



**HAL**  
open science

# Stratégies de reproduction de l'oomycète hétérothallique *Phytophthora infestans* en réponse aux infections multiples et à la résistance partielle de son hôte *Solanum tuberosum*

Julie a J Clément

► **To cite this version:**

Julie a J Clément. Stratégies de reproduction de l'oomycète hétérothallique *Phytophthora infestans* en réponse aux infections multiples et à la résistance partielle de son hôte *Solanum tuberosum*. Mycologie. Université Européenne de Bretagne; AgroCampus Ouest, 2011. Français. NNT : 2011NSARA069 . tel-04012750

**HAL Id: tel-04012750**

**<https://hal.science/tel-04012750v1>**

Submitted on 3 Mar 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° ordre : 2011-16  
N° Série : A-69

## THESE / AGROCAMPUS OUEST

Sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne  
pour obtenir le diplôme de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES,  
AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE**

Spécialité : Biologie et Agronomie

**Ecole Doctorale : Vie Agro Santé**

présentée par :

**Julie CLEMENT**

**Stratégies de reproduction de l'oomycète hétérothallique *Phytophthora  
infestans* en réponse aux infections multiples et à la résistance partielle de son  
hôte *Solanum tuberosum***

soutenue le 12 juillet 2011 devant la commission d'Examen

Composition du jury :

Jacqui SHYKOFF

Benoît MOURY

Christian LANNOU

Maria MANZANARES-DAULEUX

Didier ANDRIVON

DR CNRS Paris XI

DR, INRA Avignon

DR, INRA Grignon

Pr, Agrocampus Ouest

DR, INRA Rennes

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Examinateur

Directeur de thèse



---

**Julie CLEMENT, 2011. Stratégies de reproduction de l'Oomycète hétérothallique *Phytophthora infestans* en réponse aux infections multiples et à la résistance partielle de son hôte *Solanum tuberosum***

---

**Résumé:** Les traits d'histoire de vie des agents pathogènes sont le fruit d'une longue coévolution avec leur(s) hôte(s). Déterminant leurs capacités de colonisation, de dispersion, et de survie, ils sont le reflet du potentiel d'invasion et de persistance des espèces pathogènes au sein des systèmes naturels et agricoles. La sélection naturelle favorise les schémas de reproduction conférant une fitness optimale, eux-mêmes modulés par bon nombre de facteurs, comme la résistance de l'hôte ou les infections multiples. Mieux comprendre les interactions hôte-pathogène et pathogène-pathogène représente donc l'une des clés permettant de mieux appréhender l'adaptation des populations pathogènes à la résistance de leur hôte.

L'objectif global de ce travail de thèse est d'étudier l'impact de ces deux types d'interaction sur les stratégies de reproduction de *Phytophthora infestans*, agent responsable du mildiou de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Plus précisément, ce travail s'attache à (i) déterminer l'effet des composantes de résistance partielle de la plante hôte sur la reproduction sexuée de l'agent pathogène; (ii) décrire les stratégies de reproduction en réponse aux infections multiples impliquant des souches sexuellement incompatibles; et (iii) comparer les stratégies de reproduction en infections multiples pour des interactions sexuellement compatibles et incompatibles.

Nos résultats indiquent que la résistance partielle affecte de manière similaire les reproductions sexuée et asexuée. Par ailleurs, les variétés augmentant la latence semblent limiter la formation d'oospores, structures de survie issues de la reproduction sexuée. Ainsi, le sexe peut être vu comme une adaptation aux variétés les moins résistantes, rapidement détruites par la maladie. Nos résultats mettent également en évidence la diversité des stratégies de reproduction adoptées en réponse aux infections multiples, et soulèvent la question du coût du sexe chez *P. infestans*. Deux stratégies contrastées sont mises en évidence: certains génotypes sont compétitifs asexués, c'est-à-dire capables d'accroître leur reproduction lors d'interactions incompatibles, mais moins performants lorsque le sexe est possible; les autres génotypes, compétitifs sexués, répondent de façon opposée. L'importance du génotype du compétiteur est néanmoins à souligner. La plasticité des stratégies de reproduction de cette espèce explique que l'adaptation d'un tel agent pathogène puisse être observée à des échelles de temps très courtes, par exemple au cours d'une saison culturale, au cours de laquelle la fréquence des infections multiples est attendue croissante. Ce travail souligne l'importance de considérer les stratégies de reproduction et l'effet de l'hôte dans les mesures de fitness des agents pathogènes. Ces mesures, fortement dépendantes de la complexité du système étudié, pourraient permettre de tester l'adaptation à la résistance de l'hôte aux échelles de la population et du paysage agricole via l'utilisation de modèles d'écologie évolutive. Ces connaissances pourraient à terme contribuer à l'élaboration de stratégies pour la gestion durable des résistances des plantes cultivées.

**Mots-clés:** stratégie de reproduction, fitness, trait d'histoire de vie, interaction hôte pathogène, résistance partielle, infections multiples, *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum*.

---

**Julie CLEMENT, 2011. Reproductive strategies of the heterothallic Oomycete *Phytophthora infestans* in response to multiple infections and to partial resistance of its host *Solanum tuberosum***

---

**Abstract:** Life history traits of pathogens are the products of a long coevolution with their host(s). They determine the pathogen ability to colonize, disperse and survive, and thus reflect the potential of invasiveness and persistence within natural and agricultural systems. Natural selection retains reproductive pattern exhibiting higher fitness, this latter being modulated by several factors such as host resistance or multiple infections. Understanding these host-pathogen and pathogen-pathogen interactions is a key issue for dealing with adaptation of pathogen populations to host resistance.

The aim of this PhD thesis is to study impact of these two scales of interaction on reproductive strategies of *Phytophthora infestans*, the pathogen responsible for late blight of potato (*Solanum tuberosum*). More precisely, this work aims (i) to determine which components of partial resistance impact sexual reproduction of the pathogen; (ii) to describe reproductive strategies adopted in response to multiple infections for sexually incompatible isolates; and (iii) to compare reproductive strategies between compatible and incompatible isolates during multiple infections.

Partial resistance impacts similarly sexual and asexual reproductions of *P. infestans*. Furthermore, varieties which increase the latent period seem to limit oospore formation, which are survival structures resulting from sexual reproduction. Therefore, sex can be seen as an adaptation to less resistant varieties, which rapidly succumb to the disease. Our results also highlight the diversity of reproductive strategies observed during multiple infections, and raise the question of the cost of sex for the pathogen. Two contrasted strategies were identified: some genotypes, called asexual competitive, are able to improve their reproductive rate during incompatible infections, but less performing when sex is possible; the others, named sexual competitive, respond in the opposite way. The importance of the competing genotype is highlighted. The plasticity of reproductive strategies explains why *P. infestans* adaptation can be observed at short time scales, such as a cultural season, during which the frequencies of multiple infections are expected to increase. This work underlines the importance to take reproductive strategies and host effect into account when measuring the fitness of pathogens. These assessments, which are highly dependent on the system complexity, should allow to test the adaptation to host resistance at the population and landscape levels, using models of evolutionary ecology. This knowledge could eventually contribute to develop plans for the durable management of host resistance.

**Keywords:** reproductive strategy, fitness, life history trait, host-pathogen interaction, partial resistance, multiple infections, *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum*.

# Remerciements

La thèse est le fruit de multiples interactions entre un thésard et ses hôtes dans un environnement très spécifique. Sans eux, le thésard ne pourrait mener à bien son parasitisme, exprimer ses nouveaux traits et mener à bien son projet. Ces quelques mots ne reflèteront sans doute pas ma profonde reconnaissance envers celles et ceux qui m'auront accompagnée durant tout ou partie de ma phase parasitaire, mais je tiens à remercier vivement les quelques personnes suivantes.

Dans son unité d'accueil, le thésard parasite les ressources matérielles et financières. Je tiens donc à remercier tout d'abord l'UMR BiO3P, son équipe de direction (Jean-Christophe, Denis, Alain et Bruno) et son équipe de gestion (Géraldine, Dominique, Michèle et Patricia), de m'avoir accueilli dans ces murs, la documentaliste, Anne-Sophie Grenier, de m'avoir aidé dans mes recherches bibliographiques, de même que l'INRA d'avoir financé ce travail au travers du projet INRA - BBSRC.

J'adresse mes plus vifs remerciements aux membres du jury qui ont accepté de mesurer ma fitness en lisant et en jugeant mon travail de thèse: Jacqui Shykoff et Benoît Moury, les rapporteurs; Christian Lannou, Maria Manzanarès-Dauleux, les examinateurs; et Didier Andrivon, mon directeur de thèse.

Merci à l'ensemble de mon comité de thèse de m'avoir guidée pour mener à bien ce travail: Christian Lannou, Fabien Halkett, Jean-Eric Chauvin, Frédéric Hamelin et Maria Manzanarès-Dauleux. J'ai apprécié la richesse de nos échanges et vous suis très reconnaissante de m'avoir fait bénéficier de votre point de vue.

Je remercie vivement mes deux encadrants Didier et Hélène qui m'auront permis d'acquérir de nouvelles compétences, connaissances et m'auront aidée à m'adapter au monde de la recherche. Je pense avoir, grâce à eux, gagné quelques points de fitness et je leur en suis très reconnaissante.

Je pense tout d'abord avoir su m'adapter à mon hôte principal, Didier Andrivon, grâce à sa grande tolérance face au parasitisme de sa thésarde. Je le remercie de m'avoir toujours fait confiance, de m'avoir laissé libre cours quant à l'orientation du sujet, de m'avoir rassurée quant j'en avais besoin mais aussi d'avoir toujours cru en moi. Cette liberté, Didier, m'a beaucoup appris durant cette thèse et je t'en serai toujours reconnaissante.

Je pense également avoir su m'adapter à mon hôte alternatif, Hélène Magalon, grâce à sa présence dans tous les moments, les meilleurs comme les plus difficiles. Je te remercie d'avoir toujours été présente et très réactive, de m'avoir conseillée dans mes choix, et de m'avoir prêté souvent ton épaule pour que je verse ma petite larme. Ton arrivée m'a permis d'avoir une vision nouvelle de mon travail. Mille mercis d'avoir été là et de m'avoir apporté ton expérience.

Je tiens également à adresser ma plus vive reconnaissance à Emmanuel Jacquot qui a accepté de coopérer sur mon projet, au départ pour le développement de l'outil de PCRq puis naturellement, sur les projets d'infections multiples. Je suis ressortie de chacune de nos nombreuses réunions des idées et des remarques pertinentes plein la tête. Nos échanges ont été très riches et je te serai toujours reconnaissante d'avoir investi autant de temps dans mon projet.

Un grand merci à Isabelle Glais, Bruno Marquer pour vos (gros) coups de mains pendant mes expés démesurées, mais aussi à Claudine Pasco et Roselyne Corbière, membres de mon équipe

travaillant sur le mildiou, pour vos conseils sur notre bestiole préférée, vos coups de mains, votre expérience.

Merci aux mains d'œuvre et stagiaires qui ont contribué très largement aux manip mais également aux réflexions, Cécile, Gersende et Vincent avec qui j'ai beaucoup aimé travaillé, je leur suis reconnaissante d'avoir pris part à mon projet et de s'y être investie sans relâche. J'ai apprécié cette expérience d'encadrement qui m'a enrichie d'un point de vue professionnel et humain.

J'ai coévolué également avec de nombreuses personnes au sein de l'unité, trop nombreuses pour être toutes citées. J'ai apprécié travailler dans cette ambiance chaleureuse où l'humour égaye quotidiennement les labos. J'ai rencontré des gens formidables, des gens serviables, des gens toujours prêts à se décarcasser pour les autres (Hein Mamie!). Je remercie particulièrement le groupe BM, et Kévin, Stéphanie et Agnès que j'ai beaucoup sollicités pour mes manip.

Je ne peux bien évidemment pas oublier les nombreuses interactions avec les autres parasites: Gabou, Virgil, Laure, et surtout Natasboub, Mathieu la barrette et Renaud ceux qui ont facilité grandement mon adaptation à l'UMR le jour et aux rues de Rennes la nuit, puis se sont dispersés bien trop vite vers de nouvelles contrées; Morgane, Chrichri, Emilie avec qui j'ai coévolué durant ces 3 années, partageant nos moments difficiles, nous motivant mutuellement, fêtant nos maigres succès, souvent autour d'un verre et d'une baguette apéro au bon vieux Bistrot du Rheu (aujourd'hui disparu, paix à son âme); Muriel, Melen, BenJ, mes trois jeunes petits padawans que je vois évoluer jour après jour, qu'il sera dur de vous quitter d'ici quelques mois après tant de moments agréables partagés, qu'il sera dur de choisir mon successeur à la tête du merveilleux Portakab', j'attends offrandes et mielleux discours avant toute décision. Le Portakab'...merveilleux refuge n'abritant que de jeunes temporaires où rien de ce qui s'y passe ne doit franchir ses murs de carton... Bien qu'il soit difficile de s'acclimater à cet environnement si hostile tant les conditions climatiques y sont changeantes (de 10°C à 40°C), il y fait quand même bon vivre et il est agréable d'y avoir évolué avec tous ceux qui y seront passés. Le Portakab' crée des liens très forts, je ne pourrais donc oublier ceux que j'ai croisés et avec qui j'ai noué des liens d'amitié: Emilie (ma cobureau, marmiton confirmée), Pascaline (victime du rounard, reine des pâtes carbo + Viennetta biscuit-caramel), Romain (le rounard), Fred (le roi du palet), Brice (mon cobureau éclair, une bombe d'énergie), Emilie, Angélique et bien sûr, je citerais à nouveau Melen, Muriel et BenJ. Nos virées, nos soirées, nos barbeuks resteront à jamais gravés, ils auront rendue cette thèse bien plus qu'agréable. Dans ces conditions, je veux bien recommencer! Je crois qu'il sera difficile de partir...

Enfin, je voudrais remercier très chaleureusement mes apparentés, qui ont toujours cru en moi jusque là et sans qui ma fitness serait piètre. Maman, tu as toujours fait en sortes que je réussisse, tu as toujours été là, de bons conseils et me soutenant moralement. Ma soeurette, maîtresse Laura, qui m'a toujours encouragée, merci aussi d'avoir relu tout ce manuscrit. Mes grands-parents, mes seconds parents, qui ont toujours été là, je leur en suis très reconnaissante.

Pour finir, un grand merci à mon partenaire compatible, Benjamin, de m'avoir soutenue dans cette dernière phase de rédaction où je n'aurais pas toujours été très coopérative; de m'avoir apporté toutes les ressources nécessaires à mon cerveau très demandeur en sucre et autres douceurs; de m'avoir relue aussi et aidée à imprimer; d'avoir pris soin de moi pour que je sois encore plus fit durant ces dernières semaines, ces dernières heures.

Merci à tous!

*A mon grand-père*

*A mon père*



# Table des matières

## **INTRODUCTION GENERALE**

<b>CONTEXTE AGRONOMIQUE</b>	<b>1</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>3</b>
<b>1. LA RESISTANCE DE L'HOTE : UN MODULATEUR DES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE DU PATHOGENE</b>	<b>5</b>
1.1. LES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE DES AGENTS PATHOGENES, ENTRE INVASION ET SURVIE	5
1.1.1. LES COMPOSANTES QUANTITATIVES DU POUVOIR PATHOGENE	5
1.1.2. SURVIE INTERSAISON	8
1.2. RELIER LES CONCEPTS DE PHYTOPATHOLOGIE AUX CONCEPTS DE L'ÉVOLUTION	10
1.2.1. LA FITNESS	10
1.2.2. LA VIRULENCE	12
1.3. RÉSISTANCE DE LA PLANTE HÔTE	13
1.3.1. RÉSISTANCE QUALITATIVE : UNE RÉPONSE BINAIRE À L'INFECTION	13
1.3.2. RÉSISTANCE QUANTITATIVE : UNE MODULATION DES COMPOSANTES QUANTITATIVES DU POUVOIR PATHOGENE	13
1.4. ÉVOLUTION DES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE DES AGENTS PATHOGENES	15
1.4.1. THÉORIE DE L'ÉVOLUTION DES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE	15
1.4.2. ÉVOLUTION DES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE CHEZ LES AGENTS PATHOGENES	17
1.4.3. ADAPTATION À LA RÉSISTANCE QUANTITATIVE	17
<b>2. INFECTIONS MULTIPLES ET TRAITS D'HISTOIRE DE VIE DU PATHOGENE</b>	<b>20</b>
2.1. RÉPONSES ADAPTATIVES DES AGENTS PATHOGENES AUX INFECTIONS MULTIPLES	21
2.1.1. L'EXCLUSION COMPÉTITIVE	21
2.1.2. LA COMPÉTITION	21
2.1.3. LA COOPÉRATION	23
2.2. CONSÉQUENCES DES INFECTIONS MULTIPLES SUR LA DYNAMIQUE ÉPIDÉMIQUE ET L'ÉVOLUTION DES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE	25
2.2.1. ÉVOLUTION DES TRAITS D'HISTOIRE DE VIE EN INFECTIONS MULTIPLES	25
2.2.2. DYNAMIQUE ÉPIDÉMIQUE EN INFECTIONS MULTIPLES	26
2.3. IMPORTANCE DU GÉNOTYPE DES SOUCHES EN INFECTIONS MULTIPLES	27
2.3.1. APPARENTEMENT	27
2.3.2. COMPATIBILITÉ SEXUELLE	28
<b>3. REPRODUCTION SEXUEE VERSUS ASEXUEE</b>	<b>30</b>
3.1. LE COÛT DU SEXE	30
3.2. AVANTAGES DE LA REPRODUCTION SEXUÉE	33
3.2.1. HYPOTHÈSES THÉORIQUES	33
3.2.2. AVANTAGES DU SEXE PROPRES AUX AGENTS PATHOGENES	33
3.3. PEUT-ON SURVIVRE SANS SEXE?	34
3.4. L'ÉQUILIBRE ENTRE REPRODUCTIONS SEXUÉE ET ASEXUÉE	35

