increasing exploitation structure (which is related to the marginal value of somatic investment) no longer exceeds the cost of delaying spore production (Taylor et al. 1974; Perrin and Sibly 1993). In our model, costs and benefits depend on both mortality rates and the dynamics of resource depletion. As a consequence, optimal latency shows complex, non monotonous reaction norms in response to varying mortality rates (γ , μ) and resource absorption and conversion rates (ε , c_1).

In addition to the existence of a latent period, our model predicts that there should be no investment in within-host growth after the onset of spore production. In a related, albeit dissimilar modeling framework, Sibly et al. (1985) showed that such a result was due to fecundity (here spore production) being a concave function of within-host growth, because of the fixed cost of building the exploitation structure prior to spore production. Conversely, assuming a convex trade-off between fecundity (spore production) and within-host growth (i.e., if the cost of producing a single spore is an increasing function of the number of spores),

growth is sustained after the onset of reproduction (Sibly et al. 1985; Perrin and Sibly 1993). Sustained growth after the beginning of reproduction (spore production) results in a so-called indeterminate growth strategy (Heino and Kaitala 1999). Another reason why such a bang-mixed strategy should be advantageous is the temporal stochasticity of the fate of the offspring, i.e., producing offspring over an extended period of time diminishes the risks of offspring death (e.g., Satake et al. 2001; Halkett et al. 2004). Investigating the robustness of the predictions of bang-bang optimal allocation schedules relative to changes in model assumptions is a major perspective of the present study.

Do spore-producing pathogens have bang-bang strategies?

Latency is a common disease life-history trait observed in both spore-producing and non spore-producing pathogens. This trait has been particularly well investigated in foliar plant pathogens, especially rust fungi (Pariaud et al. 2009a), because, for these organisms, the onset of sporulation can easily be attested by the disruption of the plant epidermis and the emission of spores. Latency is a very plastic trait, but latency reaction norms can be determined by pathogen genotype (Lehman and Shanner 1996) and are subject to rapid evolution (Lehman and Shanner 2007). Interestingly, very large inter-specific variability exists among closely related fungal species. For instance, among the Pucciniale clade (rusts), latency periods may vary from 7 to 8 days for *Puccinia triticina* (responsible for the wheat leaf rust; Knott and Mundt 1991; Pariaud et al. 2009b) or *Melampsora larici-populina* (responsible for the poplar rust; Pinon and Frey 2005) to 3 to 5 weeks for e.g., *Hemileia vastatrix* (infects *Coffea* species; Coutinho et al. 1994). The present study suggests that a long latency is favored by low infection extinction risks and moderate resource absorption efficiencies, whereas short latencies are expected under very harsh conditions (both high infection extinction risks and high within-host mortalities) or very favorable conditions (low within-host mortality and high

resource absorption efficiency). It could be very interesting to further assess the ecological determinants of latency empirically, e.g., through a meta-analysis approach.

Variability in pathogen infection strategies

A major strength of this model is that each parameter can be interpreted as both a host defense strategy and a pathogen exploitation strategy, in other words, the model neatly describes the variations in disease traits that result from the interplay between host, pathogen and environmental constraints. This feature has seldom been acknowledged previously (Hall et al. 2009b). Most theoretical models assume that virulence (or resistance and tolerance) is determined solely by pathogen (or host) genotype (Frank 1996; Day and Proulx 2004; Restif and Koella 2004). However, there is growing evidence that disease traits may be under shared genetic and physiological control (Carius et al. 2001; Thomas et al. 2002; Kaltz and Shykoff 2002; Salvaudon et al. 2007) and that host and pathogen genotypes can interact in the determination of disease-associated traits (Salvaudon et al. 2007; de Roode et al. 2008). Moreover, some authors have shown that the host environment can also strongly influence pathogen exploitation strategies (De Roode et al. 2008; Hall et al. 2009a,b; Lazzaro and Little 2009). In particular, an increase in host resources has been proved to result in a higher parasite load (Hall et al. 2009b). It is noteworthy that this empirical result matches our model predictions, as pathogen fitness is an increasing function of initial host resources ($R(0)$). Furthermore, empirical studies interested in pathogen x host genotypic interactions report a huge intraspecific variability in disease-associated traits (Carius et al. 2001; Kaltz and Shykoff 2002; Salvaudon et al. 2007; de Roode et al. 2008). Salvaudon et al. (2007) suggested that this variability could result from different compatibility levels in the interaction between a pathogen and its host, which determine the amount of resources the pathogen is able to extract from its host. Our results are in agreement with these proposed arguments. Here, the

degree of compatibility of the interaction between a pathogen and its host is defined mostly—assuming an even amount of available host resources ($R(0)$)—by the mortality rate applied to the pathogen (γ) on one hand and the efficiency of the pathogen to extract and use host resources (ε and c_1) on the other. In accordance with the results of Salvaudon et al. (2007), very different combinations of trait values can be observed when either exploitation efficiency or mortality factors are modified in our model, implying that very different infection strategies can be selected for, depending on the context of the interaction. Interestingly, roughly the same level of pathogen fitness can be achieved through radically different infection dynamics depending on the strength of the mortality rate γ : either early spore production (short latency period) and long infectious period when both mortality (γ) and efficiency (ε) are weak, or conversely, postponed spore production (latency) and shortened infectious period when the pathogen suffers high within-host mortality (γ) and has high absorption efficiency (ε). It would be interesting to further decipher whether this can help explain the maintenance of infection strategy polymorphism observed in nature (Salvaudon et al. 2007; de Roode et al. 2008).

Implications for the search of trade-offs between disease-associated traits.

Life history theory postulates that evolution is constrained by trade-offs that prevent the maximization of all fitness-related traits through competition for the allocation of limited individual resources (Stearns 1992; Roff 1992). This leads to negative correlations between fitness-related traits. Consequently, much empirical research has looked for such negative genetic correlations between traits that contribute to pathogen or host fitness. Nonetheless, many empirical studies have reported variations in the sign of the correlations between disease-associated traits, depending on the characteristics of the host-pathogen interaction. Positive correlations can emerge if host or pathogen genotypes differ in their ability to acquire

resources (Van Noordwijk and de Jong 1986; Reznick et al. 2000). In our modeling approach, fitness is attained through a balance in investment toward within-host growth and spore production. In spite of this clear physiological constraint, the correlation between within-host multiplication and cumulative spore production (*i.e.*, fitness when the invariant extinction risk μ is considered) is not straightforward. This also applies to other disease-associated traits across optimal reaction norms. Even when considering an equal initial host resource ($R(0)$), and a steady pathogen fitness level, the complex patterns of variation in disease-associated traits result in positive or negative correlations between traits depending on the parameter space considered. For instance, depending on other parameters, within-host multiplication and cumulative spore production may be positively or negatively correlated.

Provided the model assumptions are met, these complex co-variations can readily explain discrepancies within or among empirical studies. Indeed, in most experimental designs, pathogen and host genotypes are drawn randomly from populations or strain collections. It is therefore very likely that quite different types and levels of compatibility of interaction are gathered in the same observation. In our modeling framework, this equates to considering different parameter spaces within the modeled reaction norms. Given the complexity of the correlations among multiple traits (see also Restif and Koella 2004 for a discussion on resistance and tolerance), we argue that much understanding of pathogen infection strategies or host defense strategies can be gained through examining the variation in a large number of disease-associated traits (as in de Roode et al. 2008) instead of focusing on the most classical trade offs (e.g., virulence-transmission).

Importance of timing in the study of disease life-history strategies

A property of the model considered here is that infection strategies can be studied in terms of both trait values and the timing of events. In addition to the disease traits most classically studied (multiplication and transmission), we define here two key periods in the timing of

infection: latency and infectious period. A number of theoretical works has previously recognised the importance of the timing of disease life history events on virulence evolution. Most of these have focused on optimal lysis time in bacteriophages (Bull 1994; Abedon et al. 2001; Bull 2006; Wang 2006) or duration of infection (Frank 1996; Day 2001, 2003; Alizon 2008), and most notably show that differences in the relative timing of parasite transmission and host death can create strong selective forces on virulence evolution (Day 2003). In addition, taking into account the existence of a latency period has been shown to modify the predictions of classical models of virulence evolution (Day 2003), i.e., a longer time lag between the onset of transmission and parasite-induced mortality can select for higher virulence. However, these studies did not consider explicit within-host parasite dynamics and no computation of the optimal latency was performed.

Conclusion

In the field of the evolution of infectious diseases, where concrete applications are of great concern, there is an urgent need to fill the gap between theory and experiment (Galvani 2003). A major problem that biologists face when trying to test model predictions experimentally is to find good proxies for the quantities involved in theoretical studies on the evolution of virulence (Alizon et al. 2009; Day 2002). By investigating the optimal resource allocation strategy between within-host multiplication and spore production, the model presented here attempts to achieve realism in the description of infection strategy by providing predictions for pathogen lifetime reproductive success, resource depletion rate, and four disease-associated life-history traits: latency period, infectious period, maximal density of multiplication forms, and maximal spore production rate. Thus, this study, with its identification and use of easily measurable life-history traits, is a first attempt at bringing theory and experiments closer together by providing realistic disease reaction norms.

Lastly, our model describes the effect of the pathogen on the host in terms of the resource depletion rate, which is related to—but certainly not equivalent to—virulence, as classically defined (pathogen-induced host mortality). It is reasonable to expect that the fewer resources left at the end of the infection, the larger the host fitness penalty. Nonetheless, in many cases, hosts have also coevolved to lower the amount of resources available for pathogen growth, and seem to have extremely low fitness penalties associated with pathogen attack. One may therefore ask whether in these species the virulence-transmission trade-off really represents an important constraint on the evolution of pathogen infection strategies. Filling the gap between resource depletion rate and virulence would require explicit modeling of the resource allocation strategy for host defense (as in Day 2007, Alizon 2009). This would render the host-pathogen confrontation game more realistic and would enable assessment of when the virulence-transmission trade-off is a major determinant of a particular pathogen infection strategy and when it is not.

Acknowledgments

We thank Alain Franc, Sylvain Gandon, Frédéric Hamelin and Manuel Plantegenest for inspiring discussions on the modeling project and Catherine Abadie, Elisabeth Fournier, Pascal Frey, Christian Lannou and Didier Tharreau for insightful discussions on fungal plant pathogen biology. Sylvain Gandon and Frédéric Hamelin provided valuable comments on an earlier version of this manuscript and Helen Rothnie made an attentive reading and careful English language checking. We are grateful to Deborah L. Sulsky and Michael A. Gilchrist who kindly provided the full appendices of their 2006 paper and gave useful tips on mathematic resolutions. We also thank Andrei Akhmetzhanov for interesting technical discussions on turnpike conditions and infinite-time-horizon optimal control problems. Audrey Andanson was supported by a doctoral ASC fellowship from INRA. This work was also supported by grants from Agropolis Foundation and RNSC (project ModPEA, Covenant support number 0902-013), INRA (call for proposal “Gestion durable des résistances aux bio-agresseurs”, project Metacarpe, contract number 394576) and ANR (ANR 07-BDIV-003, EMERFUNDIS program).

References

- Abedon, S. T., T. D. Herschler, and D. Stopar. 2001. Bacteriophage latent-period evolution as a response to resource availability. *Applied and Environmental Microbiology* 67:4233-4241.
- Alizon, S. 2008. Transmission-recovery trade-offs to study parasite evolution. *American Naturalist* 172:E113-E121.
- Alizon, S. 2009. The Price equation framework to study disease within-host evolution. *Journal of Evolutionary Biology* 22:1123-1132.
- Alizon, S., A. Hurford, N. Mideo, and M. Van Baalen. 2009. Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology* 22:245-259.
- Alizon, S., and M. van Baalen. 2005. Emergence of a convex trade-off between transmission and virulence. *American Naturalist* 165:E155-E167.
- André, J. B., and S. Gandon. 2006. Vaccination, within-host dynamics, and virulence evolution. *Evolution* 60:13-23.
- André, J. B., and T. Day. 2005. The effect of disease life history on the evolutionary emergence of novel pathogens. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272:1949-1956.
- André, J. B., J. B. Ferdy, and B. Godelle. 2003. Within-host parasite dynamics, emerging trade-off, and evolution of virulence with immune system. *Evolution* 57:1489-1497.
- Antia, R., R. R. Regoes, J. C. Koella, and C. T. Bergstrom. 2003. The role of evolution in the emergence of infectious diseases. *Nature* 426:658-661.
- Brommer, J. E., J. Merilä, and H. Kokko. 2002. Reproductive timing and individual fitness. *Ecology Letters* 5:802-810.

- Bull, J. J. 1994. Virulence. *Evolution* 48:1423-1437.
- Bull, J. J. 2006. Optimality models of phage life history and parallels in disease evolution. *Journal of Theoretical Biology* 241:928-938.
- Caraco, T., and I. N. Wang. 2008. Free-living pathogens: Life-history constraints and strain competition. *Journal of Theoretical Biology* 250:569-579.
- Carius, H. J., T. J. Little, and D. Ebert. 2001. Genetic variation in a host-parasite association: Potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution* 55:1136-1145.
- Clark, C. W. 1990. *Mathematical bioeconomics: the optimal management of renewable Resources (2nd ed.)*, Wiley Interscience.
- Cohen, D. 1971. Maximizing final yield when growth is limited by time or by limiting resources. *Journal of Theoretical Biology* 33:299-&.
- Cohen, D. 1976. Optimal timing of reproduction. *American Naturalist* 110:801-807.
- Coutinho, T. A., F. H. J. Rijkenberg, and M. A. J. Vanasch. 1994. The effect of leaf age on infection of coffea genotypes by *Hemileia vastatrix*. *Plant Pathology* 43:97-103.
- Day, T. 2001. Parasite transmission modes and the evolution of virulence. *Evolution* 55:2389-2400.
- Day, T. 2002. On the evolution of virulence and the relationship between various measures of mortality. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 269:1317-1323.
- Day, T. 2003. Virulence evolution and the timing of disease life-history events. *Trends in Ecology & Evolution* 18:113-118.
- Day, T., A. L. Graham, and A. F. Read. 2007. Evolution of parasite virulence when host responses cause disease. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 274:2685-2692.

- Day, T., and P. D. Taylor. 1997. Von Bertalanffy's growth equation should not be used to model age and size at maturity. *American Naturalist* 149:381-393.
- Day, T., and P. D. Taylor. 2000. A generalization of Pontryagin's maximum principle for dynamic evolutionary games among relatives. *Theoretical Population Biology* 57:339-356.
- Day, T., and S. R. Proulx. 2004. A general theory for the evolutionary dynamics of virulence. *American Naturalist* 163:E40-E63.
- de Roode, J. C., A. J. Yates, and S. Altizer. 2008. Virulence-transmission trade-offs and population divergence in virulence in a naturally occurring butterfly parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:7489-7494.
- Ebert, D., and E. A. Herre. 1996. The evolution of parasitic diseases. *Parasitology Today* 12:96-101.
- Ebert, D., and J. J. Bull. 2003. Challenging the trade-off model for the evolution of virulence: is virulence management feasible? *Trends in Microbiology* 11:15-20.
- Frank, S. A. 1996. Models of parasite virulence. *Quarterly Review of Biology* 71:37-78.
- Galvani, A. P. 2003. Epidemiology meets evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 18:132-139.
- Ganusov, V. V. 2003. Evolution of virulence: adaptive or not? *Trends in Microbiology* 11:112-113.
- Ganusov, V. V., and R. Antia. 2003. Trade-offs and the evolution of virulence of microparasites: do details matter? *Theoretical Population Biology* 64:211-220.
- Gilchrist, M. A., and A. Sasaki. 2002. Modeling host-parasite coevolution: A nested approach based on mechanistic models. *Journal of Theoretical Biology* 218:289-308.
- Gilchrist, M. A., D. L. Sulsky, and A. Pringle. 2006. Identifying fitness and optimal life-history strategies for an asexual filamentous fungus. *Evolution* 60:970-979.

Halkett, F., R. Harrington, M. Hulle, P. Kindlmann, F. Menu, C. Rispe, and M. Plantegenest.

2004. Dynamics of production of sexual forms in aphids: Theoretical and experimental evidence for adaptive "coin-flipping" plasticity. *American Naturalist* 163:E112-E125.

Halkin, H. 1974. Necessary conditions for optimal control problems with infinite horizons. *Econometrica* 42:267-272.

Hall, S. R., C. R. Becker, J. L. Simonis, M. A. Duffy, A. J. Tessier, and C. E. Caaceres.

2009a. Friendly competition: evidence for a dilution effect among competitors in a planktonic host-parasite system. *Ecology* 90:791-801.

Hall, S. R., J. L. Simonis, R. M. Nisbet, A. J. Tessier, and C. E. Caceres. 2009b. Resource ecology of virulence in a planktonic host-parasite system: an explanation using dynamic energy budgets. *American Naturalist* 174:149-162.

Heino, M., and V. Kaitala. 1999. Evolution of resource allocation between growth and reproduction in animals with indeterminate growth. *Journal of Evolutionary Biology* 12:423-429.

Iwasa, Y. 2000. Dynamic optimization of plant growth. *Evolutionary Ecology Research* 2:437-455.

Iwasa, Y., and J. Roughgarden. 1984. Shoot root balance of plants - optimal growth of a system with many vegetative organs. *Theoretical Population Biology* 25:78-105.

Iwasa, Y., and S. A. Levin. 1995. The timing of life-history events. *Journal of Theoretical Biology* 172:33-42.

Kaltz, O., and J. A. Shykoff. 2002. Within- and among-population variation in infectivity, latency and spore production in a host-pathogen system. *Journal of Evolutionary Biology* 15:850-860.

- Kaltz, O., and J. C. Koella. 2003. Host growth conditions regulate the plasticity of horizontal and vertical transmission in *Holospira undulata*, a bacterial parasite of the protozoan *Paramecium caudatum*. *Evolution* 57:1535-1542.
- Knott, E. A., and C. C. Mundt. 1991. Latent period and infection efficiency of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* populations isolated from different wheat cultivars. *Phytopathology* 81:435-439.
- Koella, J. C., and P. Turner. 2007. Evolution of parasites. In: *Evolution in Health and Disease*. Stearns S. C., and J.C. Koella, eds. Oxford Univ Press, Oxford, London.
- Kozlowski, J. 1992. Optimal allocation of ressources to growth and reproduction - implications for age and size at maturity. *Trends in Ecology & Evolution* 7:15-19.
- Lazzaro, B. P., and T. J. Little. 2009. Immunity in a variable world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 364:15-26.
- Lehman, J. S., and G. Shaner. 1996. Genetic variation in latent period among isolates of *Puccinia recondita* f sp *tritici* on partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* 86:633-641.
- Lehman, J. S., and G. Shaner. 2007. Heritability of latent period estimated from wild-type and selected populations of *Puccinia triticina*. *Phytopathology* 97:1022-1029.
- Levin, B. R. 1996. The evolution and maintenance of virulence in microparasites. *Emerging Infectious Diseases* 2:93-102.
- Levin, B. R. 1996. The evolution and maintenance of virulence in microparasites. *Emerging Infectious Diseases* 2:93–102.
- Lipsitch, M., and E. R. Moxon. 1997. Virulence and transmissibility of pathogens: What is the relationship? *Trends in Microbiology* 5:31-37.
- Lipsitch, M., and E. R. Moxon. 1997. Virulence and transmissibility of pathogens: What is the relationship? *Trends in Microbiology*. 5:31–37.

- Pariaud, B., C. Robert, H. Goyeau, and C. Lannou. 2009b. Aggressiveness components and adaptation to a host cultivar in wheat leaf rust. *Phytopathology* 99:869-878.
- Pariaud, B., V. Ravigne, F. Halkett, H. Goyeau, J. Carlier, and C. Lannou. 2009a. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* 58:409-424.
- Perrin, N., and R. M. Sibly. 1993. Dynamic-models of energy allocation and investment. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24:379-410.
- Pinon, J., and P. Frey. 2005. Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In: *Rust diseases of Willow and Poplar*. M. H. Pei, and A. R. McCracken, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- Pontryagin, L. S., V. G. Boltanskii, R. S. Gamkrelidze, and E. F. Mischenko. 1964. The mathematical theory of optimal control processes. Oxford, Pergamon.
- Read, A. F. 1994. The evolution of virulence. *Trends in Microbiology*. 2:73–76.
- Restif, O., and J. C. Koella. 2003. Shared control of epidemiological traits in a coevolutionary model of host-parasite interactions. *American Naturalist* 161:827-836.
- Restif, O., and J. C. Koella. 2004. Concurrent evolution of resistance and tolerance to pathogens. *American Naturalist* 164:E90-E102.
- Reznick, D., L. Nunney, and A. Tessier. 2000. Big houses, big cars, superfleas and the costs of reproduction. *Trends in Ecology & Evolution* 15:421-425.
- Roff, D. A. 1992. *The Evolution of Life Histories: Theory and Analysis*. Chapman and Hall, New York, USA.
- Salvaudon, L., V. Heraudet, and J. A. Shykoff. 2005. Parasite-host fitness trade-offs change with parasite identity: Genotype-specific interactions in a plant-pathogen system. *Evolution* 59:2518-2524.

- Salvaudon, L., V. Heraudet, and J. A. Shykoff. 2007. Genotype-specific interactions and the trade-off between host and parasite fitness. *Bmc Evolutionary Biology* 7.
- Salvaudon, L., V. Heraudet, and J. A. Shykoff. 2008. *Arabidopsis thaliana* and the Robin Hood parasite: a chivalrous oomycete that steals fitness from fecund hosts and benefits the poorest one? *Biology Letters* 4:526-529.
- Sasaki, A., and Y. Iwasa. 1991. Optimal-growth schedule of pathogens within a host - switching between lytic and latent cycles. *Theoretical Population Biology* 39:201-239.
- Satake, A., A. Sasaki, and Y. Iwasa. 2001. Variable timing of reproduction in unpredictable environments: Adaption of flood plain plants. *Theoretical Population Biology* 60:1-15.
- Sibly, R., P. Calow, and N. Nichols. 1985. Are patterns of growth adaptive. *Journal of Theoretical Biology* 112:553-574.
- Stearns, S.C. 1992. *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Taylor, H. M., Gourley R. S., and C. E. Lawrence. 1974. Natural selection of life history attributes: an analytical approach. *Journal of Theoretical Biology* 5:104-122.
- Thomas, F., S. P. Brown, M. Sukhdeo, and F. Renaud. 2002. Understanding parasite strategies: a state-dependent approach? *Trends in Parasitology* 18:387-390.
- Van Noordwijk, A. J., and G. Dejong. 1986. Acquisition and allocation of resources - their influence on variation in life-history tactics. *American Naturalist* 128:137-142.
- Wang, I. N. 2006. Lysis timing and bacteriophage fitness. *Genetics* 172:17-26.
- Weber, T. A. 2006. An infinite-horizon maximum principle with bounds on the adjoint variable. *Journal of Economic Dynamics and Control* 30:229-241.
- Weiss, R. A. 2002. Virulence and pathogenesis. *Trends in Microbiology* 10:314-317.

Appendix A: The optimal strategy is bang-bang

The control variable, which is also the required solution, is the resource allocation schedule $u(a)$, here a continuous function defined as $[0, +\infty[$, whose values lie between 0 and 1 and which is allowed to take any form in order to permit the maximisation of Φ .

The Hamiltonian

We attempted to find the resource allocation strategy that maximizes the reproductive success of the pathogen within its host (Φ). In other words, we wanted to determine the shape of the function $u(a)$ (hereafter denoted $u^*(a)$) that maximizes Φ . Let the fitness of a pathogenic strain within its host be defined as its lifetime reproductive success,

$$\Phi = \int_0^{+\infty} u(a) c_2 \varepsilon R(a) M(a) e^{-\mu a} da. \quad (\text{A6})$$

The maximum principle states that the optimal allocation strategy ($u^*(a)$) should be chosen to maximize the Hamiltonian (H), at each moment in time, given state variables (R and M) and co-state variables (Ψ^1 and Ψ^2).

The Hamiltonian is defined as follows:

$$H = L + \Psi^1 \frac{dM}{da} + \Psi^2 \frac{dR}{da}, \quad (\text{A7})$$

where L is the contribution of the pathogen strategy at age a to the total fitness Φ (i.e., the integrand in the integral that defines Φ) and Ψ^i are called the co-state variables. These functions can be interpreted as describing the dynamics of the marginal return in the total fitness Φ of an increment of M and R at age a respectively (Iwasa and Roughgarden 1984, Iwasa 2000) and follow the dynamics:

$$\frac{d\Psi^1}{da} = -\frac{\partial H}{\partial M}, \quad (\text{A8})$$

and

$$\frac{d\Psi^2}{da} = -\frac{\partial H}{\partial R}. \quad (\text{A9})$$

Hence,

$$\frac{d\Psi^1}{da} = -\left[\frac{\partial L}{\partial M} + \frac{\partial}{\partial M} \left(\frac{dM}{da} \right) \Psi^1 + \frac{\partial}{\partial M} \left(\frac{dR}{da} \right) \Psi^2 \right], \quad (\text{A10})$$

)

and

$$\frac{d\Psi^2}{da} = -\left[\frac{\partial L}{\partial R} + \frac{\partial}{\partial R} \left(\frac{dM}{da} \right) \Psi^1 + \frac{\partial}{\partial R} \left(\frac{dR}{da} \right) \Psi^2 \right], \quad (\text{A11})$$

)

which further gives:

$$\frac{d\Psi^1}{da} = -\left[u(a)c_2\varepsilon R(a)e^{-\mu a} + (c_1\varepsilon R(a)(1-u(a)) - \gamma) \Psi^1 - \varepsilon R(a)\Psi^2 \right], \quad (\text{A12})$$

)

and

$$\frac{d\Psi^2}{da} = -\left[u(a)c_2\varepsilon M(a)e^{-\mu a} + (c_1\varepsilon M(a)(1-u(a))) \Psi^1 - \varepsilon M(a)\Psi^2 \right]. \quad (\text{A13})$$

)

Replacing the functions by their respective expressions and rearranging the terms in the equation of the Hamiltonian leads to:

$$H = \Psi^1 M(a) [c_1\varepsilon R(a) - \gamma] - \Psi^2 [\varepsilon R(a)M(a)] + \varepsilon R(a)M(a) (c_2e^{-\mu a} - c_1\Psi^1) u(a). \quad (\text{A14})$$

)

To better capture the biological interest of maximizing the quantity H , let us rewrite it as follows:

$$H = \frac{dS}{da} e^{-\mu a} + \frac{dM}{da} \Psi^1 + \frac{dR}{da} \Psi^2. \quad (\text{A15})$$

)

Here it can be seen that H is the sum of the marginal gains obtained at each moment in time through the different activities of the pathogen, that is, the sum of the variations of S , M and R between a and $(a + \delta a)$ multiplied by their respective marginal values $e^{-\mu a}$, Ψ^1 and Ψ^2 . The marginal value of a particular activity being defined as the increment of reproductive success of the pathogen (Φ) caused by the unit increase in this activity. Thus, the Hamiltonian corresponds to the sum of the fitness gains caused by a small change in the density of spores, the density of multiplication forms, and the available resources left.

Maximizing the Hamiltonian

In order to find the function $u^*(a)$ maximizing the Hamiltonian, we derive H with respect to $u(a)$:

$$\frac{\partial H}{\partial u} = \varepsilon R(a) M(a) [c_2 e^{-\mu a} - c_1 \Psi^1]. \quad (\text{A16})$$

)

Equation A16 above indicates that, when $c_1 \Psi^1 > c_2 e^{-\mu a}$, the Hamiltonian is a strictly decreasing function of $u(a)$ so that the value of $u(a)$ that maximizes $H(a)$ is 0. Conversely, when $c_1 \Psi^1 < c_2 e^{-\mu a}$, the Hamiltonian is a strictly increasing function of $u(a)$ so that the value of $u(a)$ that maximizes $H(a)$ is 1. It could be that an intermediate value of $u(a)$ maximizes $H(a)$ during a period of time (say from a_1 to a_2). This can only be true if

$$\forall a \in [a_1, a_2], \frac{\partial H}{\partial u} = 0, \quad (\text{A17})$$

)

as well as all its time derivatives:

$$\forall n \in \mathbb{N}, \forall a \in [a_1, a_2], \frac{\partial^n}{\partial a^n} \left(\frac{\partial H}{\partial u} \right) = 0. \quad (\text{A18})$$

)

Condition A17 is equivalent to:

$$c_1 \Psi^1 = c_2 e^{-\mu a}, \quad (\text{A19})$$

)

because $R(a)M(a)$ cannot stay zero during an interval $[a_1, a_2]$ in sensible solutions. The only

way for A18 to hold true for $n=1$ when A17 holds is then when the first derivative of

$c_2 e^{-\mu a} - c_1 \Psi^1$ with respect to a is zero. We get:

$$c_2 \mu e^{-\mu a} + c_1 \frac{\partial \Psi^1}{\partial a} = 0, \quad (\text{A20})$$

)

which, upon inserting equation A12 yields:

$$c_2 \mu e^{-\mu a} - c_1 \left[u(a) c_2 \varepsilon R(a) e^{-\mu a} + (c_1 \varepsilon R(a) (1 - u(a)) - \gamma) \Psi^1 - \varepsilon R(a) \Psi^2 \right] = 0,$$

that gives, upon replacing $c_1 \Psi^1$ with $c_2 e^{-\mu a}$:

$$(c_2 \mu + c_2 \gamma - c_1 c_2 \varepsilon R(a)) e^{-\mu a} + c_1 \varepsilon R(a) \Psi^2 = 0, \quad (\text{A21})$$

)

from which we can conclude neither the existence of singular control nor a contradiction. We

then have to check A18 with $n=2$, which is done simply by differentiating A21 with respect to

a by using the expression of $\frac{dR}{da}$ and equation A13:

$$\begin{aligned} & \left[-\mu (c_2 \mu + c_2 \gamma - c_1 c_2 \varepsilon R(a)) e^{-\mu a} \right] + c_1 c_2 \varepsilon^2 e^{-\mu a} R(a) M(a) - c_1 \varepsilon^2 \Psi^2 R(a) M(a) \\ & - c_1 \varepsilon R(a) \left[u(a) c_2 \varepsilon M(a) e^{-\mu a} + (c_1 \varepsilon M(a) (1 - u(a))) \Psi^1 - \varepsilon M(a) \Psi^2 \right] = 0. \end{aligned}$$

(A22)

Finally, using A19, this equality is equivalent to

$$(\mu + \gamma - c_1 \varepsilon R(a)) e^{-\mu a} = 0, \quad (\text{A23})$$

which is possible only over an interval $[a_1, a_2]$ if $R(a)$ stays constant at $(\mu + \gamma) / c_1 \varepsilon$, which cannot happen unless $M(a) = 0$ over an interval $[a_1, a_2]$ because of the $\frac{dR}{da}$ dynamics. As stated earlier, this does not hold for sensible solutions. Thus, the hypothesis of existence of a singular control implies a contradiction when computing A18 with $n=2$; hence, we can conclude that there is no intermediate value of $u(a)$ such that H is maximized for a given period of time. Hence the only values able to maximize H are $u(a) = 0$ and $u(a) = 1$, and the optimal control is bang-bang.

Appendix B: Pure growth followed by pure sporulation is optimal

In the construction of the optimal control for an infinite horizon problem, we follow in the footsteps of Gilchrist et al. (2006), and use a method similar to that introduced by Clark (1990) in first solving the problem for a finite horizon a_f and then taking the solution corresponding to the limit that is obtained when letting a_f go to infinity. The advantage of this approach is that we can rely on simple boundary conditions for the co-state variables $\Psi^1(a_f) = 0$ and $\Psi^2(a_f) = 0$. These conditions allow us to easily obtain $u(a_f) = 1$ as terminal value of the control since

$$\frac{\partial H}{\partial u} = \varepsilon R(a_f) M(a_f) c_2 e^{-\mu a_f} > 0. \quad (\text{B1})$$

This is not surprising since the pathogen has no interest in somatic growth while its end is near. We should however be careful with this proposed method since it can lead to incorrect results: as pointed out in Halkin (1974) through a counter-example, the boundary conditions for the co-state variables in the infinite-horizon problem do not need to simply be the transfer of those of the finite-horizon problem taken to the limit. However, as indicated by Clark (1990), such a difference is pathological and rarely occurs when considering practical problems. The appropriate method for infinite horizon problems with discount rate considers a current valued Hamiltonian with turnpike conditions on the co-state variables Weber (2006). We have used both Clark's and Weber's methods and got the same results. In the following, we present only the former since it turns out to be less computationally intensive.

Conditions for the last optimal switch time

Because of A16, an optimal switch time a_s is defined by the relation,

$$c_2 e^{-\mu a_s} = c_1 \Psi^1(a_s). \quad (\text{B2})$$

To determine the value of the last of those switching instants a_s^* (which we will later show to be the unique switching instant), we must solve the system of differential equations of the co-state variables for Ψ^1 and Ψ^2 (Equations A12 and A13) with boundary conditions

$\Psi^1(a_f) = 0$ and $\Psi^2(a_f) = 0$. The first step is to solve for the state variables R and M , which are defined by:

$$\frac{dR}{da} = -\varepsilon RM, \quad (\text{B3})$$

and

$$\frac{dM}{da} = c_1 \varepsilon RM(1 - u(a)) - \gamma M. \quad (\text{B4})$$

This system can be solved explicitly when $a > a_s^*$ (i.e. in the terminal sporulation period) with boundary values $R(a_s^*)$ and $M(a_s^*)$, because taking $u(a) = 1$ simplifies the system to:

$$\frac{dR}{da} = -\varepsilon RM, \quad (\text{B5})$$

and

$$\frac{dM}{da} = -\gamma M. \quad (\text{B6})$$

This immediately gives:

$$M(a) = M(a_s^*) e^{\gamma(a_s^* - a)}, \quad (\text{B7})$$

and, using the fact that $\frac{dR}{dM} = \frac{\varepsilon}{\gamma} M$,

$$R(a) = R(a_s^*) e^{\frac{\varepsilon}{\gamma}(M(a) - M(a_s^*))}. \quad (\text{B8})$$

As a second step, we consider equations A12 and A13 defining Ψ^1 and Ψ^2 in this sporulation period:

$$\frac{d\Psi^1}{da} = \gamma\Psi^1 + \varepsilon R(a)(\Psi^2 - c_2 e^{-\mu a}), \quad (\text{B9})$$

and

$$\frac{d\Psi^2}{da} = \varepsilon M(a)(\Psi^2 - c_2 e^{-\mu a}). \quad (\text{B10})$$

Equation B10 above only depends on Ψ^2 and can be solved using the expression of $M(a)$ given by equation B7 and the boundary value $\Psi^2(a_f) = 0$:

$$\Psi^2(a) = c_2 \varepsilon e^{-\frac{\varepsilon}{\gamma} M(a)} \int_a^{a_f} M(t) e^{\frac{\varepsilon}{\gamma} M(t) - \mu t} dt. \quad (\text{B11})$$

We then solve for Ψ^1 using the boundary value $\Psi^1(a_f) = 0$

$$\Psi^1(a) = e^{\gamma a} \int_{a_f}^a \varepsilon R(s) (\Psi^2 - c_2 e^{-\mu s}) e^{-\gamma s} ds, \quad (\text{B12})$$

and replace M , R , and Ψ^2 by their full expression (Equations B7, B8, and B11, respectively)

$$\begin{aligned} \Psi^1(a) &= c_2 \varepsilon R(a_s^*) e^{\gamma a} \int_{a_f}^a e^{\gamma \left(M(s) - M(a_s^*) \right)} \left(\varepsilon e^{-\frac{\varepsilon}{\gamma} M(s)} \int_{a_f}^s M(t) e^{\gamma \left(M(t) - \mu t \right)} dt - e^{-\mu s} \right) e^{-\gamma s} ds \\ &= c_2 \varepsilon R(a_s^*) e^{\gamma a - \frac{\varepsilon}{\gamma} M(a_s^*)} \int_{a_f}^a \left(\varepsilon e^{-\gamma s} \int_{a_f}^s M(t) e^{\gamma \left(M(t) - \mu t \right)} dt - e^{\gamma \left(M(s) - (\mu + \gamma)s \right)} \right) ds. \end{aligned} \quad (\text{B13})$$

Integrating $\int_{a_f}^a \left(\varepsilon e^{-\gamma s} \int_{a_f}^s M(t) e^{\gamma \left(M(t) - \mu t \right)} dt \right) ds$ by part then yields

$$\Psi^1(a) = c_2 \varepsilon R(a_s^*) e^{\gamma a - \frac{\varepsilon}{\gamma} M(a_s^*)} \int_a^{a_f} e^{\gamma \left(M(s) - (\mu + \gamma)s \right)} \left(1 + \frac{\varepsilon}{\gamma} (M(t) - M(a)) \right) ds. \quad (\text{B14})$$

As a last step, we introduce $\Psi^1(a_s^*)$ computed from B14 into B2:

$$c_2 e^{-\mu a_s^*} = c_1 c_2 \varepsilon R(a_s^*) e^{\gamma a - \frac{\varepsilon}{\gamma} M(a_s^*)} \int_a^{a_f} e^{\gamma \left(M(s) - (\mu + \gamma)s \right)} \left(1 + \frac{\varepsilon}{\gamma} (M(t) - M(a)) \right) dt. \quad (\text{B15})$$

B15 cannot be solved explicitly but may still be simplified through a definition of a new

integration variable $x = e^{-\gamma(t-a_s^*)}$ and by taking $a_f \rightarrow \infty$. We get:

$$R(a_s^*) = \frac{e^{\frac{\varepsilon}{\gamma} M(a_s^*)}}{c_1 \frac{\varepsilon}{\gamma} \int_0^1 x^{\frac{\mu}{\gamma}} e^{\gamma \left(M(a_s^*) x \right)} \left(1 + \frac{\varepsilon}{\gamma} M(a_s^*) (x-1) \right) dx}. \quad (\text{B16})$$

This equality then defines the instant a_s^* of the last switch from growth to sporulation. We

notice that it only implicitly depends on a_s^* through $M(a_s^*)$ and $R(a_s^*)$. This expression can

then be used directly to give the closed-form expression of the switching curve in the (M, R)

phase plane by omitting the a_s^* dependency:

$$R_s(M) = \frac{e^{\frac{\varepsilon}{\gamma} M}}{c_1 \frac{\varepsilon}{\gamma} \int_0^1 x^{\frac{\mu}{\gamma}} e^{\frac{\varepsilon}{\gamma} M x} \left(1 + \frac{\varepsilon}{\gamma} M (x-1) \right) dx}. \quad (\text{B17})$$

In the case where $\gamma = 0$, the computations need to be somewhat changed (starting with B7-B8) and follow exactly the same footsteps with simplified calculations, so that B16 becomes

$$R(a_s^*) = \frac{(\mu + \varepsilon M(a_s^*))^2}{c_1 \varepsilon \mu} \quad (\text{B17}')$$

If, moreover, $\mu = 0$, this last expression would translate into $M(a_s^*) = 0$. This would tend to show that no switching takes place. However, since this proof of non-existence of a switch in that case was based on the hypothesis that there was a switch, we rather devote Appendix C3 to an accurate proof.

Uniqueness of switch time

We will now show that no switch can occur before a_s^* . First, we will study the properties of the switching curve. By considering $M = 0$, we have that

$$R_s(0) = \frac{1}{c_1 \frac{\varepsilon}{\gamma} \int_0^1 x^{\frac{\mu}{\gamma}} dx} = \frac{\mu + \gamma}{c_1 \varepsilon}. \quad (\text{B18})$$

and we can show that $R_s(M)$ is an increasing function of M by explicitly computing its derivative with respect to M . This indicates that the last switching always takes place at values of R that are larger than $\frac{\mu + \gamma}{c_1 \varepsilon}$ and, since R is a non-increasing function of time, R is always larger than $\frac{\mu + \gamma}{c_1 \varepsilon}$ before the last switch.

In order to analyze what happens before the last switch we will now consider a new, reversed, time $\tau = a_s^* - a$. In this time, we will check that no switch takes place for positive values of

τ , that is we will check that $c_2 e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 \Psi^1(\tau)$ stays negative for all positive τ (so that $u(\tau) = 0$ for all positive τ), while we know that it was positive for all negative τ .

The switch from $u(\tau) = 1$ to $u(\tau) = 0$ takes place at time $\tau = 0$, so

$$c_2 e^{-\mu(a_s^*)} - c_1 \Psi^1(0) = 0 \quad \text{and} \quad \frac{d(c_2 e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 \Psi^1(\tau))}{d\tau}(0) \leq 0. \quad (\text{B19})$$

Since switching actually takes place in $\tau = 0$ and no singular solution is possible, the solution lies in the region where

$$c_2 e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 \Psi^1(\tau) < 0 \quad \text{and} \quad \frac{d(c_2 e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 \Psi^1(\tau))}{d\tau}(\tau) < 0, \quad (\text{B20})$$

for small positive values of τ . Another switch can then only take place if

$c_2 e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 \Psi^1(\tau)$ goes back to zero, which can be achieved only if

$$\frac{d(c_2 e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 \Psi^1(\tau))}{d\tau}(\tau) \text{ itself first becomes positive. We will show that the latter cannot}$$

happen by considering what happens in the region where B20 holds (where $u(\tau) = 0$).

Remembering that the time derivatives with respect to τ are the opposite of those with respect to a , we compute from A12

$$\frac{d(c_2 e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 \Psi^1(\tau))}{d\tau} = c_2 \mu e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 [(c_1 \varepsilon R - \gamma) \Psi^1 - \varepsilon R \Psi^2], \quad (\text{B21})$$

Since we cannot draw any conclusion from this, we compute

$$\frac{d^2(c_2 e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 \Psi^1(\tau))}{d\tau^2} = c_2 \mu \frac{de^{-\mu(a_s^* - \tau)}}{d\tau} - c_1 (c_1 \varepsilon R - \gamma) \frac{d\Psi^1(\tau)}{d\tau}, \quad (\text{B22})$$

Using the fact that $R \geq \frac{\mu + \gamma}{c_1 \varepsilon}$ for positive τ and that B20 yields

$$c_1 \frac{d\Psi^1(\tau)}{d\tau}(\tau) > c_2 \frac{de^{-\mu(a_s^* - \tau)}}{d\tau}(\tau) > 0, \text{ we then have that}$$

$$\frac{d^2(c_2 e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 \Psi^1(\tau))}{d\tau^2} \leq c_2 \mu \frac{de^{-\mu(a_s^* - \tau)}}{d\tau} - c_1 \mu \frac{d\Psi^1(\tau)}{d\tau}, \quad (\text{B23})$$

which can be rewritten as

$$\frac{d}{d\tau} \left(\frac{d(c_2 e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 \Psi^1(\tau))}{d\tau}(\tau) \right) \leq \mu \left(\frac{d(c_2 e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 \Psi^1(\tau))}{d\tau}(\tau) \right). \quad (\text{B24})$$

Hence $\frac{d(c_2 e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 \Psi^1(\tau))}{d\tau}(\tau)$, whose initial value (in $\tau = 0$) is negative, is a decreasing

function of τ , so that it can never become non-negative, which also prevents

$c_2 e^{-\mu(a_s^* - \tau)} - c_1 \Psi^1(\tau)$ from again reaching 0, and so prevents any other switch.

The optimal strategy is therefore a pure bang-bang strategy with only one switch: it consists therefore of a latency period followed by an infectious period. The duration of the latency is determined by the time a trajectory takes to reach the switching curve defined in B17.

Appendix C: Solving resource depletion and fitness for $\mu=0$

Considering $\mu = 0$, the denominator of equation B17 greatly simplifies, which, through an integration by parts of the denominator, leads to:

$$R(a_s^*) = \frac{\gamma}{c_1 \varepsilon} e^{\frac{\varepsilon}{\gamma} M(a_s^*)}. \quad (\text{C1})$$

1- Calculus of resource depletion for $\mu = 0$:

We previously defined resource depletion as:

$$R_{dep} = 1 - \frac{R(a)}{R(0)} \Big|_{a \rightarrow \infty}, \quad (\text{C2})$$

Taking into account equation B8 for $a \rightarrow \infty$ leads to:

$$R_{dep} = 1 - \frac{R(a_s^*) e^{\frac{\varepsilon}{\gamma} M(a_s^*)}}{R(0)}. \quad (\text{C3})$$

Combining equations C1 and C3 gives a simple expression for R_{dep} :

$$R_{dep} = 1 - \frac{\gamma}{c_1 \varepsilon R(0)}, \quad (C4)$$

which is valid only if infection succeeds, that is if $R(0) > \frac{\gamma}{c_1 \varepsilon}$.

2- Calculus of fitness Φ for $\mu = 0$:

Considering $\mu = 0$ and since we have shown that the optimal strategy is $u(a) = 0, \forall a \in [0, a_s^*]$:

$$\Phi = \int_{a_s^*}^{+\infty} c_2 \varepsilon R(a) M(a) da. \quad (C5)$$

After replacing $R(a)$ with its expression for $a > a_s^*$ given by equation B8, and $R(a_s^*)$ by the expression in C1, Φ is now given by:

$$\Phi = \int_{a_s^*}^{+\infty} \frac{c_2 \gamma}{c_1 \varepsilon} \varepsilon M(a) e^{\frac{\varepsilon}{\gamma} M(a)} da. \quad (C6)$$

Recalling that, for $a > a_s^*$, $\frac{dM}{da} = -\gamma M$ enables equation C6 to be integrated which leads to:

$$\Phi = -\frac{c_2 \gamma}{c_1 \varepsilon} \left(1 - e^{\frac{\varepsilon}{\gamma} M(a_s^*)} \right). \quad (C7)$$

We now search for a convenient expression of $M(a_s^*)$

Before latency $u(a) = 0$, which simplifies the system describing infection dynamics (equation

B3 and B4) to:

$$\frac{dR}{da} = -\varepsilon R M, \quad (C8)$$

and

$$\frac{dM}{da} = c_1 \varepsilon R M - \gamma M. \quad (C9)$$

Solving this through the use of $\frac{dM}{dR} = -c_1 + \frac{\gamma}{\varepsilon R}$ gives:

$$M(a) = M(0) - c_1(R(a) - R(0)) + \frac{\gamma}{\varepsilon} [\ln(R(a)) - \ln(R(0))]. \quad (C10)$$

For $a = a_s^*$, replacing $R(a_s^*)$ by the expression in C1 and solving for $M(a_s^*)$ gives:

$$M(a_s^*) = \frac{\gamma}{\varepsilon} \ln \left(\frac{\varepsilon}{\gamma} (M(0) + c_1 R(0)) - \ln \left(\frac{c_1 \varepsilon}{\gamma} R(0) \right) \right). \quad (C11)$$

Thus, using C7:

$$\Phi = \frac{c_2}{c_1} M(0) + c_2 R(0) - \frac{c_2 \gamma}{c_1 \varepsilon} \left(1 + \ln \left(\frac{c_1 \varepsilon}{\gamma} R(0) \right) \right), \quad (C12)$$

which can directly be seen to be a decreasing function of γ/ε when $R(0) > \frac{\gamma}{c_1 \varepsilon}$ by computing

its derivative with respect to γ/ε .

3- Optimal solution when $\mu = 0$ and $\gamma = 0$:

We cannot directly infer from the previous results what the optimal solution is when $\gamma = 0$ since most of those developments needed $\gamma > 0$ to be valid. We then should do specific computations for that case.

Since $\gamma = 0$, we can directly see from $c_1 c_2 \frac{dR}{da} + c_2 \frac{dM}{da} + c_1 \frac{dS}{da} = 0$ that, independently of the

choice of $u(a)$, we have

$$\forall a \geq 0, c_1 c_2 R(a) + c_2 M(a) + c_1 S(a) = c_1 c_2 R(0) + c_2 M(0) + c_1 S(0). \quad (C13)$$

Also, from the definition of $S(a)$, and since $\mu = 0$, the total fitness $\Phi = \lim_{a \rightarrow \infty} S(a)$ with

$S(0) = 0$. Notice that, in the absence of pathogen mortality, we also have that,

$\forall a \geq 0, M(a) \geq M(0)$, so that

$$\frac{dR}{da} = -\varepsilon R(a) M(a) \leq -\varepsilon M(0) R(a),$$

which implies that $\lim_{a \rightarrow \infty} R(a) = 0$ for any choice of $u(a)$. Using C13 for $a \rightarrow \infty$ then yields

$$c_2 \lim_{a \rightarrow \infty} M(a) + c_1 \Phi = c_1 c_2 R(0) + c_2 M(0),$$

that shows that $\Phi \leq c_2 R(0)$ because $\lim_{a \rightarrow \infty} M(a) \geq M(0)$.

Finally, we can conclude that the optimal control is constant at the value $u = 1$; such a choice indeed implies that $\lim_{a \rightarrow \infty} M(a) = M(0)$ so that Φ achieves its maximum possible value $c_2 R(0)$

while any other choice implies $\lim_{a \rightarrow \infty} M(a) > M(0)$ and subsequently a smaller value of the total fitness.

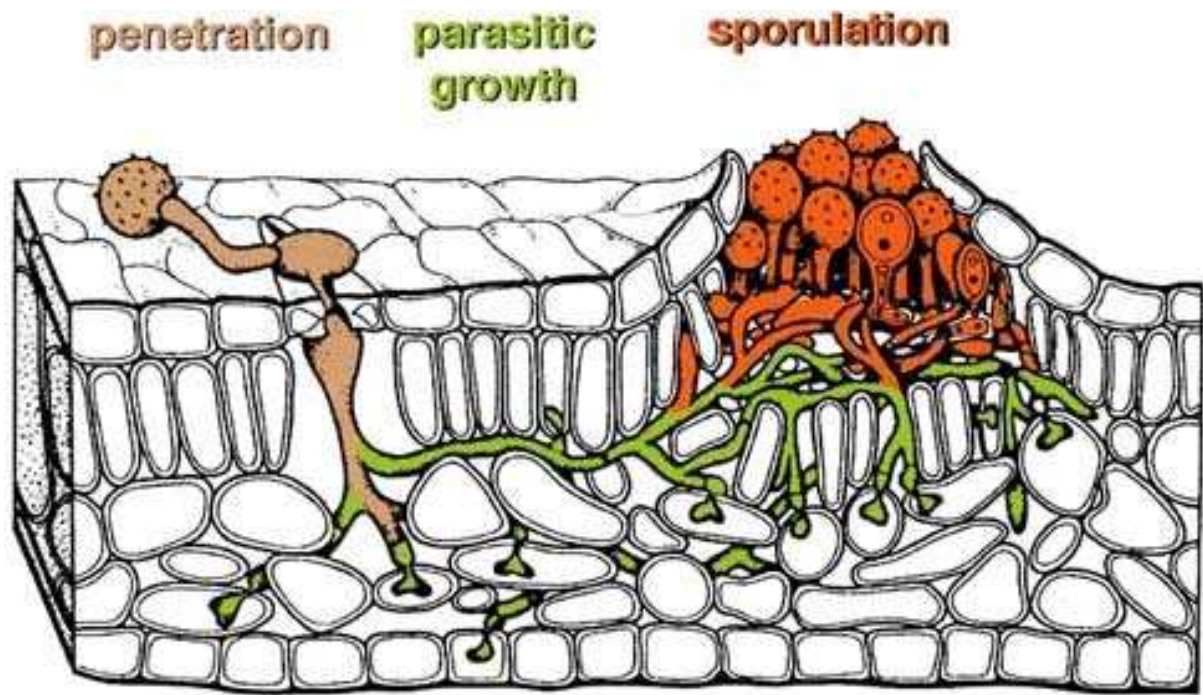
In the absence of infection extinction risk and pathogen within-host mortality, all the resource should be invested directly in sporulation without a latency period.

2.3 Un modèle pour des pathogènes qui peuvent potentiellement utiliser une quantité infinie des ressources de l'hôte

2.3.1 Introduction

Le modèle présenté précédemment s'applique à des pathogènes qui ne peuvent exploiter qu'une quantité finie et donc limitée des ressources de leur hôte, notée R_0 dans le modèle. Cela correspond bien à la biologie de nombreux champignons pathogènes nécrotrophes (Encadré 2) et hémibiotrophes ainsi qu'aux champignons saprophytes (Gilchrist *et al.* 2006).

Certains pathogènes producteurs de spores sont au contraire capables d'exploiter les ressources de leur hôte pendant une longue période sans les épuiser. Les ténias peuvent par exemple exploiter les ressources d'un même hôte pendant plusieurs années sans entraîner de symptômes chez l'hôte. Ces pathogènes ont donc potentiellement accès à une quantité infinie des ressources de l'hôte, dans la mesure où ils détournent une partie des ses ressources en continu mais sans nuire à sa santé au point d'entraîner une forte augmentation de la mortalité. Pour de tels pathogènes, les ressources de l'hôte pouvant être exploitées devraient être



Matthias Hahn,

Figure 6. Cycle infectieux d'un champignon phytopathogène biotrophe (Hahn 2000).

définies au niveau du modèle comme un flux de ressources disponible en continu plutôt que comme une quantité limitée et finie.

Les champignons phytopathogènes biotrophes correspondent tout à fait à ce cas. Ils puisent exclusivement leurs ressources de cellules végétales vivantes. Le mycélium se développe entre les cellules végétales, sans les endommager. Certaines cellules mycéliennes se différencient en une structure spécialisée pour l'exploitation des ressources de l'hôte, les haustoria. Ces excroissances mycéliennes pénètrent les plasmodesmes et viennent au contact de la membrane plasmique des cellules végétales où ils agissent comme des suçoirs en développant une zone active de transfert de nutriments (en particulier les photosynthétats produits par la cellule végétale) sans entraîner la mort des cellules végétales parasitées (Lepoivre 2003). La Figure 6 illustre le cycle infectieux typique d'un champignon phytopathogène biotrophe. Afin de pouvoir étudier le compromis dans l'allocation des ressources entre la croissance intra-hôte et la production de spores et ses conséquences sur les stratégies de vie chez ce type de pathogènes, nous avons voulu développer un modèle sur le même principe que le précédent, mais qui considère les ressources exploitable par le pathogène comme un flux et non plus comme une quantité finie.

2.3.2 Formalisation du problème

Comme dans le modèle précédent, on s'intéresse à la dynamique de croissance intra-hôte M et à la dynamique de la densité de spores S . On suppose de même que pour le précédent modèle, que les formes de multiplication intra-hôte subissent un taux de mortalité cellulaire γ et que l'infection a un risque μ de s'éteindre. La quantité de ressources exploitables par le pathogène n'est pas limitée et la quantité consommée à chaque pas de temps est proportionnelle à la densité des formes de multiplication (M) ainsi qu'à leur efficacité d'absorption (α). Les ressources consommées peuvent être allouées à chaque pas de temps à la croissance, en proportion $1 - u(a)$ et/ou à la production de spores, en proportion $u(a)$ et avec une efficacité de conversion des ressources en spores δ . Partant de ces hypothèses, la dynamique d'infection a été formulée comme suit :

$$\frac{dM}{da} = \alpha(1 - u(a))M - \gamma M$$

$$\frac{dS}{da} = \delta u(a)M.$$

Nous avons cherché à déterminer la stratégie optimale d'allocation des ressources entre la croissance intra-hôte et la production de spores $u(a)^*$, c'est-à-dire celle qui maximise la valeur sélective du pathogène définie par son succès reproducteur Φ , tel que :

$$\Phi = \int_0^{\infty} u(a)\delta M(a)e^{-\mu a} da.$$

La résolution de ce modèle (présentée en Annexe § 5.1.1) conduit à un résultat aberrant. Lorsque le risque d'extinction de la lésion (μ) est supérieur à 1, la stratégie optimale est d'allouer toutes les ressources à la production de spores pendant toute la durée de l'infection. Aucune croissance intra-hôte n'est donc observée, ce qui n'est pas réaliste. Dans le cas contraire où μ est inférieur à 1, la stratégie optimale devrait présenter une latence la plus longue possible (il est toujours avantageux de retarder le début de la sporulation), ce qui ne semble pas réaliste non plus. En fait, il apparaît que la croissance du pathogène augmente plus vite que la probabilité d'extinction et conduit à une dynamique aberrante du nombre de spores. Ces résultats nous conduisent à penser que la formulation mathématique que nous avons choisie n'est pas appropriée pour modéliser les stratégies d'infections de ce type de pathogènes. Il semble nécessaire de modifier la façon dont nous avons modélisé l'accès du pathogène aux ressources de l'hôte.

2.3.3 Retour à la biologie

Nous nous sommes donc repenchés sur la biologie d'un champignon phytopathogène biotrophe tel que *Melampsora larici-populina*. Nous avons pensé que, pour ce type de pathogène, la quantité de ressources exploitables à chaque pas de temps devait être liée au nombre d'haustoria développées par le champignon. Si le champignon développe très peu d'haustoria, il ne sera pas en mesure d'exploiter une grande quantité de ressources. Au contraire, s'il développe un trop grand nombre d'haustoria, on peut penser que l'hôte en serait affecté négativement, ce qui bornerait la quantité de ressources exploitables.

Suivant cette idée, nous avons fait l'hypothèse que le flux de ressources exploitable à chaque pas de temps par le pathogène était une fonction logistique de la densité de ses formes de multiplication (M), bornée par une capacité limite (K) reflétant le nombre maximal

d'haustoria (ou canaux d'énergie) que le champignon (ou tout autre organisme pathogène) peut différencier. Ceci nous a conduits à reformuler le modèle comme suit :

$$\frac{dM}{da} = (1 - u(a))\left[\alpha M\left(1 - \frac{M}{K}\right)\right] - \gamma M$$

$$\frac{dS}{da} = u(a)\left[\delta M\left(1 - \frac{M}{K}\right)\right].$$

Dans ce cas, le succès reproducteur Φ est définie par :

$$\Phi = \int_0^{\infty} u(a)\left[\delta M(a)\left(1 - \frac{M(a)}{K}\right)\right]e^{-\mu a} da.$$

Nous avons à nouveau cherché à déterminer la stratégie optimale d'allocation des ressources entre la croissance intra-hôte et la production de spores $u(a)^*$. Les détails de cette résolution sont présentés en Annexe §5.1.2.

Sous ces hypothèses, la stratégie optimale est toujours d'allouer dans un premier temps la totalité des ressources consommées à la croissance intra-hôte puis dans un second temps, d'allouer une partie des ressources à la croissance intra-hôte de sorte que la densité intra-hôte M se maintienne à un niveau constant et d'allouer le reste à la production de spores.

$$\forall a < a_s, u(a)^* = 0 \text{ et}$$

$$\forall a \geq a_s, u(a)^* = 1 - \frac{\gamma}{\alpha \left(1 - \frac{1}{2}(\alpha - \mu - \gamma)\right)}.$$

Le pathogène passe donc par une phase de latence pendant laquelle il ne fait que croître/se multiplier, puis entame une phase infectieuse pendant laquelle il produit des spores et maintient sa densité intra-hôte (M) constante. L'allocation optimale à la production de spore après la latence, $u(a)^* \forall a \geq a_s$, est une fonction croissante de μ et une fonction décroissante de γ . Plus le risque d'extinction de l'infection est grand, plus le pathogène à intérêt à investir rapidement une importante quantité de ressources vers la production de spores. Par ailleurs, plus le taux de mortalité intra-hôte subit par le pathogène est grand, plus celui-ci à intérêt à investir ses ressources vers sa croissance (ou multiplication intra-hôte), de manière à maintenir une densité intra-hôte suffisamment importante pour pouvoir assurer une bonne

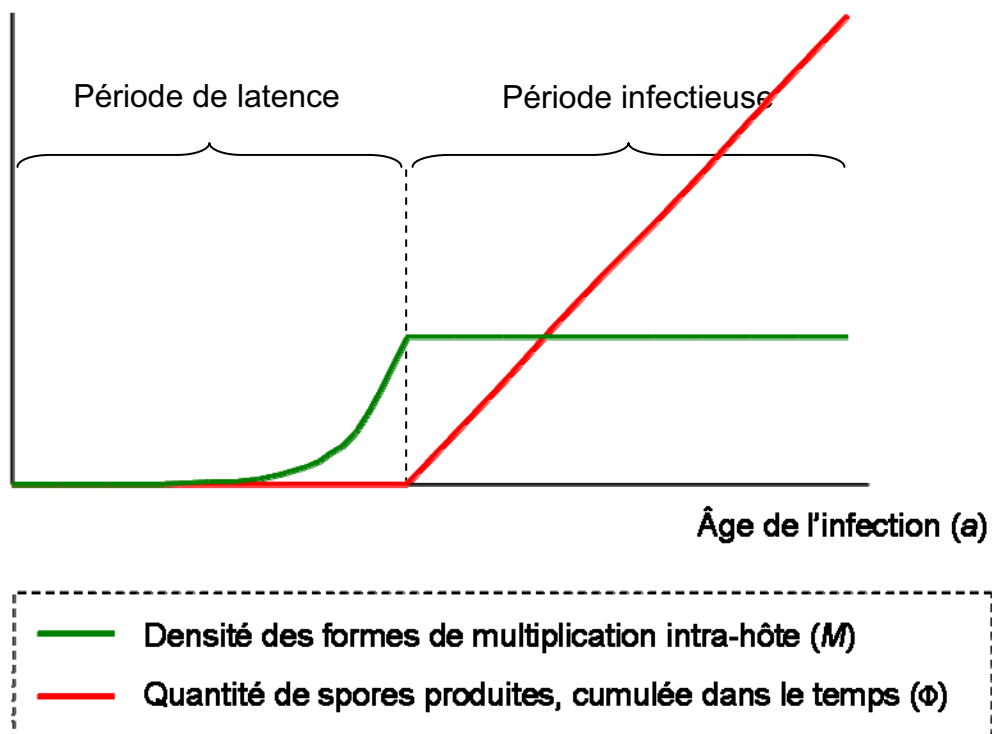


Figure 7. Dynamique typique de la densité des formes de multiplication intra-hôte et de la production des spores dans le cas d'un pathogène pouvant potentiellement exploiter une quantité infinie des ressources de l'hôte et présentant une stratégie optimale d'allocation des ressources. Paramètres : $\alpha=2.5$, $\gamma=0.3$, $K=25\,000$.

production de spores. Il est à noter que $u(a)^*$ admet un maximum pour $\alpha = \frac{1}{2}(2 + \gamma + \mu)$ et n'est pas défini pour $\alpha = 2 + \gamma + \mu$. Nos résultats montrent de plus que, bien que nous ayons introduit une capacité limite de charge des cellules (K), la stratégie optimale d'allocation des ressources $u(a)^*$ ne dépend pas de ce paramètre.

La durée optimale de la période de latence est définie par l'expression suivante :

$$a_s = \frac{Ln \left[\frac{(\alpha M_0 + K(\gamma - \alpha))(\alpha - \gamma - \mu)}{M_0(\alpha^2 + 2\gamma - \alpha(2 + \gamma + \mu))} \right]}{\alpha - \gamma}.$$

Par ailleurs, nous avons montré que la densité maximale des formes de multiplication intra-hôte pendant la phase infectieuse est constante et égale à :

$$M_{\max} = \frac{K}{2}(\alpha - \mu - \gamma).$$

$M_{\max}$ croît avec la capacité limite de charge des cellules (K), l'efficacité d'absorption (α) et décroît avec le taux de mortalité intra-hôte (γ). $M_{\max}$ décroît aussi avec le risque d'extinction de l'infection (μ), car plus celui-ci est fort plus l'investissement vers la production de spores est important.

Nous avons également montré que la quantité de spores produites pendant la phase infectieuse augmente de manière linéaire au cours du temps avec un taux :

$$\frac{dS}{da} = \left(1 - \frac{1}{2}(\alpha - \mu - \gamma) - \frac{\gamma}{\alpha} \right) \left(\delta \frac{K}{2}(\alpha - \mu - \gamma) \right).$$

Ce taux de production des spores varie de manière non monotone avec tous les paramètres du modèle.

La Figure 7 présente un exemple typique de la dynamique de la densité des formes de multiplication et de la dynamique de production des spores d'un pathogène adoptant une stratégie optimale d'allocation des ressources.

2.4 Conclusion

Nos études théoriques ont montré que, lorsqu'il existe un compromis dans l'allocation des ressources entre la multiplication intra-hôte et la production de spores, la sélection naturelle

favorise, non pas une stratégie où l'allocation des ressources entre ces fonctions est constante (comme souvent supposé dans les modèles), mais au contraire une allocation variable au cours du développement de l'infection.

A l'optimum, la stratégie d'allocation précise adoptée par le pathogène est fonction de la disponibilité des ressources. Elle est de type « bang-bang » lorsque le pathogène dispose d'un pool de ressources fini dont la taille est fixée au début de l'infection. Dans ce cas, la stratégie d'infection se caractérise par une phase de latence entièrement dédiée à la croissance intra-hôte suivie d'une période infectieuse, où toute l'énergie est allouée à la production de spores et où les structures de multiplication intra-hôte ne sont plus maintenues et décroissent. Au contraire, la stratégie d'allocation optimale est de type « bang-mixte » lorsque, les ressources de l'hôte exploitables par le pathogène peuvent être assimilées à un flux intarissable et ne sont limitées que par le nombre maximum de canaux d'énergie (ou haustoria chez les champignons biotrophes) que le pathogène peut développer. Dans ce cas, la stratégie d'infection se caractérise par une phase de latence entièrement dédiée à la croissance intra-hôte suivie d'une période infectieuse, où une partie de l'énergie est allouée à la production de spores et l'autre partie, au maintien des structures de multiplication intra-hôte, dont la densité reste constante.

On peut toutefois se demander si ces différences dans la stratégie d'allocation des ressources sont effectivement dues aux différences de disponibilité des ressources et donc aux différences de cycles de vie des pathogènes car, pour des raisons mathématiques nous avons dû considérer une limitation dans la capacité d'absorption du pathogène dans le « modèle 2 », limitation qui n'existe pas en tant que telle dans le « modèle 1 » (*cf.* §2.2). Il serait ainsi intéressant d'introduire dans le « modèle 1 » l'hypothèse que chaque cellule intra-hôte est limitée dans sa capacité d'absorption des ressources et de voir si les prédictions du modèle en sont affectées. Ceci ouvre de nombreuses perspectives pour continuer à explorer les déterminants de la stratégie d'infection chez ces pathogènes. Par exemple, ici nous avons considéré que la capacité d'absorption de la structure de multiplication intra-hôte est proportionnelle à sa masse. Or ces structures peuvent avoir des formes extrêmement variées selon les pathogènes (éclatées en cellules, filamenteuses, sphériques). Cette diversité de formes, se traduit concrètement par différents ratios masse/surface en contact avec l'hôte et donc différentes relations entre la masse intra-hôte et la capacité d'absorption. Il serait ainsi intéressant de voir si on peut prédire différentes stratégies d'allocation des ressources pour des pathogènes de formes différentes.

Par ailleurs, une des limitations des modèles présentés dans ce chapitre est qu'ils reposent sur une méthode d'optimisation. L'optimisation occupe une place controversée parmi les méthodes utilisées pour étudier l'évolution phénotypique, principalement car l'idée que l'évolution puisse optimiser les phénotypes n'est pas largement acceptée (Gould et Lewontin 1979). En effet, la sélection naturelle n'optimise pas toujours la valeur sélective définie comme le succès reproducteur de l'individu (telle qu'elle est définie dans cette étude), notamment lorsque les pressions de sélection sont relatives à la composition de la population (fréquence-dépendance). On peut d'ailleurs s'attendre à ce que ce soit le cas pour la latence. En effet, au cours d'une épidémie végétale, où les surfaces lésées ne peuvent guérir, les pathogènes sont en compétition pour l'accès aux surfaces foliaires saines (compétition par préemption). Dans ce contexte, les génotypes les plus rapides à sporuler peuvent être avantagés sur ceux qui ont une plus grande latence. Néanmoins, il n'existe pas vraiment d'alternative à l'optimisation pour traiter des problèmes aussi complexes que l'allocation temporelle des ressources. Les approches d'optimisation demeurent ainsi très informatives, à condition que l'on garde bien à l'esprit les hypothèses fortes sur lesquelles sont basées ces méthodes (Maynard Smith 1978, Bull 1994, Barton 2007, Metz *et al.* 2008).

Un résultat phare de nos études théoriques est que la stratégie d'infection des pathogènes producteurs de spores présente une phase de latence pendant laquelle le pathogène se développe à l'intérieur de l'hôte sans qu'aucune spore ne soit produite suivie d'une période infectieuse au cours de laquelle les spores sont produites et la densité des formes de multiplication intra-hôte décroît ou reste constante (respectivement dans le cas de pathogènes capables d'exploiter une quantité finie ou infinie des ressources de l'hôte). Nous avons souhaité confronter ces résultats à la réalité biologique en étudiant ces patrons chez des pathogènes d'intérêt agronomique.

3. Confrontation des modèles mathématiques à la réalité biologique

3.1 Objectifs et démarche empirique.....	76
3.2 Etude expérimentale de la stratégie d'allocation des ressources entre la croissance et la sporulation chez un pathogène capable d'exploiter une quantité finie des ressources de l'hôte.....	77
3.2.1 Principe général.....	77
3.2.2 Matériel et méthodes.....	79
3.2.2.1 Modèle biologique.....	79
3.2.2.2 Culture et inoculation.....	81
3.2.2.3 Cinétique de croissance du mycélium.....	82
3.2.2.4 Durée de la période de latence.....	85
3.2.2.5 Mesure de la taille des lésions.....	85
3.2.2.6 Analyses statistiques.....	85
3.2.3 Résultats.....	87
3.2.3.1 Cinétique d'apparition des lésions.....	87
3.2.3.2 Durée de la période de latence.....	87
3.2.3.3 Cinétique de croissance des lésions.....	87
3.2.3.4 Cinétique de croissance du mycélium.....	88
3.2.3.5 Corrélation entre la taille des lésions et le niveau de développement du champignon <i>in planta</i>	89
3.2.4 Discussion.....	90
3.2.4.1 La stratégie d'allocation des ressources entre la croissance mycélienne et la sporulation est-elle « bang-bang » ?	90
3.2.4.2 La taille des lésions est-elle corrélée linéairement avec le niveau de développement du champignon dans la plante ?	91
3.2.4.3 Variation des observations selon le couple considéré.....	91
3.2.4.4 De la variabilité dans cette expérience.....	93

3. Confrontation des modèles mathématiques à la réalité biologique

3.1 Objectifs et démarche empirique

Les modèles que nous avons étudiés au chapitre 1 prédisent que la stratégie optimale d'allocation des ressources devrait être « bang-bang » (la totalité des ressources est tout d'abord allouée à la croissance, puis dans un second temps à la sporulation) ou « bang-mixte » (les ressources sont tout d'abord allouées à la croissance, puis sont allouées pour partie à la croissance et pour partie à la sporulation) selon si la quantité de ressources exploitable par le pathogène est finie ou infinie. Nous n'avons pas connaissance de travaux empiriques portant sur les stratégies d'allocation de ressources chez les pathogènes à spores. Nous avons donc voulu tester ces prédictions en développant un protocole expérimental adapté aux champignons phytopathogènes, qui sont étudiés au sein de mes deux équipes d'accueil et qui présentent de nombreux avantages pour la manipulation en laboratoire : d'une part *Magnaporthe oryzae*, l'agent de la pyriculariose du riz, dont la biologie correspond aux hypothèses du « modèle 1 » (cf. § 2.2) et d'autre part, *Melampsora larici-populina*, l'agent de la rouille du peuplier, dont la biologie correspond aux hypothèses du « modèle 2 » (cf. § 2.3).

Une deuxième prédiction majeure issue de notre étude théorique (modèles 1 et 2) est que la période de latence varie en fonction des conditions écologiques auxquelles sont confrontés les pathogènes à spores. La période de latence est un trait d'histoire de vie important à considérer en épidémiologie des maladies infectieuses. Il conditionne la rapidité avec laquelle les hôtes sains peuvent être contaminés et donc la vitesse de propagation de l'épidémie. La latence est un trait d'histoire de vie qui a été très largement étudié empiriquement chez les champignons phytopathogènes (voir Pariaud *et al.* 2009 pour une revue). Il a été montré chez plusieurs espèces qu'elle est variable au sein des populations et présente une héritabilité positive chez *Puccinia triticina* (Lehmann et Shanner 1997). Nous avons donc voulu confronter cette prédiction à la réalité biologique. Pour cela, nous avons utilisé une approche comparative pour étudier les déterminants de la latence chez les champignons phytopathogènes.

Notre approche empirique est ainsi constituée de deux expériences en conditions contrôlées et d'une analyse comparative. Deux de ces projets sont encore en cours de

réalisation. J'ai donc choisi de ne présenter en détail dans ce chapitre que le projet le plus abouti, qui est l'expérience visant à tester si *M. oryzae* présente une stratégie d'allocation des ressources de type « bang-bang ». Les deux autres volets empiriques développés au cours de ce travail de thèse seront présentés en annexe sous forme de deux rapports de stage. Certains résultats préliminaires issus de ces travaux seront discutés en relation avec nos résultats théoriques en conclusion générale de ce manuscrit.

Dans ce chapitre, je présenterai tout d'abord le pathosystème *Oryza sativa* – *M. oryzae* ainsi que le protocole expérimental que nous avons mis en place. Les principaux résultats obtenus seront ensuite présentés puis discutés.

3.2 Etude expérimentale de la stratégie d'allocation des ressources entre la croissance et la sporulation chez un pathogène capable d'exploiter une quantité finie des ressources de l'hôte

3.2.1 Principe général

Le premier modèle étudié au chapitre 1, qui concerne des pathogènes ayant accès à une quantité finie des ressources de l'hôte déterminée au début de l'infection (R_0), fournit des prédictions claires sur la dynamique de la densité des formes de multiplications intra-hôte (M) associée à une stratégie d'allocation des ressources « bang-bang ». La densité des formes de multiplications intra-hôte d'un champignon phytopathogène correspond au niveau de développement du champignon dans la plante hôte, que l'on peut mesurer par sa masse mycélienne. La stratégie d'allocation des ressources d'un champignon phytopathogène entre croissance mycélienne et sporulation peut donc être étudiée par la mesure de l'évolution temporelle de sa masse mycélienne. Suivant les prédictions du modèle, si le pathogène adopte une stratégie d'allocation des ressources « bang-bang », on s'attend à observer une croissance mycélienne rapide (plus qu'exponentielle) pendant la phase de latence. Puis lorsque le pathogène change subitement de comportement pour allouer la totalité des ressources consommées à la sporulation, on s'attend à observer une décroissance exponentielle de la masse mycélienne sous l'effet de facteurs de mortalité (modélisés par le paramètre γ dans le modèle) (*cf.* Figure 1c de l'article, § 2.2).

Le pathosystème *M. oryzae* – *O. sativa* a été choisi pour réaliser cette expérience car la biologie *M. oryzae* et en particulier le fait que son accès aux ressources de l'hôte soit la plupart du temps limité (*comm. pers.* Tharreau), correspond bien aux hypothèses de notre modèle mathématique. De plus, nous disposons au laboratoire de solides connaissances théoriques et techniques sur ce pathosystème d'intérêt agronomique. Enfin nous avons accès à une riche collection d'isolats et de variétés dont les principales caractéristiques biologiques sont connues.

Pour étudier l'évolution temporelle de la masse mycélienne de *M. oryzae*, l'idéal serait de pouvoir la suivre au sein d'une même lésion isolée. Malheureusement, la seule méthode à notre disposition pour estimer une masse mycélienne *in planta* est la PCR quantitative, qui est destructrice pour l'échantillon et rend impossible le suivi temporel sur une seule et même lésion. Nous avons tenté de pallier à ce problème en réalisant un suivi temporel de la masse mycélienne sur une population de lésions étant apparues à la même date sur les plants de riz et étant issues de l'infection par des spores clonales *M. oryzae*.

En phytopathologie, le niveau de développement du champignon dans la plante est couramment estimé par l'intermédiaire de mesures de la taille des lésions, la relation entre la taille de la lésion et celle du champignon étant supposée linéaire (Pariaud *et al.* 2009). La validité de cet estimateur n'a cependant pas été démontrée et il semble facile de la mettre en question car la lésion est définie comme le produit d'interactions complexes entre le champignon et la plante. Par exemple, à masse égale un champignon produisant plus de toxines provoquera des lésions plus grandes qu'un champignon produisant moins de toxines. De même, un champignon se développant plus en profondeur dans la feuille induira des lésions plus discrètes qu'un champignon concentré en surface. Enfin si la masse mycélienne croît puis décroît, comme attendu, on ne s'attend pas à observer une décroissance simultanée des surfaces lésées dans la mesure où les tissus végétaux ne « guérissent » pas. Afin d'évaluer la qualité de la taille de lésion, comme estimateur de la masse mycélienne chez *M. oryzae*, nous avons également étudié la dynamique de croissance de lésions et mesuré la surface de toutes les lésions qui ont été prélevées avant de quantifier la masse mycélienne sous-jacente par PCR quantitative.



Figure 8. Symptômes de la pyriculariose du riz au champ. Photos : D.Tharreau.

a) Flétrissement des thalles. b) Symptômes sur panicule. c) Lésions sur feuille et symptômes

3.2.2 Matériel et méthodes

3.2.2.1 Modèle biologique

La pyriculariose du riz

Magnaporthe oryzae est l'agent pathogène responsable de la pyriculariose (« rice blast»), la principale maladie fongique du riz. La pyriculariose est une maladie foliaire dont les principaux symptômes sont l'apparition de lésions à la surface des feuilles. Les lésions diminuent la capacité photosynthétique des feuilles infectées, ce qui a pour conséquence une diminution de la taille des plants, de leur multiplication par tallage et finalement du rendement (Bastiaans 1991). La tige portant la panicule peut également être attaquée, on observe alors une panicule blanche dont les grains sont vides. Cette forme de la maladie est la plus dommageable en termes de rendement et de qualité de la récolte (Katsube et Koshimizu 1970). La Figure 8 illustre les différents symptômes de la pyriculariose du riz au champ.

La pyriculariose du riz est présente dans toutes les zones où *Oryza sativa* est cultivée (Ou 1985). Les conditions environnementales optimales pour le développement de *M. oryzae* se situent cependant, dans des gammes de températures comprises entre 23 et 26°C et d'hygrométrie très élevée. La pyriculariose se révèle donc la plus destructrice dans les régions tropicales. La pyriculariose du riz est responsable de pertes annuelles de plusieurs de millions de tonnes à travers le monde (Valent 2004). Le riz constituant actuellement l'aliment de base de plus de la moitié de la population mondiale (Khush 2005), son enjeu alimentaire et économique est considérable (Zeigler *et al.* 1994).

Oryza sativa

Le genre *Oryza* appartient au clade des Monocotylédones et à la famille des Poacées. Il comprend 24 espèces dont deux seulement sont cultivées (*O. sativa* et *O. glaberrima*). *Oryza sativa* se divise en deux sous-espèces, *indica* et *japonica* (Kato *et al.* 1928), et plus de 100 000 cultivars.