<b>4. MODELE D'ETUDE : <i>PHYTOPHTHORA INFESTANS</i>, AGENT DU MILDIOU DE LA POMME DE TERRE</b>	<b>38</b>
<b>4.1. LE PATHOGENE: L'OOMYCETE RAVAGEUR <i>PHYTOPHTHORA INFESTANS</i></b>	<b>38</b>
4.1.1. PHYLOGENIE	38
4.1.2. CYCLE ET TRAITS DE VIE	39
<b>4.2. EXPRESSION DE LA MALADIE, LE MILDIOU DE LA POMME DE TERRE</b>	<b>41</b>
4.2.1. SYMPTOMES	41
4.2.2. LUTTE	43
<b>4.3. L'HOTE : LA POMME DE TERRE <i>SOLANUM TUBEROSUM</i></b>	<b>45</b>
<b>4.4. AVANTAGES DU MODELE DANS NOTRE ETUDE</b>	<b>46</b>
<b>5. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE</b>	<b>48</b>

## **CHAPITRE 1**

### **LA RESISTANCE DE L'HOTE ET SES CONSEQUENCES SUR LA REPRODUCTION SEXUEE**

<b>1. OBJECTIFS DE TRAVAIL</b>	<b>51</b>
<b>2. ARTICLE 1</b>	<b>52</b>

Alteration of pathogenicity-linked life history traits by resistance of its host *Solanum tuberosum* impacts sexual reproduction of the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans*

## **CHAPITRE 2**

### **DETECTER ET QUANTIFIER LA FITNESS REPRODUCTIVE EN INFECTIONS MULTIPLES**

<b>1. OBJECTIFS DE TRAVAIL</b>	<b>63</b>
<b>2. ARTICLE 2</b>	<b>64</b>

Discrimination and quantification of *Phytophthora infestans* isolates using a real-time PCR assay that targets polymorphisms of the Avr3a gene

## **CHAPITRE 3**

### **INFECTIONS MULTIPLES ET LEURS CONSEQUENCES SUR LA REPRODUCTION ASEXUEE**

<b>1. OBJECTIFS DE TRAVAIL</b>	<b>81</b>
<b>2. ARTICLE 3</b>	<b>82</b>

To be or not to be competitive: *Phytophthora infestans*' dilemma for optimizing its asexual reproductive strategy in intra- and intergenotype multiple infections

## **CHAPITRE 4**

### **INFECTIONS MULTIPLES ET INVESTISSEMENT DIFFERENTIEL DANS LES REPRODUCTIONS SEXUEE ET ASEXUEE**

#### **1. OBJECTIFS DE TRAVAIL** **101**

#### **2. ARTICLE 4** **102**

Love and hate in the heterothallic Oomycete *Phytophthora infestans*: how multiple infections impact reproductive strategies

## **DISCUSSION GENERALE**

#### **1. STRATEGIES DE REPRODUCTION ET CONCEPT DE FITNESS** **121**

##### **1.1. LA FITNESS D'UN COUPLE, UN PROBLEME PROPRE AUX HETEROTHALLIQUES** **121**

##### **1.2. FITNESS ABSOLUE OU RELATIVE?** **122**

##### **1.3. FITNESS ET DYNAMIQUE EPIDEMIQUE** **123**

##### **1.4. PLACE DE L'HOTE DANS LA DEFINITION DE LA FITNESS** **125**

#### **2. STRATEGIES DE REPRODUCTION ET DYNAMIQUE DES POPULATIONS** **128**

##### **2.1. STRATEGIES DE REPRODUCTION EN PHASE EPIDEMIQUE** **128**

##### **2.2. STRATEGIES DE REPRODUCTION ET SURVIE** **129**

#### **3. CONSEQUENCES POUR L'ADAPTATION DES POPULATIONS ET LA DURABILITE DES RESISTANCES** **132**

#### **4. CONCLUSION** **134**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** **135**

## **ANNEXES** **147**

ANNEXE 1 - DYNAMIQUE DE SPORULATION DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS* A L'ECHELLE DE LA FEUILLE SUR *SOLANUM TUBEROSUM*

ANNEXE 2 - VARIABILITE DE LA REPRODUCTION ASEXUEE INTRASPECIFIQUE ET INDIVIDUELLE CHEZ *PHYTOPHTHORA INFESTANS*, L'AGENT RESPONSABLE DU MILDIOU DE LA POMME DE TERRE

# Introduction générale



## Contexte agronomique

Dans les systèmes agricoles, les agents pathogènes des plantes occasionnent des pertes économiques importantes, motivant les travaux dans le domaine de la protection des cultures. Dans un contexte où les autorités cherchent à réduire l'utilisation des produits phytosanitaires (Grenelle de l'environnement et plan Ecophyto 2018 en France, mesures législatives européennes du "paquet pesticides"), dont les effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine sont à présent démontrés, la sélection de variétés résistantes à leurs ennemis devient une solution intéressante pour maintenir une efficacité de lutte satisfaisante.

Néanmoins, l'efficacité des résistances introduites dans ces variétés n'est pas toujours durable, c'est-à-dire suffisamment satisfaisante après une utilisation sur du long terme et sur de grandes surfaces (Johnson, 1984). En effet, les agents pathogènes des plantes disposent de caractéristiques particulières (tailles de populations importantes, temps de génération court, systèmes de reproduction, capacité de dispersion) leur conférant un fort potentiel évolutif favorisant une adaptation rapide aux défenses de leur hôte (McDonald & Linde, 2002). Il n'est donc pas surprenant d'observer que les agents pathogènes sont tout à fait capables de s'adapter à la résistance de leur hôte. De plus, cette durabilité dépend crucialement de la nature de la résistance, généralement moindre pour les résistances totales que pour celles dites partielles (Pink, 2002; Andrivon *et al.*, 2007). Les résistances totales, empêchant toute infection lorsqu'elles sont efficaces, sont malheureusement rapidement contournées car les efforts à fournir pour acquérir la capacité à infecter ces nouvelles variétés sont minimales. Les résistances partielles, quant à elles, n'éliminent pas totalement la maladie: elles altèrent les traits d'histoire de vie des agents pathogènes et réduisent alors leur performance.

Plus difficiles à contourner, elles sont donc reconnues plus durables, mais peuvent également subir des pertes d'efficacité. Il est donc essentiel d'avoir une bonne connaissance de la capacité d'adaptation des populations pathogènes afin de maximiser la durabilité de ces résistances. Ceci passe entre autres par une évaluation de la réponse des agents pathogènes à la résistance de leur hôte et aux infections multiples en termes de stratégies de reproduction, celles-ci influençant directement leur performance.

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein de l'équipe "Caractérisation et gestion durable des résistances des plantes aux maladies" de l'UMR "Biologie des organismes et des populations appliquée à la protection des plantes" de l'INRA de Rennes. Notre étude s'est focalisée sur le couple *Phytophthora infestans* / *Solanum tuberosum*. Ce modèle dispose de caractéristiques intéressantes pour répondre aux objectifs de ce travail de thèse. Nous les décrirons précisément après une courte synthèse bibliographique introduisant les concepts théoriques et l'état de l'art sur trois grands domaines développés dans ce travail, à savoir (i) la résistance de l'hôte comme modulateur des traits d'histoire de vie des agents pathogènes, (ii) les infections multiples et (iii) les systèmes de reproduction sexuée et asexuée.

## Avant Propos

Les adaptations des organismes à leur niche écologique sont surprenantes de par leurs diversités. Elles sont le fruit d'une longue évolution avec leur environnement et résultent donc, entre autres, de l'interaction entre les espèces. Les exemples de coévolution entre espèces ne manquent pas dans le monde vivant. Citons par exemple les interactions des plantes à fleur avec leurs insectes pollinisateurs ; le cas particulier des orchidées de Madagascar et de leur papillon disposant d'une trompe parfaitement adaptée au long tube nectarifère de la fleur, indique que ces adaptations peuvent s'avérer très spécifiques.

Les relations hôte-pathogène sont des exemples extraordinaires d'interactions entre espèces, puisque tout organisme vivant est concerné en tant qu'hôte ou agent pathogène. Les effets néfastes des agents pathogènes sur la survie ou la reproduction de leur hôte questionnent pourtant l'existence et surtout le maintien de telles relations compétitives dans le monde vivant. Les hôtes évoluent bien évidemment vers des stratégies de défense vis-à-vis de ces pilleurs, mais inévitablement, les agents pathogènes répondent en développant de nouvelles armes leur permettant de contrer ces assauts. Cette course évolutive aux armements est bien connue des biologistes et des évolutionnistes et est illustrée par la théorie de la Reine Rouge (van Valen, 1973).

Comme chez tous les êtres vivants, les traits d'histoire de vie des agents pathogènes sont donc soumis à des pressions de sélection. Leurs caractéristiques particulières, basées essentiellement sur leur dépendance vis-à-vis de leur hôte, en font des modèles d'études fascinants tant du point de vue évolutif qu'épidémiologique. Etudier leurs stratégies de vie, et plus particulièrement leurs stratégies de reproduction, permet de mieux comprendre leur dynamique et leur adaptation à leur(s) hôte(s).

Les agents pathogènes sont également amenés à interagir entre eux au sein de leur hôte, puisqu'il reste fréquent dans la nature que les hôtes soient infectés par des espèces d'agents pathogènes différents ou par des génotypes différents d'une même espèce (Read & Taylor, 2001). Ces infections multiples peuvent influencer les stratégies de reproduction des compétiteurs et donc modifier leur performance, ce qui peut avoir des conséquences néfastes sur leur hôte.

Le travail de thèse présenté ici s'intéresse aux deux échelles d'interactions que sont l'interaction hôte-pathogène et l'interaction pathogène-pathogène, et à leurs conséquences sur les stratégies de reproduction des agents pathogènes.

# 1. La résistance de l'hôte : un modulateur des traits d'histoire de vie du pathogène

## 1.1. Les traits d'histoire de vie des agents pathogènes, entre invasion et survie

Une histoire de vie est le récit des événements qui ponctuent l'existence d'un organisme, ainsi que leur place dans le temps, de sa naissance à sa mort (Michalakis *et al.*, 2010). Les traits d'histoire de vie sont des traits biologiques du cycle de vie de cet organisme, contribuant à sa reproduction et à sa survie (Roff, 1992; Stearns, 1992) et dont la variation modifie fortement sa valeur sélective (ou "fitness"), c'est-à-dire sa performance en termes de contribution aux générations suivantes (Thomas *et al.*, 2010; et cf. §1.2.1 ). Ils peuvent être assimilés à des décisions prises tout au long de la vie d'un organisme, conditionnant le champ des possibles pour de futures décisions, et répondant à des questions du type « Dois-je commencer à me reproduire ? Quelle part d'énergie dois-je allouer à ma reproduction ? Combien de descendants dois-je produire ? » (Michalakis *et al.*, 2010).

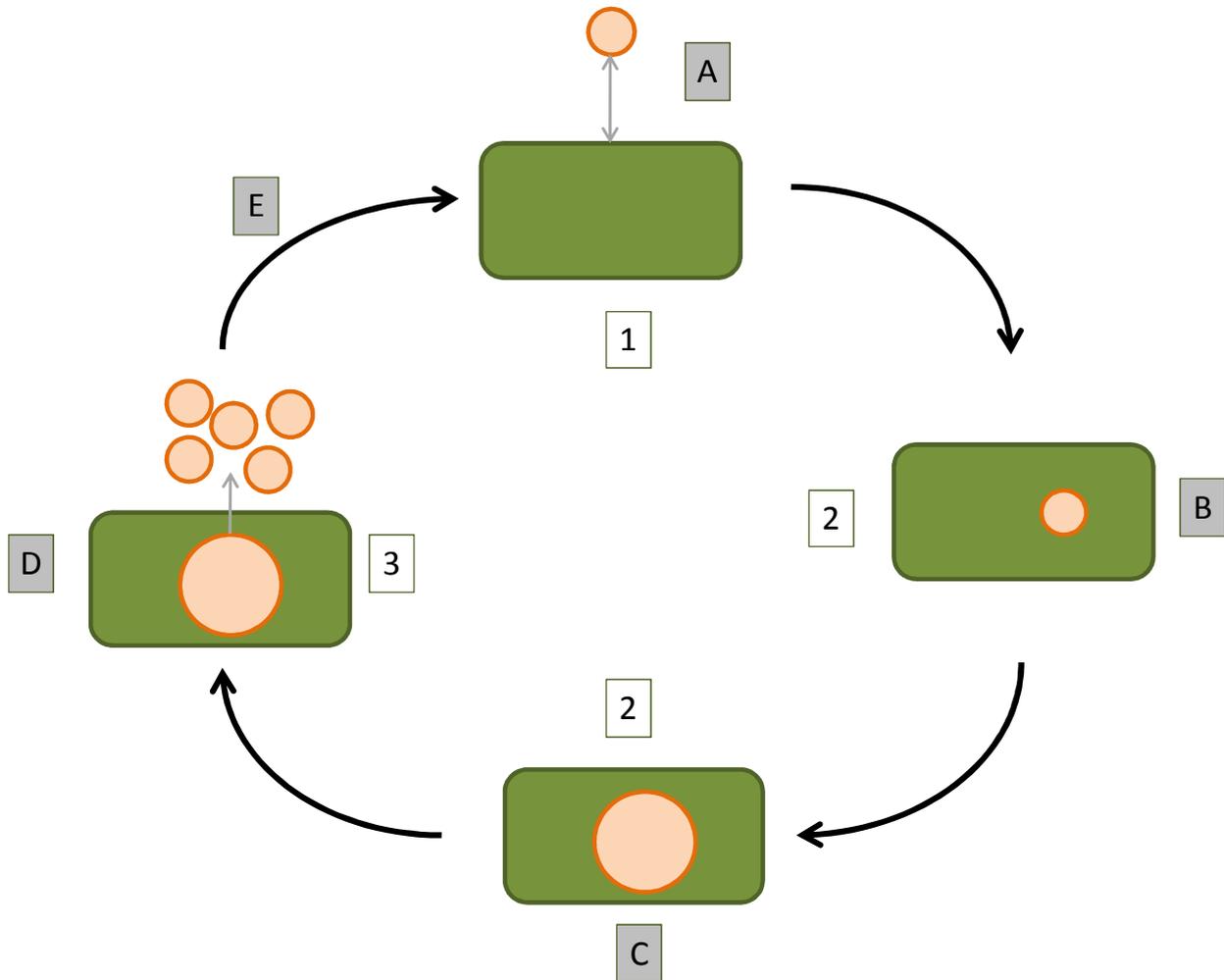
Les traits d'histoire de vie des agents pathogènes de plantes sont le fruit d'une longue coévolution avec leur(s) hôte(s). Déterminant leurs capacités de colonisation, de dispersion, et de survie, ils sont le reflet de leur potentiel d'invasion et de persistance au sein des systèmes naturels et agricoles. Ces traits peuvent être regroupés en deux catégories : ceux intervenant dans la phase épidémique et ceux liés à l'étape de survie durant la mauvaise saison.

### 1.1.1. Les composantes quantitatives du pouvoir pathogène

En phytopathologie, on appelle pouvoir pathogène l'aptitude d'un agent pathogène à causer la maladie, c'est-à-dire la capacité à envahir son hôte et à s'y établir (Agrios, 2005). Le pouvoir pathogène inclut un aspect qualitatif et un aspect quantitatif (Watson, 1970).

L'aspect qualitatif est la capacité ou non du pathogène à infecter son hôte (passage de A à B, Figure 1). Ce phénomène, conditionné par la reconnaissance du pathogène par l'hôte, est basé sur le modèle gène-pour-gène (Flor, 1971). L'infection suppose donc une relation de compatibilité entre l'agent pathogène et

son hôte et engendre une réponse « tout ou rien ». Cet aspect ne sera pas traité dans ce manuscrit puisque le travail présenté ici s'attache à étudier l'aspect quantitatif, uniquement décrit lors d'interactions compatibles.



**Figure 1** : Schéma général du monocycle de vie d'un parasite sporulant. Le parasite est schématisé par un rond orange, l'hôte par un rectangle vert. Les lettres se reportent aux étapes du cycle de vie du parasite, les chiffres à l'état de l'hôte.

- |   |                       |
|---|-----------------------|
| A : Interaction entre l'hôte et le parasite.              | 1 : Hôte sain         |
| B : Pénétration du parasite dans l'hôte / Infection       | } 2 : Hôte infecté    |
| C : Croissance du parasite. Colonisation des tissus hôtes |                       |
| D : Reproduction/multiplication du parasite               | } 3 : Hôte infectieux |
| E : Dissémination/transmission                            |                       |

L'aspect quantitatif, encore appelé agressivité, regroupe plusieurs composantes correspondant à des traits mesurables du cycle de vie du pathogène. L'efficacité d'infection, la période de latence, la taille des lésions et le taux de reproduction sont les composantes les plus étudiées. Elles conditionnent la dynamique et l'évolution des populations pathogènes, comme le prouvent les modèles d'épidémiologie évolutive dont les paramètres sont dérivés de ces composantes (Gilligan, 2002; Gilligan & van den Bosch, 2008).

(i) L'efficacité d'infection (définie comme la probabilité qu'un agent pathogène infecte son hôte sachant que l'interaction est compatible, Figure 1) est souvent délaissée car difficile à mesurer précisément chez les parasites sporulants. En effet, son estimation dépend de la capacité à réaliser expérimentalement de nombreuses inoculations monospores, techniquement compliquées et coûteuses en temps. Ces obstacles imposent généralement l'utilisation de proxys, comme par exemple le nombre de lésions formées par unité de surface foliaire dans le cas des rouilles (Pariaud *et al.*, 2009b).

(ii) La période de latence (ou l'âge à la première reproduction) est l'intervalle de temps entre l'infection et l'apparition de la sporulation (temps écoulé entre A et D, Figure 1). Elle détermine le nombre de générations au cours de la vie du pathogène, allant d'une seule pour les espèces monocycliques (cas par exemple des rouilles des espèces forestières ou des charbons) à plusieurs pour les espèces polycycliques (cas de la majorité des pathogènes de plante). La dynamique épidémique du pathogène est donc fortement liée à la période de latence, ce qui en fait un paramètre capital pour l'estimation du potentiel invasif des populations pathogènes.

(iii) La taille des lésions (ou taux de croissance) peut être définie comme la surface nécrosée et/ou sporulante de l'organe infecté (feuille, tige, racine,...). Il s'agit du trait le plus souvent mesuré lorsqu'il s'agit d'estimer l'agressivité d'un pathogène car il fait écho à la mesure de la sévérité de la maladie chez la plante, estimée comme le pourcentage de tissu végétal malade (Madden *et al.*, 2007).

(iv) Le taux de reproduction (ou nombre de descendants) est la quantité de structures de reproduction (spores, bactéries, molécules virales) comptées (Bai *et al.*, 2000; Montarry *et al.*, 2008; Rolland *et al.*, 2009) ou pesées (Pariaud *et al.*, 2009b) produites par unité de temps et par lésion. Pour les pathogènes sporulants, plusieurs types de spores, peuvent être différenciés au cours de leur cycle de vie. Elles sont généralement dotées de fonctions différentes (dispersion, infection secondaire, survie), et peuvent résulter de différents processus de reproduction (clonalité, sexualité, parasexualité). Les mesures d'efficacité d'infection, de latence et de taux de sporulation devraient donc être appliquées pour chaque type de spores (Gilles *et al.*, 2001). Cependant, ces paramètres n'ont pas les mêmes interprétations selon la nature et la fonction des spores au sein de la dynamique épidémique (Pariaud *et al.*, 2009a). C'est pourquoi nous distinguerons les spores alimentant directement la dynamique épidémique au cours d'une saison

de celles formées en fin de saison, et dont la fonction est généralement la survie durant la mauvaise saison.

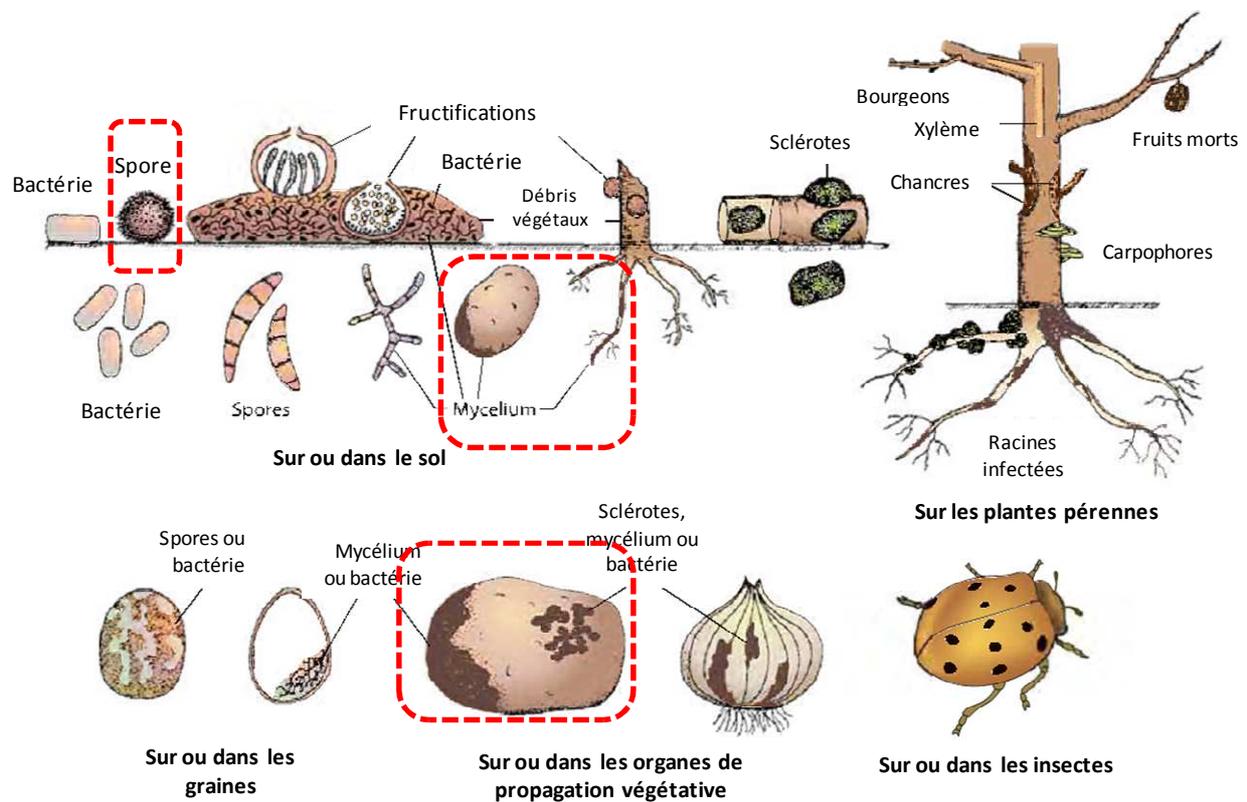
### 1.1.2. **Survie intersaison**

Tous les agents pathogènes sont dépendants du cycle de vie de leur plante hôte. Ils doivent en effet faire face, de façon périodique, (1) à son absence totale quand leur plante hôte est annuelle, événement particulièrement accentué dans les agrosystèmes, où semis et récolte déterminent la durée de sa présence, (2) à son absence partielle par exemple dans le cas des pérennes à feuillage caduque, ou (3) à une activité physiologique ralentie malgré une présence continue quand il s'agit d'un hôte pérenne à feuillage persistant. Les agents pathogènes ont donc développé de nombreuses adaptations pour faire face à ces alternances de présence/absence (ou activité ralentie) de l'hôte.

L'une de ces adaptations est la survie, soit à l'état libre (dans le sol) soit dépendant d'une partie de l'hôte (débris, graines, organes de propagation végétative), et réalisée sous la forme d'une structure spécialisée ou non (Figure 2, Agrios, 2005). Dans le cas des pathogènes de type fongique, les structures spécialisées sont diverses: il peut s'agir de spores résistantes (ex. : oospores et chlamydospores des Oomycètes, Hemmes, 1988), de fructifications résistantes contenant les spores (ex. : pseudothèces renfermant les ascospores chez de nombreux Ascomycètes comme *Leptosphaeria maculans*, Williams, 1992), ou de structures résistantes sans spores (les sclérotés chez de nombreux genre d'Ascomycètes [*Botrytis*, *Sclerotinia*, etc.] et de Basidiomycètes [*Rhizoctonia*], Ryley *et al.*, 2003). Généralement, la phase de reproduction sexuée des agents pathogènes, lorsqu'elle existe, est concomitante de l'étape de formation de ces structures spécialisées dans la survie. Elle peut avoir lieu en amont et aboutir à la formation de ces structures de survie (cas par exemple des Oomycètes formant les oospores résistantes par voie sexuée) ou en aval de leur formation (cas par exemple des Basidiomycètes, dont les téléospores résistantes sont les structures qui différencieront les gamètes). Cependant, la réciproque n'est pas vraie : toute forme de survie différenciée n'est pas forcément issue de la reproduction sexuée (ex : chlamydospores et sclérotés).

Certains agents pathogènes ont su tirer parti de la présence de plantes pérennes, naturelles ou cultivées, constituant un refuge pour la survie hivernale (ou estivale). Deux cas de figures sont possibles (Agrios, 2005): (1) la plante pérenne est l'hôte principal, et l'infection de la plante annuelle est un dommage collatéral de l'existence de cette source d'inoculum, (2) l'agent pathogène infecte alternativement deux hôtes différents, dont au moins un pérenne, pour compléter son cycle (cas de nombreuses rouilles hétéroïques comme *Melampsora larici-populina*, Frey & Pinon, 2004).

Dans tous les cas, à l'issue de la phase de survie, la population pathogène disponible constitue l'inoculum primaire qui va amorcer un nouveau cycle de maladie. La quantité d'inoculum primaire est un paramètre important conditionnant la dynamique épidémique (Cook & Yarham, 2006), il représente donc un levier d'action pour la gestion des épidémies (van der Plank, 1963; Madden *et al.*, 2007). De même, le type d'inoculum primaire disponible, dépendant donc de la (ou des) stratégie(s) adoptée(s) par le pathogène pour survivre, peut conditionner la date de début de l'épidémie (Hannukkala *et al.*, 2007) ou l'efficacité des infections primaires (Olaya & Abawi, 1994).



**Figure 2 :** Localisation et description des formes de survie chez les champignons et les bactéries phytopathogènes. Encadrées en rouge, les formes de survie correspondant à notre modèle *Phytophthora infestans* / *Solanum tuberosum* (d'après Agrios, 2005)

Les traits d'histoire de vie des agents pathogènes sont donc à considérer avec le plus grand intérêt, qu'ils soient relatifs à leur potentiel d'invasion ou de survie. Ils seront abordés, utilisés et interprétés quelque peu différemment par les pathologistes, les épidémiologistes ou les évolutionnistes mais leur importance n'est en aucun cas discutable dans l'étude de la dynamique et de l'évolution des populations pathogènes et de leurs conséquences sur les dommages occasionnés à leur plante hôte.

## 1.2. Relier les concepts de phytopathologie aux concepts de l'évolution

L'étude des interactions hôte-pathogène au sein de différentes communautés scientifiques a conduit à des divergences dans l'utilisation de termes pour désigner les mêmes concepts. Deux termes différents peuvent ainsi évoquer un même concept ou un même terme peut se rapporter à deux concepts différents. Ainsi, la virulence (en écologie évolutive) et l'agressivité (en phytopathologie) font toutes deux référence à l'importance des dommages causés par un parasite à son hôte, et par extension à la composante quantitative du pouvoir pathogène (cependant, ces deux concepts ne sont pas totalement équivalents, cf. §1.2.2). Par contre, en phytopathologie, la virulence désigne classiquement la composante qualitative du pouvoir pathogène, habituellement nommée infectivité en écologie évolutive. Il est donc très important de définir clairement ces termes et d'identifier la communauté ciblée avant toute utilisation de termes pouvant prêter à confusion (Shaner *et al.*, 1992; Andrivon, 1993).

Limiter l'impact négatif des populations pathogènes sur leur(s) hôte(s) n'est possible qu'au travers d'une bonne connaissance de l'évolution de leurs traits d'histoire de vie. Il est donc indispensable de marier les concepts d'écologie évolutive à ceux de l'épidémiologie et de la phytopathologie pour aider à la conception de stratégies durables de gestion des épidémies (Galvani, 2003). Deux concepts essentiels en écologie évolutive des interactions hôte-pathogène sont ceux de fitness et de virulence. Nous avons tenté d'identifier si les traits mesurés pour illustrer ces concepts d'écologie évolutive pouvaient trouver des équivalences chez les traits d'histoire de vie mesurés par les phytopathologistes.

### 1.2.1. La fitness

*Can we doubt (...) that individuals having any advantage, however slight, would have the best chance of surviving and of procreating their kind. On the other hand, we may feel sure that any variation in the least degree injurious would be rigidly destroyed. This preservation of favourable individual differences and variations, and the destruction of those which are injurious, I have called Natural Selection.*

C. Darwin (1859), *On the origin of Species*

#### *Définition et mesure de la fitness*

La fitness (ou valeur sélective) est un concept inventé pour résumer les interactions complexes qui sont à l'origine des changements évolutifs observés au sein des populations sous sélection naturelle (Stearns,

1992). Elle symbolise la contribution d'une entité aux générations ultérieures (Thomas *et al.*, 2010), et implique généralement des traits d'histoire de vie impliqués dans la survie et le succès reproducteur (Day & Otto, 2001). Ce concept peut être appliqué à différentes échelles de temps (voir par exemple le cas des fitness Malthusienne et Darwinienne, Day & Otto, 2001) et de niveau d'organisation du vivant, de l'allèle à l'espèce, en passant par l'individu, le groupe et la population (Day & Otto, 2001). Sa représentation nécessite d'en définir une mesure (Roff, 1992; Stearns, 1992; Combes, 1997; Day & Otto, 2001), pouvant être absolue ou relative (Day & Otto, 2001). Cependant, il n'existe pas de consensus quant à la définition de cette mesure. En effet, l'approche utilisée doit être adaptée au système analysé et au problème que l'on cherche à résoudre (Stearns, 1992) et peut, selon les situations, être estimée par une ou plusieurs composantes (Thomas *et al.*, 2010).

Ainsi, en épidémiologie évolutive, la fitness est fréquemment mesurée par les modélisateurs comme le nombre potentiel d'infections secondaires, mieux connu sous le terme  $R_0$  ou nombre de reproduction de base (May & Anderson, 1983). Son calcul dépend du modèle mathématique utilisé pour décrire la dynamique du système et peut aisément être adapté à des agents phytopathogènes, filamenteux et sporulants (Montarry *et al.*, 2010b). Salvaudon *et al.* (2005) ont tenté d'estimer expérimentalement  $R_0$  par des tests de transmission, dans lesquels le nombre de lésions nouvellement formées à partir d'une plante malade a été compté sur des plantes piège. Cette procédure a l'avantage d'estimer directement la contribution du pathogène à la génération suivante, en une seule mesure. Cependant, cette mesure est la résultante de la combinaison de plusieurs paramètres propres au pathogène (sporulation, efficacité d'infection, ...) et est fortement liée au choix du génotype de l'hôte pour tester la transmission.

En biologie des populations, la fitness est plutôt mesurée, pour un individu, comme l'espérance du nombre de descendants viables qu'il peut produire (Pringle & Taylor, 2002; Thomas *et al.*, 2010). Cette définition suppose (1) de savoir définir un individu et (2) qu'il ait une croissance finie, deux conditions qu'il est difficile de satisfaire pour les microorganismes et pour lesquels une mesure instantanée de la production de descendants est préconisée (c'est-à-dire la fitness Malthusienne, Pringle & Taylor, 2002).

### *Relier la fitness aux concepts de phytopathologie*

La fitness d'un pathogène, qu'elle soit mesurée comme un nombre d'infections secondaires ou un nombre de descendants produits, fait donc référence à des traits impliqués dans la transmission (Pariaud *et al.*, 2009a). Ainsi, parmi les traits décrits au début de ce chapitre (§1.1), on note ceux qui interviennent dans la transmission au sein d'une même saison (l'efficacité d'infection et le taux de reproduction) et ceux qui seront impliqués dans la transmission entre saisons (ex. le taux de production de structures de survie). La

phase de survie imposée par l'absence périodique de l'hôte n'est intégrée à l'étude de l'évolution de la transmission du pathogène ( $R_0$ ) que depuis peu et seulement d'un point de vue théorique (Castel, 2010; van den Berg *et al.*, 2011). Expérimentalement, la mesure de fitness dérive généralement d'estimations de paramètres à l'échelle d'une lésion durant un seul cycle de reproduction (Pariaud *et al.*, 2009a), et fait donc appel aux traits d'histoire de vie impliqués dans la définition de l'agressivité plutôt qu'à ceux relatifs à la phase de survie.

### 1.2.2. **La virulence**

#### *Définition et mesure de la virulence*

La virulence est définie en écologie évolutive comme l'augmentation de la mortalité de l'hôte résultant de l'infection par le pathogène (Bull, 1994), mais également comme l'ensemble des effets néfastes induits par la présence du pathogène sur la survie et/ou la fécondité (c'est-à-dire la fitness) de l'hôte (Lefèvre *et al.*, 2010) et/ou sur sa compétitivité (Lively, 2001). Expérimentalement, et en accord avec cette définition large, la virulence peut être estimée de différentes façons par mesure de traits propres à l'hôte : l'anémie relative (de Roode *et al.*, 2005b), la durée de vie (Ben-Ami *et al.*, 2008), la reproduction relative (Salvaudon *et al.*, 2005), la mortalité relative (Magalon *et al.*, 2010) ou le taux de croissance relatif (Nidelet *et al.*, 2009) n'en sont que quelques exemples. La diversité existant dans les mesures de la virulence vient sans doute de sa dépendance vis-à-vis de la définition de la fitness (de l'hôte dans ce cas), et pour laquelle nous avons conclu qu'il était nécessaire de tenir compte du système, de l'échelle et des questions scientifiques posées avant d'en choisir une mesure.

#### *Relier la virulence aux concepts de la phytopathologie*

Bien que le terme de virulence soit parfois défini comme une mesure du degré de pathogénicité, équivalent à la composante quantitative du pouvoir pathogène décrit au §1.1.1 (<http://www.apsnet.org/edcenter/illglossary/Pages/default.aspx>), il est important de souligner que toutes les composantes du pouvoir pathogène ne reflètent pas une diminution de la fitness de l'hôte (par exemple le taux de reproduction; Pariaud *et al.*, 2009a). Il est donc plus adéquat d'identifier les traits d'histoire de vie de l'agent pathogène qui trouvent effectivement une correspondance de mesure chez l'hôte, comme cela peut être le cas pour la taille des lésions que nous avons par ailleurs également défini comme une mesure de la sévérité de la maladie. Il est admis que la virulence est une cause directe de l'exploitation de l'hôte par le pathogène. Par conséquent, son augmentation se traduit, la plupart du temps, par une augmentation de la

transmission de l'agent pathogène (Bull, 1994; Frank, 1996; Lively, 2001) et du taux de reproduction efficace. Cependant, ce raisonnement n'est pas généralisable, puisqu'il existe des systèmes pour lesquels la virulence est la conséquence de la production de toxines et non de l'exploitation directe de l'hôte par le pathogène (Day, 2002). Ainsi, pour chaque système étudié, il est important de connaître les mécanismes à l'origine du phénomène de virulence puisque les théories fondées sur l'évolution de la virulence semblent en dépendre (Day, 2002).

### **1.3. Résistance de la plante hôte**

Toute plante possédant les qualités qui empêchent le développement d'un agent pathogène donné, en l'excluant totalement ou en limitant ses effets néfastes, est dite résistante (Agrios, 2005). Deux types de résistance existent : la résistance qualitative et la résistance quantitative (van der Plank, 1968).

#### **1.3.1. Résistance qualitative : une réponse binaire à l'infection**

La résistance qualitative, encore appelée résistance totale ou verticale par van der Plank (1968), est caractérisée par une absence totale de développement de la maladie, ce qui empêche la multiplication de l'agent pathogène (Parlevliet, 1979). Cette capacité lui est généralement conférée par un gène unique appelé gène de résistance, et n'est efficace qu'à l'encontre des génotypes de l'agent pathogène possédant le gène d'avirulence correspondant: c'est le modèle gène-pour-gène (Flor, 1971). La reconnaissance du produit du gène d'avirulence, sécrété par l'agent pathogène, par le récepteur codé par le gène de résistance de la plante conduit à une cascade de réactions qui aboutit à la résistance. Les mécanismes de défense mis en jeu conduisent à une réaction d'hypersensibilité, assimilable à un suicide des cellules environnant le point d'infection (Agrios, 2005). Ce type de résistance est du type « tout ou rien » et cible la composante qualitative du pouvoir pathogène décrite au §1.1.1. Il est également possible de voir ce type de résistance comme agissant sur l'efficacité d'infection, la rendant nulle en cas de résistance.