O. sativa est l'espèce la plus cultivée dans le monde. Les cultures de riz couvrent environ 150 millions d'hectares, soit plus du dixième de l'ensemble des surfaces cultivées. Le riz, cultivé entre 40° de latitude sud et 53° de latitude nord, se développe dans un très large éventail de milieux en termes de topographie, type de sol, régime hydrique et facteurs climatiques. L'essentiel des surfaces cultivées se situe dans les zones humides tropicales et

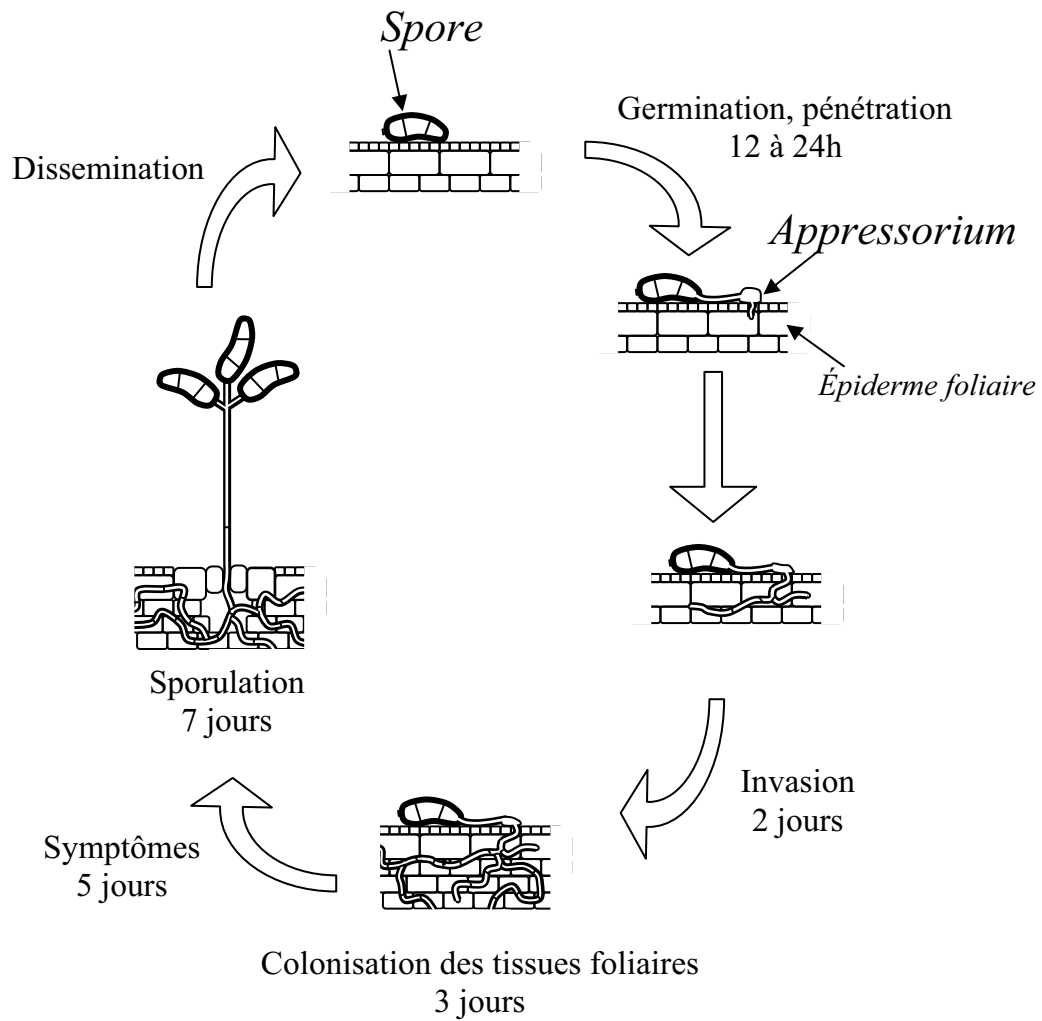


Figure 9. Cycle biologique asexué de *Magnaporthe oryzae*.

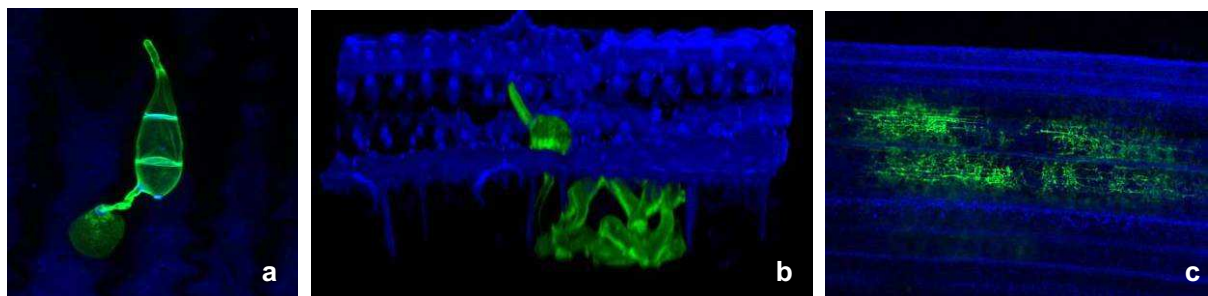


Figure 10. Illustration en microscopie électronique de trois stades de développement de *Magnaporthe oryzae*. Photos : A. Delteil.

a) Conidie ayant germée et différencié un appressorium. b) Pénétration des hyphes mycéliens dans une première cellule végétale. c) Hyphes mycéliens sous-jacents à une lésion (échelle de la feuille).

subtropicales soumises au régime des moussons, mais il est aussi cultivé en zone tempérée et à des altitudes dépassant 2000 m. Les conditions de culture du riz sont généralement classées en fonction du régime hydrique. Lorsqu'il y a immersion, la riziculture est dite irriguée s'il y a contrôle de l'eau et inondée dans le cas contraire. En absence d'immersion pendant la culture, la riziculture est dite pluviale. Des variétés d'*O. sativa* issues de ces différentes techniques de riziculture ont été sélectionnées pour réaliser cette expérience.

Magnaporthe oryzae

M. oryzae est un champignon phytopathogène filamenteux haploïde de la classe des ascomycètes et de la famille des *Magnaporthaceae*. Son hôte principal est le riz mais il est capable d'infecter d'autres céréales comme l'orge, le blé ou le millet (Nukina 1998).

Le cycle infectieux de *M. oryzae* (Figure 8) débute lorsqu'une conidie, spore asexuée issue de la sporulation du mycélium, se dépose à la surface d'une feuille. La conidie adhère à la surface hydrophobe de la feuille grâce à un mucilage riche en glycoprotéines libéré à son apex (Hamer *et al.* 1988, Howard et Valent 1996). Dans des conditions environnementales favorables, la conidie produit un tube germinatif qui va rapidement se différencier en une cellule spécialisée dans la pénétration : l'appressorium (Wang *et al.* 2005). L'accumulation d'une forte pression de turgescence au niveau de la zone de contact entre l'appressorium et la feuille, pouvant atteindre 8 mPa (Howard et Ferrari 1989, Howard *et al.* 1991), entraîne le déchirement de la paroi végétale, qui va permettre la pénétration de l'hyphe primaire. Le champignon colonise ensuite rapidement (3-4 jours) les tissus végétaux dans une phase de biotrophie en différenciant des hyphes secondaires globuleux qui semblent passer d'une cellule à l'autre par les plasmodesmes (Kankanala *et al.* 2007). La phase de nécrotrophie débute vers le cinquième jour, concomitante avec l'apparition des premiers symptômes foliaires. Des taches blanchâtres apparaissent et évoluent pour prendre l'aspect de losanges dont le centre est grisâtre et les bords bruns. Les lésions deviennent ensuite sporulantes : des conidiophores émergent à la surface des lésions. Ce sont des hyphes mycéliens spécialisés, qui vont produire les conidies. Les conidies, produites en grande quantité au niveau des lésions (2000 à 5000/lésion /jour), sont dispersées par le vent ou la pluie (Talbot 1995, Tenjo et Hamer 2002). Elles peuvent rapidement infecter d'autres plants et sont à l'origine de la propagation des épidémies. Les lésions peuvent produire des conidies pendant une quinzaine de jours mais le pic de production est atteint 7 à 10 jours après le début de l'infection en

Couples souche/varété	Climat	Système de culture du riz
FR159/Ariete	Tempéré	Irrigué
SP168/Bomba	Tempéré	Irrigué
CD117/Irat 216	Tropical	Pluvial
MD994/Fofifa 154	Tropical	Pluvial
CD101/IR8	Tropical	Irrigué
ID160/IR8	Tropical	Irrigué

Tableau 1. Présentation des six couples souche / variété utilisés pour cette étude.

Les résultats présentés portent uniquement sur les couples souche/varété présentés en gras dans le tableau.

conditions contrôlées (Kato 1974). Un cycle infectieux foliaire peut ainsi être réalisé en moins de 7 jours dans les conditions les plus favorables.

Les conidies possèdent certaines adaptations qui leur permettent de subsister pendant la « mauvaise » saison (saison froide ou saison sèche selon la zone géographique). Elles peuvent ainsi demeurer sur les stocks de semence ou les débris végétaux au sol et permettre le démarrage d'une nouvelle épidémie à la « bonne » saison.

Les souches de *M. oryzae* qui ont été sélectionnées pour réaliser cette expérience sont présentées ci-dessous.

Choix des souches de champignon et des variétés de riz

Nous avons choisi six couples de souches de *M. oryzae* et de variétés d'*O. sativa* supposés co-évolués, de manière à maximiser la probabilité que le pathogène soit à l'optimum évolutif sur la variété sur laquelle on souhaite l'inoculer, ceci afin de respecter l'hypothèse d'optimalité du « modèle 1 » (cf. § 2.2). Pour cela, nous avons choisi des variétés de riz qui étaient cultivées depuis longtemps sur une même zone géographique, sans rotation de variété. Nous avons choisi la souche pathogène la plus communément observée sur chaque variété, et ayant de plus été collectée sur cette variété.

Par ailleurs, nous avons cherché à balayer une grande diversité de stratégies d'infection en choisissant des souches pathogènes de variétés cultivées en zone tropicale, en système pluvial et irrigué et de variétés cultivées en zone tempérée, en système irrigué (la culture du riz en système pluvial ne se pratique pas en zone tempérée) (Tableau 1).

Il est à noter que pendant l'expérience, deux souches de champignon et une variété de riz appartenant à trois couples différents ne se sont pas ou pas suffisamment développées. Les résultats présentés porteront donc uniquement sur trois couples souche/variété suivants : FR159/Ariete, SP168/Bomba, CD117/Irat 216.

3.2.2.2 Culture et Inoculation

Pour chaque variété, il a été semé environ 160 graines, réparties sur 4 lignes dans un bac de culture (50 x 30 x 7 cm). Les semis sont réalisés sur un mélange de terreau et de pouzzolane (7 / 1 en volume). Les bacs ont été conservés en serre jusqu'au jour de l'inoculation (Figure 11). La température diurne y est d'environ 28°C, la température



Figure 11. Serre destinée à la culture des plants de riz sains.



Figure 12. Phytotron destiné à la culture des souches de champignons.

nocturne d'environ 21°C et l'hygrométrie est d'environ 65%. Un éclairage artificiel de 400W/m² est déclenché lorsque la luminosité extérieure est trop faible. Il est actif au maximum 12h par jour. Une fertilisation est effectuée 10 à 15 jours après semis puis tous les 7 à 10 jours (Annexe § 5.2.1).

Pour chaque souche de champignon, des conidies (spores asexuées) issues de stocks conservés au congélateur -20°C, ont été mises en culture sur des boîtes de pétri contenant un milieu nutritif gélosé à base de farine de riz. Les boîtes ont été conservées dans des chambres de culture en conditions contrôlées à 25°C ± 2°C avec une photopériode de 12 heures de jour et 12 heures de nuit, jusqu'à sporulation des mycéliums (Figure 12). Après ajout de 5 mL d'eau stérile dans la boîte de Petri, le mycélium est raclé à l'aide d'un étaloir pour mettre les spores en suspension. La solution obtenue est filtrée *via* une membrane afin de séparer le mycélium des spores. La concentration en spores de cette solution a été estimée par comptage sur cellule de Malassez. Les solutions mères de chaque souche de champignon ont été diluées afin d'obtenir des solutions filles de même concentration de 25000 spores/mL (Annexe § 5.2.2).

Les plants de riz sont inoculés 5 semaines après le semis, soit au stade 4-5 feuilles. Chaque bac a été inoculé avec 20mL de solution fille gélosée à 0.5 % pour faciliter l'adhésion des spores à la surface des feuilles de riz. Pour cela, le bac est placé dans l'enceinte d'inoculation sur un plateau tournant et est inoculé uniformément à l'aide d'un pistolet à air comprimé (Annexe §5.2.3).

Après inoculation, les bacs sont conservés dans une enceinte climatique obscure, équipée d'un système de brumisation, à une température de 25°C pendant 12h. Ils sont ensuite transférés dans une chambre de culture en conditions contrôlées : 12h de jour à 28°C ± 2°C et 12h de nuit à 21°C ± 2°C.

3.2.2.3 Cinétique de croissance du mycélium

Identification des lésions à prélever

Afin d'identifier une population de lésions apparues au même jour post-inoculation, de taille suffisante pour pouvoir réaliser des prélèvements pendant toute la durée de l'infection, nous avons étudié la cinétique d'apparition des lésions sur les feuilles de riz. Le nombre de nouvelles lésions apparues sur les feuilles n°3 et 4 a été suivi toutes les 12h du 3^{ème} jour post-inoculation au 5^{ème} jour post-inoculation, puis toutes les 24h jusqu'au 10^{ème} jour post-

inoculation (sauf la variété Irat, jusqu'au 9^{ème} jour). Cette opération a été réalisée sur environ 120 plantes de chacun des 3 couples souche-variété étudiés. A chaque étape d'observation, les lésions nouvellement apparues ont été marquées avec des feutres indélébiles de couleurs différentes dans le but de pouvoir identifier leur date d'apparition (Figure 13). Elles ont ensuite été dénombrées feuille par feuille.



Figure 13. Marquage des nouvelles lésions apparues sur les feuilles au marqueur.

Prélèvement des lésions

Les prélèvements des lésions de chaque souche étudiée ont été réalisés quotidiennement à partir du jour de détermination d'une cohorte de taille suffisante (soit le 6^{ème} jour post-inoculation) et jusqu'à épuisement des lésions de la cohorte choisie ou de la mort des plantes (soit pendant 5 jours pour les variétés Ariete et Bomba et pendant 7 jours pour la variété Irat). Il a été prélevé un total de 14 lésions par jour pour les variétés Ariete et Bomba et de 10 lésions par jour pour la variété Irat. Pour chaque prélèvement, la feuille entière a été coupée puis 3 lésions au maximum ont été prélevées sur une même feuille. Une attention particulière a été portée à choisir des lésions isolées d'autres lésions présentes sur la même feuille et à découper une large zone de feuille saine autour de la lésion, de manière maximiser les chances de prélever l'intégralité du mycélium et à limiter au maximum les possibilités de compétition pour les ressources avec d'autres mycéliums (Annexe § 5.2.4).

Traitement des lésions avant extraction

Les lésions prélevées ont été déposées dans des tubes Eppendorf 1.5mL et stockées dans des grandes boîtes en plastiques hermétiques contenant du SilicaGel pour dessiccation.

Chaque lésion a été vortexé dans un tube à essai contenant une solution de Tween 80 diluée à 0.01 % puis déposée sur une gaze fixée à un entonnoir avant d'être rincé énergiquement à l'eau stérile à l'aide d'une pissette. L'objectif de ce traitement est de décaper les conidiophores et les spores éventuellement présentes à la surface des lésions de manière à ce que l'ADN fongique, qui sera par la suite extrait des échantillons, provienne uniquement des cellules mycéliennes du champignon. Une fois décapés de leurs spores, les échantillons ont été stockés à -80°C.

Extraction d'ADN

Les échantillons ont tout d'abord été plongés dans un bain d'azote liquide puis broyés dans un broyeur à bille RETSCH, jusqu'à pulvérisation complète. La poudre ainsi obtenue a été traitée suivant un protocole d'extraction dérivé de celui de Hoisington (1992) (Annexe § 5.2.5).

Quantification de la masse mycélienne

La masse mycélienne sous-jacente à chaque lésion prélevée a été estimée via un dosage de l'ADN du champignon *in planta*, par PCR-quantitative. Le gène utilisé pour le dosage est le rétrotransposon Maggy (pour « *Magnaporthe* gypsy-like element ») présent en un grand nombre de copies au sein du génome de *M. oryzae* (Farman *et al.* 1996). Ce gène a préalablement été étudié au sein de notre laboratoire et a été jugé approprié pour doser la quantité de *M. oryzae in planta* (Vergne 2007). Des mises au point importantes ont cependant dû être réalisées pour adapter le protocole existant à l'utilisation de faibles quantités de matériel biologique. En effet, la quantité de matériel biologique utilisé en routine est d'environ trois feuilles de riz contaminées par *M. oryzae*, alors que nous avons utilisé une seule lésion, l'équivalent d'une surface d'environ 0.5mm². Il est à noter que ce dosage de l'ADN du champignon *in planta* n'est pas spécifique du mycélium. L'ADN des structures reproductrices est dosé simultanément à l'ADN du mycélium. C'est pour cette raison que nous avons pris la précaution de décaper les conidiophores et les spores des lésions

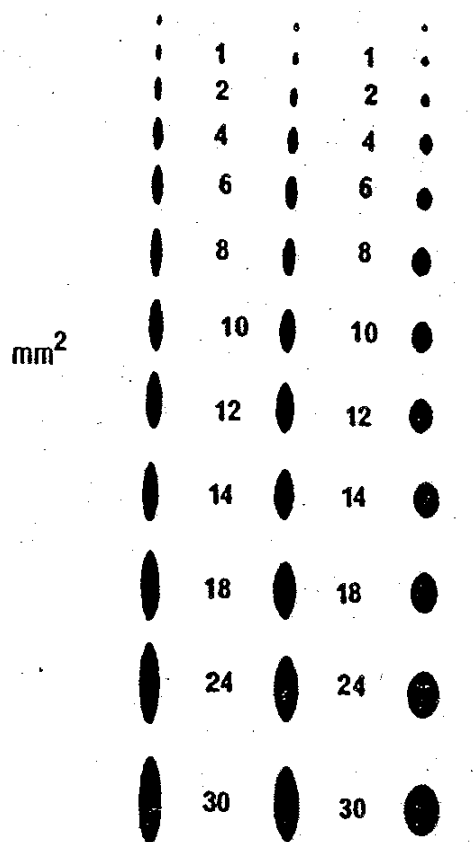


Figure 14. Empreintes de lésions de formes différentes et de surface connue, imprimées sur papier calque, utilisées pour estimer la surface des lésions.

préalablement à l'extraction et que nous avons choisi un protocole d'extraction se révélant peu efficace pour extraire l'ADN contenue dans les spores.

La quantification du gène Maggy a été réalisée par la technique Taqman[®], à l'aide du kit Eurogentec qPCR MasterMix Plus Low ROX et d'un thermocycleur Stratagène Mx3005P (Annexe § 5.2.6). La séquence des amorces sens et anti-sens utilisées est disponible en Annexe § 5.2.6. La gamme étalon a été réalisée à partir d'un mélange d'ADN génomique de plante et de champignon et a servi à calibrer les résultats obtenus dans différentes plaques. Il a été réalisé au minimum deux répliques techniques et deux répliques temporels pour chaque échantillon. Le logiciel utilisé pour analyser les données de Q-PCR est le logiciel MxPro Mx3005P.

3.2.2.4 Durée de la période de latence

Nous avons déterminé le temps de latence en réalisant des observations quotidiennes des lésions à l'aide d'une loupe binoculaire à partir du 7^{ème} jour post-inoculation, le lendemain de l'apparition de nos cohortes d'intérêt. Pour chaque variété, nous avons considéré que le champignon était sorti de sa période de latence à partir du moment où les conidiophores étaient formés.

3.2.2.5 Mesure de la taille des lésions

La surface des lésions a été mesurée à l'aide de calques présentant des empreintes de lésions de différentes formes et de surface connue (Figure 14). La surface de chaque lésion prélevée pour quantification de la masse mycélienne a été mesurée dans le but de tester si la taille des lésions est un bon estimateur du niveau de développement du champignon *in planta*. La surface de chaque lésion prélevée pour quantifier la sporulation a également été mesurée, dans le but de déterminer la quantité de spores produites par unité de surface de lésion. La surface des autres lésions appartenant à notre cohorte d'intérêt, présentes sur les feuilles de riz découpées pour les prélèvements de lésions a également été mesurée. Ceci nous a permis d'étudier dynamique de croissance de lésions au cours de l'infection sur un échantillon de taille plus importante.

3.2.2.6 Analyses statistiques

Toutes les analyses sont réalisées sous le logiciel R (R Development Core Team, 2008).

Cinétique de croissance des lésions

Les données de surfaces lésées ont été utilisées pour ajuster un modèle de cinétique de croissance. Les modèles linéaire, logistique et polynomial ont été comparés pour chaque variété.

Cinétique de croissance du mycélium

Montrer que le champignon suit une stratégie d'allocation des ressources « bang-bang » revient à observer une période de latence au cours de laquelle le mycélium croît et aucune spore n'est produite, puis une période infectieuse où des spores sont produites et le mycélium décroît exponentiellement jusqu'à la fin de l'infection (*cf.* Figure 1c de l'article, § 2.2). Nous disposons d'un faible nombre de données relatives à la quantification l'ADN mycélien pendant la période de latence car la sporulation a débuté rapidement après l'identification de nos cohortes d'intérêt (un jour pour les variétés Ariete et Bomba, deux jours pour la variété Irat). Il n'a donc pas été possible de réaliser une régression sur les données d'évolution temporelle de la masse mycélienne pendant la période de latence. Nous avons donc cherché à ajuster un modèle exponentiel aux données de taille de mycélium après latence. Parce que la distribution des résidus d'un tel modèle s'est révélée très différente d'une loi normale pour les 3 couples souche-variété (*p*-value du test de Shapiro : $3.78 \cdot 10^{-5}$ pour Ariete, $8.8 \cdot 10^{-10}$ pour Bomba et $2.43 \cdot 10^{-5}$ pour Irat), nous avons transformé les données. Aucune transformation n'a permis de normaliser les résidus des modèles testés. Nous nous sommes donc arrêtés sur une transformation logarithmique. Tester la décroissance exponentielle de la masse mycélienne après latence a donc consisté à réaliser une régression linéaire du temps sur le logarithme de la masse mycélienne.

Corrélation entre la taille des lésions et le niveau de développement du champignon in planta

La relation entre la taille des lésions et le niveau de développement du champignon *in planta* est couramment présumée linéaire. Nous avons donc comparé l'ajustement de modèles linéaire, polynomial et logistique sur les données de tailles de lésions et de masse mycélienne.

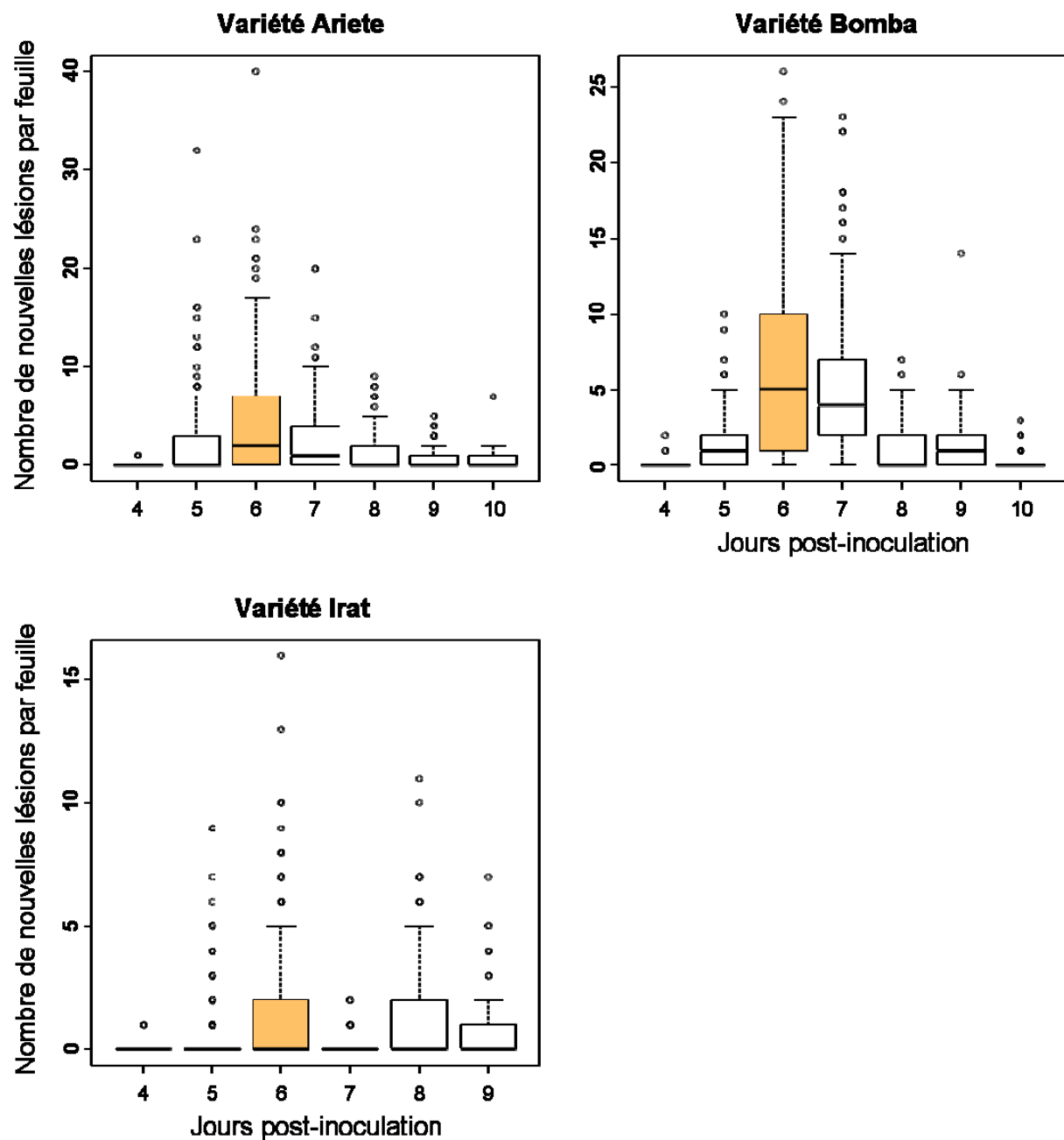


Figure 15. Cinétique d'apparition des lésions sur les variétés Ariete, Bomba et Irat.

Les boxplot présentent les 3 quartiles de la distribution du nombre de nouvelles lésions par feuille en fonction du nombre de jours post-inoculation, les valeurs minimales et maximales des distributions ainsi que les points qui peuvent être considérés comme des « outliers ». Les cohortes de lésions utilisées pour les prélèvements sont identifiées par une couleur orange.

3.2.3 Résultats

3.2.3.1 Cinétique d'apparition des lésions

Les premières lésions apparaissent 4 jours après inoculation. C'est au 6^{ème} jour post-inoculation que la cohorte la plus nombreuse apparaît sur les trois variétés (colorées en orange sur la Figure 15). Ce sont ces cohortes de lésions qui ont été utilisées pour effectuer les prélèvements. Les dernières lésions apparaissent au 10^{ème} jour post-inoculation sur les variétés Bomba et Ariete et au 9^{ème} jour post-inoculation sur la variété Irat 216.

Les lésions peuvent être plus ou moins nombreuses sur une même feuille. Lorsque les lésions sont nombreuses sur une même feuille et qu'elles s'étendent de manière importante, elles fusionnent. Il n'est alors plus possible de distinguer les lésions les unes des autres et la feuille meurt rapidement par dessèchement. Ce phénomène a été observé sur les variétés Ariete et Bomba et de manière beaucoup plus marginale sur la variété Irat.

3.2.3.2 Durée de la période de latence

Les premiers conidiophores sont apparus sur la majorité des lésions de nos cohortes d'intérêt, au 7^{ème} jour post-inoculation sur les variétés Ariete et Bomba et au 8^{ème} jour post-inoculation sur la variété Irat. C'est à ces dates que nous considérons que les pathogènes sont sortis de leur période de latence.

3.2.3.3 Cinétique de croissance des lésions

L'évolution temporelle de la surface des lésions de nos cohortes d'intérêt présente une importante hétérogénéité. Certaines lésions restent bloquées à une faible taille alors que d'autres sont capables de s'étendre jusqu'à la fin de l'infection. Ainsi, on observe encore des lésions d'une surface de 0.5 mm² dans les derniers jours de l'infection. De plus, toutes les lésions ne semblent pas présenter la même vitesse de croissance. Cette hétérogénéité biologique rend les tendances difficiles à identifier. Les statistiques permettant d'estimer la capacité des différents modèles testés à résumer nos données sont présentées dans le Tableau 2. Les modèles qui s'ajustent le mieux sur les données d'évolution temporelle de la taille des lésions sont le modèle logistique pour les variétés Bomba et Irat et le modèle polynomial pour la variété Ariete (Figure 16 et Tableau 2). Les paramètres de ces modèles ainsi que leurs statistiques d'estimation sont présentés dans le Tableau 3.

Variété	Modèle	n	$\hat{\sigma}_{res}$	p	AIC_c	R^2
Ariete	Linéaire	169	2.569	2	323.042	0.022
	Logistique	169	2.509	3	316.138	0.073
	Polynomial	169	2.455	3	308.784	0.112
Bomba	Linéaire	166	2.104	2	251.091	0.421
	Logistique	166	2.092	3	250.277	0.432
	Polynomial	166	2.091	3	250.118	0.432
Irat	Linéaire	147	0.879	2	-36.789	0.132
	Logistique	147	0.870	3	-35.692	0.155

Tableau 2. Dynamique des tailles de lésion au cours du processus infectieux : qualité des modèles testés. Pour chaque modèle, sont présentés la taille d'échantillon (n), l'erreur standard résiduelle ($\hat{\sigma}_{res}$), le nombre de paramètres du modèle (p), l'AIC corrigée (AIC_c), et le coefficient de détermination R^2 . AIC_c est calculée en utilisant la formule :

$$AIC_c = n \ln \left(\frac{SS_{res}}{n} \right) + 2K + \frac{2K(K+1)}{n-K-1} \text{ où } K \text{ est le nombre de paramètres plus un et } SS_{res} \text{ la}$$

somme des carrés résiduelle (soit $(n-p)\hat{\sigma}_{res}^2$) (Motulsky et Christopoulos 2004).

$$R^2 = 1 - SS_{res}/SS_{tot} \text{ où } SS_{tot} = \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \text{ est la somme des carrés des écarts à la moyenne totale.}$$

Variété	Modèle	Paramètre	Estimation	SE	<i>t</i>	<i>p</i> -value	
Ariete	Polynomial	<i>a</i>	-0.364	0.089	-4.106	6.3e-05	***
		<i>b</i>	6.233	1.461	4.265	3.3e-05	***
		<i>c</i>	-23.229	5.861	-3.964	1e-04	***
Bomba	Linéaire	<i>a</i>	1.381	0.126	10.925	< 2e-16	***
		<i>b</i>	-6.74	0.982	-6.861	1.33e-10	***
	Logistique	<i>α</i>	21.53	28.331	0.760	0.448	ns
		<i>β</i>	5.013	0.512	9.801	<2e-16	***
		<i>γ</i>	0.442	0.169	2.617	0.010	**
Irat	Logistique	<i>α</i>	1.810	0.223	8.110	2.01e-13	***
		<i>β</i>	4.927	2.212	2.228	0.028	*
		<i>γ</i>	0.725	0.341	2.127	0.035	*

Tableau 3. Dynamique des tailles de lésion au cours du processus infectieux : paramètres estimés.

Modèle polynomial : $y = ax^2 + bx + c$. Modèle logistique : $y = \frac{\alpha}{1 + \text{Exp}(\beta - \gamma x)}$. Modèle linéaire :

$y = ax + b$ avec y la taille de lésion et x le nombre de jours post-inoculation.

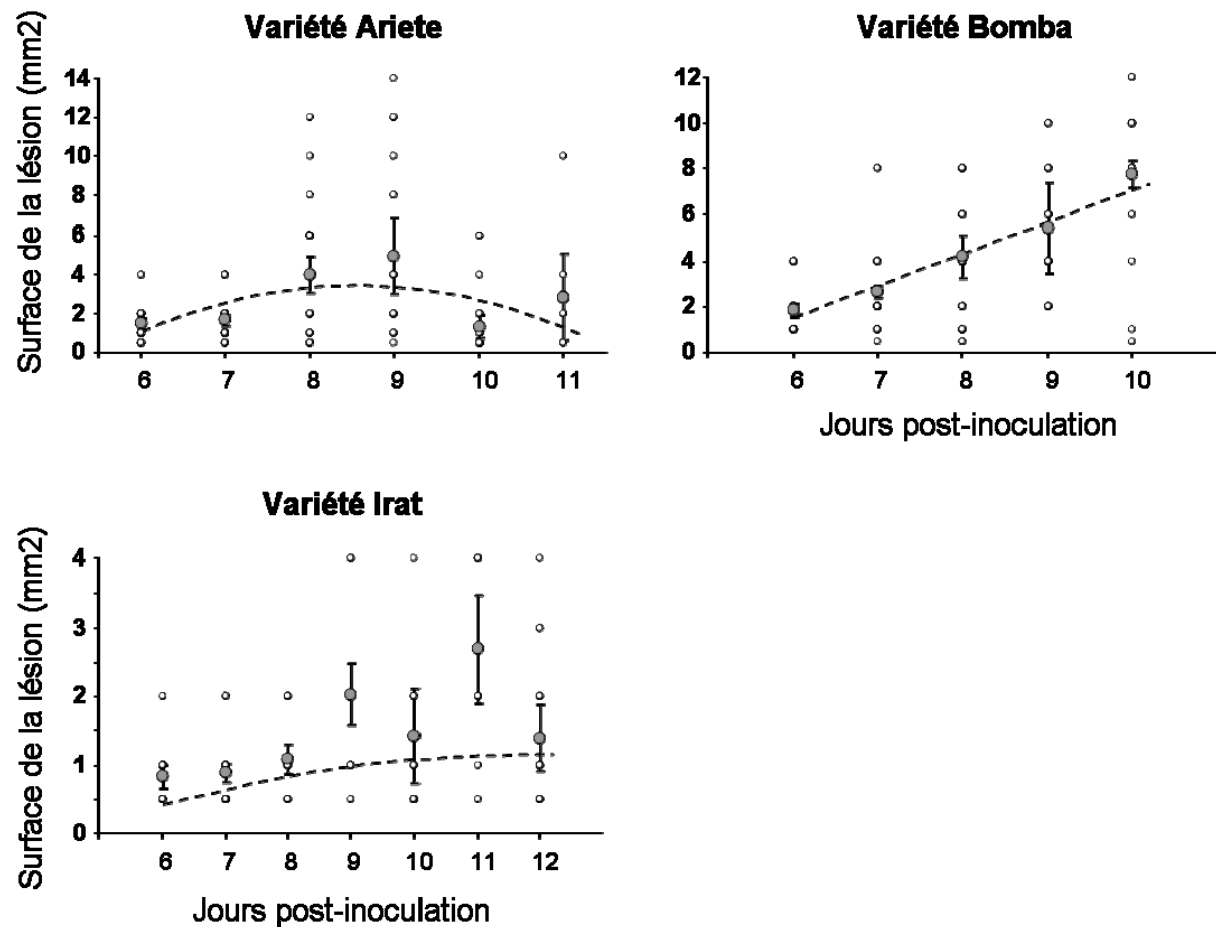


Figure 16. Cinétique de croissance des lésions au cours de l'infection.

Les cercles représentent les données brutes. Les points gris représentent les moyennes par jour post-inoculation assorties de leurs intervalles de confiance. Sur chaque graphique est représenté en pointillés noirs la courbe la plus ajustée aux données (Tableau 2) A) Variété Ariete. B) Variété Bomba. C) Variété Irat.

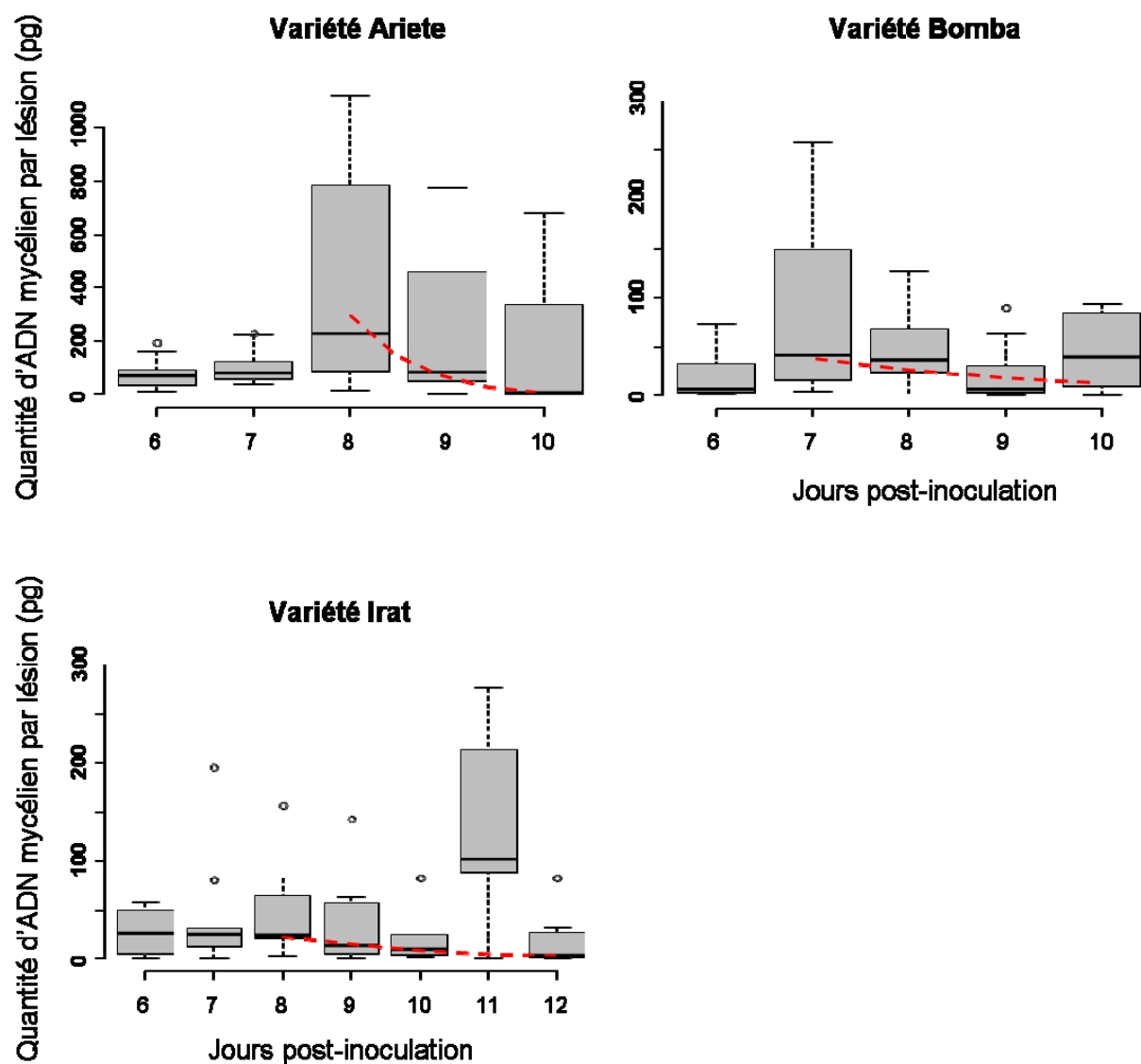


Figure 17. Cinétique de croissance de la masse mycélienne au cours de l'infection quantifiée par Q-PCR.

Les barres noires représentent les médianes, les boîtes grises comprennent 50% des données et les barres d'erreur 95% des données. Le mycélium semble décroître de manière exponentielle après la latence (courbes en pointillés, Tableau 5). A) Variété Ariete. B) Variété Bomba. C) Variété Irat.