#### **1.3.2. Résistance quantitative : une modulation des composantes quantitatives du pouvoir pathogène**

La résistance quantitative, encore appelée résistance partielle ou horizontale par van der Plank (1968), est caractérisée par l'absence d'interactions spécifiques entre les génotypes de l'hôte et du parasite (van der

Plank, 1968). Elle n'empêche pas l'infection par l'agent pathogène mais ralentit le développement de ce dernier (van der Plank, 1968; Parlevliet, 1979). Le déterminisme génétique de la résistance partielle se précise depuis quelques années, et tend à confirmer que plusieurs gènes ou régions génomiques appelées QTL (Quantitative Trait Loci) seraient impliqués dans l'expression des phénotypes résistants (St Clair, 2010).

Deux méthodes existent pour estimer le niveau de résistance partielle d'une variété de plante hôte. La première est d'estimer la progression de la sévérité de la maladie sur plante entière au cours d'une épidémie et de la comparer à celle observée sur une variété sensible de référence. Différents paramètres peuvent être estimés à partir des courbes de progression de la maladie et permettent d'établir des notations de résistance : l'AUDPCr (relative Area Under Disease Progress Curve) est par exemple une mesure fréquemment utilisée dans les notations de résistance de la pomme de terre au mildiou (Andrivon *et al.*, 2006). Cette mesure reflète l'effet cumulé sur plusieurs cycles épidémiques de différentes composantes de résistance (Parlevliet, 1979). La seconde méthode s'attache donc à mesurer précisément chacune de ces composantes de résistance, qui correspondent à l'effet de la plante résistante sur les différentes composantes d'un monocycle épidémique. Nous avons vu précédemment que celles-ci correspondaient à des traits d'histoire de vie de l'agent pathogène liés à la capacité d'invasion (§1.1.1). Ainsi, des traits considérés comme propres à l'agent pathogène, comme la latence, le taux de croissance des lésions ou le taux de sporulation, décrits uniquement en cas d'interaction compatible et dépendants du génotype d'hôte sur lesquels ils sont mesurés, peuvent également caractériser les composantes d'une résistance partielle. De façon plus pertinente, ces traits devraient donc être caractérisés comme propres à l'interaction hôte-pathogène et non seulement au parasite lui-même (Loegering, 1978). Par abus de langage, nous continuerons à parler de "traits de l'agent pathogène", tout en gardant à l'esprit cette dernière remarque. Techniquement, ces tests sont généralement menés en conditions contrôlées, durant un monocycle et parfois sur un unique organe, détaché ou non, de la plante hôte.

La résistance qualitative ne sera pas considérée dans la suite du manuscrit, puisque les questions soulevées dans ce travail de thèse sont centrées sur la modulation des composantes quantitatives du pouvoir pathogène, c'est-à-dire le cas où l'hôte n'empêche pas l'infection mais en modifie les paramètres quantitatifs.

Les caractéristiques de résistance relatives à la plante peuvent être interprétées comme ses effets néfastes vis-à-vis du développement du pathogène, qui sont alors le résultat de leur interaction. Ainsi, la résistance qualitative fait écho à la composante qualitative du pouvoir pathogène, de même que la résistance quantitative est analogue à la composante quantitative. Les traits d'histoire de vie du pathogène sont mesurés dans chacun des cas, seul le point de vue adopté (celui de la plante ou du pathogène) déterminera le vocabulaire à employer ou l'interprétation qui s'ensuivra.

## 1.4. Evolution des traits d'histoire de vie des agents pathogènes

Les traits d'histoire de vie sont variables d'une espèce à l'autre, mais aussi, au sein d'une même espèce, d'une population à l'autre voire d'un individu à l'autre, ces différences étant en partie expliquées par des différences génétiques (Michalakis *et al.*, 2010). L'héritabilité des traits d'histoire de vie semble suffisante pour conclure à l'existence d'une forte variation génétique dans les populations naturelles (Mousseau & Roff, 1987), représentant alors un potentiel d'évolution suite à des changements de conditions de vie (Michalakis *et al.*, 2010). De telles évolutions ont d'ailleurs été observées à notre échelle de temps, suggérant même, chez les guppies, des vitesses d'évolution jusqu'à sept fois plus rapides que celles suggérées par les données fossiles (Reznick *et al.*, 1997).

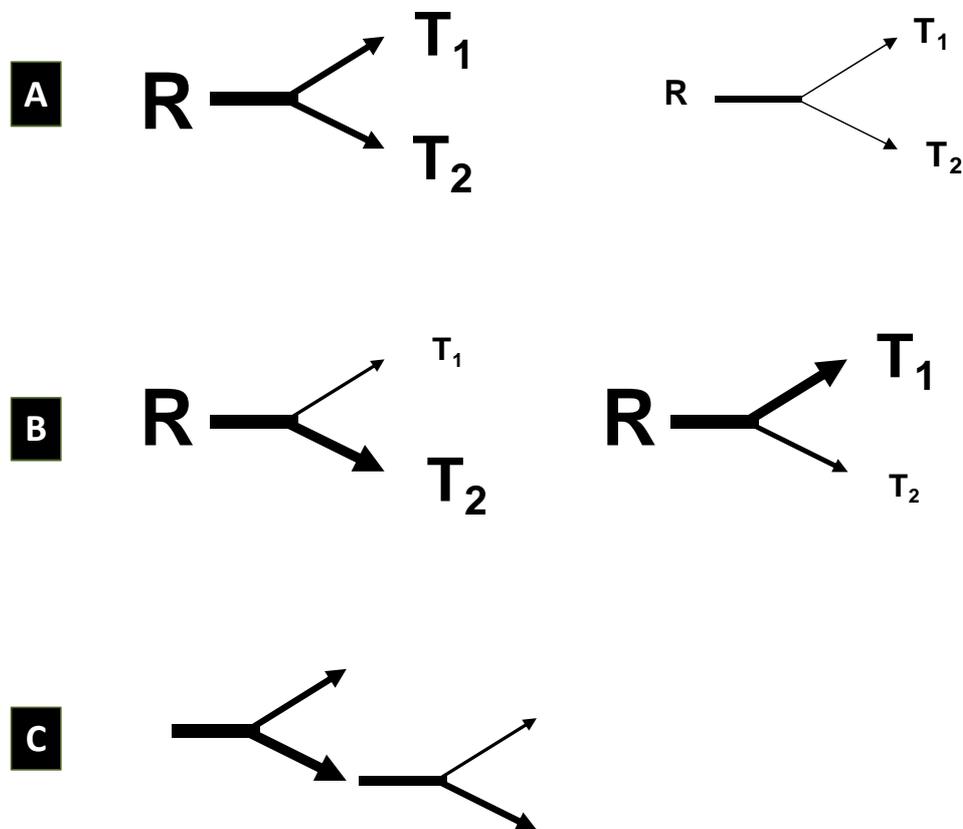
### 1.4.1. Théorie de l'évolution des traits d'histoire de vie

La théorie de l'évolution des traits d'histoire de vie est fondée sur les principes d'adaptation et de contrainte, représentant les deux extrémités d'un continuum d'explications biologiques (Stearns, 1992).

D'un point de vue fonctionnel, l'adaptation est un changement phénotypique survenant en réponse à un signal environnemental pour parvenir à une performance plus élevée des individus (Stearns, 1992; Thomas *et al.*, 2010). Elle est le résultat d'une modification des fréquences des phénotypes au sein des populations à partir d'une situation où les fréquences des phénotypes sont à l'équilibre. Toute fluctuation de l'environnement et/ou des conditions occasionne un déplacement de cet équilibre vers les individus possédant la meilleure valeur sélective (c'est-à-dire ceux qui vont contribuer de façon significativement plus importante à la descendance totale): c'est la sélection naturelle (Darwin, 1859). La modification des fréquences des phénotypes dans les populations engendre des modifications dans les fréquences des génotypes. Cependant, plusieurs phénotypes peuvent résulter de l'expression différentielle d'un seul génotype en réponse à des modifications environnementales : c'est la plasticité phénotypique (Pigliucci, 2001).

L'évolution des traits d'histoire de vie est conditionnée par différents types de contraintes, réduisant la gamme des valeurs possibles que peuvent prendre les différents traits d'histoire de vie. Ces contraintes peuvent être d'ordre morphologique, physiologique, génétique, écologique ou phylogénétique (Stearns, 1992; Michalakis *et al.*, 2010). Par exemple, les contraintes physiologiques peuvent être observées lors du partage inévitable des ressources emmagasinées par un organisme (Figure 3), lorsque différentes fonctions nécessitent les mêmes ressources. Allouer une partie de l'énergie dans une fonction (par exemple, la

reproduction) la rend indisponible pour une autre fonction (par exemple la survie). Ainsi, en condition de ressources limitées, ce qui est généralement le cas pour tous les organismes et encore plus vrai pour des pathogènes qui dépendent de la survie de leurs hôtes, certaines fonctions sont antagonistes. Ces compensations négatives entre traits d'histoire de vie sont connues sous le terme de trade-offs (ou compromis) auxquels l'individu est soumis ou confronté, tel un dilemme dans l'allocation de ses ressources. L'évolution des traits d'histoire de vie ne peut être comprise qu'à la lumière des interactions antagonistes qui relient ces différents traits.



**Figure 3 :** Schéma adapté de Michalakis (2010) du modèle en Y illustrant le processus d'allocation des ressources  $R$  dans deux fonctions  $T_1$  et  $T_2$  (correspondant à deux traits d'histoire de vie). La taille des lettres est proportionnelle à la quantité des variables correspondantes. Notons que l'expression des deux traits d'histoire de vie varie (A) en fonction de la capacité d'acquisition des ressources et (B) en fonction des stratégies d'allocation. Il est également possible d'étendre le modèle Y à plus de deux traits (C).

### 1.4.2. **Evolution des traits d'histoire de vie chez les agents pathogènes**

Comme pour tous les organismes vivants, les traits d'histoire de vie des agents pathogènes sont soumis à des pressions de sélection et sont susceptibles d'évoluer. Il est par ailleurs admis que les agents pathogènes disposent d'un potentiel évolutif plus important que celui de leur hôte, principalement dû à leur temps de génération court et à la taille importante de leurs populations (Kochin *et al.*, 2010).

Beaucoup de travaux se sont construits autour de l'évolution de la virulence, puisqu'elle est directement liée à la santé et/ou la survie des individus, ce qui s'avère être d'intérêt premier en médecine humaine. La première théorie sur l'évolution de la virulence émergeant des premières réflexions autour de ce concept, comme dans les travaux de Smith (1904), postule que les pathogènes devraient évoluer pour devenir toujours plus inoffensifs vis-à-vis de leurs hôtes, puisque qu'il est avantageux pour les agents pathogènes de les maintenir en vie (the "avirulence hypothesis"). Cependant, de nombreuses théories alternatives ont remis en cause cette première vision, laissant apparaître la théorie du compromis ("trade-off hypothesis") entre la virulence et la transmission du pathogène (Alizon *et al.*, 2009). Cette théorie est basée sur l'hypothèse (vue au §1.2.2) que la virulence est la conséquence de l'exploitation de l'hôte par l'agent pathogène (Bull, 1994; Frank, 1996; Lively, 2001). Ainsi, plus l'agent pathogène exploite son hôte, plus il peut se multiplier, mais plus il réduit l'espérance de vie de l'hôte (augmentation de la virulence), ce qui lui devient préjudiciable. Ce coût du parasitisme tend à sélectionner un niveau intermédiaire de virulence où le gain de fitness résultant de la multiplication de l'agent pathogène compense la perte de fitness due à la mortalité de l'hôte (Lively, 2001). Les valeurs optimales de virulence et de transmission associée dépendent de nombreux facteurs relatifs à l'hôte ou à l'agent pathogène (Stearns & Koella, 2008), comme par exemple le cycle de vie de l'agent pathogène (Koella & Antia, 1995) ou la résistance de l'hôte (Gandon & Michalakis, 2000).

Les stratégies optimales d'exploitation de l'hôte peuvent également être explorées par des approches centrées sur l'allocation des ressources entre les différents traits d'histoire de vie des agents pathogènes (Gilchrist *et al.*, 2006; Andanson, 2010). Modéliser des traits qui sont couramment mesurés expérimentalement faciliterait donc les validations empiriques des études théoriques et favoriserait le dialogue entre disciplines, ce qui reste aujourd'hui encore problématique (Ebert & Bull, 2003).

### 1.4.3. **Adaptation à la résistance quantitative**

Le phénomène d'adaptation (décrit au §1.4.1) des populations d'agents pathogènes à la résistance partielle est décrit comme une érosion de la résistance (Watson, 1970), celle-ci devenant graduellement

moins efficace. La pression de sélection qu'exerce une résistance partielle sur les traits d'histoire de vie des populations d'agents pathogènes conduit à un déplacement des équilibres établis vers une augmentation de leur agressivité (McDonald & Linde, 2002) et de leur virulence (Gandon & Michalakis, 2000). Ces changements quantitatifs s'effectuent à une échelle de temps plus importante que celle nécessaire au contournement d'un gène majeur de résistance, ce qui fait de la résistance partielle une résistance généralement reconnue comme plus durable (Encadré n°1: Durabilité des résistances).

### Encadré n°1

## Durabilité des résistances

### Définition

Une résistance est considérée comme durable si elle conserve son efficacité après une utilisation prolongée sur de grandes surfaces dans un environnement propice au développement de l'agent pathogène (Johnson, 1984).

### Constat sur la durabilité

- 1- La plupart du temps, l'évaluation est faite *a posteriori*, c'est-à-dire lorsque l'on s'aperçoit que les résistances ne sont plus efficaces.
- 2- Les contournements de la résistance qualitative sont rapides, ce qui impose un remplacement rapide des gènes de résistance (Pink, 2002)
- 3- La durabilité est souvent inférieure au temps nécessaire pour concevoir de nouvelles variétés (de l'ordre de la dizaine d'années)
- 4- La résistance qualitative est généralement moins durable que la résistance quantitative (McDonald & Linde, 2002)

### Stratégies de gestion possibles

- 1- La diversification dans le temps et l'espace des variétés disponibles limiterait les possibilités d'adaptation des populations pathogènes (Andriveau *et al.*, 2003; Lo-Pelzer *et al.*, 2010).
- 2- Le pyramidage de gènes consiste en l'accumulation de plusieurs gènes majeurs au sein d'une même variété. Cette technique retarderait le contournement car l'acquisition simultanée par un même isolat de pathogène de tous les gènes de virulence correspondant serait plus difficile (Pedersen & Leath, 1988).
- 3- La combinaison des résistances qualitative et quantitative au sein d'une même variété augmenterait la durabilité des gènes majeurs de résistance (Palloix *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2010).
- 4- Sélectionner une résistance qui imposerait de sévères coûts aux pathogènes qui la contournent permettrait, en relâchant la pression de sélection par la résistance de la plante, de contre-sélectionner ces isolats devenus alors moins compétitifs. Après quelques années, ces variétés pourraient donc être réutilisées avec toute leur efficacité (Janzac *et al.*, 2010; Montarry *et al.*, 2010b).

On peut donc penser qu'à terme, une résistance partielle utilisée à large échelle spatiale et temporelle devrait être érodée au point de devenir inefficace vis-à-vis des populations d'agents pathogènes. Le phénomène de résistance observé ne serait qu'une forme de maladaptation plus ou moins persistante des populations pathogènes au génotype de la plante hôte qui porte cette résistance. Cependant, la nature de cette résistance partielle, c'est-à-dire les traits de l'agent pathogène sur lesquels elle a un impact négatif, ne sont pas sans importance. En effet, comme nous avons pu le voir précédemment (§1.4.1 et §1.4.2), les traits d'histoire de vie des agents pathogènes sont soumis à différents types de contraintes qui enrayent les possibilités d'évolution des agents pathogènes vers une hyper-virulence. Par ailleurs, le risque d'érosion des résistances partielles dépend incontestablement du potentiel évolutif de l'espèce pathogène ciblée. McDonald et Linde (2002) ont proposé un modèle qualitatif qui tient compte des différentes forces évolutives régissant l'évolution des populations pour estimer ce risque, à savoir les taux de mutations, la taille des populations (et la dérive génétique associée aux goulots d'étranglements), les flux de gènes, le système de reproduction et la sélection par les populations d'hôtes. Cette dernière force évolutive est celle qui peut être la plus aisément manipulée par l'homme, plus particulièrement lorsqu'il s'agit d'agrosystèmes. L'utilisation de variétés génétiquement homogènes et déployées à de larges échelles spatiales et temporelles constitue une pression de sélection forte sur les traits d'histoire de vie et la virulence des agents pathogènes (Mennerat *et al.*, 2010), aboutissant à des phénomènes d'adaptation locale au sein des bassins de production (Montarry *et al.*, 2008). La possibilité d'intervention dans les processus évolutifs qu'offrirait une utilisation raisonnée des génotypes d'hôtes pourrait alors constituer le principal levier d'action dans la quête de stratégies durables et efficaces de lutte contre les agents pathogènes (Encadré n°1: Durabilité des résistances).

Dans cette première partie, nous avons vu que les traits d'histoire de vie liés au pouvoir pathogène étaient soumis à évolution et également à modulation par la résistance quantitative de l'hôte, à laquelle ils sont capables, dans une certaine mesure, de s'adapter. Jusqu'à présent, nous nous positionnions dans le cadre d'interactions entre un génotype hôte et un génotype pathogène. Cependant, les hôtes sont susceptibles d'être infectés par plusieurs génotypes pathogènes (Read & Taylor, 2001). On parle alors d'infections multiples, qui peuvent avoir un impact sur l'expression du pouvoir pathogène, puisque les ressources en hôte doivent être partagées, mais également sur le potentiel d'évolution et de survie du parasite, surtout lorsque la formation de certaines structures est conditionnée par la rencontre de partenaires compatibles.

## 2. Infections multiples et traits d'histoire de vie du pathogène

*A struggle for existence inevitably follows from the high rate at which all organic beings tend to increase.*

C. Darwin (1859), *On the origin of Species*

Puisque les agents pathogènes se dispersent au sein des populations, tout ou partie des individus hôtes sont susceptibles d'être exposés à plusieurs génotypes pathogènes. En l'absence de distinction morphologique entre génotypes d'une même espèce pathogène, le diagnostic d'infection multiple nécessite l'utilisation de méthodes d'isolement et de caractérisation plus fines que celles basées sur la morphologie. L'essor de la biologie moléculaire a démocratisé le développement d'outils ciblant le polymorphisme génétique inter-individus. Ceux-ci permettent de distinguer les individus au niveau intra-spécifique de façon simple, rapide et efficace, de telle sorte que leur utilisation a révélé la forte prévalence des infections multiples dans de nombreux systèmes (Read & Taylor, 2001). Le génotypage du champignon systémique *Microbotryum violaceum* au sein de populations naturelles de compagnons blancs (*Silene latifolia*) indique que les infections multiples sont très fréquentes (70% des plantes échantillonnées) et qu'il est possible de trouver jusqu'à 9 génotypes pathogènes différents au sein d'une même plante (Lopez-Villavicencio *et al.*, 2007).

Inévitablement, les différents génotypes d'agents pathogènes doivent alors partager le même hôte et donc les ressources nécessaires à leur développement et leur reproduction. La division des ressources entre individus imposée par les infections multiples peut modifier les stratégies d'exploitation de l'hôte, affecter la dynamique épidémique et influencer l'évolution des traits d'histoire de vie des agents pathogènes (§2.2). Ceci dépend avant tout de la réponse du système lors de l'interaction pathogène-pathogène.

## 2.1. Réponses adaptatives des agents pathogènes aux infections multiples

Les adaptations (§1.4.1) développées par les agents pathogènes pour faire face à l'interaction avec leurs congénères sont le reflet des adaptations observées à l'échelle du monde vivant dans les interactions entre espèces. Elles se traduisent par différents comportements propres au système, allant de l'exclusion à la coopération en passant par la compétition.

### 2.1.1. L'exclusion compétitive

L'exclusion compétitive se produit lorsque deux ou plusieurs génotypes ne peuvent coexister, le génotype le plus compétitif éliminant les autres (Thomas *et al.*, 2010). L'exposition d'un hôte à différents génotypes d'un même agent pathogène aboutit alors à son infection par une unique souche de pathogène. Les résultats de Koskella *et al.* (2006) suggèrent que ce phénomène intervient dans le pathosystème *M. violacearum* / *S. latifolia* pour des souches peu apparentées. Les auteurs imputent ce phénomène d'exclusion au système d'incompatibilité végétative pour la reconnaissance du non-soi rencontré chez la plupart des espèces fongiques (Glass & Kaneko, 2003). Ce phénomène peut également être interprété comme un cas extrême de compétition entre différentes souches, l'une (la plus compétitive) réduisant à zéro l'efficacité d'infection de(s) l'autre(s) (c'est-à-dire de la ou des souches exclues).

### 2.1.2. La compétition

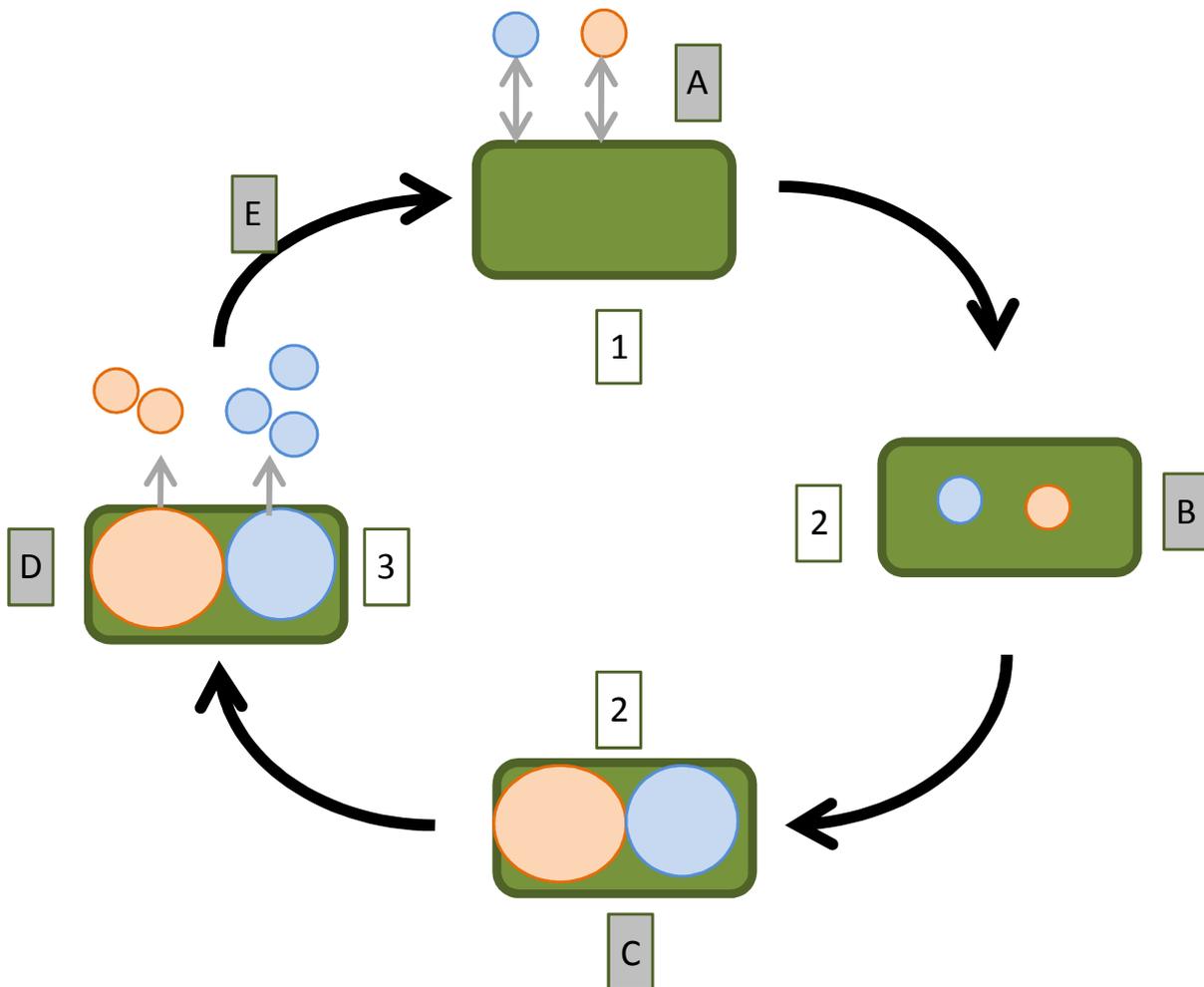
Le phénomène de compétition intervient en conditions de ressources limitées lorsque les individus exploitent le même hôte sans pouvoir tirer profit d'une exploitation prudente qui préserverait l'hôte. Les individus maximisent alors leurs bénéfices en exploitant égoïstement et rapidement leur hôte au détriment du collectif : c'est la tragédie des biens communs (en anglais "the tragedy of the commons"; Hardin, 1968). Trois types d'interactions compétitives sont décrits dans la littérature : la compétition d'exploitation, la compétition apparente et la compétition interférente (Read & Taylor, 2001; Mideo, 2009).

(i) La compétition d'exploitation est un processus passif dans lequel un individu est affecté par la quantité de ressources restant après que d'autres l'aient exploitée (Read & Taylor, 2001). Théoriquement, ce type de compétition devrait conduire soit à une divergence dans le type de ressources utilisées (c'est-à-dire le déplacement de caractère à l'origine par exemple de la radiation

adaptative des pinsons de Darwin; Abrams, 1987a; Dayan & Simberloff, 2005), soit à une adaptation améliorant le processus d'acquisition des ressources (Abrams, 1987b). La spécialisation des trématodes sur différents hôtes (poisson, escargot), voire différents organes (intestin, tissu oculaire) et même parties d'organe (différentes portions de l'intestin), est un bon exemple illustrant la divergence d'utilisation des ressources (Mideo, 2009). Lorsqu'aucune substitution de ressources n'est possible, les agents pathogènes peuvent évoluer vers des stratégies qui leur permettront de gagner une part plus importante des ressources limitées. Ainsi, des modifications dans le schéma d'allocation des ressources entre différentes fonctions (Figure 4) pourraient déplacer l'équilibre établi jusqu'à un nouvel équilibre qui maximiserait la fitness des individus en compétition. Un moindre investissement dans la transmission en faveur de la croissance (Figure 4) a par exemple été mis en évidence pour *Plasmodium chabaudi*, l'un des parasites responsables de la malaria, d'un point de vue théorique (Mideo & Day, 2008) mais également empirique (Wargo *et al.*, 2007; Pollitt *et al.*, 2011). Une autre stratégie efficace serait d'évoluer vers une acquisition des ressources plus rapide pour faire face à une mort prématurée de l'hôte. Les études théoriques qui se sont penchées sur l'évolution de la virulence lors d'infections multiples confortent en effet l'hypothèse de l'augmentation du taux d'exploitation de l'hôte (May & Nowak, 1995; van Baalen & Sabelis, 1995; Choisy & de Roode, 2010). Une acquisition plus rapide des ressources peut également se traduire par une reproduction prématurée, c'est-à-dire une diminution de la période de latence dans le cas des agents pathogènes sporulants (Newton *et al.*, 1999; Nidelet *et al.*, 2009).

(ii) La compétition apparente est également une forme de compétition indirecte entre génotypes de pathogènes via la stimulation des défenses de l'hôte. L'augmentation de la densité intra-hôte d'un génotype active en effet la réponse de l'hôte qui en l'absence de spécificité d'action aura un effet négatif sur l'ensemble des pathogènes qui l'infectent (Read & Taylor, 2001).

(iii) La compétition interférente résulte d'une interaction directe entre les protagonistes. Il s'agit d'attaques directes pouvant aller jusqu'à l'exclusion (§2.1.1) par des moyens mécaniques ou chimiques (Read & Taylor, 2001). Outre les systèmes d'incompatibilité végétative (cités au §2.1.1), les agents pathogènes peuvent synthétiser des molécules réduisant le succès de leur(s) compétiteur(s): citons par exemple le cas des bactéries sécrétant des bactériocines, connues pour leur action anti-microbienne (Riley & Gordon, 1999).

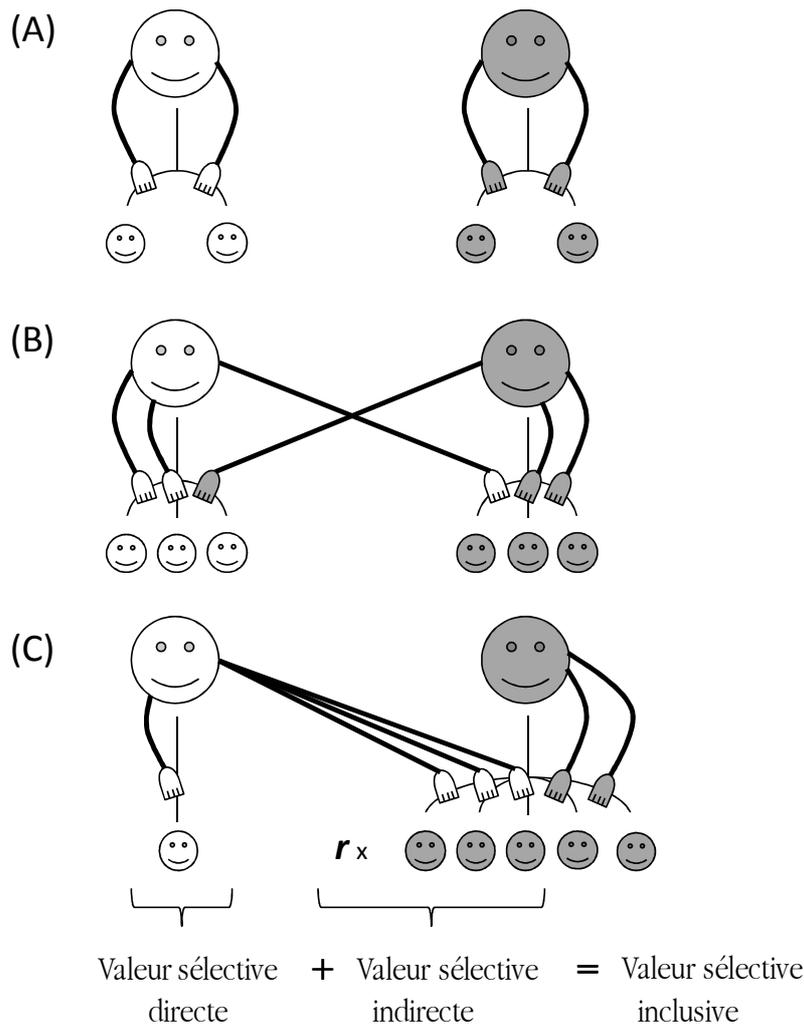


**Figure 4 :** Compétition d'exploitation lors de l'infection d'un hôte par deux génotypes (orange et bleu) de parasites : modification de la balance croissance-transmission. Les parasites (orange et bleu) interagissent (A) avec l'hôte sain (1). La double infection (B) peut être simultanée ou décalée dans le temps. L'exploitation par les deux parasites de l'hôte doublement infecté (2) modifie le schéma d'allocation des ressources : la compétition se traduit par un investissement supérieur dans la croissance (C) et moindre dans la reproduction (D) conduisant à une réduction de la transmission (E) par rapport à l'infection simple (Figure 1).

### 2.1.3. La coopération

La coopération est une forme d'organisation sociale dans laquelle les individus travaillent ou fonctionnent dans l'intérêt général de tous les acteurs. La coopération est avantageuse pour la population ou l'espèce mais coûteuse pour l'individu, qui utilise une part de son énergie au bénéfice des autres (Reboud & Sicard, 2010). Le succès reproducteur est plus élevé lorsque les individus coopèrent (Figure 5B) que lorsqu'ils sont seuls (Figure 5A). Prenons l'exemple des virus : l'exploitation de la machinerie cellulaire de leur hôte est dépendante de la quantité disponible de l'ARN-réplicase. L'effort de production de réplicase est coûteux au niveau individuel mais se fait au bénéfice de tous : chacun peut se répliquer de façon plus efficace grâce à l'effort collectif (Brown *et al.*, 2002). L'apparition de tricheurs dans les populations (en gris,

Figure 5C) ne serait pas surprenante, puisqu'il est avantageux de tirer bénéfice de la coopération (par exemple disponibilité dans le milieu en ARN-réplicase produite par ses semblables) sans en subir le coût (c'est-à-dire en n'en produisant pas eux-mêmes). L'altruisme (en blanc, Figure 5C) n'est cependant possible que si un bénéfice indirect est procuré aux individus. La théorie d'Hamilton sur la sélection de parentèle (Hamilton, 1964) explique qu'aider un parent à se reproduire permet indirectement de transmettre ses propres gènes à la génération suivante. Ceci est donc d'autant plus efficace que ce parent est proche génétiquement, puisque la valeur sélective indirecte s'en verra accrue (Figure 5C ; West *et al.*, 2007).



**Figure 5 :** Coopération et succès reproducteur (inspiré de Thomas, 2010). (A) Reproduction solitaire : chaque individu (blanc ou gris) a son propre succès reproducteur, qu'il obtient seul (mains de couleur correspondante). (B) Mutualisme : les deux individus coopèrent et tirent chacun un bénéfice direct, chacun obtient plus de descendants qu'il en aurait produit s'il n'avait pas coopéré. Ce bénéfice peut être symétrique ou déséquilibré entre les deux individus et simultané ou différé. (C) Altruisme : un individu altruiste (blanc) sacrifie tout ou partie de sa reproduction pour aider un autre individu (gris). L'altruisme n'est avantageux que si ce coût est compensé par le bénéfice que l'individu assisté tire de cette aide, pondéré par le degré de parenté ( $r$ ) entre les individus (valeur sélective indirecte). La valeur sélective inclusive de l'altruisme est la somme de la valeur sélective directe et de sa valeur sélective indirecte.

## 2.2. Conséquences des infections multiples sur la dynamique épidémique et l'évolution des traits d'histoire de vie

En affectant le succès reproducteur des agents pathogènes, les infections multiples peuvent également altérer la dynamique épidémique, et donc la sévérité de la maladie via la modification du succès reproducteur total de la population ou la modification des fréquences relatives de souches plus ou moins agressives (Read & Taylor, 2001). A terme, les infections multiples peuvent donc avoir des conséquences non négligeables sur l'évolution des traits d'histoire de vie des agents pathogènes, comme par exemple la virulence.

### 2.2.1. Evolution des traits d'histoire de vie en infections multiples

La plupart des travaux qui se sont intéressés à l'évolution de traits d'histoire de vie de pathogènes en infections multiples se sont plutôt focalisés sur l'évolution de la virulence comme un paramètre reflétant l'exploitation de l'hôte par le pathogène. La plupart des travaux théoriques prédisent un accroissement de la virulence en situations d'infections multiples, puisque la sélection intra-hôte favoriserait les individus ayant le taux de réplication le plus élevé, c'est à dire les individus les plus virulents (Nowak & May, 1994; May & Nowak, 1995; van Baalen & Sabelis, 1995; Frank, 1996; Ebert & Bull, 2008; Choisy & de Roode, 2010). Peu d'études expérimentales (de Roode *et al.*, 2005b; Gower & Webster, 2005; Bell *et al.*, 2006; Ben-Ami *et al.*, 2008) se sont risquées à tester l'hypothèse fondamentale des modèles théoriques, c'est-à-dire celle selon laquelle les souches les plus virulentes sont plus compétitives et se transmettent mieux que les souches moins virulentes. Cette hypothèse ne s'avère toutefois pas toujours vérifiée (Gower & Webster, 2005). D'autres travaux empiriques ont également testé l'impact des infections multiples sur la virulence et la réplication des parasites. Différents schémas sont alors observés: (1) virulence et réplication totale ne sont pas affectées (Imhoof & Schmid-Hempel, 1998); (2) virulence et réplication totale sont accrues (Davies *et al.*, 2002); (3) la virulence augmente sans modification observée dans la réplication totale (Taylor *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 2002); et (4) virulence et réplication sont diminuées (Balmer *et al.*, 2009). La diversité de ces réponses et leur écart aux prédictions théoriques citées ci-dessus proviennent sans doute du fait que ces prédictions ne sont valables que sous certaines conditions. En effet, il est impératif pour qu'elles s'appliquent que le taux de réplication soit positivement corrélé à la virulence et dépende directement d'un comportement individuel et non collectif, c'est-à-dire de l'absence de coopération (Brown *et al.*, 2002). Ainsi, lorsque la coopération entre agents pathogènes est nécessaire pour exploiter un hôte commun, les

prédictions sont en faveur d'une réduction de la virulence (Turner & Chao, 1999; Brown, 2001; Brown *et al.*, 2002).