Pour la variété Ariete, le meilleur modèle de croissance est polynomial (la différence d'AIC avec les modèles linéaire et logistique est supérieure à 2) avec des lésions de taille moins importante au 10^{ème} et 11^{ème} jour post-inoculation qu'au 8^{ème} et 9^{ème} jour post-inoculation (Figure 16a). Ceci est très probablement un artéfact qui reflète le fait que les lésions ayant présenté une croissance rapide ont entraîné le dessèchement des feuilles sur lesquelles elles ont poussé. De plus grosses lésions n'ont donc pas pu être échantillonnées pendant les derniers jours de l'infection. La taille maximale observée a été de 14 mm² et la taille moyenne des lésions au jour 9 était de 4,9 mm².

Pour la variété Bomba, les trois modèles ne diffèrent pas dans leur qualité d'ajustement aux données (AIC et R² très proches, Tableau 2) (Figure 16b). On peut donc conclure que chez cette variété les lésions présentent une croissance linéaire (ou quasiment) du début à la fin de l'infection avec un taux de croissance de 1.381 ± 0.126 mm²/jour. La plus grande lésion observée a atteint 12 mm² et la taille moyenne de lésions au jour 9 de 5.4 mm².

Concernant la variété Irat, le meilleur modèle est le modèle logistique (avec cependant une différence d'AIC faible avec le modèle linéaire, Tableau 2 et Figure 16c). On observe de plus que la taille maximale des lésions observées n'augmente plus à partir du 9^{ème} jour post-inoculation (plateau estimé à 1.810 ± 0.223 mm², Tableau 3). La plus grande lésion observée ne dépassait pas 4 mm² et la taille moyenne de lésion au jour 9 était de 2 mm².

Bien que l'on ne puisse statistiquement comparer les profils de croissance de lésion entre les couples souche/variété, on peut remarquer la ressemblance entre les variétés Ariete et Bomba (en ne retenant que les jours 6-9 pour Ariete). La variété Irat présente une cinétique de croissance de lésion assez différente car ses lésions restent beaucoup plus petites que celles observées sur les variétés Ariete et Bomba. Elle semble de plus atteindre un plateau à partir du jour 9, ce qui n'est pas le cas pour Bomba (on ne peut pas conclure sur ce point pour Ariete).

3.2.3.4 Cinétique de croissance du mycélium

La croissance mycélienne ne semble monotone chez aucun des trois couples souche-variété étudié (Figure 17). Il semblerait que la masse mycélienne augmente du 6^{ème} au 7^{ème} ou 8^{ème} jour post-inoculation avant de diminuer jusqu'à la fin de l'infection. Nous n'avons pas été en mesure d'étudier avec précision la croissance du mycélium pendant la période de latence car les lésions que nous avons suivies ont débuté leur période infectieuse dès le lendemain de leur apparition sur les feuilles de riz. La phase d'exploitation biotrophe de °M.

Variété	n	$\hat{\sigma}_{\text{res}}$	p	R^2
Ariete	30	2.463	2	0.154
Bomba	54	1.687	2	0.055
Irat	31	1.634	2	0.123

Tableau 4. Dynamique de la masse mycélienne au cours du processus infectieux : qualité des modèles testés. Pour chaque modèle, sont présentés la taille d'échantillon (**n**), l'erreur standard résiduelle ($\hat{\sigma}_{\text{res}}$), le nombre de paramètres du modèle (**p**) et le coefficient de détermination R^2 .

Variété	Paramètre	Estimation	SE	<i>t</i>	<i>p</i> -value	
Ariete	M_{a_s}	16.599	5.5387	2.997	0.005	**
	γ	-1.375	0.609	-2.257	0.031	*
Bomba	M_{a_s}	6.104	1.757	3.474	0.001	**
	γ	-0.359	0.205	-1.748	0.086	.
Irat	M_{a_s}	6.384	1.965	3.249	0.003	**
	γ	-0.408	0.202	-2.017	0.053	.

Tableau 5. Dynamique de la masse mycélienne au cours du processus infectieux : paramètres estimés.

Modèle : $\text{Ln}(\mathbf{ADN}) = \mathbf{M}_{a_s} + \gamma \times \mathbf{DPI}$ (DPI : Jours post-inoculation).

oryzae°, qui n'entraîne pas une importante nécrose des tissus et donc pas de lésions clairement identifiables sur les feuilles, a ainsi duré pendant la quasi-totalité de la période de latence.

Les tableaux 4 et 5 présentent les résultats de l'ajustement de modèles exponentiels sur les données après latence. Il est à noter que sur Ariete, l'ajustement du modèle a été réalisé sur les données à partir du 8^{ème} jour post-inoculation, c'est-à-dire le lendemain de la fin de la période de latence. Sur Irat, les données du 11^{ème} jour post-inoculation, qui semblaient aberrantes, n'ont pas été prises en compte pour l'ajustement du modèle. Pour les trois couples souche/variété, la transformation log des données a amélioré la distribution des résidus mais celle-ci n'est pas encore normale pour Ariete et Bomba (Test de Shapiro, p -values = 0.019 pour Ariete, 0.029 pour Bomba et 0.741 pour Irat). C'est pourquoi il convient de prendre les résultats suivants avec précaution. Les analyses suggèrent néanmoins une décroissance exponentielle de la masse mycélienne après la latence pour les trois souches étudiées. Le paramètre de décroissance exponentielle, qui équivaut au paramètre γ du « modèle 1 » (taux de mortalité intra-hôte), est estimé à $-1.375 \pm 0.609 \text{ jour}^{-1}$ (p -value = 0.031) pour Ariete ; $-0.359 \pm 0.205 \text{ jour}^{-1}$ (p -value = 0.086) pour Bomba ; et $-0.408 \pm 0.202 \text{ jour}^{-1}$ (p -value = 0.053) pour Irat.

On peut enfin remarquer que les quantités d'ADN fongiques sous-jacentes aux lésions sont en moyenne trois fois plus importantes sur la variété Ariete que sur les variétés Bomba et Irat.

3.2.3.5 Corrélation entre la taille des lésions et le niveau de développement du champignon in planta

Les distributions des quantités d'ADN mycélien par classe de surface des lésions sont présentées en Figure 18. On peut voir que les très fortes tailles de lésions sont peu représentées et auront donc un faible poids dans l'analyse (surtout sur la variété Ariete). Le modèle qui s'ajuste le mieux à ces données est linéaire (Tableaux 6 et 7).

Pour la variété Ariete, les valeurs des paramètres du modèle linéaire présentent une bonne significativité (Tableau 7) et le coefficient de détermination est égal à 0.67.

Pour les variétés Bomba et Irat au contraire, les valeurs des coefficients de détermination sont très faibles, respectivement égales à 0.08 et 0.14. Les valeurs positives des pentes des droites de régression restent toutefois significatives (Tableau 7).

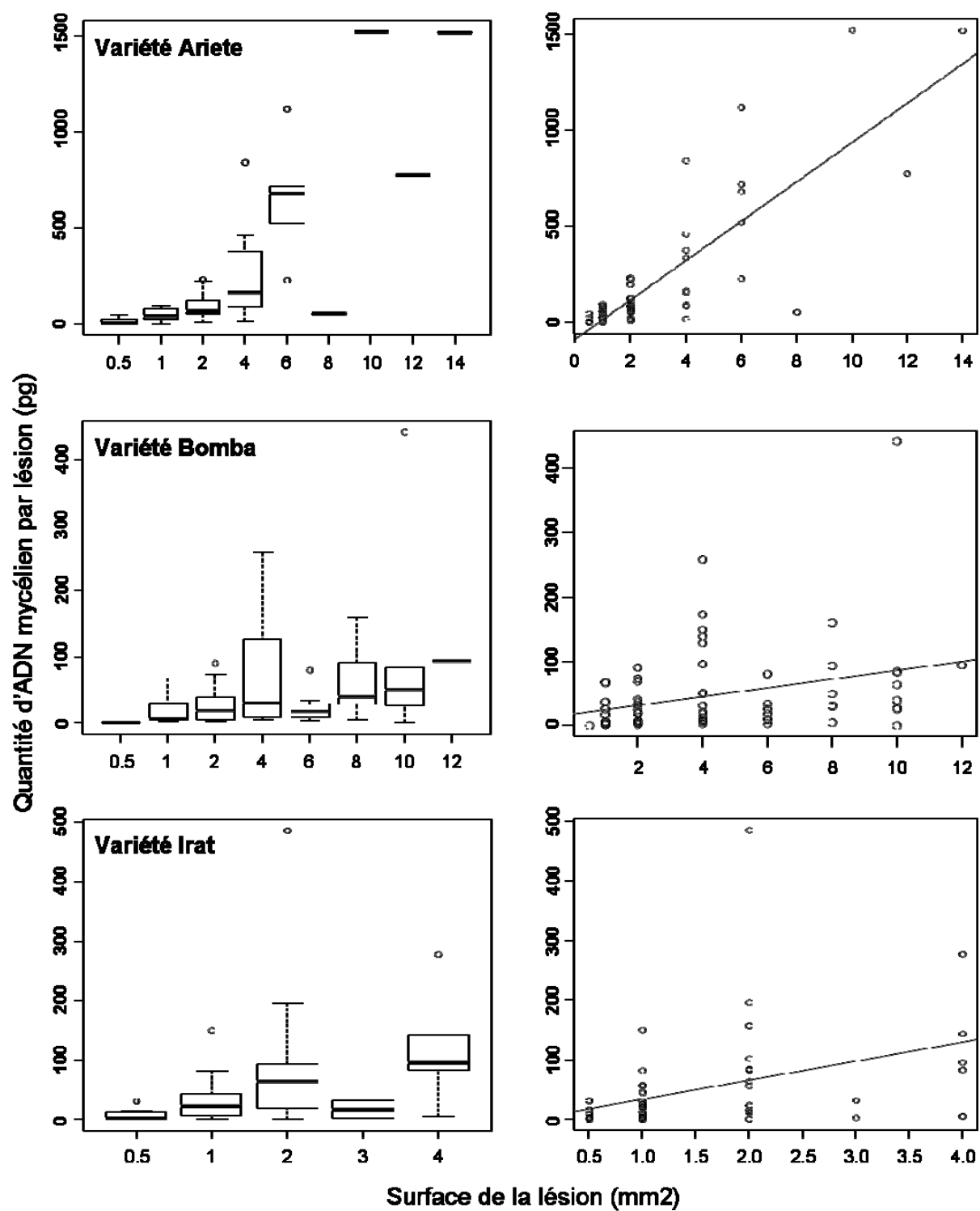


Figure 18. Corrélation entre la taille des lésions et le niveau de développement du champignon *in planta*.

Variété	Modèle	<i>n</i>	$\hat{\sigma}_{res}$	<i>p</i>	<i>AIC_c</i>
Bomba	Linéaire	67	67.19	2	568.159
	Polynomial	67	67.70	3	570.397
	Logistique	67	67.81	3	570.615
Ariete	Linéaire	52	207.20	2	559.164
	Polynomial	52	208.60	3	561.165
	Logistique	52	212.90	3	563.287
Irat	Linéaire	55	75.47	2	480.044
	Polynomial	55	75.38	3	481.195

Tableau 6. Corrélacion entre la taille des lésions et le niveau de développement du champignon *in planta* : qualité des modèles testés. Pour chaque modèle, sont présentés la taille d'échantillon (*n*), l'erreur standard résiduelle ($\hat{\sigma}_{res}$), le nombre de paramètres du modèle (*p*) et l'AIC corrigée (*AIC_c*). Il n'a pas été possible d'ajuster un modèle logistique sur les données de la variété Irat.

Variété	Modèle	Paramètre	Estimation	SE	<i>t</i>	<i>p-value</i>	
Bomba	Linéaire	<i>a</i>	6.802	2.653	2.564	1.27E-02	*
		<i>b</i>	18.012	14.227	1.266	0.210	ns
Ariete	Linéaire	<i>a</i>	102.380	10.080	10.161	9.38E-14	***
		<i>b</i>	-85.970	42.210	-2.037	0.047	*
Irat	Linéaire	<i>a</i>	31.721	10.087	3.145	2.72E-03	**
		<i>b</i>	2.454	18.387	0.133	0.894	ns

Tableau 7. Corrélacion entre la taille des lésions et le niveau de développement du champignon *in planta* : paramètres estimés. Modèle : $ADN = a + b \times Surface$.

Ces premiers résultats suggèrent qu'il existe effectivement une corrélation linéaire positive entre la surface des lésions et le niveau de développement du champignon *in planta*. Il existe cependant une forte variabilité dans les données, ce qui tend à penser que la taille des lésions ne rend pas toujours bien compte de la masse mycélienne sous-jacente.

3.2.4 Discussion

3.2.4.1 La stratégie d'allocation des ressources entre la croissance mycélienne et la sporulation est-elle bang-bang ?

Au cours de cette expérience, nous avons confirmé l'existence d'une phase de latence chez *M. oryzae*, c'est-à-dire une phase de croissance mycélienne sans production de spores. La phase d'exploitation biotrophe de *M. oryzae* (n'entraînant pas une importante nécrose des tissus) a été trop longue pour que nous puissions étudier en détail le développement du mycélium pendant la période de latence. Il semble cependant que la masse mycélienne augmente bien jusqu'à la fin de la latence. Nos résultats suggèrent de plus qu'à partir de la mise en place des structures de reproduction, la masse mycélienne diminue chez les trois couples souche-variété que nous avons étudiés. On peut donc considérer que ces premiers résultats sur l'allocation des ressources entre la croissance mycélienne et la sporulation suggèrent l'existence d'une stratégie d'allocation des ressources bang-bang chez *M. oryzae*.

Une perspective intéressante serait de travailler avec une souche de *M. oryzae* exprimant constitutivement une protéine fluorescente telle que la GFP, afin de détecter le champignon dès les premiers stades de l'infection, avant l'apparition des premiers symptômes visibles à l'œil. Ceci nous permettrait de suivre précisément l'évolution de la masse mycélienne pendant la période de latence.

Par ailleurs, les prédictions du « modèle 1 » concernant la dynamique du taux de sporulation (que nous n'avons pas pu étudier en détail au cours cette expérience) semblent cohérentes avec les résultats de travaux empiriques. Il a en effet été montré que les lésions peuvent produire des conidies pendant au moins 15 jours mais que le pic de production est atteint 7 à 10 jours après le début de l'infection (Kato 1974), soit au moment ou peu après la latence, conformément aux prédictions du modèle.

3.2.4.2 La taille des lésions est-elle corrélée linéairement avec le niveau de développement du champignon dans la plante ?

La taille des lésions ne semble pas toujours corrélée linéairement avec le niveau de développement du champignon dans la plante (Figure 18). La croissance mycélienne peut être en partie découplée de l'intensité avec laquelle les cellules hôte sont dégradées. En effet, la lésion causée par le pathogène correspond à une zone des tissus foliaires dont les cellules sont nécrosées. Les cellules végétales n'ayant pas la capacité de se régénérer, une fois les lésions apparues, elles ne peuvent que s'étendre ou stopper leur développement. Au contraire, le mycélium peut subir des facteurs de mortalité qui peuvent faire diminuer la masse mycélienne au cours du temps.

Nos résultats sont en accord avec les résultats des travaux de Vergne (2007), qui quantifie des quantités similaires d'ADN fongique à partir de lésions de taille différente, issues de l'infection par une même souche de *Magnaporthe oryzae* sur des cultivars présentant des niveaux de résistance partielle différents. De la même manière, nous observons des lésions de taille équivalentes sur les variétés Ariete et Bomba, mais les quantités d'ADN fongique mesurées sont bien plus importantes sur la variété Ariete. De même, les lésions observées sur la variété Irat présentent des tailles bien inférieures à celles observées sur la variété Bomba alors que les quantités d'ADN fongiques sous-jacentes aux lésions observées sur ces deux variétés sont sensiblement les mêmes.

C'est pourquoi, utiliser la taille de lésion comme estimateur de la masse mycélienne *in planta* ne semble pas être une bonne approximation et ceci particulièrement dans la phase tardive de l'infection.

3.2.4.3 Variation des observations selon le couple considéré

Nous avons observé une variabilité relativement importante entre les trois couples souche-variété que nous avons étudiés pendant cette expérience.

Sur la base de la comparaison des masses mycéliennes sous-jacentes aux lésions prélevées sur les variétés Ariete et Bomba (Figure 17), on pourrait supposer que la variété Ariete présente un taux de résistance partielle plus faible que la variété Bomba. En effet, les masses mycéliennes quantifiées sur la variété Ariete sont bien plus élevées que celles quantifiées sur la variété Bomba alors que les tailles des lésions sont sensiblement les mêmes sur ces deux variétés. Cependant, si l'on compare les modèles exponentiels ajustés à la phase

de décroissance du mycélium sur ces deux variétés, on constate que le paramètre de décroissance (γ) le plus fort est obtenu sur variété Ariete (Figure 17). En faisant le lien avec notre modèle mathématique, on peut faire l'hypothèse que le taux de mortalité subi par la souche qui colonise la variété Ariete (γ dans le modèle mathématique) est le plus élevé. Nos résultats suggèrent ainsi que le taux de croissance du mycélium pendant la période de latence et son taux de décroissance pendant la période infectieuse ont été plus forts chez la souche colonisant la variété Ariete que chez la souche colonisant la variété Bomba. Il est difficile d'essayer d'interpréter de manière plus approfondie ces résultats (qui nécessitent d'ailleurs d'être confirmés par au moins une répétition temporelle) car de nombreux mécanismes sont susceptibles d'influer sur les patrons que nous avons observé.

Il est toutefois probable que la stratégie d'infection ait été quelque peu différente entre les deux souches et/ou que la stratégie de résistance partielle ait différé entre les deux variétés. La comparaison de nos résultats sur les variétés Bomba et Irat nous conduit au même type de conclusion. Les masses mycéliennes qui ont été quantifiées à partir des lésions prélevées sur ces deux variétés sont du même ordre de grandeur, alors que les lésions observées sur la variété Irat sont restées bien plus petites que celles observées sur la variété Bomba. On peut faire l'hypothèse que la souche colonisant Irat s'est développée sans trop endommager les tissus de l'hôte, en produisant une faible quantité de toxines par exemple et/ou que l'hôte a peu dégradé ses propres tissus pour ralentir la progression du champignon (résistance partielle analogue à la réaction d'hypersensibilité. Contrairement à la souche colonisant Bomba qui a présenté le même taux de croissance mais a induit des lésions qui pour beaucoup, ont continué à s'étendre jusqu'à coalescer et entraîner le dessèchement complet des feuilles. Comme le suggèrent nos résultats ainsi que ceux de Vergne (2007), il paraît nécessaire d'intégrer plusieurs traits caractéristiques de l'infection afin de déterminer avec justesse le niveau de virulence d'une souche pathogène tout comme le niveau de résistance partielle d'une variété.

Cette expérience, qui représente une démarche assez nouvelle en phytopathologie, nous a permis d'améliorer notre compréhension du processus infectieux de *M. oryzae* mais nous a également conduits vers de nombreuses nouvelles interrogations concernant la stratégie d'infection de *M. oryzae* ainsi que la stratégie de résistance d'*O. sativa*.

3.2.4.4 De la variabilité dans cette expérience

L'importante variance observée dans les jeux de données est bien d'origine biologique et ne provient pas des résultats des analyses Q-PCR réalisées, qui présentent une bonne répétabilité. La présence de lésions contenant une faible quantité d'ADN mycélien, dans les prélèvements jusqu'à la fin de l'infection est une des cause de cette forte variance. Nous n'avons toutefois pas été capables de détecter une bi-modalité dans les données journalières. Ceci rend les données difficiles à ajuster par des modèles. Les tailles des jeux de données étant de plus relativement faibles et les données fortement dispersées, cela pourrait expliquer notre difficulté à extraire des tendances plus significatives.

La confirmation de nos résultats nécessiterait de répéter cette expérience en effectuant un échantillonnage plus important et en essayant d'adapter le protocole expérimental pour limiter la variabilité biologique. Les interprétations biologiques issues de ces résultats doivent donc être prises avec précaution. Les analyses statistiques restent de plus préliminaires et nécessitent d'être affinées. Si nous n'arrivons pas à améliorer les ajustements sur ces jeux de données par des méthodes statistiques plus avancées, le protocole expérimental devra être adapté pour réduire la variabilité biologique observée. Une perspective d'amélioration pourrait être de semer les plants de riz en godets individuels. Cela permettrait de limiter la compétition entre les plantes pour les ressources et la lumière et de randomiser la place de chaque plante pendant la culture et l'expérience, ce qui permettrait d'obtenir une population hôte plus homogène. Une autre perspective serait de diminuer la concentration en conidies des solutions d'inoculation pour limiter au maximum les phénomènes de compétition entre les lésions ainsi que les phénomènes de coalescence. La compétition pour l'espace et les ressources est susceptible d'influencer la croissance des différents mycéliums colonisant une même feuille et ainsi d'engendrer de la variabilité dans nos données. Par ailleurs, lorsque deux lésions ont coalescé nous ne pouvons plus étudier leurs cinétiques de croissance. De plus lorsque de nombreuses lésions coalescent, cela entraîne la mort prématurée des plants de riz et diminue donc la durée de notre suivi. Bien que nous ayons inoculé avec des solutions de concentration bien inférieure à ce qui est couramment réalisé au laboratoire, nous avons observé de nombreuses lésions coalescentes sur les variétés Ariete et Bomba. Il serait intéressant de diminuer encore cette concentration, où même d'inoculer chaque feuille de riz en déposant une goutte d'eau gélosée ne contenant qu'une seule spore (comme cela a été réalisé dans l'expérience que nous avons menée sur l'agent de la rouille du peuplier).

D'autres causes peuvent être responsables de la forte variabilité biologique observée. L'effet feuille pourrait par exemple jouer un rôle important. Nous avons prélevé nos échantillons indifféremment sur les feuilles n°3 et 4 des plants de riz. Or il est couramment accepté en phytopathologie que les feuilles appartenant à différents rangs foliaires, présentant de plus des âges différents n'expriment pas exactement la même résistance face aux pathogènes. En conséquence, dans certain pathosystème tel que la rouille jaune du blé, seule la zone centrale de la feuille drapeau du plant de blé est utilisée pour l'observation des symptômes.

4. Conclusion générale

Le formalisme de l'optimisation dynamique a été largement utilisé pour étudier l'histoire de vie des organismes végétaux et animaux. Il a permis des avancées de compréhension sur des thèmes variés tels que l'âge et la taille à maturité, les avantages et les déterminants de la croissance déterminée ou indéterminée et de la semelparité ou de l'itéroparité, la biologie du comportement (voir Kozłowski 1992, Perrin et Sibly 1993, Iwasa 2000 et McNamara et al. 2001 pour des revues bibliographiques). Étonnamment, ce formalisme a été très peu utilisé pour étudier l'histoire de vie des parasites (Sasaki et Iwasa 1991). Il peut pourtant aider à répondre à des questions du type : à partir de quel moment un parasite a-t-il intérêt à se transmettre ? Quel niveau de développement intra-hôte a-t-il intérêt à atteindre avant de se transmettre ? Et ainsi améliorer notre compréhension des stratégies d'infections et nous permettre d'identifier des contraintes importantes à prendre en compte pour étudier l'évolution des populations pathogènes.

Bien que se basant sur l'hypothèse forte que l'organisme est capable d'adopter une stratégie optimale (maximisant sa valeur sélective) dans son environnement, on ne s'attend pas à ce que les pathogènes présentent des stratégies de vie exactement optimales en conditions naturelles (Parker et Maynard Smith 1990, McNamara *et al.* 2001). L'utilité de ce formalisme réside plutôt dans le fait d'essayer d'acquérir une meilleure compréhension des stratégies de vie des organismes, en se demandant quel type de comportement est bénéfique pour un individu donné dans un environnement donné (Kokko 2007). Les méthodes d'optimisation dynamique fournissent ainsi des prédictions simples sur les choix qui maximisent la valeur sélective d'un individu en fonction des différentes circonstances auxquelles il peut faire face au cours de sa vie. Il est évident que ces méthodes reposent sur des hypothèses particulières et présentent de ce fait un certain nombre de limitations. On pourrait cependant faire le même constat pour de nombreuses autres méthodes utilisées en biologie (d'autres méthodes de modélisation mathématique, des méthodes statistiques, de génétique des populations et bien d'autres). Il nous semble donc important de ne pas rejeter trop vite l'intérêt de l'utilisation d'une méthode à cause des limitations qu'elle comporte, comme cela est souvent fait pour les méthodes d'optimisations dynamiques, qui sont au cœur de ce type de débat depuis de nombreuses années (Gould et Lewontin 1979, Parker et Maynard Smith 1990). Il semblerait plus consensuel de profiter de ce que ces méthodes peuvent apporter à notre compréhension d'un problème donné, tout en gardant en mémoire les

principales hypothèses sur lesquelles elles s'appuient afin de ne pas réaliser d'interprétations abusives (Parker et Maynard Smith 1990, Barton 2007, Kokko 2007).

Appliquant le formalisme de l'optimisation dynamique à l'étude des interactions hôte-parasite, nous avons cherché à identifier certains des principaux mécanismes qui gouvernent les stratégies d'infection des champignons phytopathogènes en particulier et plus généralement des pathogènes producteurs de spores. Nous avons montré que la manière dont l'accessibilité du pathogène aux ressources de l'hôte est définie dans les modèles, impacte fortement la stratégie optimale d'allocation des ressources entre la croissance intra-hôte et la production de spores. Un pathogène qui ne pourrait exploiter qu'une quantité finie des ressources de l'hôte devrait présenter une stratégie optimale d'allocation des ressources de type « bang-bang ». Cette stratégie d'allocation se traduit par une croissance intra-hôte rapide pendant la période de latence, suivie par la production de spores et la décroissance (exponentielle) de la densité intra-hôte pendant la période infectieuse. Au contraire, un pathogène qui pourrait potentiellement exploiter une quantité infinie des ressources de l'hôte, devrait présenter une stratégie optimale d'allocation des ressources de type « bang-mixte ». D'après le second modèle que nous avons étudié, cette stratégie d'allocation se traduit par une croissance intra-hôte rapide pendant la période de latence, suivi par la production de spores et le maintien de la densité intra-hôte à un niveau constant pendant la période infectieuse. Bien que les hypothèses (ou contraintes) spécifiées dans les deux modèles que nous avons étudiés correspondent à deux types d'interactions hôte-pathogène distinctes, il est à noter que la stratégie optimale d'allocation des ressources entraîne dans les deux cas l'existence d'une période de latence et d'une croissance déterminée (la densité intra-hôte atteinte à la fin de la période de latence correspond à la densité intra-hôte maximale que peut atteindre le pathogène). Ces résultats sont cohérents avec de nombreux cycles de vie des pathogènes producteurs de spores. Les deux modèles que nous avons étudiés semblent donc avoir une portée relativement générique pour les pathogènes producteurs de spores. Il serait toutefois intéressant d'étudier par la modélisation, quels types de contraintes pourraient conduire à l'existence d'une croissance indéterminée du pathogène dans son hôte et à quels types de cycles de vie pourraient-elle correspondre.

Le formalisme mathématique que nous avons utilisé ne nous a pas permis d'étudier la virulence définie comme une baisse de la valeur sélective de l'hôte ou comme une augmentation de son taux de mortalité. Il nous a par contre permis d'étudier la stratégie d'infection du pathogène à travers les valeurs de certains de ses traits d'histoire de vie relatifs

à la virulence comme la latence (ou âge à maturité), la densité intra-hôte maximale (ou taille à maturité) et la sporulation (relative à la transmission). La durée de la période de latence ainsi que le timing de la sporulation ont des implications directes sur la dynamique épidémiologique. Leur prise en compte dans les modèles épidémiologiques étudiant l'évolution de la virulence pourrait modifier les prédictions classiquement obtenues. Une des principales perspectives à nos travaux théoriques basés sur la méthode de l'optimisation dynamique est de coupler l'étude de la dynamique intra-hôte et de la dynamique épidémiologique dans le but d'étudier l'évolution des stratégies d'infections à l'échelle de la population. Ceci nous permettrait de plus d'accéder à la notion de virulence telle qu'elle est le plus couramment définie dans les modèles mathématiques, c'est-à-dire comme une augmentation du taux de mortalité de la population hôte due au parasitisme.

Les valeurs des traits d'histoire de vie du parasite définis dans nos deux modèles varient selon des patrons relativement complexes avec les valeurs des paramètres des modèles, définissant des normes de réaction optimales. Les paramètres utilisés dans les deux modèles que nous avons étudiés définissent à la fois la résistance de l'hôte et l'efficacité d'exploitation du parasite (ε , c_1 , c_2 et γ dans le « modèle 1 » et α , γ , δ et K dans le « modèle 2 ») ainsi que la prédictibilité de l'environnement (μ). Les normes de réaction optimales de chaque trait d'histoire de vie du parasite nous aident à comprendre quelle stratégie d'infection est avantageuse pour le parasite en fonction des caractéristiques de l'interaction hôte-pathogène et en fonction de la prédictibilité de l'environnement. En d'autres termes, elles peuvent permettre d'identifier quels types de contraintes imposées au parasite sont susceptibles d'induire quels types de stratégies d'infection. Elles peuvent être interprétées comme des adaptations aux conditions de l'habitat du parasite. En appliquant ce type de raisonnement aux interactions plantes-pathogènes, il est possible d'étudier quelles seraient les pressions de sélection associées à différents types de résistances partielles et comment les pathogènes devraient répondre à ses pressions (sous l'hypothèse d'optimalité). Ce type d'étude pourrait constituer une bonne base de réflexion pour améliorer nos connaissances concernant la durabilité des résistances.

Le fait d'étudier des traits d'histoire de vie du pathogène relatifs à la virulence plutôt que d'étudier la virulence en tant que telle, présente l'avantage de fournir des prédictions sur des traits qui sont souvent plus facilement accessibles par l'expérience et peut faciliter les aller-retour entre la théorie et l'empirisme. Comme les traits d'histoire de vie que nous avons

modélisés sont facilement mesurables chez les champignons phytopathogènes, nos résultats théoriques obtenus par modélisation ont pu être valorisés par une confrontation avec des résultats expérimentaux (Parker et Maynard Smith 1990, Barton 2007, Kokko 2007). Nous avons ainsi entrepris de mener une expérience adaptée à chacun des deux modèles mathématiques que nous avons étudiés. L'objectif de ces travaux expérimentaux était d'ancrer nos réflexions théoriques dans un contexte biologique précis, afin de vérifier la pertinence des prédictions fournies par les modèles et ainsi de juger de la pertinence des hypothèses spécifiées dans les modèles. Développer ces deux protocoles expérimentaux nous a également permis d'améliorer nos connaissances sur les stratégies de vie des champignons phytopathogènes et d'asseoir une méthodologie pour l'étude des traits d'histoire de vie des champignons pathogènes au-delà des protocoles classiques couramment employés jusqu'à présent dans nos laboratoires.

Les champignons phytopathogènes *Magnaporthe oryzae* et *Melampsora larici-populina* ont été choisis comme modèle biologique pour ces deux projets expérimentaux car leurs cycles de vie sont conformes aux hypothèses de nos modèles mathématiques et en particulier à celle relative au mode d'exploitation des ressources de l'hôte. *M. oryzae* présente une stratégie d'exploitation des ressources hémibiotrophe. Les cellules végétales que ce pathogène exploite finissent toutes par mourir, il ne peut donc disposer que d'une quantité finie de ressources. Chez *M. oryzae*, nous avons observé une décroissance de la masse mycélienne après la latence et ce jusqu'au dernier jour de nos mesures, conformément aux attendus théoriques du premier modèle développé en §2.2. Le champignon phytopathogène *M. larici-populina* présente quand à lui une stratégie d'exploitation des ressources biotrophe, qui ne conduit pas à la sénescence des cellules végétales exploitées. Il détourne en continue, une partie des photosynthétats produits par sa plante hôte et peut ainsi potentiellement avoir accès à une quantité infinie des ressources de l'hôte. Chez *M. larici-populina*, il a été observé que la masse mycélienne semblait rester constante après la latence et ce jusqu'à la fin de nos mesures, ce qui correspond à l'attendu du second modèle développé en §2.3. D'après ces premiers résultats expérimentaux, il semblerait que les prédictions théoriques fournies par les deux modèles que nous avons étudiés soient congruentes avec les patrons biologiques observés. Ceci est un argument en faveur du fait que les contraintes spécifiées dans les modèles sont effectivement importantes à prendre en compte et déterminent (au moins en partie) les stratégies de vie des pathogènes producteurs de spores. Le compromis dans

l'allocation des ressources entre la multiplication intra-hôte et la production de spores semble donc déterminant pour les stratégies d'infection des pathogènes producteurs de spores.

Pour étudier les stratégies de vie des champignons phytopathogènes nous avons mis en œuvre des méthodes jamais ou peu utilisées dans nos laboratoires d'accueil. Nous avons donc réalisé un grand nombre de mises au point, particulièrement pour les techniques de biologie moléculaire qui n'avaient jamais été testées pour de si faibles quantités de matériel biologique. À l'issue de ces premières expériences, de nombreuses questions restent posées et des améliorations techniques peuvent être envisagées. Pour l'expérience réalisée avec le couple *M. oryzae* – *Oryza sativa*, l'inoculation a été réalisée sur plantes entières en pots par aspersion d'une solution de spores de concentration connue, alors qu'une inoculation monospore a été réalisée sur des disques de feuilles en survie pour le couple *M. larici-populina* – *Populus* sp. La technique de l'inoculation monospore sur disque de feuille en survie présente l'avantage de pouvoir estimer directement l'efficacité d'infection des spores (en calculant la proportion de disques que le pathogène a réussi à coloniser) et de pouvoir quantifier le développement du mycélium dès ses premiers stades de croissance. En effet le disque entier est broyé pour extraction même si l'on n'a pas pu détecter visuellement la présence du champignon dans la feuille, ce qui n'est pas possible sur les feuilles de riz ayant été inoculées par une grande quantité de spores. De plus cette méthode permet d'éviter d'éventuels problèmes de compétition pour les ressources de l'hôte entre différents mycéliums. Elle permet également d'être sûre que l'on ait bien prélevé le mycélium dans son intégralité, ce qui n'est pas assuré dans le cas de *M. oryzae*, malgré le prélèvement d'une large zone de feuille saine autour de la lésion. L'inoculation sur disques de feuilles en survie présente cependant l'inconvénient d'être relativement loin des conditions naturelles et il n'est pas garanti que la résistance partielle de l'hôte s'exprime exactement de la même manière que dans le cas de plantes entières en culture. Par ailleurs nous avons découvert (trop tardivement pour pouvoir l'utiliser) une technique très efficace pour décaper les spores de la surface des feuilles. Les échantillons peuvent être placés dans une cuve remplie d'eau et les spores détachées des feuilles grâce à des ultrasons produits par un sonicateur plongé dans l'eau. Cette technique est utilisée avec succès et sans aucune dénaturation des échantillons sur le pathogène *Mycosphaerella fijiensis* infectant les feuilles de bananier et pourrait s'avérer moins coûteuse en temps et moins agressive pour les échantillons que le décapage par « vortexage » dans une solution de Tween.

Les modèles mathématiques que nous avons étudiés fournissent de plus des prédictions sur les patrons de variation du temps de latence en fonction de la nature de l'interaction résultant des propriétés intrinsèques de développement du pathogène et de résistance de l'hôte (qui sont principalement déterminés dans les modèles par l'efficacité du pathogène à détourner les ressources de l'hôte et par le taux de mortalité cellulaire qu'il subit) et en fonction des risques de mortalité du pathogène liés aux conditions environnementales (le paramètre μ dans le modèles). Une analyse comparative des déterminants de la période de latence chez les champignons phytopathogènes, basée sur la méthode des contrastes indépendants (Felsenstein 1985), a été entreprise pour tester la pertinence de ces prédictions théoriques et rechercher sans *a priori*, quels pourraient être les facteurs écologiques susceptibles de faire évoluer la période de latence. La tendance principale issue de cette analyse comparative est que la durée de la période de latence des champignons phytopathogènes semble être plus faible en milieu tropical qu'en milieu tempéré. Ce résultat peut être mis en lumière de l'analyse du « modèle 1 ». En milieu tropical, les champignons phytopathogènes peuvent généralement infecter des hôtes tout au long de l'année ce qui n'est pas le cas en milieu tempéré où ils passent la saison froide sous forme de spores et ne peuvent redémarrer des épidémies qu'au printemps. L'existence d'une mauvaise saison limitant la durée des épidémies peut être interprétée mathématiquement comme un risque d'extinction de la lésion (paramètre μ dans les équations) plus fort. Suivant cette hypothèse, les champignons phytopathogènes évoluant en milieu tropical seraient soumis à des risques d'extinction locale (intra hôte) moins fort que ceux évoluant en milieu tempéré. Le « modèle 1 » prédit cette relation positive entre la durée de la période de latence et la valeur du paramètre μ , dès lors que le pathogène est suffisamment efficace pour exploiter son hôte (ε et c_1 fort au regard de γ).

Les travaux de ce projet ont été réalisés à l'occasion d'un stage court de Master 1 et n'ont pas pu être poursuivi pour des questions pratiques d'organisation. Ils nous semblent cependant prometteurs et nous envisageons de nombreuses pistes pour les poursuivre afin d'acquérir des résultats plus robustes. Il serait notamment important d'augmenter le nombre d'espèces recensées dans la base de données afin que chacun des trois embranchements de champignons pathogènes présent dans l'arbre phylogénétique soit représenté par des espèces présentant une plus grande diversité de stratégies d'infection. Les données récoltées dans la littérature présentant une forte hétérogénéité, cela nous permettrait de plus d'augmenter la puissance statistique de notre étude et notamment de vérifier si la variance intraspécifique est bien

inférieure à la variance interspécifique. La méthode des contrastes indépendants utilisée pour cette analyse comparative s'est révélée tout à fait appropriée car nous avons pu mettre en évidence un effet clair de la phylogénie sur les valeurs de la période de latence chez les champignons phytopathogènes. En perspective à cette étude, nous souhaiterions introduire d'autres traits d'histoire de vie couramment mesurés chez les champignons phytopathogènes dans notre base de données, afin d'étudier plus largement les déterminants écologiques des stratégies d'infection chez ces pathogènes. Une telle base a d'ores et déjà été construite pour étudier la relation entre la probabilité d'invasion et les traits d'histoire de vie chez des champignons pathogènes forestiers (Philibert *et al.* 2010, soumis). Une perspective envisageable à plus long terme, qui nous semble particulièrement attirante serait de conduire une expérience d'évolution expérimentale pour tester l'hypothèse de l'existence d'une relation positive entre la durée de la période de latence et le niveau de prédictibilité de l'environnement (correspondant à la valeur du paramètre μ dans nos modèles mathématiques). De telles expériences ont déjà été conduites. Par exemple, Nidelet *et al.* (2009) ont étudié l'évolution du temps de latence chez des bactéries parasites de paramécies dont la durée de vie est contrôlée par l'expérimentateur (courte VS longue durée de vie). Après environ 300 générations, la durée de la période de latence des bactéries pathogènes s'est avérée plus faible chez les hôtes présentant la plus faible durée de vie. Ces résultats sont cohérents avec les premiers résultats de notre analyse comparative.

La terminologie utilisée pour décrire les maladies infectieuses ne fait pas consensus au sein des différentes communautés scientifiques (*cf.* §1.2.1). Ceci tend malheureusement à limiter un dialogue entre chercheurs issus de différentes spécialités, qui serait selon nous très profitable pour l'avancée de nos connaissances, du fait que chaque champ de recherche a sa manière traditionnelle d'envisager et d'étudier les relations hôte-parasite. De la même manière, nous pensons que de grandes avancées de nos connaissances sur l'évolution de la virulence et sur la durabilité des résistances pourraient résulter de l'utilisation parallèle de plusieurs méthodes différentes, qui possèdent chacune des avantages et des inconvénients différents.

5. Références bibliographiques

- Agrios, G.N. (2005) *Plant pathology* Academic Press, San Diego.
- Alizon, S. & Van Baalen, M. (2005) Emergence of a convex trade-off between transmission and virulence. *American Naturalist*, **165**, 155-167.
- Alizon, S. (2008) Transmission-recovery trade-offs to study parasite evolution. *American Naturalist*, **172**, 113-121.
- Alizon, S. & Van Baalen, M. (2008) Multiple infections, immune dynamics, and the evolution of virulence. *American Naturalist*, **172**, 150-168.
- Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N., & Van Baalen, M. (2009) Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**, 245-259.
- Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Epstein, P.R., & Daszak, P. (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, **19**, 535-544.
- Anderson, R.M. & May, R.M. (1982) Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, **85**, 411-426.
- André, J.B., Ferdy, J.B., & Godelle, B. (2003) Within-host parasite dynamics, emerging trade-off, and evolution of virulence with immune system. *Evolution*, **57**, 1489-1497.
- André, J.B. & Godelle, B. (2006) Within-host evolution and virulence in microparasites. *Journal of Theoretical Biology*, **241**, 402-409.
- Andrison, D. (1993) Nomenclature for pathogenicity and virulence, the need for precision. *Phytopathology*, **83**, 889-890.
- Antia, R., Levin, B.R., & May, R.M. (1994) Within-Host Population-Dynamics and the Evolution and Maintenance of Microparasite Virulence. *American Naturalist*, **144**, 457-472.
- Antia, R., Regoes, R.R., Koella, J.C., & Bergstrom, C.T. (2003) The role of evolution in the emergence of infectious diseases. *Nature*, **426**, 658-61.
- Barres, B., Halkett, F., Dutech, C., Andrieux, A., Pinon, J., & Frey, P. (2008) Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: Evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infection Genetics and Evolution*, **8**, 577-587.
- Barrett, L.G., Thrall, P.H., Burdon, J.J., & Linde, C.C. (2008) Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, **23**, 678-685.
- Barry, A.E., Leliwa-Sytek, A., Tavul, L., Imrie, H., Migot-Nabias, F., Brown, S.M., McVean, G.A.V., & Day, K.P. (2007) Population Genomics of the immune evasion (var) genes of *Plasmodium falciparum*. *Plos Pathogens*, **3**, 9.
- Barton, N.H., Briggs, D.E.G., Eisen, J.A., Goldstein, D.B., & Patel, N.H., eds. (2007) *Evolution*, pp 833. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Bastiaans, L. (1991) Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. *Phytopathology*, **81**, 611-615.
- Bedhomme, S., Agnew, P., Sidobre, C., & Michalakakis, Y. (2004) Virulence reaction norms across a food gradient. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **271**, 739-744.
- Ben-Ami, F., Mouton, L., & Ebert, D. (2008) The effects of multiple infections on the expression and evolution of virulence in a *Daphnia*-endoparasite system. *Evolution*, **62**, 1700-1711.
- Bonhoeffer, S., Lenski, R.E., & Ebert, D. (1996) The curse of the pharaoh: the evolution of virulence in pathogens with long living propagules. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **263**, 715-721.
- Bull, J.J. (1994) Virulence. *Evolution*, **48**, 1423-1437.
- Bull, J.J., Badgett, M.R., Springman, R., & Molineux, I.J. (2004) Genome properties and the limits of adaptation in bacteriophages. *Evolution*, **58**, 692-701.
- Caraco, T. & Wang, I.N. (2008) Free-living pathogens: Life-history constraints and strain competition. *Journal of Theoretical Biology*, **250**, 569-579.
- Carius, H.J., Little, T.J., & Ebert, D. (2001) Genetic variation in a host-parasite association: Potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution*, **55**, 1136-1145.
- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.M., Simon, A., & Viaud, M. (2007) *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *Fems Microbiology Letters*, **277**, 1-10.
- Davies, C.M., Webster, J.P., & Woolhouse, M.E.J. (2001) Trade-offs in the evolution of virulence in an indirectly transmitted macroparasite. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **268**, 251-257.
- Day, T. (2001) Parasite transmission modes and the evolution of virulence. *Evolution*, **55**, 2389-2400.
- Day, T. (2002) a). On the evolution of virulence and the relationship between various measures of mortality. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **269**, 1317-1323.
- Day, T. (2002) b). Virulence evolution via host exploitation and toxin production in spore-producing pathogens. *Ecology Letters*, **5**, 471-476.
- Day, T. & Gandon, S. (2007) Applying population-genetic models in theoretical evolutionary epidemiology. *Ecology Letters*, **10**, 876-888.
- De Lapeyre de Bellaire, L., Chillet, M., Lassois, L., Ewané, C.A., Bastiaanse, H., Jijakli, M.H., & Lepoivre, P. (2009) The post-harvest quality of bananas is determined by pre-harvest factors. In 6th International postharvest symposium, Antalya, Turkey.
- De Roode, J.C., Yates, A.J., & Altizer, S. (2008) a). Virulence-transmission trade-offs and population divergence in virulence in a naturally occurring butterfly parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 7489-7494.

- De Roode, J.C., Pedersen, A.B., Hunter, M.D., & Altizer, S. (2008) b). Host plant species affects virulence in monarch butterfly parasites. *Journal of Animal Ecology*, **77**, 120-126.
- Ebert, D. & Bull, J.J. (2003) Challenging the trade-off model for the evolution of virulence: is virulence management feasible? *Trends in Microbiology*, **11**, 15-20.
- Ebert, D., Rainey, P., Embley, T.M., & Scholz, D. (1996) Development, life cycle, ultrastructure and phylogenetic position of *Pasteuria ramosa* Metchnikoff 1888: Rediscovery of an obligate endoparasite of *Daphnia magna* Straus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **351**, 1689-1701.
- Ewald, P.W. (1983) Host-parasite relations, vectors, and the evolution of disease severity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **14**, 465-485.
- Farman, M.L., Tosa, Y., Nitta, N., & Leong, S.A. (1996) MAGGY, a retrotransposon in the genome of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular & General Genetics*, **251**, 665-674.
- Felsenstein, J. (1985) PHYLOGENIES AND THE COMPARATIVE METHOD. *American Naturalist*, **125**, 1-15.
- Flor, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, **9**, 21.
- Galvani, A.P. (2003) Epidemiology meets evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**, 132-139.
- Gandon, S. (1998) The curse of the pharaoh hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **265**, 1545-1552.
- Gandon, S. & Michalakis, Y. (2000) Evolution of parasite virulence against qualitative or quantitative host resistance. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **267**, 985-990.
- Gandon, S., Jansen, V.A., & van Baalen, M. (2001) Host life history and the evolution of parasite virulence. *Evolution*, **55**, 1056-1062.
- Gandon, S., van Baalen, M., & Jansen, V.A.A. (2002) a). The evolution of parasite virulence, superinfection, and host resistance. *American Naturalist*, **159**, 658-669.
- Gandon, S., Agnew, P., & Michalakis, Y. (2002) b). Coevolution between parasite virulence and host life-history traits. *American Naturalist*, **160**, 374-388.
- Gandon, S. & Day, T. (2003) Understanding and managing pathogen evolution: a way forward. *Trends in Microbiology*, **11**, 206-207.
- Gandon, S. (2004) Evolution of multihost parasites. *Evolution*, **58**, 455-469.
- Gilchrist, M.A. & Sasaki, A. (2002) Modeling host-parasite coevolution: A nested approach based on mechanistic models. *Journal of Theoretical Biology*, **218**, 289-308.
- Gilchrist, M.A., Sulsky, D.L., & Pringle, A. (2006) Identifying fitness and optimal life-history strategies for an asexual filamentous fungus. *Evolution*, **60**, 970-979.
- Goto, K. (1963) Estimating losses from rice blast in Japan. In IRRI, pp. 195-202. Johns

- Hopkins Press, Baltimore.
- Gould, S.J. & Lewontin, R.C. (1979) Spandrels of San-Marco and the Panglossian paradigm: A critique of the adaptationist program. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **205**, 581-598.
- Gout, L., Kuhn, M.L., Vincenot, L., Bernard-Samain, S., Cattolico, L., Barbetti, M., Moreno-Rico, O., Balesdent, M.H., & Rouxel, T. (2007) Genome structure impacts molecular evolution at the AvrLm1 avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environmental Microbiology*, **9**, 2978-2992.
- Hamer, J.E., Howard, R.J., Chumley, F.G., & Valent, B. (1988) A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science*, **239**, 288-290.
- Hammerschmidt, R. (2006) Hemibiotrophic growth: Combining two forms of fungal parasitism. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **69**, 1-2.
- Hoisington, D. (1992) Laboratory protocols. *CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Mexico DF*.
- Howard, R.J. & Ferrari, M.A. (1989) Role of melanin in appressorium function. *Experimental Mycology*, **13**, 403-418.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H., & Money, N.P. (1991) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 11281-11284.
- Howard, R.J. & Valent, B. (1996) Breaking and entering: Host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*, **50**, 491-512.
- Iwasa, Y. (2000) Dynamic optimization of plant growth. *Evolutionary Ecology Research*, **2**, 437-455.
- Jensen, K.H., Little, T., Skorpung, A., & Ebert, D. (2006) Empirical support for optimal virulence in a castrating parasite. *Plos Biology*, **4**, 1265-1269.
- Kamo, M. & Boots, M. (2004) The curse of the pharaoh in space: free-living infectious stages and the evolution of virulence in spatially explicit populations. *Journal of Theoretical Biology*, **231**, 435-441.
- Kankanala, P., Czymmek, K., & Valent, B. (2007) Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *Plant Cell*, **19**, 706-724.
- Kato, H. (1974) Epidemiological aspect of sporulation by blast fungus on rice plants. *Jap Agric Res Quaternally*, **8**.
- Kato, H., Kosaka, H., & Hara, S. (1928) On the affinity of rice varieties as shown by the fertility of rice plants. *Centr Agric Kyushu Imp Univ*, **2**, 241-276.
- Katsubev, T. & Koschimizu, Y. (1970) Influence of blast disease on harvests in Rice plant. 1. Effects of panicle infection on yield components and quality. *Bulletin of Tohoku National Agriculture Experimental Station*, **39**, 55-96.
- Khush, G.S. (2005) What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology*, **59**, 1-6.

- Kokko, H. (2007) *Modelling for field biologists and other interesting people* Cambridge University Press, New York.
- Kolmer, J.A. (1996) Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual Review of Phytopathology*, **34**, 435-455.
- Kozlowski, J. (1992) Optimal Allocation of Resources to Growth and Reproduction - Implications for Age and Size at Maturity. *Trends in Ecology & Evolution*, **7**, 15-19.
- Lehman, J.S. & Shaner, G. (1997) Selection of populations of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* for shortened latent period on a partially resistant wheat cultivar. *Phytopathology*, **87**, 170-176.
- Lenski, R.E. & May, R.M. (1994) The Evolution of Virulence in Parasites and Pathogens: Reconciliation Between Two Competing Hypotheses. *Journal of Theoretical Biology*, **169**, 253-265.
- Lepoivre, P., ed. (2003) *Phytopathologie, bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*, pp 427. De Boeck Université, Bruxelles.
- Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M., & Walker, A.S. (2007) Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*, **63**, 688-698.
- Lindhout, P. (2002) The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica*, **124**, 217-226.
- Lopez-Villavicencio, M., Jonot, O., Coantic, A., Hood, M.E., Enjalbert, J., & Giraud, T. (2007) Multiple infections by the anther Smut pathogen are frequent and involve related strains. *Plos Pathogens*, **3**, 1710-1715.
- McDonald, B.A. & Linde, C. (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 349-379.
- McNamara, J.M., Houston, A.I., & Collins, E.J. (2001) Optimality models in behavioral biology. *Siam Review*, **43**, 413-466.
- Messenger, S.L., Molineux, I.J., & Bull, J.J. (1999) Virulence evolution in a virus obeys a trade-off. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **266**, 397-404.
- Metz, J.A.J., Mylius, S.D., & Diekmann, O. (2008) When does evolution optimize? *Evolutionary Ecology Research*, **10**, 629-654.
- Mideo, N., Alizon, S., & Day, T. (2008) Linking within- and between-host dynamics in the evolutionary epidemiology of infectious diseases. *Trends in Ecology & Evolution*, **23**, 511-517.
- Montarry, J., Glais, I., Corbiere, R., & Andrivon, D. (2008) Adaptation to the most abundant host genotype in an agricultural plant-pathogen system - potato late blight. *Journal of Evolutionary Biology*, **21**, 1397-1407.
- Motulsky, H.J. & Christopoulos, A. (2004) *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression* Oxford University Press, New York, USA.

- Mundt, C.C. (2002) Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 381-410.
- Nidelet, T. & Kaltz, O. (2007) Direct and correlated responses to selection in a host-parasite system: Testing for the emergence of genotype specificity. *Evolution*, **61**, 1803-1811.
- Nukina, M. (1998). On the phylogenetic correlations of phytotoxins and related metabolites among blast disease fungi. In *Molecular genetics of host-specific toxins in plant disease*. Kluwer Academic Publishers, London.
- Oliver, R.P. & Ipcho, S.V.S. (2004) Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology*, **5**, 347-352.
- Ou, S.H. (1985) *Rice diseases* Commonwealth Mycological Institute, Wallington, England.
- Pariaud, B., Robert, C., Goyeau, H., & Lannou, C. (2009) Aggressiveness Components and Adaptation to a Host Cultivar in Wheat Leaf Rust. *Phytopathology*, **99**, 869-878.
- Parker, G.A. & Smith, J.M. (1990) Optimality Theory in Evolutionary Biology. *Nature*, **348**, 27-33.
- Paul, R.E.L., Lafond, T., Muller-Graf, C.D.M., Nithiuthai, S., Brey, P.T., & Koella, J.C. (2004) Experimental evaluation of the relationship between lethal or non-lethal virulence and transmission success in malaria parasite infections. *Bmc Evolutionary Biology*, **4**, 30-42.
- Perrin, N. & Sibly, R.M. (1993) Dynamic-Models of Energy Allocation and Investment. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 379-410.
- Philibert, A., Desprez-Loustau, M.-L., Fabre, B., Frey, P., Halkett, F., Husson, C., Lung-Escarmant, B., Marçais, B., Vacher, C., & Makowski, D. (2010) Predicting invasion success in forest pathogenic fungi from species traits. *Journal of Applied Ecology*, Submitted.
- Plank, J.E.V.d. (1968) *Disease resistance in plants*. Academic Press, New York.
- Polakova, S., Blume, C., Zarate, J.A., Mentel, M., Jorck-Ramberg, D., Stenderup, J., & Piskur, J. (2009) Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 2688-2693.
- Poulin, R. & Combes, C. (1999) The concept of virulence: Interpretations and implications - Comment. *Parasitology Today*, **15**, 474-475.
- R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Restif, O. & Koella, J.C. (2003) Shared control of epidemiological traits in a coevolutionary model of host-parasite interactions. *American Naturalist*, **161**, 827-836.
- Roff, D.A. (1992) *The evolution of life histories : theory and analysis*. Chapman and Hall, New York.
- Sabelis, M.W. & Metz, J.A.J. (2002) a). Taking stock: Relating theory to experiment. In *Adaptive dynamics of infectious diseases: in pursuit of virulence management* (ed J.A.J.M. U. Dieckmann), pp. 379-398. Cambridge University Press, New York.

- Sabelis, M.W. & Metz, J.A.J. (2002) b). Perspectives for virulence management: Relating theory to experiment. *Interim Report IIASA*, **IR-02-009**, 1-17.
- Salvaudon, L., Heraudet, V., & Shykoff, J.A. (2005) Parasite-host fitness trade-offs change with parasite identity: Genotype-specific interactions in a plant-pathogen system. *Evolution*, **59**, 2518-2524.
- Salvaudon, L., Heraudet, V., & Shykoff, J.A. (2007) Genotype-specific interactions and the trade-off between host and parasite fitness. *Bmc Evolutionary Biology*, **7**, 189-199.
- Samborski, D.J., ed. (1985) *Wheat leaf rust*. Academic press, Orlando.
- Sasaki, A. & Iwasa, Y. (1991) Optimal-Growth Schedule of Pathogens within a Host - Switching between Lytic and Latent Cycles. *Theoretical Population Biology*, **39**, 201-239.
- Seppala, O., Liljeroos, K., Karvonen, A., & Jokela, J. (2008) Host condition as a constraint for parasite reproduction. *Oikos*, **117**, 749-753.
- Shaner, G., Ohm, H.W., & Finney, R.E. (1978) Response of susceptible and slow leaf-rusting wheats to infection by *Puccinia recondita*. *Phytopathology*, **68**, 471-475.
- Shaner, G., Stromberg, E.L., Lacy, G.H., Barker, K.R., & Pirone, T.P. (1992) Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annual Review of Phytopathology*, **30**, 47-66.
- Smith, J.M. (1978) Optimisation theory in evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **9**, 31-56.
- Smith, T. (1904) Some problems in the life-history of pathogenic microorganism. *Science*, **20**.
- Stearns, S.C. (1992) *The evolution of life histories* Oxford University Press, New York.
- Stearns, S.C. & Koella, J.C., eds. (2008) *Evolution in health and disease*, Second edition edn, pp 374. Oxford University Press, New York.
- Stuthman, D.D. (2002) Contribution of durable disease resistance to sustainable agriculture. *Euphytica*, **124**, 253-258.
- Talbot, N.J. (1995) Having a blast: exploring the pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Trends in Microbiology*, **3**, 9-16.
- Tenjo, F.A. & Hamer, J.E. (2002). Pathogenic development in *Magnaporthe grisea*. In *Molecular biology of fungal development*, pp. 399-418.
- Thomas, F., Adamo, S., & Moore, J. (2005) Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behavioural Processes*, **68**, 185-199.
- Valent, B. (2004) Plant disease - Underground life for rice foe. *Nature*, **431**, 516-517.
- Vergne, E. (2007) Analyse des systèmes inductibles et préformés de défense du riz à *Magnaporthe oryzae* au travers de l'expression de gènes. Thèse, Université de Montpellier II.
- Wang, Z.Y., Jenkinson, J.M., Holcombe, L.J., Soanes, D.M., Veneault-Fourrey, C., Bhambra, G.K., & Talbot, N.J. (2005) The molecular biology of appressorium turgor generation by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Biochemical Society Transactions*, **33**, 384-388.

- West, J.S., Kharbanda, P.D., Barbetti, M.J., & Fitt, B.D.L. (2001) Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology*, **50**, 10-27.
- Xu, J.R., Peng, Y.L., Dickman, M.B., & Sharon, A. (2006) The dawn of fungal pathogen genomics. *Annual Review of Phytopathology*, **44**, 337-366.
- Zeigler, R.S., Pantoja, A., Duque, M.C., & Weber, G. (1994) Characteristics of resistance in rice to *Rice-Hoja-Blanca-Virus* (RHBV) and its vector, *Tagosodes orizicolus* (MUIR) *Annals of Applied Biology*, **124**, 429-440.

6. Annexes

6.1 Développements mathématiques du « modèle2 ».....	110
6.1.1 Résolution du modèle n'intégrant pas de capacité limite (K).....	110
6.1.2 Résolution du modèle intégrant une capacité limite (K).....	112
6.2 Protocoles expérimentaux de « l'expérience nécrotrophe ».....	115
6.2.1 Semi et culture du riz.....	115
6.2.2 Culture et conservation de <i>Magnaporthe oryzae</i>	116
6.2.3 Inoculation du riz par <i>Magnaporthe oryzae</i>	117
6.2.4 Prélèvements et stockage des échantillons.....	118
6.2.5 Extraction de l'ADN des échantillons.....	119
6.2.6 PCR quantitative sur l'ADN du champignon.....	121
6.3 Projets empiriques en cours de réalisation.....	124
6.3.1 Etude expérimentale de la stratégie d'allocation des ressources entre la croissance et la sporulation chez un pathogène capable d'exploiter une quantité potentiellement infinie des ressources de l'hôte.....	124
6.3.2 Analyse comparative des déterminants de la période de latence chez les champignons phytopathogènes.....	147

6. Annexes

6.1 Développements mathématiques du « modèle 2 » (§ 2.3)

6.1.1 Résolution du modèle n'intégrant pas de capacité limite (K)

Le modèle :

$$\begin{aligned}\frac{dM}{da} &= \alpha(1-u(a))M - \gamma M \\ \frac{dS}{da} &= \delta u(a)M\end{aligned}\quad (1)$$

On cherche à maximiser la valeur sélective :

$$\Phi = \int_0^{\infty} u(a) \delta M(a) e^{-\mu a} da.$$

Résolution du modèle :

On divise l'équation (1) par $(\alpha - \gamma)$:

$$\begin{aligned}\frac{1}{\alpha - \gamma} \frac{dM}{da} &= \frac{1}{\alpha - \gamma} [\alpha(1-u(a))M - \gamma M] \\ \frac{dM}{d(\alpha - \gamma)a} &= \left(1 - \frac{\alpha}{\alpha - \gamma} u(a)\right) M\end{aligned}$$

On remplace $(\alpha - \gamma)a$ par t et $\frac{\alpha}{\alpha - \gamma}$ par ξ et on obtient :

$$\frac{dM}{dt} = (1 - \xi u(a)) M$$

On écrit le Hamiltonien :

$$H = \lambda (1 - \xi u(t)) M + e^{-\mu t} u M$$

$$H = u (e^{-\mu t} M - \lambda \xi M) + \lambda M$$

Avec λ la variable adjointe, qui suit :

$$\lambda = -\frac{\partial^2 H}{\partial M} = -e^{-\mu t} u - \lambda (1 - \xi u)$$

La théorie du contrôle optimale dit qu'il faut choisir la fonction $u(t)$ tel qu'elle maximise le Hamiltonien à tous les temps :

$$u(t) = \text{Heavyside}(e^{-\mu t} M - \lambda \xi M)$$

Pour avoir un contrôle singulier, il faut que l'argument de la fonction Heavyside soit nul, c'est-à-dire :

$$\lambda = \frac{e^{-\mu t}}{\xi} \Rightarrow \dot{\lambda} = -\mu \lambda$$

En identifiant ce $\dot{\lambda}$ avec $\dot{\lambda} = -e^{-\mu t} u - \lambda(1 - \xi u)$ et $\lambda = \frac{e^{-\mu t}}{\xi}$, on trouve qu'il faut :

$$\mu = 1$$

Ce qui n'a pas de raison de se produire.

On a donc sûrement des situation bang-bang-bang-bang-... En effet, si l'on suppose que l'on a une stratégie bang-bang « pur » ($u=0$ puis $u=1$, ou inversement) avec un switch au temps

$t = t_s$ on a :

$$\forall t \in [0, t_s], u(t) = 0 \Rightarrow M(t) = M_0 e^t$$

$$\forall t \in (t_s, +\infty), u(t) = 1 \Rightarrow M(t) = M(t_s) e^{(1-\xi)(t-t_s)} = M_0 e^{(1-\xi)t + \xi t_s}$$

Donc la quantité à maximiser (notons J) vaut :

$$J = \int_0^{+\infty} \alpha e^{-\mu \tau} u(\tau) M(\tau) d\tau$$

$$J = \frac{M_0 e^{\xi t_s}}{1 - \xi - \mu} \left(e^{(1-\xi-\mu)\infty} - e^{(1-\xi-\mu)t_s} \right)$$

Si $(1 - \xi - \mu) > 0$, $J \rightarrow \infty$ pour tous les t_s .

De plus on peut montrer que :

$$\frac{\partial J}{\partial t_s} > 0$$

Donc plus on attend pour switcher plus J sera grand.

Si $(1 - \xi - \mu) < 0$, alors :

$$J = \frac{e^{(1-\mu)t_s}}{\mu + \xi - 1}$$

A nouveau il y a deux possibilités. Si $\mu > 1$ alors J est décroissant de t_s et il faut choisir $t_s = 0$ ou $u = 1$ tout le temps.

Si $\mu < 1$, à nouveau J est croissant de t_s et plus on attend pour switcher plus J est grand.

Aux vues de l'analyse ci-dessus, il semble que la problème a été mal posé.

6.1.2 Résolution du modèle intégrant une capacité limite (K)

Le modèle :

$$\frac{dM}{da} = (1 - u(a))\left[\alpha M\left(1 - \frac{M}{K}\right)\right] - \gamma M$$

$$\frac{dS}{da} = u(a)\left[\delta M\left(1 - \frac{M}{K}\right)\right]$$

On cherche à maximiser la valeur sélective :

$$\Phi = \int_0^{\infty} u(a)\left[\delta M(a)\left(1 - \frac{M(a)}{K}\right)\right]e^{-\mu a} da.$$

Résolution du modèle :

On peut écrire le Hamiltonien :

$$H = \frac{d\Phi}{dt} + \lambda_M \frac{dM}{dt}$$

$$\text{Soit } H = u\left[\delta M\left(1 - \frac{M}{K}\right)\right]e^{-\mu\tau} + \lambda_M \left[(1 - u)\left[\alpha M\left(1 - \frac{M}{K}\right)\right] - \gamma M \right]$$

$$\text{Ou encore } H = u \left[M\left(1 - \frac{M}{K}\right) \left(\delta e^{-\mu\tau} - \alpha \lambda_M \right) \right] + \lambda_M \left[\alpha M\left(1 - \frac{M}{K}\right) - \gamma M \right]$$

$$H = M\left(1 - \frac{M}{K}\right) \left[u \left(\delta e^{-\mu\tau} - \alpha \lambda_M \right) + \alpha \lambda_M \right] - \lambda_M \gamma M$$

Avec λ_M la variable adjointe qui suit :

$$\dot{\lambda}_M = -\frac{\partial H}{\partial M} = -\left(1 - \frac{2M}{K}\right) \left[u \left(\delta e^{-\mu\tau} - \alpha \lambda_M \right) + \alpha \lambda_M \right] + \lambda_M \gamma$$

Si on a un contrôle singulier alors il doit respecter :

$$\frac{\partial H}{\partial u} = M\left(1 - \frac{M}{K}\right) \left(\delta e^{-\mu\tau} - \alpha \lambda_M \right) = 0 \Leftrightarrow \lambda_M = \frac{\delta}{\alpha} e^{-\mu\tau}$$

Ceci est vrai quelque soit τ et on a

$$\frac{\partial}{\partial \tau} \left(\frac{\partial H}{\partial u} \right) = 0$$

$$\Leftrightarrow M \left(1 - \frac{M}{K} \right) (\delta e^{-\mu \tau} - \alpha \lambda_M)' + \left[M \left(1 - \frac{M}{K} \right) \right]' (\delta e^{-\mu \tau} - \alpha \lambda_M) = 0$$

$$\Leftrightarrow M \left(1 - \frac{M}{K} \right) (-\delta \mu e^{-\mu \tau} - \alpha \dot{\lambda}_M) + \dot{M} \left(1 - \frac{2M}{K} \right) (\delta e^{-\mu \tau} - \alpha \lambda_M) = 0$$

$$\Leftrightarrow M \left(1 - \frac{M}{K} \right) \left(-\delta \mu e^{-\mu \tau} - \alpha \left(- \left(1 - \frac{2M}{K} \right) [u (\delta e^{-\mu \tau} - \alpha \lambda_M) + \alpha \lambda_M] + \lambda_M \gamma \right) \right) + \dot{M} \left(1 - \frac{2M}{K} \right) (\delta e^{-\mu \tau} - \alpha \lambda_M) = 0$$

Considérant que $\alpha \lambda_M = \delta e^{-\mu \tau}$ et $M \neq 0 \neq K$ le système se simplifie grandement pour donner :

$$\frac{\partial}{\partial \tau} \left(\frac{\partial H}{\partial u} \right) = 0$$

$$\Leftrightarrow -\delta \mu e^{-\mu \tau} - \alpha \gamma \lambda_M + \alpha^2 \lambda_M \left(1 - \frac{2M}{K} \right) = 0$$

$$\Leftrightarrow -\mu \alpha \lambda_M - \alpha \gamma \lambda_M + \alpha^2 \lambda_M \left(1 - \frac{2M}{K} \right) = 0$$

$$\frac{\partial}{\partial \tau} \left(\frac{\partial H}{\partial u} \right) = 0$$

$$\Leftrightarrow \alpha \lambda_M \left(-\mu - \gamma + \alpha \left(1 - \frac{2M}{K} \right) \right) = 0$$

$$\Leftrightarrow M = \frac{K}{2} (\alpha - \mu - \gamma)$$

On remarque au passage que l'expression de M est positive seulement si $\alpha > (\mu + \gamma)$.

Lors du contrôle singulier on a donc $\dot{M} = 0$ ce qui équivaut successivement à

$$(1-u) \left[\alpha M \left(1 - \frac{M}{K} \right) \right] - \gamma M = 0$$

$$(1-u) \left(\alpha \frac{K}{2} (\alpha - \mu - \gamma) \left(1 - \frac{1}{2} (\alpha - \mu - \gamma) \right) \right) - \gamma \frac{K}{2} (\alpha - \mu - \gamma) = 0$$

$$(1-u) \left(\alpha \left(1 - \frac{1}{2} (\alpha - \mu - \gamma) \right) \right) - \gamma = 0$$

Soit

$$u = \frac{\alpha \left(1 - \frac{1}{2} (\alpha - \mu - \gamma) \right) - \gamma}{\alpha \left(1 - \frac{1}{2} (\alpha - \mu - \gamma) \right)}$$

Et si on considère $\alpha = 1$, on retombe sur une expression beaucoup plus simple de u :

$$u = \frac{1 + \mu - \gamma}{1 + \mu + \gamma}.$$

La production instantanée de spore équivaut alors à :

$$\begin{aligned} \frac{dS}{da} &= u^* \left[\delta M \left(1 - \frac{M}{K} \right) \right] \\ \frac{dS}{da} &= \left(\frac{\alpha \left(1 - \frac{1}{2}(\alpha - \mu - \gamma) \right) - \gamma}{\alpha \left(1 - \frac{1}{2}(\alpha - \mu - \gamma) \right)} \right) \left[\delta \frac{K}{2} (\alpha - \mu - \gamma) \left(1 - \frac{1}{2}(\alpha - \mu - \gamma) \right) \right] \\ \frac{dS}{da} &= \left(1 - \frac{1}{2}(\alpha - \mu - \gamma) - \gamma / \alpha \right) \left(\delta \frac{K}{2} (\alpha - \mu - \gamma) \right) \end{aligned}$$

Si $\alpha = 1$

$$\frac{dS}{da} = \delta \frac{K}{4} (1 + \mu - \gamma)(1 - \mu - \gamma).$$

6.2 Protocoles expérimentaux de « l'expérience nécrotrophe »

6.2.1 Semis et culture du riz

Objectif : semis et culture du riz en serre ou phytotron de plantes jusqu'à 5 semaines d'âge.

Réactifs (chimiques et biologiques) :

Terreau (Neuhaus S) pH4 à 4.5 70 l.

Pouzzolane 2 pelles pour 70 l de terreau.

Engrais et éléments minéraux :

-Algospeed

-Ferveg 6

Contenu du mode opératoire :

1. Semis

Si possible, sortir les semences 1 à 2 h avant le semis. Mélanger le terreau et la pouzzolane à la pelle. Remplir les terrines du mélange. Tracer des sillons de semis à l'aide de la planche métallique prévue à cet effet. Déposer les grains dans les sillons de semis et recouvrir de mélange. Tasser légèrement. Remettre les semences à leur place en chambre froide. Mettre les initiales de l'utilisateur et le n° de manipulation sur l'étiquette en haut à gauche de chaque terrine.

2. Entretien de la culture

Fumure de démarrage : Préparer un mélange d'Algospeed (176 g/l) et de Ferveg 6 (12.5 g/l).

Cette solution mère est diluée (1 %) et distribuée par des pompes DOSATRON (réglées à 1%). Chaque terrine est ainsi arrosée avec 1 l de la solution diluée une fois par semaine.

Arrosage : maintenir toujours très humide mais sans que le terreau soit détrempé (le riz n'aime pas l'excès d'eau).

3. Conditions de culture des plantes

L'hygrométrie est de l'ordre de 65 à 70 % de jour comme de nuit. La température maximum est de 29°C pour le jour et de 21°C pour la nuit. L'éclairage est de 400-600 W/m² sur un temps maximum de 12 heures.

6.2.2 Culture et conservation de *Magnaporthe oryzae*

Objectif : culture et conservation d'isolats de *Magnaporthe oryzae* en laboratoire.

Principe de la méthode : culture des isolats sur milieu solide réalisé à partir de farine de riz et conservation des isolats sur du papier filtre mis sous vide et stocké à -20°C .

Réactifs (chimiques et biologiques) :

Milieu de culture :

-agar 15 g/l

-farine de riz 20 g/l

-extrait de levure 1.5 g/l

-antibiotique : Pénicilline G 500000 U/l

Alcool.

Contenu du mode opératoire :

Couler en boîte de Pétri le milieu de culture et laisser prendre sous hotte. Un stock peut être réalisé et placé en boîte métal à température ambiante, il sera réapprovisionné en fonction de la demande.

1. Culture d'un isolat

Récupérer à -20°C un sachet plastique de conservation de l'isolat souhaité. Ouvrir le sachet sous hotte à l'aide d'un ciseau. Déplier le sachet stérile en papier et à l'aide d'une pince récupérer un morceauensemencé de filtre (Whatmann N°5). Promener le bout de filtre sur la moitié de la surface de la boîte de Pétri, faceensemencée coté gélose, puis déposer le morceau de filtre au centre de cette moitié de boîte. Répéter les mêmes opérations à l'aide d'un nouveau morceau de filtreensemencé sur l'autre moitié de boîte. Fermer la boîte puis la sceller avec du ruban adhésif (Teasa® 5280) pour limiter l'évaporation. Référencer la boîte. Ranger le sachet stérile en papier dans une nouvelle gaine de plastique, faire le vide, souder puis replacer au congélateur à -20°C . Placer la boîte en chambre de culture à 25°C . Contrôler la culture du champignon régulièrement. Une culture sporulante optimale est généralement obtenue dix jours après mise en culture.

2. Conservation d'un isolat

Placer le papier filtre stérile (Whatmann N°5) sur le milieu de culture d'une boîte de Pétri neuve. Prélever dans une boîte de Pétriensemencée, en front de culture, un bout de gélose colonisé par l'isolat que l'on veut conserver. Ecraser sur toute la surface du papier filtre le

bout de gélose colonisé. Fermer, référencer et placer la boîte en chambre de culture à 25°C. Contrôler la culture du champignon régulièrement. Si la culture est correcte enlever le papier après 7 jours et le mettre dans une boîte de Pétri stérile vide. Placer celle-ci à 37°C pendant quatre jours pour déshydratation. Quatre jours plus tard découper en petits morceaux le papier filtre colonisé par le champignon. Référencer les sachets stériles en papier. Placer une vingtaine de morceaux de papier filtreensemencés dans le sachet papier, puis le fermer en le repliant deux fois sur lui-même. Glisser le sachet en papier dans 1 sachet plastique, faire le vide, souder et stocker à -20°C.

Contraintes à respecter :

Tout le matériel doit être stérile et la manipulation s'effectue sous hotte.

Après isolement, la mise en conservation de l'isolat correspondant se fait en assez grosse quantité de manière à disposer d'un stock suffisant par la suite. Un sachet est mis en réserve et ne doit être utilisé qu'en cas de force majeure. Les autres mises en conservation se lancent au moment où il ne reste plus qu'un sachet disponible au sein des stocks d'utilisation.

S'assurer que tout le matériel stérile est disponible avant d'entamer la manipulation.

6.2.3 Inoculation du riz par *Magnaporthe oryzae*

Objectif : préparation d'inoculum et inoculation du riz avec un isolat de *Magnaporthe oryzae*.

Principe de la méthode : mettre des conidies de *Magnaporthe oryzae* en suspension dans de l'eau gélosée pour réaliser l'inoculation des plants de riz.

Réactifs (chimiques et biologiques) :

Boîte(s) de Pétriensemencée(s) depuis une dizaine de jours avec l'isolat que l'on souhaite inoculer

H₂O stérile (autoclavé)

Gélatine 1 %

Contraintes de la méthode : Prévoir environ dix jours avant la date d'inoculation, la culture de l'isolat (un peu plus si sa sporulation est plus lente).

Tenir compte de la quantité de terrines à inoculer et de la concentration finale souhaitée pour l'inoculum afin de déterminer le nombre de boîtes de culture à lancer.

Préparer l'H₂O gélatinée (1 %) quelques heures à l'avance, pour la laisser refroidir avant la préparation finale de l'inoculum.

Contenu du mode opératoire :

1. Préparation de l'inoculum

Déposer sur l'isolat en culture 5mL d'H₂O stérile. Racler le mycélium à l'aide d'un étaloir pour mettre en suspension la culture. Récupérer la suspension dans 1 tube en filtrant sur entonnoir + gaze. Utiliser la cellule de Malassez pour quantifier la concentration de cette solution mère : à l'aide d'une pipette prélever environ 500µl de suspension de spores vortexée. Déposer ces 500 µl sur la cellule de Malassez et placer dessus une lamelle. Attendre 1 min environ, le temps que les spores s'immobilisent sur la surface de la cellule, puis procéder au comptage sous microscope : lorsque l'on compte 5 des quadrillages présents sur la cellule de Malassez, la multiplication du chiffre obtenu par 20000 donne la concentration en spores/ml de la suspension préparée. Pour obtenir la solution final d'inoculum, diluer la solution mère avec de l'eau stérile et ajouter une solution de gélatine de manière à obtenir environ 40 mL d'inoculum de concentration 25000 spores/mL, gélosée entre 0.5 et 1 %.

2. Inoculation

Préparer l'enceinte climatique devant recevoir les plantes inoculées (chauffage et brumisation). Ouvrir le robinet de pression du pistolet pneumatique et mettre en route l'aspiration de l'enceinte d'inoculation. Placer la terrine à inoculer sur le plateau tournant de l'enceinte d'inoculation. Pulvériser les 20 ml d'inoculum à l'aide du pistolet pneumatique tout en faisant tourner la terrine, afin de toucher la totalité du feuillage, de manière homogène. Tout de suite après placer les bacs dans l'enceinte climatique, en ambiance humide et obscure, à une température de 25°C. 12 h plus tard transférer la terrine dans le phytotron prévu pour plantes infectées.

6.2.4 Prélèvements et stockage des échantillons

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide de ciseaux de dissection. Les ciseaux ont été stérilisés à l'alcool et à la flamme entre chaque prélèvement. Pour chaque prélèvement, le plant de riz a été coupé, puis trois lésions appartenant à notre cohorte d'intérêt au maximum ont été prélevées sur une même feuille. Comme les lésions ont des tailles différentes et une forme plus ou moins allongée, la taille des prélèvements n'a pas pu être standardisée. Les

échantillons sont stockés individuellement dans des tubes eppendorf de 1.5mL. Les tubes eppendorf sont ensuite stockés, bouchon ouvert, dans des grandes boîtes en plastiques hermétiques contenant du Silicagel, pour dessiccation.

6.2.5 Extraction de l'ADN des échantillons

Objectif : extraction d'ADN de riz et de *Magnaporthe oryzae in planta* en tube 1.5mL.

Principe de la méthode : extraction de l'ADN à l'aide du MATAB et du chloroforme puis précipitation de l'ADN à l'isopropanol.

Réactifs (chimiques et biologiques) :

Azote liquide

MATAB (« Mixed alkyltrimethyl amonium bromide ») à 65°C

Chloroforme

Isopropanol

Ethanol 70% à 4°C

H2O ultra pure

Préparation de la solution de MATAB :

Les quantités de réactifs indiquées permettent de réaliser 500mL de solution de MATAB. Ajouter les réactifs dans l'ordre et chauffer pour dissoudre les solides.