Les infections multiples peuvent également, comme nous l'avons vu au §2.1, influencer le schéma d'allocation des ressources entre différentes fonctions, comme la croissance et la transmission ou les reproductions sexuée et asexuée. Ainsi les compromis auxquels l'agent pathogène doit faire face en cas d'infection simple (§1.4.1 et §1.4.2) peuvent être modifiés en réponse aux infections multiples de manière à maximiser sa compétitivité, par exemple en investissant plus dans la répllication intra-hôte au détriment de la production de formes de transmission (Wargo *et al.*, 2007; Pollitt *et al.*, 2011).

### 2.2.2. Dynamique épidémique en infections multiples

La dynamique intra-hôte du pathogène est quasiment toujours perturbée en situation d'infections multiples par rapport à la dynamique observée en infection simple (Newton *et al.*, 1999; de Roode *et al.*, 2005a; de Roode *et al.*, 2005b; Bell *et al.*, 2006; Wargo *et al.*, 2007; Balmer *et al.*, 2009; Pollitt *et al.*, 2011). La densité de l'agent pathogène peut effectivement être négativement affectée sur toute la dynamique après un court délai d'initiation de l'infection (de Roode *et al.*, 2005a; de Roode *et al.*, 2005b; Bell *et al.*, 2006; Wargo *et al.*, 2007; Balmer *et al.*, 2009; Pollitt *et al.*, 2011). La dynamique apparaît dans certains cas retardée, la densité de l'agent pathogène observée pouvant alors être supérieure en infections multiples à certains moments de la dynamique (de Roode *et al.*, 2005a; de Roode *et al.*, 2005b; Bell *et al.*, 2006). Il apparaît clairement que les conséquences des infections multiples sur la dynamique intra-hôte sont dépendantes à la fois du génotype pathogène considéré, mais également de celui du compétiteur (Newton *et al.*, 1999; de Roode *et al.*, 2005a; de Roode *et al.*, 2005b; Bell *et al.*, 2006).

Ces modifications de la dynamique intra-hôte ont inévitablement des conséquences épidémiologiques, c'est-à-dire sur la dynamique inter-hôte (Alizon *et al.*, 2011). Les études populationnelles dans les systèmes naturels ou cultivés révèlent que la dynamique de certains génotypes de l'agent pathogène peut être considérablement affectée par la présence d'un autre génotype (Miller & Johnson, 2000), pouvant aller jusqu'au remplacement des populations (Montarry *et al.*, 2010a). Cependant, peu d'études se sont réellement focalisées sur l'effet des infections multiples sur la dynamique épidémique des différents génotypes. Par ailleurs, le couplage des approches de dynamiques intra- et inter-hôte n'est abordé que d'un point de vue théorique, par exemple dans les modèles emboîtés (Mideo *et al.*, 2008), laissant alors de belles perspectives aux expérimentateurs pour tester leurs prédictions. Cependant l'évolution des traits d'histoire

de vie des champignons et des Oomycètes phytopathogènes a été très peu étudiée dans le cadre des infections multiples.

## 2.3. Importance du génotype des souches en infections multiples

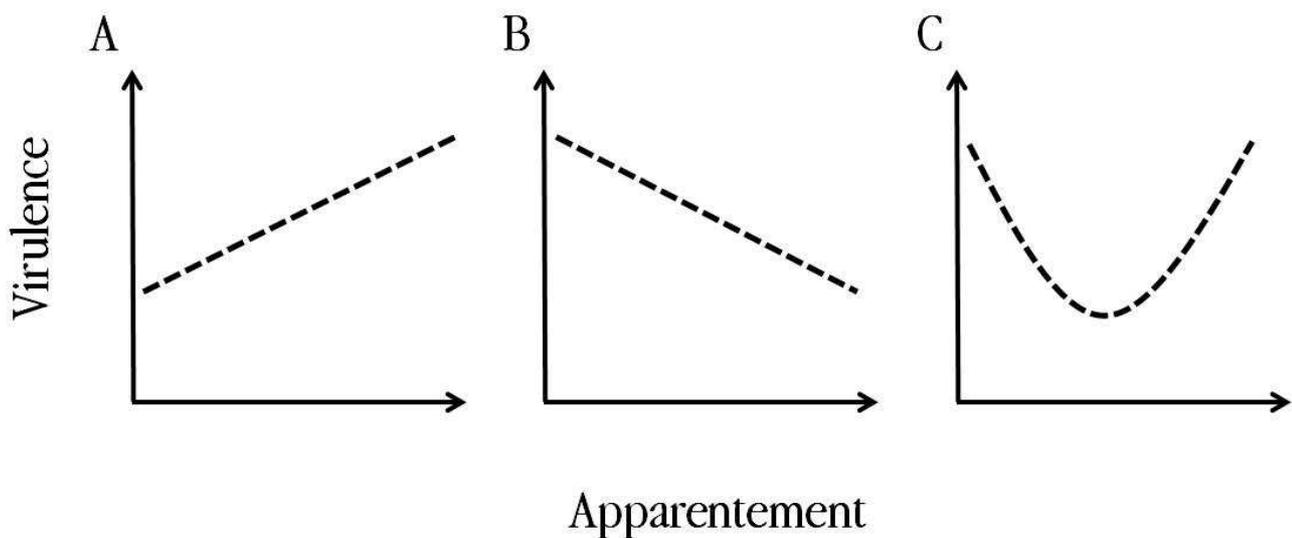
### 2.3.1. Apparentement

Lorsque différents génotypes pathogènes interagissent au sein d'un même hôte, l'apparentement entre les individus impacte également l'issue de cette interaction. En effet, si un agent pathogène partage son hôte avec un individu génétiquement proche (apparenté), c'est-à-dire avec qui il a de nombreux allèles en commun, il peut espérer, via la reproduction de celui-ci, transmettre une fraction plus élevée de son patrimoine génétique que s'il partageait son hôte avec un individu peu apparenté. Les individus apparentés auraient donc tout intérêt à coopérer, ou du moins à limiter la compétition, et vice versa. Cette théorie de la sélection de parentèle (abordée au §2.1.3; Hamilton, 1964) est basée sur le principe de maximisation de la fitness inclusive (Maynard Smith, 1964) : peu importe alors le parent qui transmet, ce qui compte est le nombre d'allèles transmis.

Les prédictions en termes d'évolution de traits d'histoire de vie peuvent donc varier selon l'apparentement entre souches au sein d'une population (Frank, 1996; Buckling & Brockhurst, 2008; Mideo, 2009), mais également en fonction du type d'interaction entre souches (Buckling & Brockhurst, 2008). Ainsi, lorsque les traits d'exploitation des agents pathogènes sont sous la contrainte d'une action collective (c'est-à-dire de la coopération), leur expression sera maximisée au sein de groupes parfaitement apparentés, mais l'apparition de tricheurs est plus probable et le bénéfice rencontré par les individus sera moindre si l'intégrité du groupe est diminuée (Figure 6A; Brown *et al.*, 2002; Buckling & Brockhurst, 2008). Au contraire, lorsque des individus exploitent leur hôte dans leur propre intérêt et qu'il y a compétition d'exploitation, un faible apparentement entre les individus conduit à la sélection de celui ou ceux qui exploiteront l'hôte le plus rapidement, conduisant donc à une augmentation de la valeur du trait (Figure 6B; Brown *et al.*, 2002; Buckling & Brockhurst, 2008). La compétition interférente prédite est maximale à des niveaux intermédiaires d'apparentement entre individus, la valeur maximale des traits se situant alors aux extrêmes inférieur et supérieur (Figure 6C; Buckling & Brockhurst, 2008).

Il apparaît clairement dans les études empiriques que l'apparentement entre les souches interagissant lors d'infections multiples est un facteur important dans l'expression de traits d'histoire de vie ou de stratégies de reproduction (Jager & Schjorring, 2006; Koskella *et al.*, 2006; Lagrue *et al.*, 2009; López-

Villavicencio *et al.*, 2010). Par exemple, López-Villavicencio *et al.* (2010) ont récemment montré que la réponse du champignon phytopathogène *Microbotryum lychnidis-dioicae* aux infections multiples suivait les prédictions théoriques émises en cas de compétition interférente (Figure 6C; Buckling & Brockhurst, 2008) : la croissance et la virulence du pathogène sont minimales pour un apparentement intermédiaire, et maximales lorsque les souches sont très proches génétiquement. L'interférence est donc moindre dans ce dernier cas, ce qui est en accord avec la théorie de la sélection de parentèle (Hamilton, 1964).



**Figure 6** : Relations hypothétiques entre virulence et apparentement en cas de coopération (A) ou de compétition d'exploitation prudente (B) ou de compétition interférente (C). (Schéma de Buckling & Brockhurst, 2008)

### 2.3.2. **Compatibilité sexuelle**

La reproduction sexuée des agents pathogènes à sexes (ou types sexuels) séparés est conditionnée par la rencontre de partenaires compatibles : c'est le cas chez les organismes hétérothalliques comme *Phytophthora infestans* (Gallegly & Galindo, 1958). Les infections multiples pour les espèces parasites dotées d'un tel système de reproduction sont un passage obligatoire pour que la reproduction sexuée ait lieu. Cela veut également dire que les infections multiples peuvent être de deux sortes : (1) celles n'engageant que des souches non compatibles sexuellement ou (2) celles impliquant des souches compatibles. Dans ce dernier cas, il est donné aux souches la possibilité d'exprimer un ou des traits supplémentaires impliqués dans la

reproduction sexuée et d'adopter des stratégies de reproduction différentes. Un nouveau dilemme apparaît donc dans la stratégie de répartition des ressources entre les différentes fonctions. La réponse d'un agent pathogène aux infections multiples pourrait donc être conditionnée par la compatibilité sexuelle des souches. Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne s'est penchée sur cette question. Une partie du travail de thèse présenté ici (voir Chapitre 4) tente d'apporter des éléments de réponse à cette nouvelle problématique.

Les interactions pathogène-pathogène engendrées lors d'infections multiples peuvent être de nature différente selon les stratégies employées par les pathogènes pour exploiter leur hôte. La nature de ces interactions est un élément déterminant dans l'évolution des traits d'histoire de vie mais d'autres facteurs comme le génotype du compétiteur s'avèrent également décisifs et doivent être pris en compte. Lors d'infections multiples impliquant des génotypes compatibles, la voie de la reproduction sexuée est alors ouverte et vient alors faire concurrence à la reproduction asexuée.

### 3. Reproduction sexuée versus asexuée

Deux modes de reproduction peuvent être définis chez les organismes vivants :

- (i) La reproduction sexuée correspond à la combinaison au sein d'un même génome de matériel génétique provenant de deux individus différents. Elle correspond (du moins chez les eucaryotes) à l'alternance des événements complémentaires que sont la méiose et la fécondation (Lenormand *et al.*, 2010).
- (ii) La reproduction asexuée génère des individus dont l'information génétique est issue d'un seul parent. Il existe différentes formes de reproduction asexuée comme la reproduction végétative (absence de méiose et de fécondation) ou la parthénogénèse (modification de la méiose et/ou de la fécondation).

La fréquence relative des événements de reproduction sexuée et asexuée varie selon les espèces ; on observe alors un continuum entre reproduction sexuée exclusive et reproduction asexuée exclusive. Chez certaines espèces, les deux modes de reproduction peuvent donc coexister ou alterner.

L'existence et le maintien de la reproduction sexuée est un mystère que bon nombre de scientifiques tentent d'éclairer. Le sexe est en effet un processus coûteux, qualifié même d'antagoniste à la reproduction par Maynard Smith (1989). Il utilise en effet l'image de la reproduction comme un processus générant deux cellules à partir d'une alors que le sexe en génère une seule par fusion de deux. Pourquoi le sexe est-il donc présent chez la plupart des espèces vivantes ? Sans doute car les multiples avantages qu'il offre permettent de compenser voire d'outrepasser ce coût. Néanmoins, certaines espèces sont capables de survivre sans sexe.

#### 3.1. Le coût du sexe

Au début des années 1970 sont apparues les premières théories mettant en avant le sévère désavantage de la reproduction sexuée. Le sexe présenterait en effet de nombreux coûts au niveau individuel, ce qui poserait donc la question de l'existence mais surtout du maintien d'un tel processus biologique (Maynard Smith, 1971; Williams, 1975; Maynard Smith, 1978; 1989). Plus particulièrement, Maynard Smith (1971) avance l'hypothèse du coût des mâles, correspondant aux ressources dépensées pour produire des individus ou des gamètes mâles, lorsqu'eux-mêmes ne transmettent pas de ressource à leur descendance. Cette hypothèse ne s'applique donc qu'aux espèces anisogames pour lesquelles l'ensemble des ressources énergétiques du zygote est fourni par l'individu ou le gamète femelle (c'est-à-dire les espèces oogames). La figure 7 illustre ce coût des mâles en comparant la descendance d'une femelle sexuée et d'une

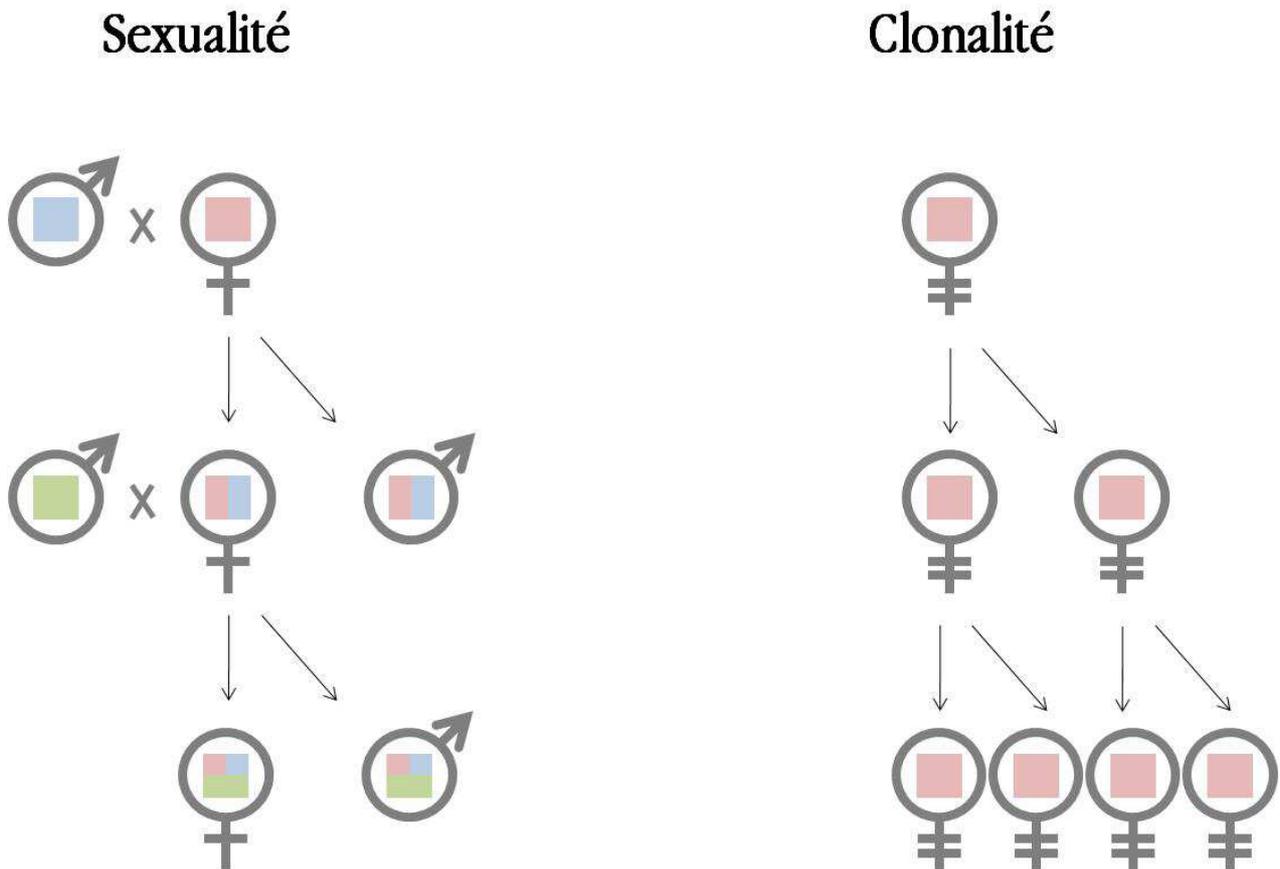
femelle asexuée sur deux générations, en supposant qu'une femelle dispose de suffisamment de ressources pour produire deux descendants. Avec un sex-ratio de  $\frac{1}{2}$ , la femelle sexuée produira un mâle et une femelle à la première génération tandis que la femelle asexuée produira deux femelles asexuées. A la génération suivante, la femelle sexuée produira de nouveau un mâle et une femelle, le mâle ne contribuant pas à la descendance, et les deux femelles asexuées produiront chacune deux descendants, donc un total de quatre nouvelles femelles asexuées. Le nombre d'individus produit par voie asexuée (c'est-à-dire par clonalité) augmente donc plus rapidement en fréquence que ceux produits par voie sexuée. C'est la raison pour laquelle on impute souvent au sexe un coût de deux, ce qui représente donc un coût évolutif extrêmement fort puisqu'après 10 générations seulement la population asexuée sera environ 1000 fois plus importante que la population sexuée.

Le sexe est également coûteux en énergie car il sollicite les voies métaboliques de mécanismes qui lui sont propres comme la méiose (Lenormand *et al.*, 2010). Par ailleurs, la reproduction sexuée dans sa totalité requiert plus de temps que la reproduction asexuée. Alors que cette dernière n'est dépendante que du seul mécanisme de mitose, le sexe exige au moins deux étapes : la méiose et la fécondation. Ajoutons à cela, lorsque cela s'avère nécessaire, l'énergie allouée à la recherche du partenaire et à l'accouplement. Le sexe devient alors très gourmand en investissement individuel pour au final ne transmettre que la moitié du patrimoine génétique de chaque parent (Figure 7). De plus, le sexe impose un coût génétique en risquant de rompre des associations alléliques (c'est le fardeau de ségrégation) ou des déséquilibres de liaison (c'est le fardeau de recombinaison) qui seraient avantageux (Barton, 1995; Otto, 2003).

Appliqué à un Oomycète hétérothallique hermaphrodite tel que *Phytophthora infestans*, capable d'auto- comme d'allo-fécondation, l'évaluation du coût du sexe devient relativement complexe. Chez les hermaphrodites, un coût des mâles égal à 2 s'applique si l'investissement dans les fonctions mâle et femelle sont identiques (Lenormand *et al.*, 2010), mais peut être contré s'il existe un biais en faveur des femelles ou en cas d'autofécondation (Charlesworth, 1980). Cependant, aucune prédiction n'est disponible pour des espèces capables de réaliser l'auto- comme l'allo-fécondation. Par ailleurs, les espèces hétérothalliques disposent de systèmes de reconnaissance élaborés, comme le système de sécrétion d'hormones sexuelles (Ko, 1988), sans doute très coûteux du point de vue métabolique à mettre en place. De plus, la reproduction sexuée de *P. infestans* aboutit à la formation de structures plus résistantes (les oospores), qui sont sans doute plus coûteuses en termes d'énergie nécessaire à leur mise en place puisque leur composition est plus complexe (double paroi, réserves) et leur taille plus importante que celle des spores asexuées.

Il ne fait aucun doute que la reproduction sexuée est un processus plus coûteux que la reproduction asexuée tant du point de vue énergétique que du point de vue évolutif. Le sexe reste malgré tout le mode de

reproduction dominant le monde vivant. La stabilité évolutive de la reproduction sexuée devrait donc s'expliquer par au moins un avantage : c'est le "balance argument" (Williams, 1975).



**Figure 7 :** Coût des mâles et transmission du patrimoine génétique à la descendance pour les deux modes de reproduction. Ce schéma s'applique aux espèces bisexuées anisogames dont le sexe ratio est de  $\frac{1}{2}$ . Ici, les femelles ne produisent que 2 descendants par génération mais ce schéma est généralisable pour un nombre plus important de descendants. Les carrés de couleur représentent l'information génétique de l'individu. Pour la sexualité, chacun des parents transmet à sa descendance la moitié de ses gènes: ainsi, à la première génération, les descendants disposent de 50% d'information génétique rose et 50% de bleue. A la deuxième génération, seule la femelle donne des descendants en s'accouplant avec un mâle quelconque (vert), ses descendants dispose donc de 50% de son information génétique (rose-bleue) et 50% de l'information génétique du parent mâle (vert). La reproduction clonale génère des individus dont l'information génétique est 100% identique au parent (aux erreurs de mutations près).

## 3.2. Avantages de la reproduction sexuée

### 3.2.1. Hypothèses théoriques

L'hypothèse qui a longtemps été avancée pour expliquer l'évolution et le maintien du sexe est que la reproduction sexuée génère une plus forte diversité génétique qui serait favorable à l'espèce. Or, la théorie de l'évolution des traits d'histoire de vie prédit plutôt une sélection des traits au niveau individuel (§ 1.4.1), les traits trop coûteux en termes de fitness étant éliminés. L'hypothèse de la diversité génétique seule est donc insuffisante, voire obsolète, si le sexe ne dispose pas d'un avantage sélectif à l'échelle de l'individu et à court terme.

De nombreuses hypothèses ont été formulées pour expliquer l'avantage du sexe à court terme (Kondrashov, 1993; Hadany & Comeron, 2008). Par exemple, le sexe pourrait être un outil de réparation de l'ADN, le purgeant des mutations délétères ponctuelles ou de segments abimés (Bernstein, 1977). Cette restauration de l'ADN étant impossible chez les asexués et les mutations inverses étant très improbables, l'absence de sexe conduirait alors à l'inéluctable accumulation de mutations délétères: c'est le cliquet de Muller (Muller, 1964). Une autre grande théorie développée pour expliquer l'existence du sexe est basée sur le fait que les organismes non parasitaires sont tous susceptibles d'être parasités un jour. Le sexe favoriserait dans ce cas l'apparition de génotypes rares, potentiellement mieux adaptés pour échapper à l'infection. Cette idée est mieux connue sous le terme d'hypothèse de la Reine Rouge (en anglais "Red Queen hypothesis", voir Encadré n°2) introduite par van Valen (1973).

Chez certaines espèces, le sexe aurait également pu être retenu pour des raisons différentes, tout simplement parce qu'il apparaîtrait comme une adaptation à une situation particulière comme un changement des conditions environnementales (Williams, 1975). Par exemple, la phase de reproduction sexuée chez la plupart des agents pathogènes de plantes est généralement associée à une fonction de survie intersaison (§ 1.1.2).

### 3.2.2. Avantages du sexe propres aux agents pathogènes

Si l'hypothèse de la Reine Rouge est admise pour expliquer le maintien du sexe chez les espèces d'hôtes (voir Clay & Kover, 1996 pour une revue sur les interactions plante-pathogène; et Salathe *et al.*, 2008 pour une revue plus généraliste), l'intérêt est grandissant quant à son application pour tenter d'expliquer l'existence de la reproduction sexuée chez les agents pathogènes (Gemmill *et al.*, 1997; Howard & Lively,

2002; Zhan *et al.*, 2007). Chez les agents pathogènes, le sexe peut en effet conférer des avantages non négligeables tels que l'augmentation du pouvoir pathogène (Grigg *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007; Klarfeld *et al.*, 2009), de nouvelles spécificités d'hôte (Yang & Gabriel, 1995), ou l'adaptation aux conditions abiotiques (Michod *et al.*, 2008). La reproduction sexuée confère donc un potentiel évolutif important aux agents pathogènes qui disposent de ce mode de reproduction.

### 3.3. Peut-on survivre sans sexe?

La reproduction asexuée dispose d'avantages à court terme qui sembleraient l'avantager par rapport à la reproduction sexuée, comme l'explosion démographique ou la conservation de génotypes adaptés. Cependant, les prédictions théoriques indiquent qu'à long terme, les lignées ne se reproduisant que par voie asexuée sont amenées à disparaître, essentiellement à cause du cliquet de Muller (§3.2.1).

Certaines espèces sont pourtant décrites comme totalement asexuées, et seraient apparues récemment (Lenormand *et al.*, 2010). C'est le cas de certains reptiles (par exemple le lézard fouette queue), de plusieurs espèces de poissons et d'amphibiens ou encore des espèces de plantes, comme les pissenlits (*Taraxacum*) semblant se reproduire exclusivement par agamospermie (Mogie & Ford, 1988). Certains parasites également, dont les agents pathogènes de plantes, au centre de nos préoccupations dans ce travail, sont capables de se reproduire uniquement par voie asexuée. C'est le cas par exemple des espèces du genre *Alternaria* (Agris, 2005).

Il est important d'envisager que pour ces espèces, il existe peut-être d'autres formes d'échanges génétiques pour pallier à l'absence de reproduction sexuée. On peut par exemple noter que les parasites du genre *Leishmania* sont capables de recombinaison mitotique, mécanisme à l'origine d'une forte variabilité génétique pour une protéine impliquée dans l'interaction avec leur hôte (Victoir & Dujardin, 2002). De même, chez les champignons phytopathogènes, des mécanismes tels que les fusions d'hyphes peuvent être à l'origine d'échanges de matériel génétique entre individus ou génotypes distincts.

Chez la plupart des agents pathogènes, les deux modes de reproduction coexistent ou alternent durant leur cycle de vie. Ceci permet de combiner les avantages de chacun des modes de reproduction tout en palliant leurs inconvénients (Figure 8). Un équilibre s'installe alors entre reproduction sexuée et asexuée. Les agents pathogènes doivent alors faire face à de nouveaux dilemmes en termes de stratégie de

reproduction: Quand et combien investir dans la reproduction sexuée relativement à la reproduction asexuée? Faut-il alterner ou combiner les deux modes de reproduction?

	Descendance asexuée	Descendance sexuée
<i>Taille initiale</i>	grande	petite
<i>Reproduction</i>	continue	saisonnière
<i>Développement</i>	proche des parents immédiat stade adulte immédiat	largement dispersé dormance étapes (embryons, larves)
<i>Génotype optimal</i>	celui des parents	impossible à prévoir
<i>Taux de mortalité</i>	faible	élevé
<i>Sélection naturelle</i>	légère	intense

**Figure 8 :** Différences attendues entre les descendants produits de façon asexuée ou sexuée (d'après Williams, 1975)

### 3.4. L'équilibre entre reproductions sexuée et asexuée

Il ne serait pas surprenant d'imaginer que les caractéristiques de l'équilibre entre reproduction asexuée et reproduction sexuée soient les mêmes que celles reliant deux traits d'histoire de vie quelconques, comme nous avons pu le voir précédemment pour d'autres traits (§ 1.4.1 et § 1.4.2).

Plusieurs facteurs peuvent en effet être à l'origine du maintien ou de la modification dans l'équilibre entre les deux processus de reproduction. Cet équilibre peut tout d'abord être intrinsèque à l'espèce ou au génotype de l'individu mais est également susceptible d'être modifié par des facteurs extérieurs comme les conditions climatiques, la disponibilité en ressources ou encore la compétition (Chamberlain & Ingram, 1997).

Pour des parasites disposant de deux modes de reproduction, Koella & Antia (1995) prédisent que la stratégie optimale dépendrait de plusieurs facteurs comme le taux de croissance et la virulence du parasite. Dans plusieurs cas de figure, le parasite devrait selon eux alterner entre ces deux modes de reproduction plutôt que d'employer les deux simultanément. C'est ce qui est observé chez la plupart des pathogènes de

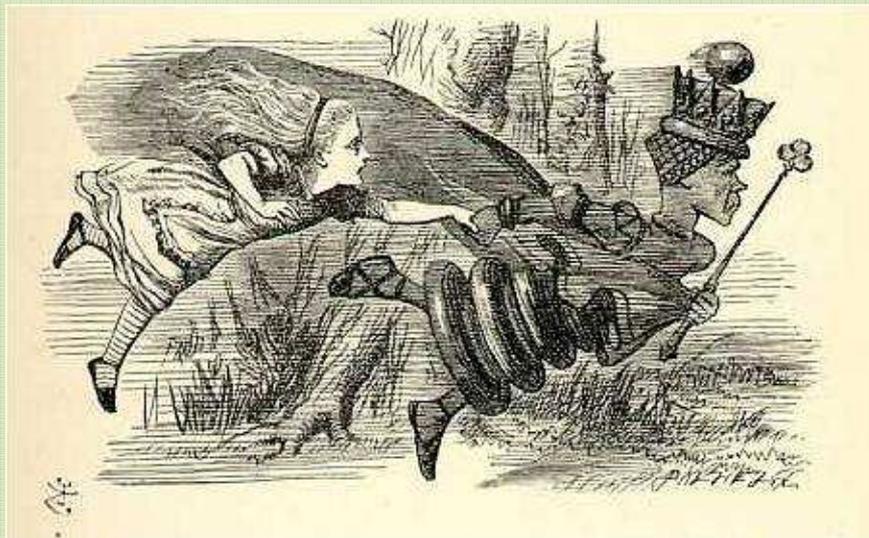
plantes en conditions naturelles. En effet, reproductions sexuée et asexuée alternent dans le temps, le sexe apparaissant généralement tardivement, en fin d'épidémie, lorsque les ressources en hôte deviennent rares.

Lorsqu'elles ont lieu simultanément, les reproductions sexuée et asexuée sont des processus en compétition l'un avec l'autre. On peut donc s'attendre à observer des compromis (ou "trade-offs") entre ces modes de reproduction. Michelmore et Ingram (1980) ont par exemple noté une relation négative entre l'intensité de la reproduction asexuée et l'incidence de la reproduction sexuée pour l'Oomycète hétérothallique *Bremia lactucae*.

Le coût évident de la reproduction sexuée semble être contrebalancé par ses nombreux avantages à court et long termes. Il reste cependant difficile de comprendre pourquoi certaines espèces se reproduisent uniquement par voie sexuée, pourquoi d'autres uniquement par voie asexuée et enfin pourquoi certaines combinent les deux modes de reproduction. Si l'on peut penser que ces dernières ont l'avantage de combiner les avantages des deux modes de reproduction, elles doivent néanmoins faire face à un nouveau dilemme qu'est le compromis entre sexe et multiplication asexuée. Au final, aucune stratégie de reproduction n'est parfaite; elles sont simplement le fruit d'une adaptation de chaque espèce à son environnement, doté lui aussi de ses propres contraintes.

Encadré n°2

## Hypothèse de la Reine Rouge ("Red Queen hypothesis")



L'hypothèse de la Reine Rouge a été introduite par van Valen (1973) pour illustrer la dynamique de la course aux armements. van Valen fait alors référence à un passage du livre *Through the Looking-Glass* de Lewis Carroll (1872) où la Reine Rouge explique à Alice que dans son royaume, il est nécessaire de courir le plus vite possible pour au final rester à la même place. Dans un contexte évolutif, l'hypothèse de la Reine Rouge fait alors référence à la nécessité pour toute espèce de s'adapter continuellement pour maintenir sa fitness relativement au système dans lequel elle évolue.

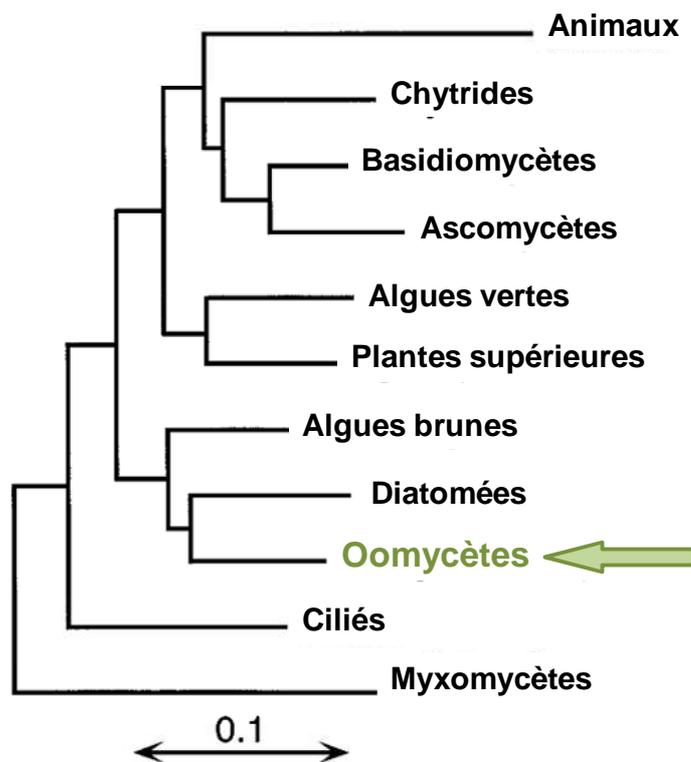
L'hypothèse de la Reine Rouge est souvent émise pour expliquer le maintien du sexe chez les organismes susceptibles d'être parasités : il leur permettrait d'échapper au parasitisme en créant de nouveaux génotypes résistants à l'infection (Salathe *et al.*, 2008). Mais cette théorie pourrait également expliquer pourquoi le sexe est maintenu chez les agents pathogènes eux-mêmes, puisqu'eux aussi doivent s'adapter à leur hôte (Howard & Lively, 2002; Andrivon *et al.*, 2003).

## 4. Modèle d'étude : *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre

### 4.1. Le pathogène : l'Oomycète ravageur *Phytophthora infestans*

#### 4.1.1. Phylogénie

*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary est un Oomycète de la famille des Pythiacées (Agris, 2005). Longtemps considérés comme appartenant au règne des champignons de par leurs caractéristiques morphologiques, les Oomycètes ont été reclassés chez les Straménophiles et sont donc phylogénétiquement plus proches des algues brunes et des diatomées que des champignons (Figure 9; Judelson, 1997). Cependant, le terme de champignon (ou mycose lorsqu'on désigne la maladie) est encore largement employé pour *P. infestans*.



**Figure 9** : Phylogénie basée sur les similarités de séquences des ARN ribosomiaux (Judelson, 1997). Notons la position des Oomycètes, qui sont plus proches des diatomées et des algues brunes que des champignons.

#### 4.1.2. Cycle et traits de vie

Le cycle de vie de *P. infestans* est majoritairement aérien et asexué, mais comporte une phase sexuée facultative (Figure 10). Le cycle asexué de la maladie est initié à partir de sporanges, eux même issus soit d'oospores (structures issues de la reproduction sexuée, Figure 10A), soit produits sur de jeunes pousses malades ou des tubercules infectés (Figure 10B) en début de saison. Ces sporanges, véhiculés sur de longues distances par le vent ou la pluie, germeront au contact de la plante hôte de façon directe (émission d'un tube germinatif infectieux) ou indirecte en libérant des zoospores unicellulaires biflagellées (Figure 10C). La zoosporogénèse (c'est-à-dire la différenciation et la formation des zoospores) est favorisée par des températures basses et une humidité élevée (Judelson & Blanco, 2005; Fry, 2008). Chaque sporange peut émettre en moyenne 6 à 7 zoospores (Judelson & Blanco, 2005; Annexe 2) : ceci démultiplie la capacité d'infection, d'autant plus que les zoospores apparaissent comme des structures plus infectieuses que les sporanges (Widmer, 2009) et sont capables de nager jusqu'à la rencontre de la plante hôte par tropisme chimique (Carlisle, 1988). Ces deux stratégies de germination confèrent donc à *P. infestans* un très fort potentiel d'invasion et une capacité à répondre rapidement aux changements environnementaux, puisque les conditions optimales pour le développement de chaque structure sont différentes (Robertson, 1991). Sporanges et zoospores (après encystement, c'est-à-dire la perte de leurs flagelles) émettent alors un tube germinatif (Figure 10D) qui leur permet de pénétrer dans l'hôte soit par des ouvertures naturelles comme les stomates ou les lenticelles, soit directement au travers des parois végétales par formation d'un appressorium (Coffey & Gees, 1991). En cas d'interaction compatible avec l'hôte, un réseau d'hyphes intra- et intercellulaire envahit les tissus (Coffey & Gees, 1991), sans symptômes visibles dans les deux premiers jours (période d'incubation). Après une période d'environ 3-4 jours (correspondant à la période de latence), et sous certaines conditions de température et d'humidité (entre 17 et 25°C et avec un fort taux d'humidité relative; Robertson, 1991), des sporangiophores sont différenciés au travers des stomates (Figure 10E). Il s'agit de structures arbusculaires portant à leurs extrémités de nouveaux sporanges (Robertson, 1991; Judelson & Blanco, 2005; Fry, 2008), constituant l'inoculum secondaire qui va initier un nouveau cycle de reproduction asexuée. La rapidité du cycle asexué et la quantité importante de spores (sporangies et zoospores) produites expliquent le développement rapide de la maladie.