50	ml	Tris HCl (1M, pH=8)
87.5	ml	NaCl (4M)
50	ml	EDTA (0.5M, pH=8)
5	g	MATAB (Mixed AlkylTrimethyl Amonium Bromide)
1.25	g	Na ₂ SO ₃
qsp 500ml		H2O

Contraintes de la méthode :

Placer la solution de MATAB en étuve 65°C environ 1h avant l'extraction.

Travailler avec un nombre pair de tubes pour équilibrer le broyeur puis les centrifugeuses.

Hygiène et sécurité :

Retirer les objets de l'azote liquide avec des pinces et les manipuler en portant des tridigants. Des lunettes sont conseillées lorsqu'on manipule les tubes eppendorfs qui sortent de l'azote car les billes sont susceptibles de sauter.

Mettre des gants de protection contre le MATAB et le chloroforme, qui sont irritants pour la peau, nocifs par inhalation et ingestion.

Pendant l'extraction, manipuler sous sorbonne jusqu'à l'élimination du dernier surnageant.

Contenu du mode opératoire :

1. Broyage des échantillons

Sortir les tubes de prélèvements de -80°C et les plonger dans l'azote. Placer les tubes de prélèvement, de façon équilibrée, dans deux portoirs bleus sans le fond puis les remettre dans l'azote. Allumer le broyeur à plaques RETSCH. Retirer les tubes de l'azote à l'aide de pinces et les placer entre les supports de l'adaptateur set. Placer le tout entre les mâchoires de l'appareil. Visser les molettes et enclencher les viroles de protection. Attention à toujours charger les 2 mâchoires. Baisser le capot de protection. Régler le broyeur sur 0.30 minutes et une fréquence de 25/s puis lancer le broyage. Désenclencher les viroles de protection puis retirer les supports. Vérifier les échantillons et poursuivre l'alternance « Azote – Broyage » jusqu'à obtenir une poudre. Réaliser au maximum 4 à 5 broyages. Conserver les tubes avec la poudre sur des portoirs bleus dans l'azote jusqu'à l'extraction (il est possible de stocker les tubes de poudre à -80°C).

2. Extraction de l'ADN des échantillons

Sortir les tubes contenant les échantillons broyés de l'azote et réchauffer les capuchons avec la main avant de les ouvrir. Ajouter 450 μl de MATAB à 65°C . Bien agiter pour mélanger le MATAB et la poudre. Incuber 30 min à 65°C en agitant toutes les 10 min. Laisser refroidir. Sous sorbonne : ajouter 450 μl de chloroforme et agiter. Centrifuger 10min à 3000rpm. Renommer de nouveaux tubes en haut et en bas (pour limiter le risque d'effacement avec l'éthanol en fin d'extraction). Transférer 300 μl du surnageant dans les nouveaux tubes et jeter le reste dans la poubelle « Déchets Chloroforme ou solvants chlorés ». Ajouter 0.8 volumes d'isopropanol : (soit 240 μl d'isopropanol pour 300 μl de surnageant transféré) et agiter doucement (formation de pelote d'ADN). Centrifuger 30 min à 3000 tours/min. Eliminer le surnageant en renversant les tubes (le culot d'ADN reste collé au fond). Ajouter 300 μl d'éthanol 70%. Ne pas agiter. Centrifuger 10 min à 3000 tours/min. Eliminer l'éthanol en renversant les tubes sur la poubelle « Déchets éthanol ou solvants non chlorés » puis sur un papier absorbant. Placer les tubes dans le système « Speed Vac », piège sur froid, pendant 1

heure. Mettre en suspension dans 20µL d'eau ultra pure. Laisser resuspendre la nuit au réfrigérateur puis stocker à -20°C.

6.2.6 PCR quantitative sur l'ADN du champignon

Objectif : quantification de l'ADN mycélien de *Magnaporthe oryzae* présent dans une lésion par la méthode de PCR quantitative (Q-PCR) à partir de l'ADN préalablement extraite des lésions, à l'aide de sondes spécifiques « TAQMANN ».

Principe de la méthode : La PCR classique est une méthode d'amplification exponentielle qui permet de doser une séquence d'ADN cible. Ce dosage est dit semi-quantitatif car s'effectue en fin d'amplification (au moins 35 cycles) et donc au niveau de la phase plateau de la courbe d'amplification, zone relativement variable.

Comparée à une PCR classique, la Q-PCR en temps réel permet d'accéder à la quantité de produit de PCR tout au long de la réaction et non seulement en fin de réaction, ceci notamment au niveau de la zone de reproductibilité maximale de la courbe d'amplification, c'est à dire au début de la phase exponentielle. Pour chaque réaction Q-PCR, la donnée utile obtenue est le « Ct » ou « nombre de cycles Q-PCR minimum pour permettre la production d'une quantité de produit de Q-PCR détectable par rapport au bruit de fond ».

Il existe de nombreuses techniques de détection en Q-PCR, que l'on classe en deux grandes catégories : la détection non spécifique utilisant l'intercalant fluorescent de l'ADN « SYBR Green » et la détection spécifique qui utilise des sondes de différents types. Les méthodes de détection spécifique permettent de doser en même temps plusieurs cibles d'intérêt présentes dans le même échantillon. En pratique, il s'avère difficile de doser plus de deux cibles en même temps. Les sondes « TAQMANN » sont un type de sonde spécifique.

Le principe repose sur l'activité exonucléase 5'→3' de la Taq polymérase. La sonde est marquée en 5' par un fluorophore appelé « reporter » et en 3' par un autre type de fluorophore appelé « quencher ». Le spectre d'émission du reporter chevauche le spectre d'excitation du reporter. L'émission du reporter est donc éteinte (quenché) par la proximité du quencher.

Quand la sonde est dégradée par l'activité exonucléase 5'→3' de la Taq polymérase, les fluorophores ne sont plus reliés entre eux et l'émission du reporter est donc augmentée. Cette augmentation de fluorescence est proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la QPCR.

La sonde TAQMANN utilisée dans le cadre de cette expérience permettent de doser le champignon *in planta* en ciblant le transposon Maggy de *Magnaporthe oryzae*.

Réactifs (chimiques et biologiques) :

Kit qPCR MasterMix Plus Low ROX (référence : RT-QP2X-03+WOULR EUROGENTEC)

Amorces Maggy R et F

Séquence: -Maggy F : CCCGCTTAACGACCCTATGG

-Maggy R : GGCAACGAAATGTTCTTGGGATC

Sonde Maggy : 5' HEX + 3' Eclipse Dark Quencher (référence : OL-0361-0202/TA/DQ pour 0.2µmol). La sonde Maggy a été "designée" à l'aide du logiciel Beacondesigner. Elle a été commandée chez Eurogentech

ADN des échantillons sur lesquels on souhaite doser le gène Maggy

Eau distillée GIBCO « nuclease free »

Mélange réactionnel dans chaque puits :

MasterMix 2x	10 µl
Amorce Maggy R+F 1.25 µM	4 µl
Sonde Maggy 1.25 µM	2 µl
ADN	2 µl
H2O	qsp 20 µl

Contraintes de la méthode :

L'enzyme HGS présente dans le MasterMix est très sensible à la température.

Les sondes sont marquées et craignent donc la lumière. Les sortir du congélateur au dernier moment. Limiter l'éclairage de la pièce pendant la manipulation et protéger les tubes puis la plaque QPCR avec du papier d'aluminium.

Les plaques doivent être protégées de la lumière et conserver au réfrigérateur si elles ne sont pas directement analysées dans le thermocycleur.

Contenu du mode opératoire :

1-Préparation de la gamme étalon

La gamme étalon a été réalisée à partir d'ADN génomique de la souche SP168 à 20ng/µL de *Magnaporthe oryzae* et d'ADN génomique de la variété Azucena à 1 ng/µL d'*Oryza sativa*.

L'ADN a été préalablement chauffé à environ 50°C et du matériel en plastique « low

retention » a été utilisés pour réaliser les dilutions de manière à gagner en précision. La gamme étalon comprend 8 points dont les concentrations s'étalent entre 0 et 10000 pg/μL. Les détails de la préparation de la gamme étalon sont présentées dans le **tableau ?**.

Titre de la solution (pg/μL)	Volume de la solution de concentration supérieure à pipeter (μL)	Volume d'ADN d' <i>O.sativa</i> pipeter (μL)	Volume final disponible (μL)
10000	116	116	144
5000	88	88	144
1000	32	128	144
100	16	144	144
10	16	144	144
1	16	144	144
0.1	16	144	144

Tableau 6. Détail de la préparation de la gamme étalon.

2-Préparation d'une plaque QPCR

Préparer et déposer le mix dans la plaque QPCR sous la hotte « nuclease free ».

Dans un tube de volume adapté au nombre de plaque à préparer, ajouter le MasterMix, les amorces, les sondes Maggy et l'eau distillée. Vortexer et centrifuger. Déposer 18μL de ce mix dans chaque puits de la plaque à l'aide d'une pipette multi-distributrice.

Déposer la gamme étalon et les échantillons d'ADN en duplicat dans les puits. Déposer certains échantillons en triplicat pour un contrôle supplémentaire. Déposer également des témoins H₂O et plante saine pour pouvoir détecter d'éventuelles contaminations. Réaliser tous les dépôts de matrice avec des cônes à filtre de type « low retention ». Boucher les plaques avec les barrettes de bouchons en prenant garde à ne pas les contaminer. Vortexer et centrifuger très rapidement.

3-Lancement de la QPCR

Insérer la plaque dans le thermocycleur MxPro3005 et lancer le programme MxPro3005 sur l'ordinateur. Attribuer le dye HEX à Maggy et sélectionner également le dye ROX pour les corrections relatives aux erreurs sur la quantité de mix déposée dans les puits. Programmer un run de :

-10 min 95°C

-cycle x 40 :

Dénaturation de l'ADN 15 s 95°C

Hybridation des amorces 1 min 62°C

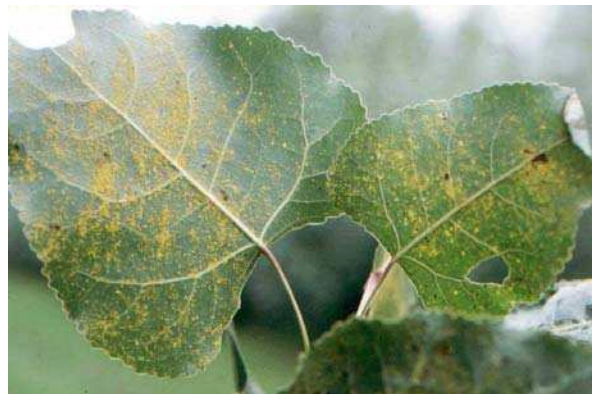
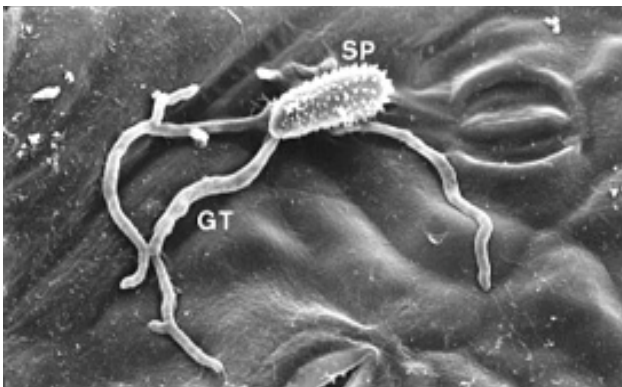
Elongation des fragments 1 min 72°C

6.3 Projets empiriques en cours de réalisation

6.3.1 Etude expérimentale de la stratégie d'allocation des ressources entre la croissance et la sporulation chez un pathogène capable d'exploiter une quantité potentiellement infinie des ressources de l'hôte

Dynamique d'infection parasitaire chez les plantes : confrontation des approches empirique et par modélisation

Etude du couple *Melampsora larici-populina* / peuplier



REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à Fabien Halkett, Bénédicte Fabre et Pascal Frey pour leur accueil au sein de l'équipe de pathologie forestière, leur disponibilité au cours de ces six semaines de stage et leur aide très précieuse pour la rédaction de ce rapport.

Je remercie Claude Husson pour ces conseils et son aide technique lors de mes manipulations.

Je remercie également tous ceux qui ont pris le temps de me conseiller lors de la réalisation de cette étude

Enfin, merci à toute l'équipe de pathologie forestière pour sa sympathie et son accueil.

SOMMAIRE

Introduction	127
I. Contexte	127
II. Pathosystème étudié	128
Matériels et méthodes	131
I. Démarche expérimentale	131
1. Description du matériel fongique et végétal	131
1.1 Gestion de l'isolat de <i>Melampsora larici-populina</i>	
1.2 Matériel végétal	
2. Inoculation et test de germination	131
3. Suivi du développement des lésions et prélèvement des disques	132
4. Traitement des disques inoculés	132
5. Quantification de croissance mycélienne et de la sporulation par les outils de la biologie moléculaire	133
5.1 Extraction d'ADN et mise au point du protocole expérimental	
5.2 PCR quantitative et mise au point du protocole expérimental	
5.3 Quantification du matériel fongique des échantillons par PCR quantitative	
II. Analyse statistiques – Calculs mathématiques	135
1. Mesure de l'efficacité d'infection	135
2. Comparaison des méthodes d'extraction	135
3. Le modèle mathématique	135
Résultats	137
I. Plan d'échantillonnage	137
II. Mise au point des protocoles	137
III. Taux de germination et efficacité d'infection	138
IV. Temps de latence	138
V. Caractérisation de la dynamique d'infection	138
Discussion	140
Conclusion et perspectives	142
Références bibliographiques	143
Annexe 1 : Présentation du laboratoire	144
Annexe 2 : Caractéristiques des amorces qPCR	145
Résumé – Abstract	146

INTRODUCTION

I. Contexte

Jusqu'à présent, les stratégies de protection des systèmes agricoles cultivés se sont principalement concentrées sur la régulation à court terme des dynamiques d'infection des ravageurs. Pour limiter la présence de ces parasites, de nombreux pesticides sont utilisés. Dans un contexte de protection de l'environnement, ces pratiques agricoles deviennent de moins en moins socialement et écologiquement acceptables. Afin de réduire l'utilisation de ces produits, de nouvelles stratégies de protection des cultures doivent donc être mises en place. Ces stratégies passent notamment par la gestion et l'exploitation des résistances naturelles des plantes. Jusqu'à présent, l'amélioration des plantes s'est concentrée sur la résistance qualitative (reposant sur le modèle gène-pour-gène). Or, de nombreuses études ont montré que de nombreux ravageurs et parasites sont capables de contourner ces résistances. Tant que le gène de résistance n'est pas contourné, la plante est immune. Par contre, une fois le gène de résistance contourné, la plante se montre souvent très sensible et cela conduit à des épidémies drastiques (Mac Donald, 2010). Il devient donc essentiel d'étudier plus en détail les interactions hôte-pathogène et de mieux comprendre les mécanismes de développement de ces agents. Cela permettra de proposer des stratégies de lutttes efficaces sur le long terme et de pouvoir mettre sur le marché des nouveaux cultivars de plante limitant l'impact des nuisibles.

Dans ce but, les améliorateurs se penchent donc de plus en plus vers l'utilisation de la résistance quantitative qui, même si elle est moins efficace, est supposée plus durable (l'intérêt des travaux menés s'inclut dans ce pré-supposé ; en effet, rien n'a été démontré à ce sujet et il est donc raisonnable de considérer que l'agent pathogène sera également capable de s'adapter à ce type de pression de sélection). Les améliorateurs étudient alors les paramètres de l'agressivité des agents pathogènes. L'agressivité peut être définie comme la composante quantitative du pouvoir pathogène. Elle décrit globalement la quantité de maladie causée par l'agent pathogène sur l'hôte. L'agressivité peut être mesurée à différentes échelles : à l'échelle du champs ou bien à l'échelle de la plante hôte (lésion). Lors de l'étude de l'agressivité à l'échelle de la lésion, plusieurs traits quantitatifs s'exprimant pendant l'interaction hôte-pathogène sont mesurés : l'efficacité d'infection, le temps de latence, la production de spores, la période infectieuse, la taille de la lésion, etc. (Pariaud *et al.*, 2009).

L'étude de ces mécanismes constitue un enjeu essentiel pour de nombreux systèmes cultivés, notamment la populiculture. Les Peupliers, bien que ne représentant en France que 240 000 ha (1,4 % de la surface boisée), sont, en effet, une espèce d'intérêt majeur pour la filière bois du fait de sa forte productivité. La bonne aptitude au bouturage généralement observée chez les Peupliers, a amené l'homme très tôt à utiliser des cultivars (clones). Cependant, cette culture est attaquée par de nombreux agents pathogènes, la faible variabilité génétique du matériel planté (plantations monoclonales, peu de cultivars commercialisés parfois même apparentés) accentuant l'importance du phénomène. La principale maladie des peupliers cultivés est la rouille, qui induit des défeuillaisons précoces et provoque de grosses pertes de rendement (jusqu'à 30% sur la croissance). Plusieurs espèces de champignon peuvent être responsables de cette maladie, mais la rouille causée par *Melampsora larici-polulina* (*Mlp*) est la plus fréquente et la plus dommageable en France (Gauvin *et al.*, 2006).

II. Le pathosystème étudié

1. Le peuplier

Le peuplier (genre *Populus*) appartient à la famille des Salicacées. C'est un arbre à la croissance très rapide et au feuillage caduc qui présente des fleurs groupées en chatons mâles ou femelles, les deux étant présents sur des arbres différents (espèce dioïque). Sa grande capacité de croissance et la possibilité de le multiplier par bouturage font de cet arbre un bon modèle d'étude.

L'introduction de *Populus deltoides*, espèce américaine, en Europe, au cours du XVIII^{ème} siècle, a conduit à des hybridations spontanées avec *P. nigra*, créant des hybrides appelés euraméricains, largement utilisés en populiculture. C'est ainsi qu'est apparu l'hybride *P. x euramericana* 'Robusta', cultivar qui a été cloné et diffusé, et qui est utilisé dans l'intégralité des observations effectués au cours de ce stage.

2. Melampsora larici-polulina (Mlp)

Melampsora larici-polulina, agent responsable de la rouille foliaire du peuplier, est un champignon phytopathogène appartenant à la classe des Hémibasidiomycètes et à l'ordre des Pucciniales. C'est un champignon pathogène biotrophe, qui se développe à l'intérieur d'un hôte vivant. *Mlp* est une espèce dite hétéroïque, c'est-à-dire qu'elle alterne entre deux plantes hôtes pour effectuer son cycle de vie : le mélèze, *Larix* sp, hôte écidien sur lequel s'effectue la reproduction

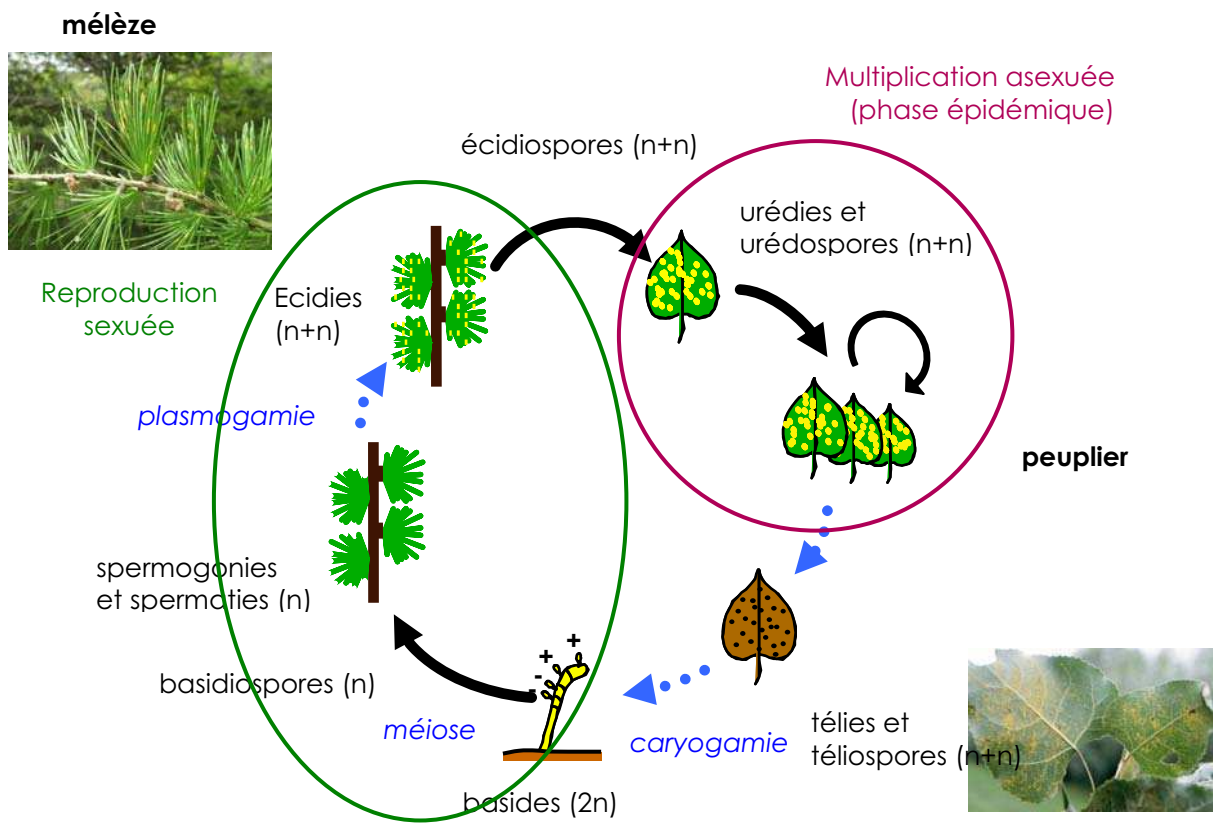


Figure 1 : cycle de reproduction de *Melampsora larici-populina*

sexuée, et le peuplier, hôte principal et télien qui permet la reproduction asexuée (clonale) du champignon. Ainsi, cinq types successifs de spores sont produits au cours de son cycle de vie (figure 1).

La phase importante dans l'épidémiologie de la maladie - et celle à laquelle nous allons nous intéresser au cours de cette étude - est le stade urédien, qui s'effectue sur le peuplier entre mai et octobre. Voici les différents stades du développement d'une lésion sporulante (ou urédie) dans l'état actuel de nos connaissances (Figure 2) :

L'urédospore se dépose sur la surface inférieure des feuilles de peuplier. Deux à six heures après que la spore soit rentrée en contact avec la feuille, le champignon développe un tube germinatif qui pénètre à l'intérieur d'un stomate et commence à se développer entre les cellules du parenchyme foliaire. A ce stade, il n'y a pas encore de reconnaissance moléculaire par la plante. Le champignon pénètre ensuite dans les cellules via les plasmodesmes et différencie un suçoir, l'haustorium (un par cellule). Le champignon, biotrophe, ne tue pas la cellule mais détourne et pompe les photosynthétats grâce à ce suçoir. Pendant les premières 24h, se pose la question de compatibilité ou d'incompatibilité entre le champignon et l'hôte. La reconnaissance a lieu seulement au moment où se mettent en place les haustoria. S'il y a compatibilité, le mycélium continu à se développer. Après une semaine environ (Frey et Pinon, 2004), le mycélium différencie une structure plus dense sous épidermique qui sera à l'origine des urédies. Ainsi, entre le 6^{ème} et le 8^{ème} jour (post inoculation), l'épiderme se rompt et libère les spores. Après sporulation, la lésion se manifeste par une pustule orange d'environ 1mm de diamètre que l'on appelle urédie. L'intervalle de temps entre l'infection et le moment où a lieu la sporulation est appelé période de latence (Pariaud *et al.*, 2009). Dans le cas des rouilles, la latence est facilement identifiable par le moment où l'épiderme de la plante se rompt pour libérer les spores. L'urédie produit alors des quantités importantes de spores qui seront disséminées par le vent, permettant ainsi la propagation de la maladie.

La sporulation et sa dynamique dans le temps, sont des phénomènes bien connus, des études antérieures ayant déjà traité ce sujet. Cependant, on ne sait toujours pas ce qui se passe *in planta* : comment se développe le champignon, à quelle vitesse, dans quelles proportions, combien d'haustoria se mettent en place, etc. Dans les premiers temps, le développement de la lésion n'est pas observable. La lésion ne devient perceptible qu'à l'approche de la sporulation par apparition d'un dôme sous épidermique. Il est donc difficile d'estimer le développement *in planta*, qui est bien souvent considéré comme une boîte noire.

Un premier élément de réponse peut être fourni par modélisation de la stratégie d'infection du parasite. Dans ce but, des travaux antérieurs ont cherché à définir quelle devrait être la règle d'allocation optimale des ressources entre ces deux fonctions primordiales que sont la multiplication (développement

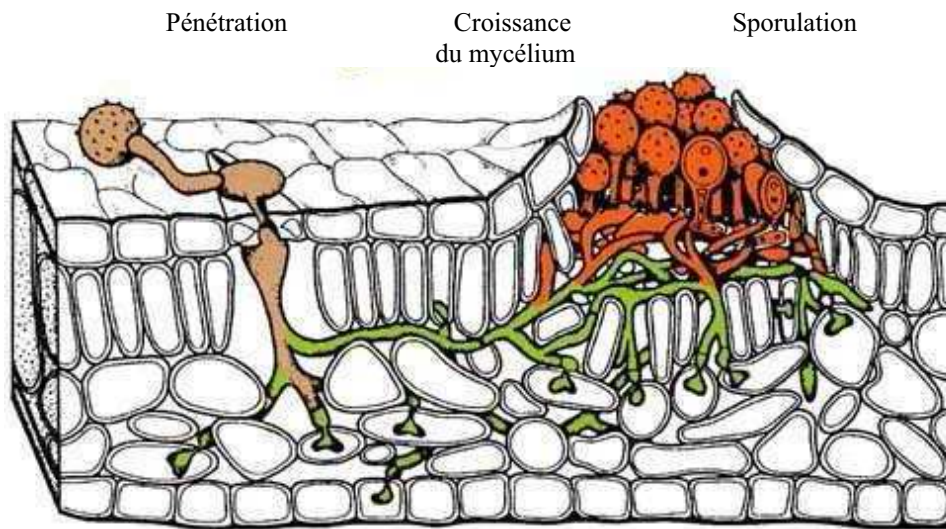


Figure 2 : illustration du cycle d'infection de *Melampsora larici-populina* et développement d'une urédie. (Hahn, 2000)

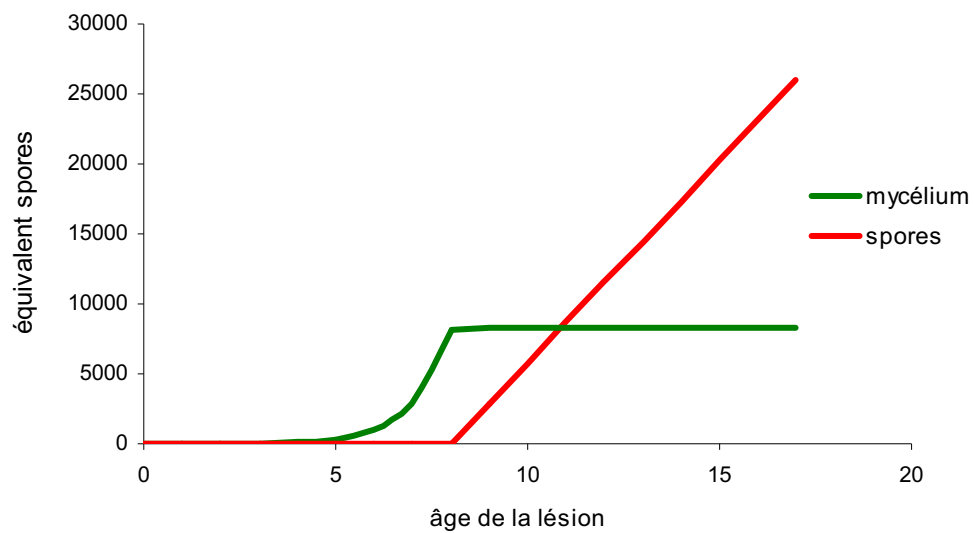


Figure 3 : modèle prédisant la croissance du mycélium et la production de spores au cours du temps (Andanson *et al.*, en préparation)

du champignon *in planta*) et la transmission (production de spores) (Andanson *et al.*, en préparation). Ces deux fonctions utilisent de l'énergie et rentrent en compétition, la multiplication pouvant entraîner un désavantage pour la transmission et inversement. Selon les conditions de l'environnement (favorisant plutôt la sporulation ou la multiplication), différentes stratégies d'allocations peuvent être sélectionnées. Celles-ci résulteraient en des dynamiques d'infection différentes.

Considérant un cycle de vie biotrophe, la stratégie optimale d'allocation des ressources serait de type « bang-mixte » avec deux régimes contrastés. La meilleure stratégie d'infection pour l'agent pathogène serait d'investir la totalité de ses ressources dans la croissance intra-hôte pendant sa phase de latence, puis d'investir ses ressources simultanément vers la production de spores et vers la maintenance d'une masse mycélienne stable jusqu'à la fin de l'infection (Andanson *et al.*, en préparation). Les dynamiques temporelles de la masse mycélienne et des spores produites correspondantes sont illustrée en Figure 3.

Un des intérêts de ce modèle est qu'il permet de générer des attendus théoriques qui sont testables empiriquement. Le modèle suggère que le mycélium se développe puis que sa croissance se stabilise après la latence, l'énergie prélevée à l'hôte étant alors allouées pour la production des spores. Ce modèle suppose également que la sporulation est constante au cours du temps, ce qui fait que la quantité cumulée de spores croît linéairement au cours du temps.

L'objectif de ce stage est de mettre en place un protocole innovant qui permettra de confronter les attendus du modèle par l'observation d'une dynamique d'infection de *Mlp* sur le peuplier. La confrontation de ce modèle à des données nécessite de se placer au plus proche des hypothèses de modélisation. L'échelle d'observation considérée est la lésion et la méthodologie reposera sur le suivi d'inoculations en conditions contrôlées. Pour minimiser la variabilité entre les valeurs de la latence de chaque individus et obtenir une dynamique mimant un même événement d'infection, on réalise des inoculations monospores et ce, dans les conditions les plus standards possible. La quantification de la sporulation et de la masse mycélienne *in planta* au cours du temps reposera sur la technique de PCR quantitative.

MATERIELS ET METHODES

I. Démarche expérimentale

1. Description du matériel fongique et végétal

1.1 Gestion de l'isolat de *Melampsora larici-populina*

Les isolats de *Mlp* sont conservés sous forme d'urédospores. Un isolat est donc constitué d'individus présentant le même génotype. Les spores sont stockées au froid (+1°C) dans un dessiccateur (évite la germination en maintenant un degré d'hygrométrie de 30%). L'isolat de *M. larici-populina* utilisé, dans cette étude est l'isolat nommé « 93ID6 », isolat couramment étudié au laboratoire.

1.2 Matériel végétal

Toutes les expériences sont réalisées sur le cultivar *Populus deltoides* x *P. nigra* 'Robusta', qui a la particularité d'être sensible à toutes les isolats connus de *Mlp*. Les plants sont élevés dans un phytotron (permettant leur développement dans des conditions contrôlées). Les paramètres contrôlés sont : la température, l'humidité relative, l'intensité et la durée de l'éclairement.

Toutes les feuilles utilisées sont prélevées sur le même plant de 'Robusta' et si possible sur le même rang foliaire, car celui-ci peut influencer les différents traits mesurés (Jorda, 2009).

2. Inoculation et test de germination

Pour des raisons pratiques (week-ends, nombres de disques à inoculer très important), les disques ne peuvent pas être inoculés en même temps. Les inoculations sont donc effectuées en série, afin d'obtenir des mesures pour chaque jour après inoculation (de 1 à 16 jours). Au total, 5 séries d'inoculations sont prévus. La série 1 permet l'observation des jours ..., la série 2 des jours ..., la série 3 des jours ..., la série 4 des jours ... et la série 5 des jours ...

Les feuilles sont prélevées entre le 7^{ème} et 14^{ème} rang foliaire (défini à partir de la première feuille déroulée). Avant l'inoculation, la feuille prélevée est rincée et séchée. Elle est ensuite découpée à l'emporte pièce pour produire des disques foliaires de 12 mm de diamètre. Ces disques sont mis en flottaison (face inférieure vers le haut) sur des boîtes à puits remplies au ¾ d'eau distillée.

L'inoculation consiste en un dépôt d'une seule spore par disque foliaire. Les spores sont prélevées sous loupe binoculaire à l'aide d'un cil monté sur un porte-minutie. Chaque spore est déposée sur une gouttelette d'eau gélosée préalablement disposée au centre de chaque disque. La goutte d'eau gélosée (i) facilite l'adsorption de la spore, (ii) apporte l'humidité nécessaire à la germination et (iii) facilite le suivi

du déroulement de l'infection en indiquant le point de pénétration de l'épiderme. Les boîtes à puits sont ensuite placées en chambre d'incubation (+19°C) sous lumière continue. Les boîtes sont ouvertes régulièrement et l'intérieur des couvercles est essuyé afin de prévenir un excès d'humidité qui pourrait nuire à la germination des spores.

Avant et au cours de l'expérimentation, le pouvoir germinatif de la sporée a été contrôlé en étalant une fraction de spores sur une boîte de Petri contenant de la gélose solide. Le pouvoir germinatif est défini par comptage sous microscope du pourcentage d'urédospores qui ont germé 24 h après étalement. Outre, le fait de tester la viabilité de la sporée, la mesure du pouvoir germinatif permettra de corriger les données d'efficacité d'infection.

3. Suivi du développement des lésions et prélèvement des disques

Le suivi d'incubation des urédies s'effectue pendant 16 jours à partir du jour d'inoculation. Il s'arrête à 16 jours afin d'éviter que des lésions filles, issues de spores de deuxième génération, ne se développent. Au sixième jour, des dômes sous-épidermiques sur les disques sont observés, ce qui annonce l'émergence des urédies. A partir de cette date, un relevé régulier (matin, midi et soir) à la loupe binoculaire des disques doit être réalisé. Pour chaque disque, l'heure et le jour où il y a eu apparition d'un dôme puis sporulation est noté. Le temps de latence est ainsi consigné pour chaque disque pour lequel l'infection a réussi.

Du jour 1 au jour 16 post-inoculation, un pool de disques est prélevé. Les disques à prélever sont déterminées aléatoirement. Pour assurer une puissance suffisante lors des tests statistiques, 24 disques au moins doivent être prélevés pour chaque date et ce équitablement entre les séries d'inoculation concernées.

4. Traitement des disques inoculés

Rapidement après le prélèvement, les disques inoculés sont congelés pour stopper la croissance du mycélium et le développement de l'urédie. Avant latence, les disques ne présentent pas d'urédies ; ils sont donc congelés directement. Après latence, les disques qui présentent une urédie sont découpés avant congélation, afin de récolter les spores produites et de pouvoir quantifier séparément la croissance mycélienne et la sporulation.

Pour le décapage, les disques sont mis en tube Eppendorf dans 1mL d'une solution de Tween 1% (agent mouillant qui homogénéise la solution et qui évite l'accolement des spores entre elles, ainsi qu'aux parois du tube ou du cône de prélèvement). Les spores sont décollées par forte agitation à l'aide de l'appareil « Retsch » (5min à 30Hz). Les disques sont ensuite rincés avec 500µL de solution de Tween, déposés dans des microtubes tubes et congelés. La solution de Tween

contenant les spores est centrifugés 5min à 14000rpm. Le culot est congelé après pipetage du surnageant. Par observation microscopique du surnageant, nous avons vérifié qu'il n'y avait plus de spores dans la solution de Tween après centrifugation.

Deux types d'échantillons sont donc obtenus : des échantillons de disques foliaires décapés (pour le suivi de la croissance mycélienne *in planta*) et des échantillons de spores (pour le suivi de la production de spores).

5. Quantification de croissance mycélienne et de la sporulation par les outils de la biologie moléculaire

5.1 Extraction d'ADN et mise au point du protocole expérimental

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. Dans cette étude, l'ADN total de *M. larici-populina* contenu dans le mycélium et les spores doit être extrait afin de le quantifier. Il se pose donc la question de l'efficacité de l'extraction. En effet, de petites quantités de mycélium et de spores vont être quantifiées, par conséquent il faut trouver la méthode d'extraction présentant le meilleur rendement. Au cours de ce stage, deux verrous méthodologiques sont à lever : le broyage des échantillons qui a pour but de lyser physiquement les cellules et libérer le contenu cytoplasmique, et le protocole d'extraction d'ADN au sens stricte.

Concernant la mise au point du broyage des échantillons, des tests d'efficacité de broyage sont réalisés sur les deux types d'échantillons en faisant varier le type de bille (tungstène ou verre), leur nombre, le temps de broyage et le volume de tampon.

Concernant la mise au point du protocole d'extraction d'ADN, trois protocoles d'extraction ont été testés : l'extraction en tube individuel (kit DNeasy de QIAGEN), en plaque de 96 puits (kit d'extraction QIAGEN DNeasy 96 plant) et au robot extracteur biosprint 96. Pour comparer l'efficacité de ces trois protocoles, une gamme décroissante de suspension de spores est réalisée, l'ADN étant extrait par chacune des trois méthodes. L'ADN a ensuite été quantifié par PCR quantitative qui nous permettra de déterminer la méthode d'extraction la plus efficace.

5.2 PCR quantitative et mise au point du protocole expérimental

La PCR (polymerase chain reaction) correspond à l'amplification d'un fragment d'ADN spécifique délimité par des amorces. La PCR quantitative (qPCR) est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN. Elle consiste à comparer au moins deux échantillons. Un échantillon sert de référence, la quantification des autres

échantillons étant faite relativement à cette référence (Généthon, 2001). Ici la référence utilisée est une gamme étalon de suspension de spores de concentration connue (en nombre de spores/mL).

Pour la réalisation des gammes étalon, des dilutions en cascade au 1/10 (équivalent 10 spores) sont réalisées à partir d'une solution mère contenant 2,5mg de sporée fraîche (équivalent 1 000 000 spores). La concentration en spore de chacune des solutions est déterminée précisément par comptage à la cellule de Malassez.

Une mise au point du protocole de qPCR est également nécessaire, en particulier vis-à-vis de la concentration finale en $MgCl_2$. Le $MgCl_2$ est un composant important du mélange des réactif PCR car il contribue notamment à l'accrochage des amorces au brin d'ADN. Plus il y a de $MgCl_2$, plus l'accrochage est facilité. Cependant si le $MgCl_2$ est présent en trop grande concentration, l'hybridation n'est plus spécifique. Et inversement, un manque de $MgCl_2$ peu nuire à l'hybridation des amorces sur les brins d'ADN à amplifier. Le kit commercial préconise une concentration de 3mM de $MgCl_2$. Des mélanges PCR contenant du $MgCl_2$ à 3, 4 et 5mM ont alors été testés. Pour cela une gamme dite « technique » est réalisée par extraction de l'ADN d'une suspension de 10^6 spores. La solution d'ADN obtenue est ensuite diluée successivement au 1/10.

Nous avons aussi testé si le tissu foliaire perturbe la quantification de l'ADN de *Mlp*. Pour ce faire, comme précédemment, des gammes « biologiques » (suspension de spores) sont réalisées et analysé par qPCR. Deux types de gammes sont testées : une gamme de spores seules (pour la quantification des échantillons de spore) et une gamme de spores avec disque de peuplier (pour la quantification du mycélium *in planta*).

L'ensemble de ces pré-manipulations a permis de fixer un protocole qui a été utilisé par la suite pour l'extraction et quantification des gammes étalons biologiques de référence et des échantillons (disques et spores).

5.3 Quantification du matériel fungique des échantillons par PCR quantitative

Après extraction des échantillons, les ADN sont élués dans 100µL de tampon. L'ADN est ensuite amplifié par qPCR grâce à un thermocycleur (35 cycles d'amplification, présentant trois étapes : dénaturation (30s à 95°C), hybridation (30s à 60°C), polymérisation (30s à 72°C)).

L'évolution de l'amplification de l'ADN initial est représentée par une courbe sigmoïde et est visualisée grâce à la mesure d'une fluorescence émise par un agent intercalant : le SYBR Green. Ce colorant s'intercale au niveau des chaînes double brin et devient fluorescent seulement s'il se lie à l'ADN double brin. La PCR quantitative nous permet de suivre en temps réel cette fluorescence. Au

cours des cycles de PCR, l'ADN est amplifié est donc la fluorescence augmente. Plus la quantité d'ADN initial est importante, plus le nombre de cycle nécessaire pour atteindre une fluorescence donnée est faible. Pour la réalisation des courbes étalons et l'analyse des échantillons, il est nécessaire de fixer un seuil de fluorescence, appelé Ct (threshold cycle). La valeur de Ct est déterminée dans la phase exponentielle, à l'intersection de la ligne de bruit de fond avec la courbe de fluorescence. Les valeurs des concentrations de chaque échantillon sont établies par rapport à la courbe étalon.

II. Analyse statistiques – Calculs mathématiques

1. Mesure de l'efficacité d'infection

L'efficacité d'infection est définie par la probabilité qu'une spore, déposée à la surface d'un hôte sensible, produise une urédie. Elle est mesurée comme le pourcentage de succès d'infection (Pariaud *et al.*, 2009). L'efficacité d'infection est le ratio entre le nombre de disques présentant une urédie et le nombre de disques présents lors du relevé des urédies (non prélevés avant la latence). Ce ratio est corrigé par le taux de germination des spores. L'efficacité d'infection (EI) est donc définie par la formule suivante :

$$EI = \frac{\text{Nombre de disques sporulés}}{\text{Nombre de disques total à la latence / taux de germination}}$$

2. Comparaison des méthodes d'extraction

Les paramètres de qPCR qui seront étudiés pour comparer les méthodes d'extraction : la linéarité de la gamme étalon, l'ajustement de la droite de régression (coefficient de détermination R^2), les seuils de détection, les seuils de quantification et l'efficacité.

3. Le modèle mathématique

Le système a été posé comme suit :

$$\frac{dM}{da} = (1 - u(a))M(1 - \frac{M}{K}) - \gamma M \quad \text{Equation 1}$$

$$\frac{dS}{da} = u(a)M(1 - \frac{M}{K}) \quad \text{Equation 2}$$

L'équation 1 modélise la croissance mycélienne et l'équation 2 la production de spore. Ces deux expressions dépendent de plusieurs paramètres et de la fonction $u(a)$ appelé commande, dont la valeur (entre 0 et 1) dépend du temps et détermine le calendrier d'allocation de l'énergie acquise par le champignon vers la croissance ou la sporulation. $u(a)$ permet de modéliser la contrainte inhérente à la réalisation de ces deux fonctions, la part d'énergie attribuée à la production des spores à un temps donné ($u(a)$) ne pouvant être utilisée pour la croissance du mycélium ($1 - u(a)$) et réciproquement. Si le champignon investit uniquement dans le développement du mycélium, $u(a)$ est égal à 0 et s'il investit seulement dans la production de spore alors $u(a)$ est égal à 1.

K correspond en écologie à la capacité limite du milieu. Ici K borne le flux d'énergie qui peut être absorbé à chaque pas de temps en déterminant un nombre maximum de canaux d'énergie. Pour Mlp , il correspond donc au nombre maximum d'haustoria différentiables par le champignon. Enfin, γ est le taux de mortalité du mycélium. Il exprime donc au moins pour parti le degré de résistance de la plante, plus la valeur de ce paramètre est faible, plus la croissance du champignon est facilité. Par la suite, si les résultats obtenus le permettent, il sera possible d'ajuster les courbes modélisées aux données empiriques.

Tableau a : tableau récapitulatif du plan

dpi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	total
nombre d'échantillons disques	40	40	40	40	40	42	40	42	44	41	49	45	44	46	45	15	653
nombre d'échantillons spores	0	0	0	0	0	0	6	13	11	10	13	14	17	16	16	11	127
Echantillons disques traités	24	24	24	24	24	24	10	8	8	8	8	12	12	12	12	8	242
Echantillons spores traités							6	8	8	8	8	12	12	12	12	8	94

Tableau b : comparaison des méthodes de broyage. a. pourcentage de spores broyées. b : (Pei et al, 1997)

Broyage (Tissuelyser, 2 fois 30s à 30 Hz)	1 bille de carbure de tungstène	1 bille de carbure de tungstène + 20 billes de verre	2 billes de verre 3 mm + 20 billes de verre 2 mm ^b
A - à sec et à froid	100% ^a	100%	100%
B - dans 50µL de tampon AP1	50%	100%	100%
C - dans 400µL de tampon AP1	10% (mousse)	20% (mousse)	20%-30% (mousse)

RESULTATS

I. Plan d'échantillonnage

Sur l'ensemble des cinq séries d'inoculation, 653 disques ont été prélevés et congelés. Parmi ces disques, seuls ceux présentant une urédie après la latence ont été décapés, soit 127 disques, dont sont issus les échantillons contenant des spores uniquement (Tableau a).

Pour étudier le développement du mycélium avant le 6^{ème} jour, 24 disques ont été choisis aléatoirement pour chaque jour post inoculation. A partir du sixième jour, il nous est possible de sélectionner les disques pour lesquels le développement du mycélium est confirmé c'est à dire, ceux pour lesquels un dôme ou une urédie a été observé. Seuls les disques présentant une urédie sont donc été étudiés. Ainsi, au final, 242 échantillons de disques et 94 échantillons de spores seront analysés.

II. Mise au point des protocoles

1. PCR quantitative

La mise au point de la réaction de PCR quantitative proprement dite a consisté en l'ajustement de la concentration en MgCl₂. Pour une concentration en MgCl₂ de 3mM et de 5mmol, le seuil de quantification est faible, ce qui ne permet pas de quantifier l'ADN au-delà d'une dilution au 1/1000 de la solution d'ADN mère extraite à partir de 2,5 mg de spore. De meilleurs résultats sont obtenus pour une concentration en MgCl₂ de 4mM (préconisation du fabricant), pour laquelle (i) le seuil de détection est abaissé (jusqu'à la dilution au 1/10 000) et (ii) la droite de régression obtenue est mieux ajustée aux échantillons étalons ($R^2 = 0,99$ et efficacité = 0,72). Par conséquent, nous utiliserons pour la qPCR, un mix contenant une solution de MgCl₂ à 4mM.

2. Broyage et d'extraction d'ADN

Le broyage des échantillons contenant des spores est le plus satisfaisant en utilisant des billes de verre dans 50µL de tampon (Tableau b). Pour le broyage des échantillons contenant des disques foliaires, le plus efficace est de broyer à l'aide d'une bille de tungstène dans 400µL de tampon avec une agitation de 4 fois 30s à 30Hz (les billes de verre ne sont pas assez denses pour attaquer le tissu foliaire).

Concernant l'extraction d'ADN, les résultats obtenus au Robot extracteur Biosprint ne sont pas satisfaisants (Tableau c). Par cette méthode, le seuil de détection n'est qu'à l'équivalent 100 spores. A l'inverse les deux autres méthodes d'extraction (tubes individuels et plaque de 96) permettent de quantifier en deçà de 10 spores. De plus, la linéarité des droite étalons, l'ajustement de la droite de

Tableau c : comparaison des méthodes d'extraction. B : Robot extracteur Quiagen Biosprint. T : kit DNeasy en tube individuel. P : kit DNeasy en plaque de 96. NC : non corrigé.

	gammes spores				gammes spores et disques			
	B ₁	B ₂	T	P	B ₁	B ₂	T	P
R ² avant corr.	0,906	0,941	0,472	0,843	0,971	0,878	0,985	0,986
R ² après corr.	0,978	0,971	0,99	0,974	0,972	0,85	NC	NC
Efficiencie	1,14	0,74	1,19	1	1,1	1,23	1,04	1,07

Tableau d : Taux de germination et efficacité d'infection

inoc	date d'inoculation	effectif au jour 8	taux de germination %	nombre de disques avec sporulation	efficacité d'infection
1	17 févr.	112	82	27	0,293
2	18 févr.	106	81	33	0,384
3	22 févr.	92	75	27	0,389
4	23 févr.	108	74	30	0,375
5	24 févr.	71	73	16	0,310

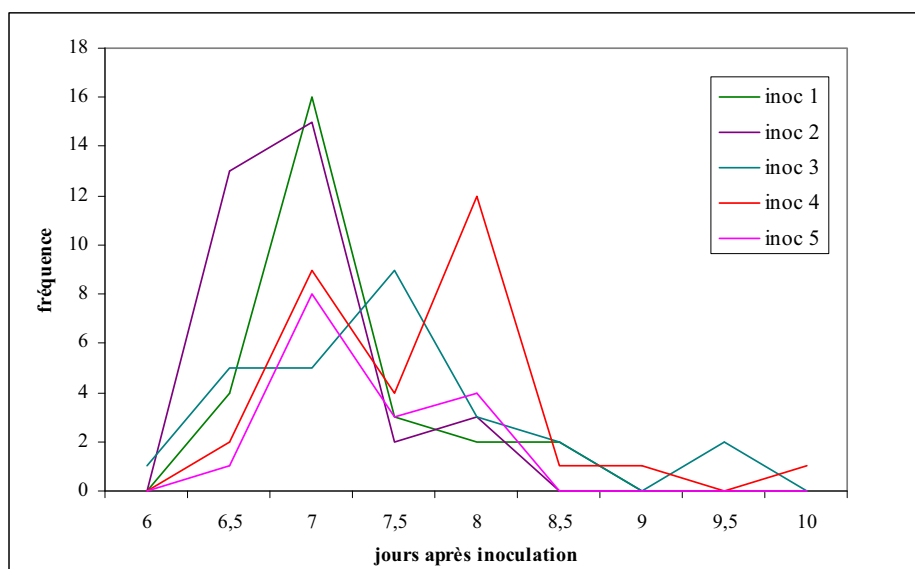


Figure 4 : cinétique d'apparition des urédies pour chaque série d'inoculation

régression (R^2) et l'efficacité sont bien meilleurs pour ces deux méthodes d'extraction (Tableau c). A efficacité égale, nous avons choisi de traiter nos échantillons par la méthode d'extraction en plaques de 96 puits (kit DNeasy 96 plant) qui est plus simple d'utilisation que le kit individuel en tube.

Enfin, le disque de peuplier n'entraîne aucun biais pour la quantification de l'ADN de *Mlp* (la quantité d'ADN équivalent à 10 spores est quantifiable).

III. Taux de germination et efficacité d'infection

Le taux de germination décroît au cours du temps (Tableau d). Quelques jours après la dernière série d'inoculation (le 8 mars), ce taux chute à 54,8%.

IV. Temps de latence

La période de latence s'étale de 5,96 à 9,89 jours, toutes séries d'inoculation confondues. Les temps de latence moyens sont respectivement de 6,85 ; 6,63 ; 7,17 ; 7,52 ; 7,11 pour les inoculations 1, 2, 3, 4 et 5. La cinétique d'apparition des urédies pour chaque série d'inoculation est présentée en Figure 4. Les inoculations 1 et 2 présentent une distribution similaire des temps de latence avec une moyenne précoce et une bonne synchronisation du début de la sporulation (pic de valeur de latence prononcé). Les inoculations 3, 4 et 5 ont des temps de latence plus étalés entre les infections, avec des pics peu prononcés à 7 jours pour l'inoculation 5 et 7, 5 jours pour l'inoculation 3. La série d'inoculation 4 se distingue par un pic de fréquence tardif à 8 jours.

V. Caractérisation de la dynamique d'infection

Pour visualiser plus facilement la dynamique des deux paramètres de l'agressivité étudiés, les données brutes de quantification du mycélium et de la production de spores (Figure 5), obtenues par qPCR, sont moyennées pour chaque jour post-inoculation (Figure 6). Pour cela, les valeurs des disques pour lesquels on détecte une et deux spore après 1 jour post-inoculation ont été supprimées. On considère qu'après le premier jour post inoculation, si l'on détecte une spore, c'est que celle si ne germera pas par la suite.

Une régression linéaire a été ajustée sur les données moyennées de production de spore ($R^2 = 0,965$, $P < 0,001$) et sur les données croissance du mycélium après latence ($R^2 = 0,016$, $P = 0,75$). La production de spore croît linéaire (pente significative, $P < 0,001$) avec une production journalière d'environ 3100 spores. Après latence, le mycélium ne croît plus (pente non significative, $P = 0,37$), un plateau est atteint pour une valeur de 8 600 équivalents spores.

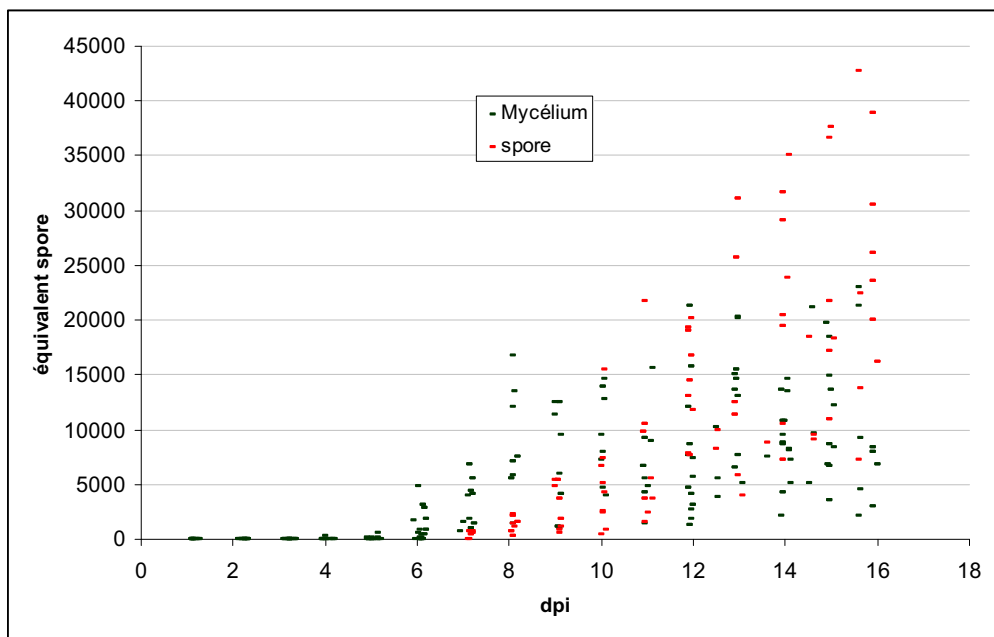


Figure 5 : croissance du mycélium et production de spores au cours du temps (données brutes)

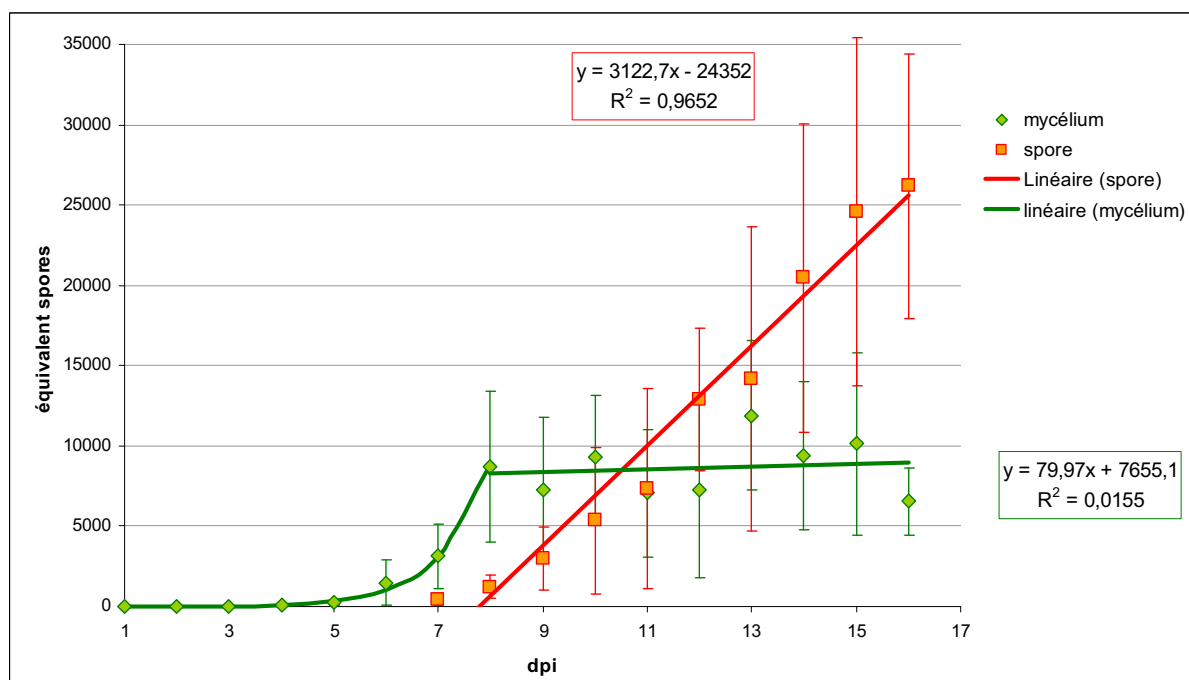


Figure 6 : croissance du mycélium et production de spores au cours du temps

Les données obtenues nous permettent d'estimer les paramètres du modèle mathématique (K et γ). Ainsi la valeur de K est estimée à 23 600 et γ à 0,28. Ces nouvelles valeurs permettent de calculer la courbe théorique croissance mycélienne avant latence. Celle-ci donnant une valeur de latence aberrante (au-delà de 15 jours), nous avons ajusté la dynamique de croissance mycélienne avant latence par ajout d'un taux intrinsèque de croissance ici estimé à 2,45.

DISCUSSION

Afin de pouvoir modéliser la dynamique d'infection de *Mlp*, nos échantillons doivent être standardisés. Le paramètre central est la période de latence. Les attendus étaient que cette période soit peu variable. Or la période de latence observée s'étale de 5,96 à 9,89 jours. Cependant, les temps de latence moyens se situent globalement autour du 7^{ème} jour post-inoculation. Les différences observées entre les séries d'inoculation peuvent s'expliquer par une défaillance technique de l'éclairage survenue lors des incubations des séries d'inoculations 3, 4 et 5 (coupure de courant du à une tempête le week-end précédent la latence). Privées de lumière, les disques ont certainement produit moins de photosynthétats, provoquant à retard de croissance et un allongement du temps de latence par rapport aux premières inoculations. La variabilité de la période de latence observée sur l'ensemble des séries d'inoculation peut également dépendre de nombreux facteurs d'ordre environnementaux. Même si les expérimentations ont été réalisées dans les mêmes conditions, il y a des micro-conditions qui peuvent intervenir et qu'on ne peut prévenir. Le développement de l'urédie peut être ainsi être plus au moins précoce selon la spore considérée (plus au moins d'énergie mise rapidement à contribution dans la germination), le disque de peuplier (rang, présence de micro-nervures qui ralentissent le développement du mycélium et la mise en place des haustoria...), la position des disques dans la boîte, etc. La variabilité de la latence peut expliquer par la suite une partie de la variabilité observée pour les autres résultats obtenus.

L'objectif premier de ce stage était d'étudier la dynamique d'infection de *Mlp* sur le peuplier. L'observation des données brutes montre une grande variabilité des résultats. Cette variabilité peut s'expliquer par plusieurs raisons : les raisons techniques (différence de rendement de la qPCR et de l'extraction d'ADN) et les raisons biologiques (micro-environnementales). La variabilité qui a pour origine le dosage par qPCR peut être revue et corrigée en effectuant des répétitions en qPCR des points aberrants. La variabilité de l'extraction ne peut pas être testée. Les raisons biologiques sont expliquées par des micro-conditions (identiques à celle de la latence). Nous avons modélisé le résultat d'un événement d'infection or, en réalité, du fait de ces micro-conditions, plusieurs événements d'infection sont observés. Ces micro-conditions influeraient sur les valeurs de K et γ , et produiraient des dynamiques d'infection sensiblement différentes.

Malgré cette forte variabilité, la dynamique de sporulation obtenue est cohérente avec les travaux antérieurs. Au cours de ce stage une capacité de sporulation de 3100 spores par urédie et par jour a été obtenue. Bien qu'une production plus faible a été observée par Pei *et al.*(2003) qui ont estimé la production de spore de *M. larici-populina* entre 430 et 700 spores par urédie et par jours, des études antérieurs menées au laboratoire sur un couple hôte pathogène proche ont obtenue le

même ordre de grandeur avec 2500 à 5000 urédospores produites par urédie et par jour (Pinon et Frey, 2004) ou encore 1500 et 1800 dans l'étude de Miot (1999).

Le principal objectif était de confronter les données expérimentales et de modélisation (modèle présenté en introduction). La première observation que l'on peut faire sur la dynamique obtenue de façon expérimentale est que l'on observe une correspondance quasi parfaite avec les prédictions du modèle théorique.

A partir des courbes expérimentales, il nous a donc été possible d'ajuster une dynamique d'infection moyenne et d'inférer les paramètres K et γ . Cependant, en retraçant la dynamique d'infection théorique avant latence, nous avons observé un retard de croissance par rapport aux données empirique avec une valeur de la latence très élevée. Nous avons alors conjecturé que l'équation de croissance était incomplète et nous avons rajouté un paramètre reflétant le taux intrinsèque de croissance du mycélium in planta (α). L'équation 1 se réécrit alors :

$$\frac{dM}{da} = \alpha(1-u)M\left(1 - \frac{M}{K}\right) - \gamma M \quad \text{Equation 3}$$

Pour obtenir une latence proche des données empirique, α prend une valeur de 2,45. La nouvelle courbe théorique obtenue avec les nouvelles valeurs de K , γ et α est bien ajustée à nos données. Des tests statistiques plus approfondis pourront permettre de confirmer cela.

Cependant, la résolution mathématique n'est pas tout à fait satisfaisante. Après ajout du paramètre α , il faudrait recalculer les conditions de la dynamique optimale et voir si ce paramètre n'interfère pas avec l'estimation de K et γ . Par ailleurs, un autre paramètre pourrait être pris en compte déterminant la part d'énergie réellement converti en spores.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce stage, bien que court, m'a permis de traiter un sujet de recherche dans sa globalité. J'ai pu suivre les différentes étapes, avec le problème posé, la mise en place du protocole, l'expérimentation et la mise en place et l'analyse des résultats.

Ce stage visait un triple objectif : mettre en place un protocole innovant basé sur la méthode de la qPCR, obtenir expérimentalement la dynamique de deux paramètres de l'agressivité du champignon biotrophe *Melampsora larici-populina*, la croissance mycélienne et la production de spores, et enfin, confronter les données empiriques et de modélisation. Globalement, l'objectif de ce stage a été atteint, voir dépassé.

La confrontation des données nous a permis de pouvoir aller jusqu'à la détermination des paramètres du modèle (K et γ) et de pouvoir préciser ce modèle par ajout de nouveaux paramètres (α). Cependant, le dernier modèle obtenu reste non satisfaisant (manque de précision) et demande à être revu.

Lors de cette étude, nous nous sommes concentrés sur un seul couple de génotype sur le pathosystème *Melampsora larici-populina*/peuplier. Il peut être intéressant, maintenant que le protocole a été mis en place et validé, d'effectuer cette même étude sur d'autres couples isolat/cultivars.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Andanson A., Halkett F., Mailleret L., Grognard F. and Ravigné V. *in preparation*.

Ces travaux font référence au §2.3 du manuscrit de thèse.

Hahn, M. 2000. The Rust Fungi. Cytology, Physiology and Molecular Biology of Infection. In Fungal Pathology, ed. JW Kronstad, pp. 267-306. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

McDonald B. 2010. How can we achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems? New Phytologist 185: 3–5.

Miot S. 1999. Rôle de la variabilité de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille des peupliers, et de la structure de la population hôte sur l'évolution des populations de l'agent pathogène. Thèse de doctorat, Nancy 1, Université Henri Poincaré, 161pp.

Pariaud B., Ravigné V., Halkett F., Goyeau H., Carlier J. and Lannou C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. Plant Pathology 58(3), 409-424.

Pei MH, Ruiz C, Harris J, Hunter T. 2003. Quantitative inoculations of poplars with *Melampsora larici-populina*. European Journal of Plant Pathology. **109**: 269-276.

Pinon J, Frey P. 2004. Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. In A.R. McCracken, M.H. PEI (eds) Rusts on willow and Poplar. CABI publishing, Wallingford UK

ANNEXE 1 : Présentation du laboratoire

L'UMR 1136 a pour thème central de recherche la biologie et l'écologie des interactions entre microorganismes et arbres forestiers. Ces recherches visent à acquérir ou améliorer les connaissances sur les interactions établies entre arbres, champignons et bactéries rizosphériques, sur une échelle allant du gène à l'individu (biologie intégrative) et de l'individu à l'écosystème (écologie des interactions). Quatre équipes la composent : Homéostasie métallique et bioremédiation, réponse aux stress et régulation redox, écogénomique des interactions et enfin écologie des champignons pathogène forestiers, équipe dans laquelle j'ai effectué mon stage.

L'objectif de l'équipe écologie des champignons pathogène forestiers est d'identifier les facteurs qui contribuent aux émergences de maladies fongiques dans les écosystèmes naturels et forestiers, que ce soit lié à l'apparition de nouveaux pathotypes d'agents pathogènes contournant les résistances déployées dans les populations hôtes ou au développement d'épidémies provoquées par des agents pathogènes qui ne posait que peu de problème auparavant. Pour répondre à cette question, ils étudient les phénomènes suivants sur les maladies forestières les plus importantes en France actuellement :

- les processus de dispersion des agents pathogènes qui conditionnent les flux de gènes
- l'évolution des populations d'agents pathogènes qui ont pu conduire à l'émergence
- les modifications environnementales (climat, dépôts anthropiques d'azote, modification dans la conduite des peuplements forestiers)

En parallèle, ils étudient l'impact des maladies sur les populations d'arbres et les conséquences des maladies émergentes sur les populations hôtes.

ANNEXE 2 : Caractéristiques des amorces qPCR

Relation taille du génome / masse d'ADN

Sachant que 1 pg d'ADN = 978 Mb (Doležal et al 2003), et que la taille du génome haploïde de *Mlp* est de 101,1 Mb (<http://genome.jgi-psf.org/Mellp1/Mellp1.home.html>), la quantité d'ADN d'une urédospore (dicaryotique) de *Mlp* est de : $2 * 101,1 / 978 = 0,207$ pg. En conséquence, la gamme biologique de spores de *Mlp* correspondrait en théorie à une gamme de concentrations d'ADN croissantes de 0,207 pg à 183 ng.

Ref : Doležal J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J (2003). Letter to the editor: Nuclear DNA Content and Genome Size of Trout and Human. Cytometry 51A: 127–128.

Protocole qPCR

Le mélange de qPCR contient les ingrédients suivants : ABsolute™ Blue SYBR® Green Mix (Thermo Scientific) 1X (mélange contenant le tampon de qPCR, la *Taq* polymérase, les dNTP et le SYBR Green), MgCl₂ 4 mM, amorces F et R 0,3 µM. Le mélange de qPCR est distribué à raison de 18 µL par tube, auxquels 2 µL de solution d'ADN à tester sont ajoutés, soit un volume final de 20 µL. Les amorces F (5' TCGGCCCTCATTCTTTCTAA 3') et R (5' GATAGTCGGAGCGACCAAAG 3') ont été définies dans la région ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomal de *Mlp*, une région couramment utilisée pour le diagnostic interspécifique (Hacquard et al 2010 ; voir annexe XX).

Ref : Hacquard S., Frey P., Martin F., Duplessis S. 2010. *In planta* expression profiling of *Melampsora larici-populina* transcripts through RT-quantitative PCR. The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology (sous presse).

Séquence de la région ITS de l'ADNr de l'isolat 93ID6 (GenBank Accession n° AY375268) :

```
>93ID6
TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATACATGTTGAGCGCACTTTAATGTGACTCTTTGTATAAACCATTACCCC
CCAAACCCAGAGGTGCATTTGTGGCCCGTCAAAGGTTAGCAGTGTATCAGTACGTATCTCAAAGGCACTTTGATTTACA
TTACCCATCATTTACCCCATTTACACTTAAGAAGTTTTAAGAATGATAACCATAACTATATAACTTTTCAGCAATGGATC
TCTAGGCTCTCAGTCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC
TTTGAACGCACCTTGCACCTTTTGGTTATTCCGAAAGGTACGCCTGTTTGAATGTCACGAAACCCCCCTCGGCCCTCATT
CTTTCTAA AAGCATGGGGGACGGATTCTGAGTGTGGCGTGTCAACGCCTCGCTTCAAATAGATTAGCACTTTTGGATGG
TATACTATTAGTTCAAAGACGTACTTGATGTTGTATTTATATTTTATTGAGGCAGTCTTTGGTTCGCTCCGACTATCTGC
TAATAGGGCAACTTGAAGAATAGCTTCCTAACCTATCAACTTAATTAAGTAATTAATTAGTCTTTAGACTTCAAATCAG
GTGGGACTACCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

Amorces qPCR Hacquard et al 2010 :

F : TCGGCCCTCATTCTTTCTAA

R : GATAGTCGGAGCGACCAAAG (→ REVERSE : CTTTGGTTCGCTCCGACTATC)

Taille de l'amplifiat : 169 pb

```
TCGGCCCTCATTCTTTCTAA AAGCATGGGGGACGGATTCTGAGTGTGGCGTGTCAACGCCTCGCTTCAAATAGATTAGC
ACTTTTGGATGGTATACTATTAGTTCAAAGACGTACTTGATGTTGTATTTATATTTTATTGAGGCAGTCTTTGGTTCGCT
CCGACTATC
```


Résumé

Mieux comprendre les interactions hôte – pathogène est une question fondamentale en recherche (notamment en biologie évolutive) qui a de profondes répercussions dans des domaines plus appliqués. Il s'agit en effet d'un enjeu essentiel pour de nombreux systèmes agricoles cultivés et constitue la toute première étape afin de mettre sur le marché des nouveaux cultivars minimisant l'impact des parasites tout en respectant l'environnement.

Lors de ce stage nous nous sommes concentrés sur le couple hôte-champignon parasite formé par le Peuplier et l'agent de la rouille foliaire *Melampsora larici-populina*. Notre étude expérimentale a porté sur deux processus clés de l'infection que sont : la croissance mycélienne *in planta* et la production de spores. L'objectif était de retracer une dynamique d'infection afin de pouvoir confronter *in fine* les données empirique à des prédictions théoriques issues d'une approche par modélisation. Ceci a nécessité de se placer au plus proche des hypothèses de modélisation. Pour ce faire, un protocole innovant de quantification par PCR quantitative a été mis en place, l'expérimentation consistant en des inoculations monospores en conditions contrôlées. Conformément aux prédictions théoriques, les données acquises au cours de ce stage montrent que la production cumulée de spores croît linéairement et que pendant cette phase de sporulation la masse mycélienne reste stable. L'ajustement des courbes théoriques aux données expérimentales a permis d'inférer les paramètres du modèle. En perspective, il serait intéressant de poursuivre les expérimentations sur d'autres génotypes de peuplier et de champignons pour déterminer la variabilité des dynamiques d'infection.

Mots clés : Agressivité, modélisation, Peuplier, *Melampsora larici-populina*, PCR quantitative, dynamique d'infection.

Abstract

Understanding the interactions host - pathogen is a fundamental issue in basic research (including evolutionary biology) that has profound repercussions in more applied areas. It is a key issue for many agricultural systems cultivated and is the first step to bring to market new cultivars which minimize the impact of parasites while respecting the environment

In this course we focused on the host-fungus formed by the agent and poplar leaf rust *Melampsora larici-populina*. Our experimental study has focused on two key processes of infection: the mycelial growth in planta and spore production. The objective was to trace the dynamics of infection in order to ultimately confront the empirical data to predictions from a theoretical modelling approach. This need to be placed closer to the modelling assumptions. To do this, an innovative protocol of quantification by quantitative PCR has been established, testing consisting of single-spore inoculations under controlled conditions. According to theoretical predictions, the data acquired during this course show that the cumulative production of spores increases linearly and, that during this phase of the sporulation, mycelium mass remains stable. The theoretical curves fit the experimental data allowed inferring the model parameters. In perspective, it would be interesting to conduct further testing on other genotypes of poplar and fungi to determine the variability of the dynamics of infection

Key words: Aggressiveness, modelling, Poplar, *Melampsora larici-populina*, PCR quantitative, dynamics of infection.

6.3.2 Analyse comparative des déterminants de la période de latence chez les champignons phytopathogènes

Manuella Noreskal

Encadrée par Virginie Ravigné et Audrey Andanson

UMR BGPI

CIRAD Montpellier

Analyse comparative des déterminants de la période de latence chez les champignons phytopathogènes



UMR - BGPI
Biologie et Génétique
des Interactions Plante-Parasite



Table des Matières

INTRODUCTION.....	1610
<u>I. CONTEXTE DU STAGE.....</u>	<u>151</u>
I.1. PRESENTATION DU LABORATOIRE D'ACCUEIL	151
<u>II. MATERIEL ET METHODES.....</u>	<u>152</u>
II.1. Etablissement de la base de données	152
II.1.1. Les sources	152
II.1.2. Les variables d'intérêts.....	152
II.1.3. Traitement de la base de données	154
III.1. Choix de la séquence à comparer.....	155
III.2. Inférence de l'arbre phylogénétique des espèces étudiées..	155
III.3. Analyse statistique.....	155
III.3.1. Analyse conventionnelle des données	155
III.3.2. Méthode de calcul des contrastes indépendants (CI)	155
III.3.3. Calcul du signal phylogénétique (SP).....	156
<u>IV. RESULTATS.....</u>	<u>156</u>
IV.1. Présentation de la phylogénie des espèces.....	156
IV.2. Présentation de la base de données	157
IV.3. Analyse conventionnelle des données.....	157
IV.3.1. Influence de la stratégie parasitaire (ER) et du climat d'origine (ZC) sur LP	157
IV.3.2. Analyse de la covariance.....	158
IV.3.3. Influence de la température sur LP	158
IV.4. Méthode d'analyse comparative phylogénétique.....	158
IV.4.1. Signal phylogénétique	158
IV.4.2. Corrélation entre CI	159
<u>V. DISCUSSION.....</u>	<u>159</u>
V.1. Base de données	159
V.2. Traitement statistique des données.....	159
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	161

INTRODUCTION

Les champignons sont responsables de près de la moitié des maladies connues sur les plantes cultivées et de 30% des maladies émergentes toutes plantes confondues (Anderson et al. 2004). Dans un contexte où l'agriculture se veut de plus en plus intensive et où le recours aux intrants chimiques tend à se réduire, il devient essentiel, pour inventer de nouvelles solutions visant à maintenir les rendements agricoles, de comprendre comment les agents pathogènes contournent les résistances partielles de leurs hôtes, améliorent leurs performances sur un hôte donné, ou encore s'adaptent à de nouvelles pratiques culturales. Pour cela, il faut élucider les facteurs qui déterminent l'évolution de l'agressivité des champignons phytopathogènes.

L'agressivité peut se définir comme la capacité d'un champignon à créer une épidémie sévère dans une parcelle et est fonction de caractères quantitatifs (communément appelés traits d'histoire de vie en biologie évolutive) du cycle de vie de l'agent pathogène tels que le taux de sporulation, la taille des lésions occasionnées par le champignon ou encore sa période de latence (LP). Cette dernière représente le temps qui s'écoule entre l'infection de la plante par le champignon et le moment où la sporulation débute. Ce caractère revêt une importance particulière car il peut à la fois expliquer en partie l'agressivité de l'agent pathogène et sa fitness¹. Plus la LP est courte, plus vite une infection donnera de spores, aptes à se propager, plus le champignon aura de chances de se répandre dans la culture et de causer des épidémies sévères. En ce sens, la LP est une composante essentielle de l'agressivité du pathogène. La fitness de l'agent pathogène est renseignée par la LP également dans le sens où elle mesure la durée nécessaire à l'apparition de nouvelles spores donc de nouvelles sources d'inoculum.

Cependant, il est clair que l'étude de cet unique caractère ne suffit pas à mesurer l'agressivité du pathogène. Par exemple, dans un cas où le pathogène aurait une courte LP mais un faible taux de sporulation, l'agressivité du champignon serait très faible. Il faut aussi interpréter la variabilité de la LP en considérant la biologie de reproduction du champignon. Par exemple, *Mycosphaerella fijiensis*, agent responsable de la maladie des raies noires sur les bananiers, se propage principalement de manière sexuée, le développement de grandes lésions est important pour permettre la rencontre des mycéliums et donc la reproduction sexuée qui aboutira à la sporulation. Il existe donc une période de latence pour les spores issus de la reproduction sexuée différente de celle des spores produits par reproduction asexuée. En général, cette dernière est plus courte que la première mais elle n'est pas toujours représentative de l'agressivité du pathogène sur le terrain comme c'est le cas pour *M. fijiensis*. Courte période de latence ne veut donc pas dire période de latence optimale ou forte agressivité et il est important de corrélérer différents traits du champignon afin de mieux caractériser son agressivité. La période de latence est un caractère fortement lié aux conditions environnementales, mais il a aussi été démontré que ce caractère est héritable. Il peut donc répondre à la sélection imposée par un peuplement hôte donné (Pariaud *et al.* 2009). A notre connaissance, il n'existe cependant pas de travaux théoriques permettant de prédire l'évolution de la latence en fonction des caractéristiques des peuplements hôtes. Dans un modèle mathématique en cours d'analyse, Anderson *et al.* (en préparation), souligne l'importance de la durée de la période de réceptivité, de la mortalité cellulaire ainsi que des efficacités d'absorption et de conversion des ressources par le champignon sur la latence optimale.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de stage. On cherche plus précisément à tester la validité de ce modèle et à le compléter en identifiant, par une comparaison entre espèces, les facteurs qui déterminent la période de latence. Cette approche suppose que la variation des périodes de latence entre espèces reflète les différences écologiques de ces espèces. Elle requiert de considérer les liens phylogénétiques entre espèces et de rendre compte du lien (et non de l'indépendance) entre les valeurs des traits chez des espèces différentes. Il est clair que deux champignons proches car appartenant à des espèces sœurs ont une grande probabilité d'avoir une LP proche. De même, on peut supposer que deux espèces de champignons plus éloignées phylogénétiquement peuvent avoir des LP différentes, uniquement du fait de la longue histoire évolutive qui les sépare. Ainsi, les différences entre deux champignons proches phylogénétiquement ont plus de chances de refléter des adaptations à leurs

¹ La fitness ou valeur sélective est le nombre de descendants reproducteurs produits en une génération par un individu reproducteur (Futuyama 1997)

contextes écologiques particuliers que les différences entre champignons éloignés phylogénétiquement, qui sauf cas de convergence évolutive ont plus de chance d'intégrer d'autres contraintes évolutives. Plusieurs étapes ont permis de traiter cette question : l'établissement d'une base de données de traits de champignons phytopathogènes, l'établissement de la phylogénie de ceux-ci et enfin l'analyse comparative des données en prenant en compte la phylogénie grâce à la méthode de calcul de contrastes indépendants.

I. Contexte du stage

I.1. Présentation du laboratoire d'accueil

L'Unité Mixte de Recherche de Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite (BGPI) dans laquelle j'ai effectué mon stage aborde les problématiques de lutte contre les agents pathogènes (virus, nématode, champignon, bactéries) et leurs interactions avec les plantes. L'unité développe différentes compétences concernant la caractérisation des agents pathogènes et des mécanismes de pathogénie, l'étude de la biologie évolutive des agents pathogènes, celle des mécanismes de résistance des plantes, celle des mécanismes de vection des maladies transmises par insectes, et la modélisation des épidémies. Elle permet le rapprochement d'équipes travaillant sur différents types d'organismes pathogènes et utilisant des approches diversifiées. La figure 1 rend compte de l'organisation de l'UMR et des domaines traités par les différentes équipes.

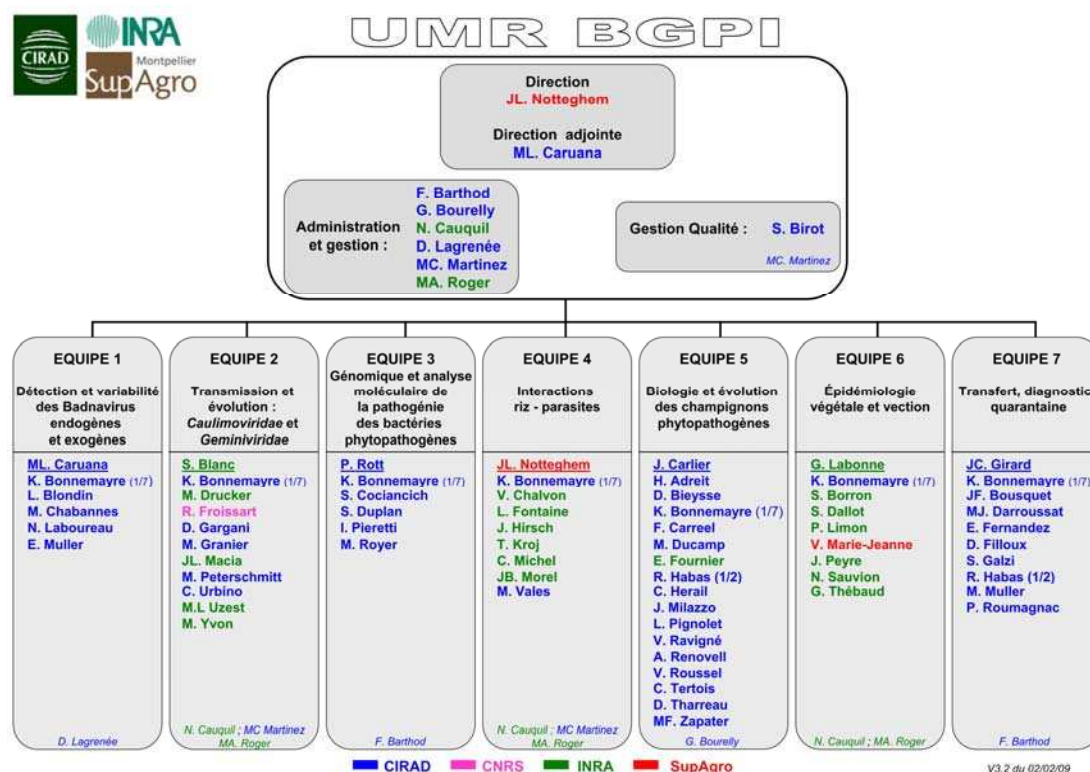


Figure 1 : Organigramme de l'UMR BGPI

C'est dans le cadre du travail de l'équipe 5 que s'inscrit mon stage. Le travail des chercheurs s'organise autour de deux axes principaux :

L'évolution de l'agressivité des champignons phytopathogènes qui regroupe l'étude des caractéristiques de l'agressivité du pathogène en fonction du peuplement hôte et les effets de l'utilisation de résistances partielles dans le contrôle des épidémies et sur l'évolution de l'agressivité. Ces questions seront traitées par des approches complémentaires telles que le développement de modèles épidémiologiques et de dynamique évolutive, la caractérisation précise en conditions contrôlées des différentes composantes d'agressivité et de résistance partielle, la biologie des populations expérimentale.

Une expertise en phytopathologie et mycologie qui permet de répondre aux sollicitations et besoins pour la description de parasites fongiques en particulier émergents, permet d'assurer un appui et une formation auprès de chercheurs d'autres unités ou de partenaires extérieurs et de développer une plateforme pour la caractérisation de la résistance des plantes.

II. Matériel et méthodes

II.1. Etablissement de la base de données

Dans l'optique de caractériser la période de latence des champignons en fonction d'autres traits de l'agressivité et de conditions environnementales sources de variabilité, plusieurs variables d'entrée de la base de données ont été retenues. Il existe deux types de variables : des variables d'intérêt, dont on souhaite savoir si elles sont corrélées à la période de latence (ex : stratégie parasitaire, climat d'origine) et des variables de nuisance qui permettent de prendre en compte une partie de l'hétérogénéité des conditions expérimentales. (ex : condition d'expérimentation et analyse des données).

La base de données a été établie en deux étapes, la collecte des données pour tous les caractères retenus puis, un traitement de celle-ci pour ne garder que les données exploitables statistiquement.

II.1.1. Les sources

Le principal moyen de recherche a été l'utilisation de la base de données de publications ISI Web of Knowledge qui fournit un accès aux publications dans une large gamme de journaux scientifiques et de domaines. Les publications d'études d'agressivité de différents champignons en conditions contrôlées ont été la principale source de données.

Des spécialistes du domaine, membres de la Société Française de Phytopathologie, chercheurs du CIRAD, ont également été contactés par mail afin qu'ils communiquent leurs données non publiées.

II.1.2. Les variables d'intérêts

En l'absence d'*a priori* sur les variables réellement exploitables dans la littérature scientifique, nous avons initialement relevé des variables potentiellement intéressantes. Puis *a posteriori* nous avons retravaillé le jeu de données pour ne conserver que les variables réellement utilisables. Par la suite, je décris ce processus en deux temps.

II.1.2.1. La mesure de la période de latence

- La période de latence

Deux types de mesures de la LP sont répandus dans les modes opératoires de caractérisation de l'agressivité des champignons. La période de latence (LP) qui correspond au temps s'écoulant entre l'inoculation du champignon et la première sporulation. La période de latence 50 (LP50) qui renvoie au temps nécessaire à la sporulation de la moitié des lésions présentes sur l'organe inoculé. Les LP et LP50 prises en compte dans l'étude sont des moyennes de période de latence de la répétition de la même expérience (inoculum inoculé sur la plante hôte en conditions expérimentales contrôlées).

- L'écart-type

L'écart type des moyennes de périodes de latence relevées est une information statistique importante qui permettra d'évaluer la dispersion du caractère. Ce paramètre peut également être pris en compte dans les calculs de contrastes indépendants

II.1.2.2. Les traits relatifs aux champignons

- Le champignon phytopathogène

Les champignons présentant une période de quiescence lors de leur cycle de vie, comme *Botrytis cinerea*, ainsi que les champignons sporulant à un stade physiologique précis de la plante hôte, par exemple lors de la floraison ou de la fructification, sont écartés de l'étude. En effet, cela introduirait un biais dans les données puisque la définition de LP ne convient pas dans le premier cas de figure et elle serait mal estimée dans le deuxième, car elle dépend du stade physiologique de la plante au moment de l'inoculation du champignon.

- Zone climatique de prélèvement du champignon (ZC)

La zone de prélèvement géographique du champignon est reliée à son appartenance à une zone climatique tropicale ou tempérée. Cette variable permet indirectement de faire le lien avec le temps de disponibilité de l'hôte pour le pathogène. En zone tropicale, l'espèce peut rencontrer tout au long de l'année des conditions climatiques et une disponibilité en plantes-hôtes favorables, qu'ils soient cultivés ou sauvages. En zone tempérée, la variabilité du climat occasionne des cycles de culture plus courts et l'abaissement des températures est accompagné d'une baisse d'activité des champignons qui résistent au climat grâce à des formes de spores particulières.

- Le type de reproduction (sexuée ou asexuée) observée

Il s'agit de relever le type de reproduction qui a permis l'apparition des spores lors de l'expérience dans le but de caractériser l'influence de ces deux types de reproduction sur la variabilité de la LP.

- La stratégie d'exploitation des ressources (ER)

On peut distinguer de grandes catégories de stratégies parasitaires. Certains pathogènes ne peuvent vivre qu'en association avec la plante vivante et ne tuent pas les cellules végétales pour se nourrir : les biotrophes stricts. D'autres peuvent se nourrir sur des tissus morts. On distingue les nécrotrophes, qui, dès l'infection, tuent les cellules et se nourrissent de leur contenu, et les hémibiotrophes, qui ne deviennent vraiment nécrotrophes qu'après une phase initiale d'installation dans les tissus végétaux où les cellules végétales ne sont pas tuées. Comme la distinction entre ces deux dernières catégories semble faire débat, nous avons opposé les biotrophes stricts aux parasites facultatifs (hémibiotrophes et nécrotrophes).

II.1.2.3. Les traits relatifs à l'hôte

- La plante hôte

Il est nécessaire de relever le cultivar de l'espèce sur lequel a été inoculé le champignon phytopathogène car la LP varie en fonction de celui-ci. Lorsque cela est possible son degré de résistance vis-à-vis de ce champignon est également relevé.

II.1.2.4. Les variables environnementales

- La température et l'hygrométrie

La température et l'hygrométrie auxquelles a été placée la plante avant la sporulation sont des données environnementales dont la période de latence dépend fortement.

- La concentration de la solution d'inoculation

Il est connu que la latence varie fortement en fonction de la densité de lésions (Pariaud et al. 2009). Afin de prendre en compte cette source de variabilité, nous aurions souhaité relever la densité des lésions ou le nombre de spores inoculées. Cependant ces deux paramètres ne sont quasiment jamais communiqués dans les publications. Nous avons donc utilisé la concentration des solutions d'inoculation comme paramètre accessible s'en rapprochant le plus.

II.1.3. Traitement de la base de données

Le principal problème de la base de données est l'hétérogénéité des conditions expérimentales qui amène à considérer certaines variables initialement intéressantes comme des variables de nuisance. C'est par exemple le cas pour les types d'organes inoculés. De même, il est difficile de prendre en compte des paramètres pour lesquels beaucoup de données sont manquantes ou incomparables entre elles du fait d'un changement d'unité de mesure par exemple. Enfin, certaines subtilités des conditions expérimentales doivent être ignorées, comme les expériences exposant la plante inoculée à un couple de températures. Dans ce cas, la température relevée est celle à laquelle la plante a été le plus longtemps exposée avant l'apparition des spores. Le tableau 1 récapitule les changements effectués pour aboutir à la base de données finale.

Tableau 1 Transformation de la base de données initiale en un jeu de données exploitable statistiquement

1 période de latence = moyenne par		1 période de latence = moyenne des moyenne des LP par	
Isolat d'espèce de champignon	définition du paramètre élargie ou paramètre ignoré	Espèce de champignon	
Cultivar d'une espèce de plante hôte		Espèce de plante hôte	
Concentration de la solution d'inoculation		Toutes concentrations confondues	
Organes inoculés		Touts organes inoculés confondus	
Couple de températures ou température unique		Température unique (si la plante est placée 14h à 30°C et 10h à 20°C on considère la T° de 30°C)	
Hygrométrie		Toute hygrométrie confondue	
Type de reproduction		Touts type de reproduction	
Stratégie d'exploitation des ressources, zone climatique			
517 entrées différentes		81 entrées différentes	

III. Etablissement de la phylogénie des espèces

III.1. Choix de la séquence à comparer

Les ITS (Internal Transcribed Spacer) renvoient à une portion d'ARN non fonctionnelle située entre de l'ARN ribosomal structural sur un même ARN précurseur. Lu de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' cet ARN précurseur contient les séquences suivantes : 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA et 3'ETS. Les séquences ITS sont donc des régions non codantes qui sont excisées lors de l'épissage de l'ARN. La comparaison des séquences ITS est largement répandue dans les études de taxonomie et de phylogénie moléculaire pour plusieurs raisons. Les séquences ITS présentent un fort taux de variabilité même pour des espèces très proches phylogénétiquement et sont souvent peu variables en intra-spécifiques. De plus les ITS sont séquencés chez un très grand nombre de champignons.

L'ARNr est un ARN dont la séquence est très conservée chez différentes espèces vivantes. Les gènes codant pour cet ARN sont ainsi séquencés afin d'identifier l'appartenance d'un organisme à un groupe taxonomique et pour estimer le taux de divergence entre espèces.

Pour ces raisons, l'utilisation de la séquence de la totalité de l'ARN précurseur cité ci-dessus a été choisi en vue de l'établissement de l'arbre phylogénétique des espèces étudiées.

Les séquences d'ARN de chaque champignon ont été extraites de la banque de données Genbank.

III.2. Inférence de l'arbre phylogénétique des espèces étudiées

L'alignement de séquences est une étape préliminaire nécessaire à la comparaison des séquences. Elle permet de disposer les nucléotides des ARN de telle manière à pouvoir identifier les zones de concordance qui traduisent des similarités ou dissemblances de nature historique. La méthode d'alignement utilisée a été celle proposée par l'algorithme MUSCLE (Edgar 2004) qui permet l'alignement multiple de séquences.

L'utilisation de la méthode des inférences bayésiennes a permis d'établir l'arbre phylogénétique des espèces de champignons. C'est une méthode qui fait appel au concept des probabilités postérieures (le théorème de Bayes), où la probabilité est estimée sur la base d'un modèle d'évolution des caractères et

d'une certaine connaissance des données :
$$\Pr(\mathbf{H} / \mathbf{D}) = \frac{\Pr(\mathbf{D} / \mathbf{H}) \Pr(\mathbf{H})}{\Pr(\mathbf{D})}$$

où $\mathbf{H}$ est un hypothétique arbre phylogénétique et les données $\mathbf{D}$ sont les séquences comparées. En pratique, la probabilité postérieure d'une topologie d'arbre phylogénétique $\Pr(\mathbf{H} / \mathbf{D})$ ne peut être calculée. Cependant celle-ci peut être approximée par $\Pr(\mathbf{D} / \mathbf{H})$ si on néglige l'influence du ratio $\Pr(\mathbf{H}) / \Pr(\mathbf{D})$. A partir d'un échantillonnage d'arbres phylogénétiques créés aléatoirement (selon une loi $\Pr(\mathbf{H})$), on peut calculer numériquement la vraisemblance des données sachant l'arbre. L'arbre qui permet de maximiser $\Pr(\mathbf{D} / \mathbf{H})$ représente l'arbre qui a le plus de chance d'établir les bonnes relations entre les espèces.

III.3. Analyse statistique

III.3.1. Analyse conventionnelle des données

Le logiciel SAS a été utilisé afin de réaliser les statistiques basiques sur les données récoltées, les régressions linéaires et l'analyse de la covariance des données sans prise en compte de la phylogénie.

III.3.2. Méthode de calcul des contrastes indépendants (CI)

Les analyses statistiques qui considèrent à tort les données relatives à différentes espèces comme indépendantes conduisent généralement à augmenter le nombre d'erreurs de type 1, la signification

statistique des tests est reconnue alors que cela n'est pas vrai. Fixer le seuil de probabilité critique à 5% ne convient pas dans ces cas là. Il faut alors abaisser le seuil de probabilité critique pour que l'on n'observe pas des corrélations entre variables seulement par le fait du hasard. La méthode des contrastes indépendants établie par Felsenstein (1985) permet justement de prendre en compte la phylogénie des espèces pour rendre indépendantes les variables entre elles. Elle transforme N mesures dépendantes d'espèces sœurs en N-1 contrastes indépendants en comparant deux à deux les taxons frères afin d'évaluer la valeur du caractère pour l'ancêtre commun de ces deux taxons en prenant en compte la longueur des branches. L'opération est répétée autant de fois qu'il y a de variables à comparer. Une corrélation entre contrastes indépendants peut alors être effectuée et la signification du test peut cette fois être fixée à 5% étant donné que les observations ont été rendues indépendantes. Après comparaison de plusieurs logiciels, Phylocom a finalement été retenu pour l'analyse statistique car il présentait le plus de fonctionnalités. En effet, il permet le calcul de CI par la méthode Felsenstein (1985) pour des caractères continus ou binaires et il prend en charge les cas de polytomies (nœuds non résolus dans un arbre) et le calcul du signal phylogénétique (SP).

III.3.3. Calcul du signal phylogénétique (SP)

Le signal phylogénétique rend compte de la plus ou moins grande tendance qu'ont les espèces sœurs à se ressembler pour le caractère considéré. Le calcul du SP est basé sur un test utilisant la variance des CI. Phylocom compare la variance des CI de l'arbre étudié avec les variances obtenues sous l'hypothèse du modèle nul, c'est à dire dans l'hypothèse où les caractères ne dépendent pas de la phylogénie. Pour calculer les variances sous les hypothèses du modèle nul, Phylocom distribue aléatoirement les données dans l'arbre phylogénétique et la variance des CI ainsi obtenue est relevée. Plusieurs répartitions aléatoires sont générées afin d'obtenir une distribution des variances des CI. Si la variance de l'arbre étudié se situe en dessous du seuil de 5% des plus grandes variances générées sous les hypothèses du modèle nul, alors on considère que la phylogénie n'explique pas la variabilité du caractère et que les espèces sœurs n'ont pas une plus grande tendance à se ressembler.

IV. Résultats

IV.1. Présentation de la phylogénie des espèces

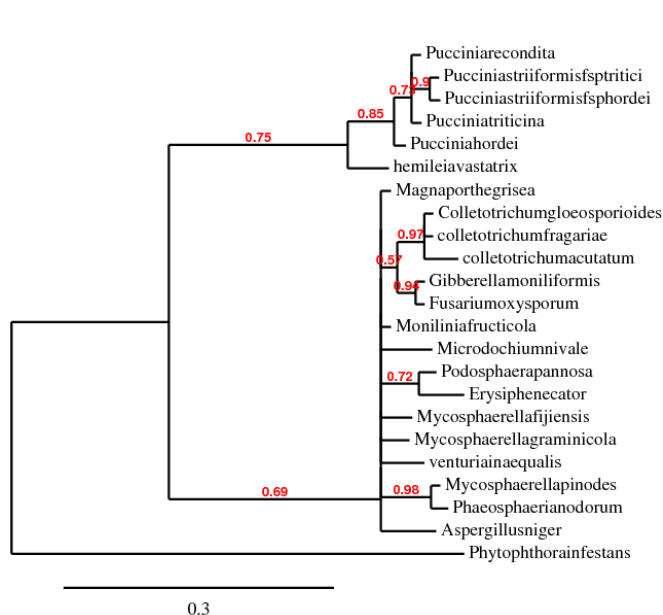


Figure 2 Arbre phylogénétiques des espèces étudiées.

L'arbre contient 23 espèces de champignons phytopathogènes. Le taxon des basidiomycètes est représenté par des rouilles, du genre **Puccinia** et **Hemileia**. Le taxon des ascomycètes possède une plus grande diversité de champignons causant des maladies diverses comme la cercosporiose (**Mycosphaerella**), la fusariose (Fusarium), ou encore la tavelure du pommier (**Venturia inaequalis**). Enfin le taxon des oomycètes à un unique représentant, **Phytophthora infestans** responsable du mildiou. Les nœuds sont en général bien supportés (valeurs en rouge sur la fig.2) mais il existe un certain nombre de polytomies non résolues.

IV.2. Présentation de la base de données

La base de données comporte 77 valeurs de LP et 9 valeurs de LP50 pour 23 champignons différents. Plus de la moitié des valeurs de LP sont inférieures à 15 jours. Les LP50 sont réparties pour moitié entre 6 et 18 jours et entre 18 et 24 jours. Les températures expérimentales vont de 5 à 35°C mais environ la moitié des périodes de latence relevées ont été obtenues pour des valeurs de température allant de 15 à 25°C. Enfin 21 espèces de plantes hôtes sont recensées. Certains champignons ont plusieurs valeurs de LP pour différentes températures (ex, *Podosphaera Pannosa*) ou pour différentes plantes hôtes (ex : *P. infestans*), d'autres n'ont qu'une valeur de LP comme *Puccinia striiformis* f. sp. *Hordei*. Le petit nombre de valeurs de LP50 relevées ne permet pas de faire des analyses statistiques. Les analyses présentées dans la suite ont été faites uniquement pour LP.

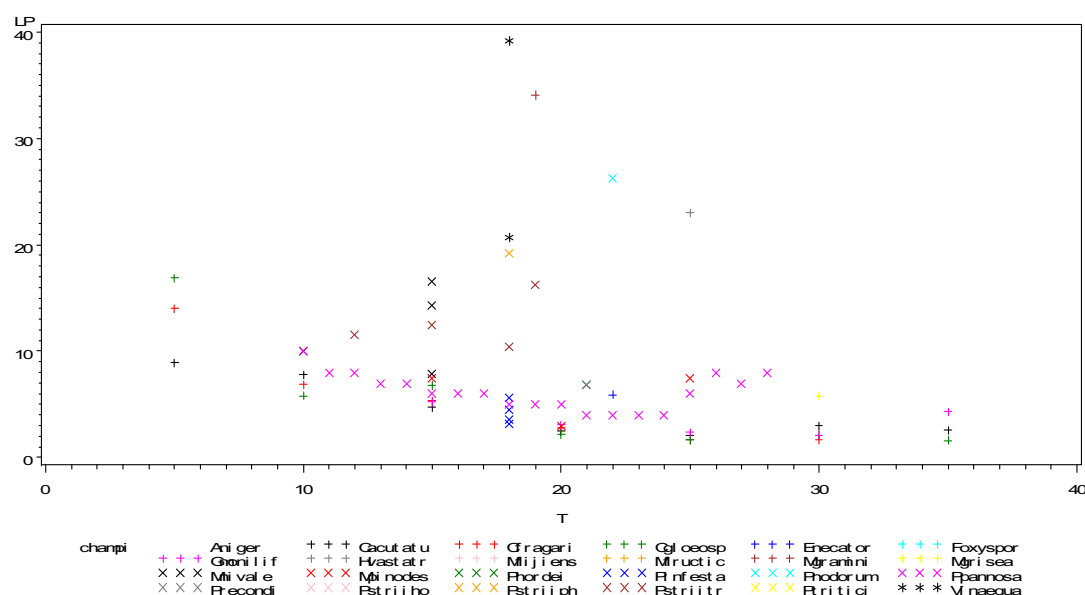


Figure 3 Période de latence LP en fonction de la température.

IV.3. Analyse conventionnelle des données

IV.3.1. Influence de la stratégie parasitaire (ER) et du climat d'origine (ZC) sur LP

On effectue un test d'égalité des moyennes afin de savoir si les stratégies d'exploitation des ressources et la zone climatique de prélèvement de l'agent pathogène ont une influence sur la variabilité interspécifique de la période de latence. L'hypothèse d'égalité des variances est satisfaite dans les deux cas mais celle d'égalité des moyennes est rejetée. En moyenne, les périodes de latence des champignons biotrophes strictes et facultatifs sont similaires. De même qu'en moyenne les périodes de latence des agents pathogènes issus de zones climatiques tempérées ou tropicales diffèrent peu entre elles.

Tableau 2 Statistiques basiques sur LP en fonction des classes ZC et ER

	Ecart type	moyenne
Caractère ER		
Biotrophes strictes	5,7	13,3
Facultatifs	7,4	7,4
Caractère ZC		
Tempéré	7,8	9,6
Tropical	6,6	6,2

IV.3.2. Analyse de la covariance

Afin de prendre en compte les paramètres qualitatifs que sont ZC et ER dans l'explication de la variabilité de LP, une analyse de la covariance est effectuée. Le modèle testé est le suivant : La période de latence dépend de la température de ZC et ER. Le modèle explique à 40% la variabilité de LP.

IV.3.3. Influence de la température sur LP

Le modèle de régression de la LP sur la température ne vérifie pas l'hypothèse de normalité des résidus, cependant la régression du logarithme décimal de la période de la latence sur la température permet de vérifier ces hypothèses qui sont nécessaires à la validité du modèle et à son interprétation. Ainsi le modèle explique à 90% (r^2 ajusté) la variabilité de Log(LP) en fonction de la température et la probabilité de rejeter ce modèle alors qu'il est vrai est inférieure à 0,008. La température est donc une variable dont dépend fortement la période de latence, celle-ci diminue de manière exponentielle lorsque la température augmente linéairement

IV.4. Méthode d'analyse comparative phylogénétique

IV.4.1. Signal phylogénétique

Tableau 3 Signal phylogénétique des variables retenues

Trait	Variance des CI	P-value (estimée par la position de la variance observée dans la distribution nulle)
Température	24.167	0.77
LP	75.108	0.03
Zone climatique ZC	0.147	0.70
Stratégie d'exploitation des ressources ER	0.037	0.65

Les caractères « Zone climatique » et « stratégie d'exploitation des ressources » sont codés de manière binaire : 1 pour un champignon prélevé en zone tropicale et 0 pour une zone tempérée ; 1 pour les champignons strictement biotrophes et 0 pour les champignons hémibiotrophes ou nécrotrophes. Les variances des contrastes indépendants des ZC et ER proches de 0 indiquent qu'il y a peu de variabilité pour ces caractères au sein de l'arbre phylogénétique étudié. Les variances sont bien loin de se trouver au-delà du seuil des 5% indiquant ainsi que des espèces sœurs ne tendent pas à se ressembler pour les caractères ZC et ER. En ce qui concerne ZC, les résultats doivent être interprétés avec précaution puisque, du fait du caractère émergent de certaines espèces, il arrive fréquemment qu'un même champignon se trouve dans des zones climatiques différentes. Par contre, le résultat sur ER est étonnant et sera discuté dans la partie suivante.

La température non plus n'est pas expliquée par la phylogénie. Une explication possible est qu'elle représente la température moyenne à laquelle l'expérience a été faite et non la température optimale du développement du champignon.

Enfin, la variance du caractère LP se situe au-delà du seuil des 5% ce qui indique que les espèces sœurs ont tendance à avoir une période de latence proche. La phylogénie explique en partie la variabilité du caractère période de latence (LP) entre les champignons.

IV.4.2. Corrélation entre CI

Tableau 4 Corrélation des contrastes indépendants
CI(LP)

CI(T)	- 0,58
CI(ZC)	-0,25
CI(ER)	-0,26

La corrélation entre le CI(LP) et le CI(T) est de $-0,58$ alors que la corrélation entre la température et la LP est de $-0,30$ (rappelons que les hypothèses de ce modèle n'étaient pas vérifiées). La corrélation négative entre CI(ZC) et CI(LP) mais aussi entre CI(LP) et CI(ER) indique que la période de latence a tendance à augmenter lorsque l'agent pathogène est issu de zone tempérée et lorsqu'il est un parasite facultatif. Phylocom ne donne pas d'information sur la significativité des coefficients de corrélation.

V. Discussion

V.1. Base de données

L'hétérogénéité des conditions expérimentales dans lesquelles sont réalisées les mesures de caractérisation de l'agressivité diminue fortement la confiance qu'on peut apporter à la base de données créée. Les modes opératoires varient souvent pour les caractères relevés d'une publication à une autre. Par exemple pour la température, des couples de températures ou températures uniques sont appliquées. La plante subit en général une période en chambre d'incubation variable en temps et en température. Les organes inoculés diffèrent fréquemment et ceux-ci peuvent être attachés à la plante ou découpés et cultivés sur milieu nutritif. De même, une autre source d'hétérogénéité se trouve dans l'âge des organes inoculés et leur étage sur la plante. Enfin, rappelons que les moyennes de la base de données finale ont été faites sans se préoccuper du type d'isolat et de la résistance ou sensibilité de l'hôte. La donnée qui aurait pu être la plus représentative de la réalité aurait été la période de latence du champignon sur cultivar sensible dans des conditions environnementales optimales de développement du champignon mais cette information est introuvable dans une grande majorité des publications. L'hétérogénéité des données est cependant le lot de toute analyse comparative, dont le principe est de supposer que la variance entre espèces est globalement plus importante que la variabilité intra-spécifique. Une analyse précise de la part de variance intra-spécifique serait bénéfique à la poursuite de cette étude. Il serait également intéressant de réfléchir à une prise de données sur de nouvelles espèces à partir de protocoles coordonnés entre les différents laboratoires impliqués.

V.2. Traitement statistique des données

Le calcul du signal phylogénétique indique qu'une partie de la variabilité de la période de latence est due à la phylogénie des espèces. Cependant, il est difficile d'interpréter tous les résultats de corrélations des contrastes indépendants. En effet, on ne peut pas directement comparer le coefficient de corrélation de CI(LP) sur CI(ZC) à un calcul équivalent qui ne prendrait pas en compte la phylogénie. Une régression directe de LP sur ZC est impossible puisque celui-ci est un paramètre qualitatif. De même faire une analyse de la covariance pour un modèle où LP dépendrait uniquement de ZC amène à considérer un modèle où les hypothèses de bases ne sont pas satisfaites (pas d'homoscédasticité des résidus qui sont distribués en deux groupes correspondant aux deux états, tropical et tempéré, de la variable ZC). Il en est de même pour le paramètre ER. Cependant, le coefficient de corrélation de CI(T) sur CI(LP) peut lui, être comparé à celui de la comparaison entre la température et LP. On constate que ce dernier est plus faible que le premier, la phylogénie apporte une information supplémentaire qui permet de mieux corréler les deux variables.

Au contraire de ce qu'on aurait pu attendre le coefficient de corrélation de CI(LogLP) sur CI(T), d'une valeur de $-0,42$ est moins élevé que celui de Log(LP) sur la température qui est de $-0,52$. Cela est sans doute dû au fait que le Logarithme « écrase » les données et donc réduit la variabilité entre CI d'où un moins bon coefficient de corrélation pour la comparaison des CI.

Le calcul des contrastes indépendants de ZC et ER est rendu possible grâce à leur assimilation à des caractères continus. En effet, le logiciel Phylocom évalue la valeur du caractère de l'ancêtre commun de deux taxons frères comme si celui-ci était une variable continue. Ainsi si un ancêtre à un descendant biotrophe (codé par 1) et un descendant non biotrophe (codé par 0) à longueur de branche égale, il lui sera attribué une valeur de caractère de 0,5. Cette valeur peut-elle être représentative d'un caractère qui existerait réellement ? Cette technique de calcul pose certains problèmes mais elle permet de ne pas perdre en puissance statistique. En effet en considérant le caractère comme continue, le calcul de 19 contrastes indépendants est possible alors qu'en le considérant comme binaire seul 8 CI sont calculés du fait du mode particulier de calcul (cf. Phylocom manual).

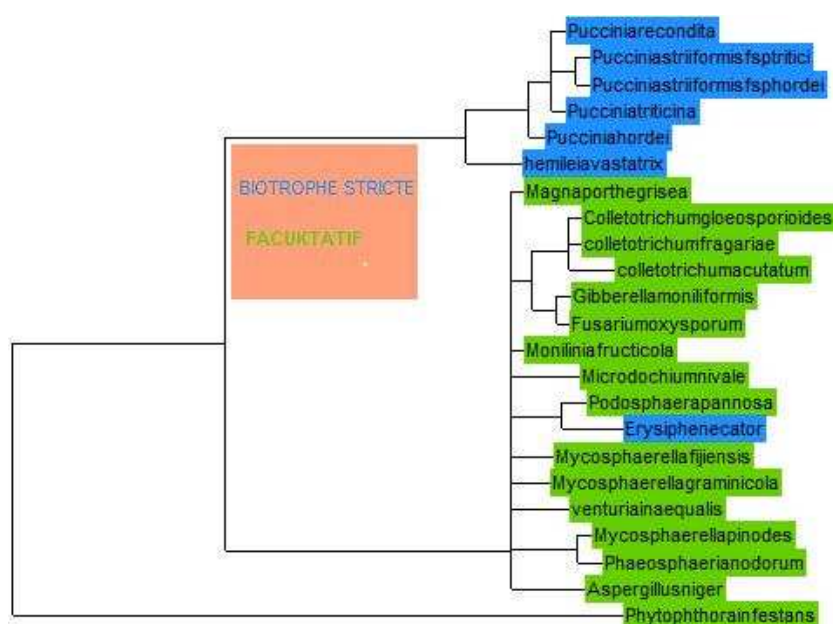


Figure 4 Variabilité des stratégies d'exploitation des ressources (ER) au sein de l'arbre phylogénétique

Le problème de la représentativité des variables au sein de l'arbre phylogénétique est également posé. Pour le caractère ER, on constate que tout les basidiomycètes sont biotrophes strictes et que quasiment tous les autres agents pathogènes sont des parasites facultatifs. Il y a peu de variabilité dans l'arbre ce qui occasionne une faible puissance statistique à détecter l'influence de la variable ER (ou ZC) sur LP. Cela peut expliquer la faiblesse du signal phylogénétique pour ER (partie IV.4.1)

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce court stage n'a pas permis de traiter toute l'étendue du problème mais au moins de se rapprocher des problématiques que soulevait une telle étude et la mise à jour de pistes de recherche afin d'améliorer cette première approche.

Malgré l'hétérogénéité des données, l'influence de la phylogénie sur la LP a été mise en évidence grâce au signal phylogénétique. Le coefficient de corrélation a été amélioré dans le cas de la comparaison entre température et LP en prenant en compte la phylogénie

La base de données qui est le socle de l'étude pourrait être améliorée en menant des expériences de mesure d'agressivité dont les conditions expérimentales seraient définies et fixées afin de réduire l'hétérogénéité mise en évidence lors de la lecture des publications. L'analyse des caractères binaires ou qualitatifs est peu répandue dans les outils de l'analyse comparative phylogénétique et pousser les recherches en ce sens permettrait d'analyser un plus grand nombre de variables d'intérêt. Une autre piste est de relever d'autres traits quantitatifs du champignon, comme la densité des lésions ou le taux de sporulation, afin de profiter des outils statistiques déjà en place et d'observer la corrélation des différents traits d'agressivité des champignons au travers de leurs liens phylogénétiques. Le logiciel utilisé ne prend pas en compte la variance des caractères étudiés ce qui fait défaut pour la fiabilité des calculs.

Enfin le calcul des contrastes indépendants, celui du signal phylogénétique et de l'arbre phylogénétique nécessite de faire des hypothèses sur le mode d'évolution du caractère LP (hypothèse du mouvement brownien dans cette étude) qu'il faudrait vérifier. L'arbre phylogénétique peut être également consolidé en prenant en compte une autre séquence d'ADN ou d'ARN et diversifié en veillant à prendre des agents pathogènes permettant d'augmenter la variabilité des caractères dans l'arbre (par exemple plus de biotrophes strictes).

Bibliographie sélective

Edgar, Robert C. (2004), MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-97.

Huelsenbeck, J. P, and F. R. Ronquist. In Press. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Biometrics*.

Bénédicte Pariaud (2008), Agressivité de *Puccinia triticina* (agent de la rouille brune du blé) et son adaptation à l'hôte.

LUTZONI ET AL. In *American Journal of Botany*. ASSEMBLING THE FUNGAL TREE OF LIFE: PROGRESS, CLASSIFICATION, AND EVOLUTION OF SUBCELLULAR TRAITS

T. Garland, A.F. Benett and E.L. Rezende in *th Journal Of Experimental Biology*. Phylogenetic approaches in comparative physiology.

S. Morand1 and R. Poulin in *Advances In Parasitology*. Phylogenies, the Comparative Method and Parasite Evolutionary Ecology

Chevenet F., Brun C., Banuls A.L., Jacq B. and R. Christen TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees ***BMC Bioinformatics*** 2006, 7:439

Logiciels

TREEDYN Copyright (C) 2000-2007 Chevenet F.

PHYLOCOM Version 4.0.1 c 2008 Campbell O. Webb, David D. Ackerly, Steven W. Kembel.

Sites internet

<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html#Comparative>

<http://www.phylogeny.fr>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.indexfungorum.org/>

Titre : Evolution de l'agressivité des champignons phytopathogènes, couplage des approches théorique et empirique

Résumé :

Les organismes vivants puisent leurs ressources de l'environnement pour les allouer aux différentes fonctions biologiques assurant leur développement (croissance, survie, reproduction). La quantité de ressources disponibles dans un environnement étant finie voire limitante, les individus doivent faire des compromis lors de l'allocation de ces ressources à leurs différentes fonctions biologiques. Ces compromis contraignent le développement des individus et entraînent l'apparition d'autres compromis entre leurs traits d'histoire de vie (âge et taille à maturité, nombre de descendants), conditionnant ainsi les capacités d'adaptation des individus à leur environnement.

Au cours de cette thèse, nous avons étudié l'évolution de traits d'histoire de vie des pathogènes relatifs à la virulence, par une approche de modélisation. Nous avons centré notre approche sur l'étude des stratégies d'allocation des ressources entre la croissance (ou multiplication intra-hôte) et la production de spores au cours d'une infection par un unique génotype pathogène. Nous avons déterminé, les stratégies optimales d'allocation des ressources ponctionnées à l'hôte, entre la multiplication intra-hôte et la production de spores dans différentes conditions écologiques. Le résultat principal de ces travaux de modélisation est qu'il n'est jamais optimal d'allouer un pourcentage fixe des ressources exploitées à la croissance et à la production de spores tout au long de l'infection. Au contraire, la stratégie optimale comporte généralement une période de latence, c'est-à-dire un temps au cours duquel toute l'énergie est investie dans la croissance et où aucune spore n'est produite. Après la période de latence, toutes les ressources consommées sont utilisées pour la production de spores si le pathogène a un accès limité aux ressources de l'hôte. Au contraire, si le pathogène a un accès illimité aux ressources de l'hôte, une partie fixe des ressources consommées est réservée pour la maintenance des formes de multiplication intra-hôte. Ces modèles mathématiques fournissent non seulement des prédictions qualitatives sur les dynamiques intra-hôte des agents pathogènes mais permettent également de quantifier la variation attendue de certains traits couramment mesurés lors d'expérimentation d'infection en conditions contrôlées.

Dans un deuxième volet de ces travaux, des éléments de validation empirique de ces modèles ont été recherchés au travers d'expérimentations menées sur les deux modèles biologiques couramment manipulés par les équipes d'accueil : l'agent de la pyriculariose du riz (*Magnaporthe oryzae*) et l'agent de la rouille du peuplier (*Melampsora larici-populina*). Les observations réalisées sont en adéquation avec les prédictions théoriques et confirment la pertinence des hypothèses et de la démarche de modélisation.

Mots-clé : virulence, évolution des stratégies d'infection, champignon pathogène, pathogène producteur de spores, théorie du contrôle optimal, latence.

Title: Evolution of phytopathogenic fungi aggressiveness, linking theoretical and empirical approaches

Abstract:

Living organisms extract resources from their environment and invest them toward various biological functions (growth, survival, reproduction). Available resources in an environment are usually limited so that organisms have to trade-off the resources invested in different biological functions. These trade-offs in resource investment reverberate in trade-offs between life-history traits (age and size at maturity, number of offspring) and determine pathogen potential to adapt to their environment.

During this work, we have developed models of evolution of pathogen life-history traits in relation with virulence, in order to enhance our understanding of the host-parasite interaction. We studied resource allocation strategy during infection caused by spore-producing pathogen. We have determined optimal resource allocation strategies between intra-host multiplication and spore production in different ecological settings. The main result of this work is that the optimal strategy never consists in investing a fixe proportion of the extracted resources toward growth and spore production. On the contrary, the optimal strategy is defined by the existence of a latent period, a period of time during which all extracted resources are investing toward within-host multiplication and no spore is produced. After latency, when the pathogen has a limited access to host resources, consumed resources are invested toward spore production only. On the contrary, when the pathogen has an unlimited access to host resources, a fixed proportion of host resources are invested toward maintenance of within-host multiplication forms. These two models offer qualitative predictions for the intra-host dynamics of the pathogen and enable to study traits that are fluently measured in infection experiments.

A second part of this work presents empirical test of these theoretical assumptions, through experimentations on *Magnaporthe oryzae*, responsible for rice blast and on *Melampsora larici-populina* responsible for poplar rust. Our observations on these pathogens seem to agree with our theoretical predictions and corroborate the relevance of our modelling assumptions and approach.

Keywords: virulence, evolution of infection strategies, pathogenic fungi, spore-producing pathogens, optimal control theory, latency.