*P. infestans* est une espèce hétérothallique, autrement dit, la reproduction sexuée n'est possible que si deux individus de types sexuels différents et compatibles se rencontrent. En effet, deux types sexuels, appelés A1 et A2, ont été mis en évidence chez *P. infestans* (Gallegly & Galindo, 1958). Lorsque qu'un individu A1 et un individu A2 se rencontrent, des signaux hormonaux spécifiques sont à l'origine de la



Autofécondation et allofécondation sont alors possibles et aboutiront toutes deux à la formation d'oospores (Figure 10A). Leur paroi très épaisse (0,7-1,0  $\mu\text{m}$ ; Hemmes, 1988) leur permet de survivre en absence d'hôte dans le sol jusqu'à trois hivers successifs tout en restant capables de réinfecter de nouvelles plantes (Andersson *et al.*, 1998). Les oospores constituent alors une forme de survie intersaison. Les facteurs responsables de la germination des oospores sont encore mal connus et les taux de germination estimés en conditions contrôlées restent par conséquent en moyenne assez faibles (rarement plus de 10%; Pittis & Shattock, 1994; Stromberg *et al.*, 2001). En revanche, la survie peut également s'effectuer sous forme asexuée via le mycélium au sein de débris végétaux ou de tubercules (Andrison, 1995), à condition que les températures hivernales ne soient pas trop rudes (c'est-à-dire à condition que le sol et les débris infectés qui s'y trouvent ne gèlent pas).

Le cycle de vie de *P. infestans* peut donc être découpé en une phase épidémique, principalement alimentée par la succession de plusieurs cycles de production de spores asexuées, et une phase de survie, sous forme asexuée ou sexuée (Figure 10).

## 4.2. Expression de la maladie, le mildiou de la pomme de terre

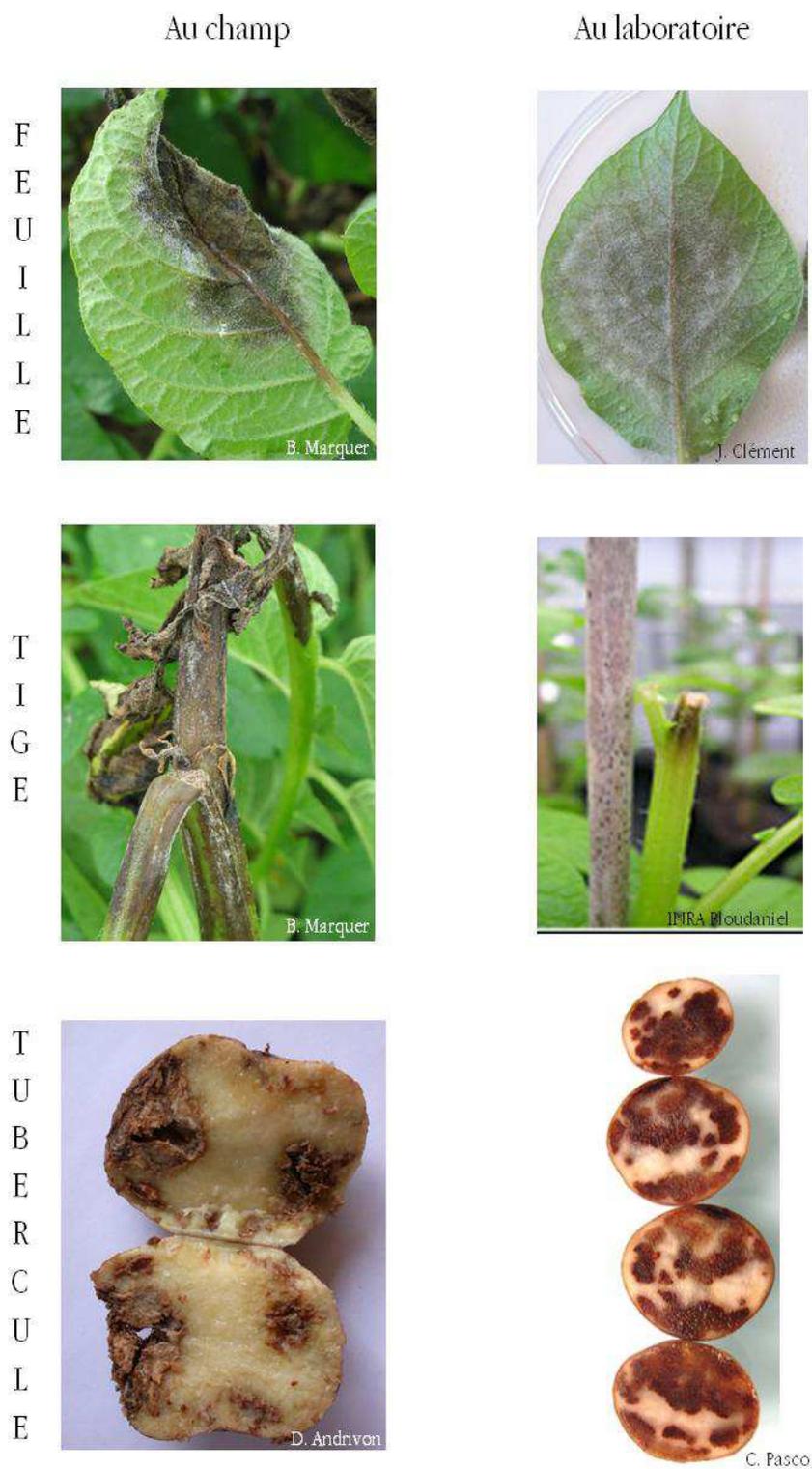
### 4.2.1. Symptômes

*Nothing quite so destructive as this new murrain had ever been seen before. It struck down the growing plants like frost in summer. It spread faster than the cholera amongst men.*

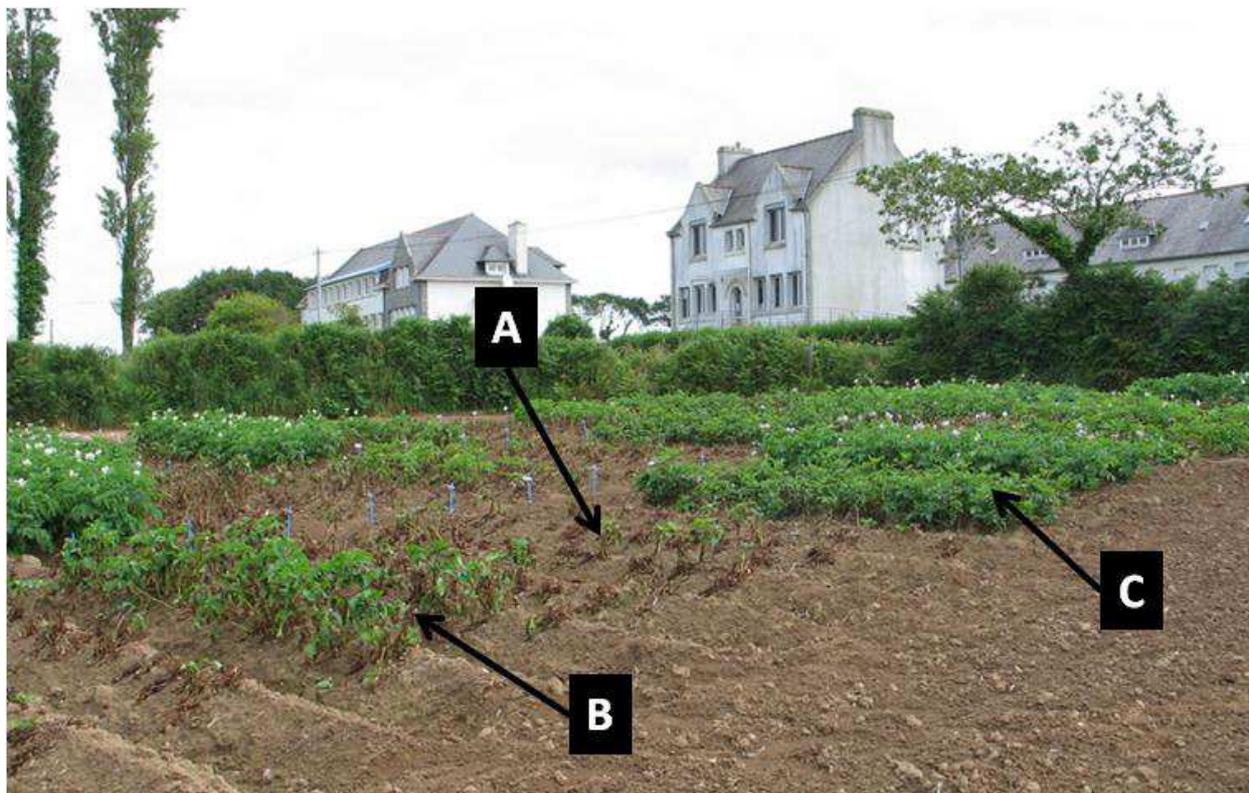
*E. C. Large (1940), The advance of the Fungi*

*Phytophthora infestans* est responsable du mildiou de la pomme de terre (et d'autres Solanacées comme la tomate). Le mildiou est un véritable fléau pour les producteurs de pomme de terre (coût économique mondial supérieur à 3 milliards de dollars par an; Fry, 2008). Cette maladie peut en effet toucher tous les organes de sa plante hôte: les feuilles, tiges, pétioles, bouquets terminaux et les tubercules (Figure 11). Les pertes de rendement peuvent aller jusqu'à 100% et en moins de trois semaines, une culture peut être entièrement détruite (Fry, 2008). Toutes les attaques n'ont pas les mêmes conséquences sur le rendement: les attaques précoces induisent surtout une diminution de la photosynthèse et donc du nombre et de la taille des tubercules formés, tandis que les attaques tardives vont engendrer une diminution de la qualité des tubercules (Radtke & Rieckmann, 1991). Le mildiou provoque des nécroses sur les différents

tissus infectés (Figure 11), ce qui donne au champ une impression de plantes brûlées par la maladie (Figure 12).



**Figure 11 :** Symptômes observés au champ et en conditions contrôlées suite à l'infection par *Phytophthora infestans* de différents organes de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*)



**Figure 12** : Dégâts observés au champ durant une épidémie de mildiou sur variété sensible (A), partiellement résistante (B), et totalement résistante (C).

*Photo prise à la station INRA de Ploudaniel, rattachée à l'UMR Amélioration des Plantes et Biotechnologies Végétales, abritant entre autres une collection spectaculaire de génotypes de pommes de terre.*

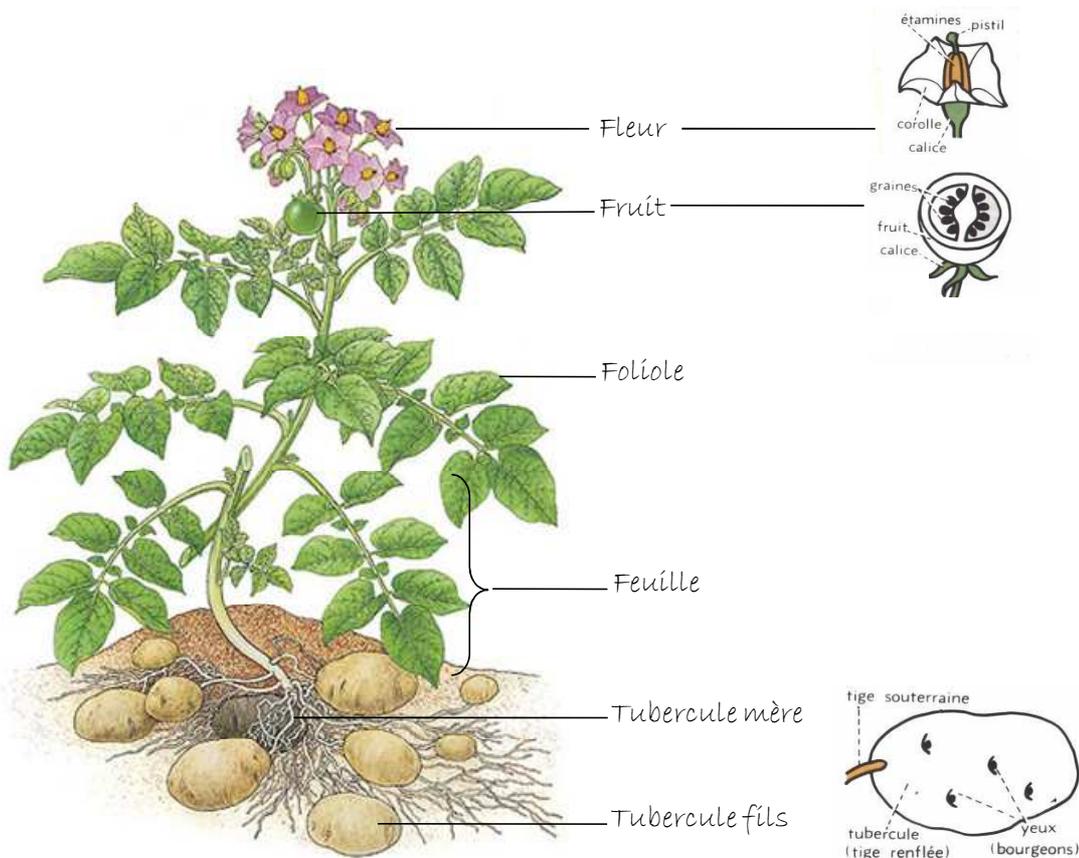
#### 4.2.2. **Lutte**

La lutte prophylactique face au mildiou consiste en l'élimination des sources d'inoculum primaire par rotations culturales et élimination des tas de déchets aux abords des parcelles. Issus de la récolte précédente, ces derniers constituent la principale source d'inoculum primaire selon Boyd (1974). L'utilisation de plants sains prévient également les épidémies. Enfin, la destruction des fanes permet de limiter les risques de contamination des tubercules par un feuillage malade au moment de la récolte. Ces mesures sont essentielles pour limiter l'importance des attaques et retarder leur développement (Duvauchelle & Andrivon, 1996).

L'utilisation de fongicides de contact, pénétrants ou systémiques reste la principale méthode de lutte face au mildiou de la pomme de terre. Cependant, l'utilisation massive des fongicides systémiques, en particulier des phénylamides, a très rapidement sélectionné des isolats résistants à ces matières actives, rendant alors les traitements inefficaces (Dowley & Osullivan, 1991; Waard *et al.*, 1993; Duvauchelle & Andrivon, 1996). Dans des régions où la pression de maladie est forte (en particulier les zones océaniques dont le climat doux et humide favorise les épidémies), le nombre de traitements par saison culturale peut atteindre la vingtaine à raison d'un traitement par semaine. Les effets nocifs liés à l'emploi des produits

phytosanitaires sur la santé des utilisateurs et sur l'environnement amène aujourd'hui à une utilisation plus raisonnée. La fréquence des traitements peut être rationalisée grâce aux systèmes de prévision des risques, basés sur des modèles mathématiques (citons par exemple Milsol, modélisant le cycle épidémique de la maladie; Duvauchelle, 1991) guidant alors la fréquence d'application des produits.

La lutte génétique est la meilleure alternative à l'utilisation de fongicides. Les programmes de sélection pour la résistance au mildiou chez la pomme de terre se sont longtemps basés sur l'introduction de gènes de résistance totale issus de l'espèce sauvage *Solanum demissum* (Duvauchelle & Andrivon, 1996). Cependant, l'utilisation de telles variétés a révélé l'existence dans les populations pathogènes de génotypes capables de contourner ces gènes, entraînant alors une perte de leur efficacité (Wastie 1991). La faible durabilité de ce type de résistance conduit aujourd'hui les sélectionneurs à de nouvelles stratégies de conception de variétés dotées d'une résistance plus durable (voir Encadré n°1). Leurs espoirs reposent entre autres sur l'introgession de résistance quantitative dans de nouvelles variétés, pour lesquelles il est indispensable de développer de nouvelles stratégies d'utilisation afin de maximiser leur durabilité. On sait en effet que l'adaptation des populations pathogènes à ce type de résistance est possible (voir § 1.4.3 ; Andrivon et al., 2007), même si ce phénomène apparaît plus lent que celui du contournement de gènes de résistance totale.



**Figure 13 :** Gravure d'un plant de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) représentant les différents organes qui la compose. Notons que ses feuilles sont imparipennées, constituées de folioles de forme lancéolée et de taille hétérogène.

### 4.3. L'hôte : la pomme de terre *Solanum tuberosum*

« Cet arbuste dit cartoufle porte fruit de mesme nom, semblable a truffes, et par d'aucuns ainsi appelé. Il est venu de Suisse, en Dauphiné, depuis peu de temps en çà. La plante n'en dure qu'une année, dont en faut venir au refaire chacune saison. Par semence, l'on s'en engeance, c'est-à-dire, par le fruit mesme, le mettant en terre au commencement du printemps, après les grandes froidures, la lune estant en decours, quatre doigts profond, désire bonne terre, bien fumée, plus légère que poisante : l'aer modéré. Veut estre semé au large, comme de trois en trois, ou de quatre en quatre pieds de distance l'un de l'autre, pour donner place à ses branches de s'accroître, et de les provigner. De chacun cartoufle sort un tige, faisant plusieurs branches, s'eslevans jusqu'à cinq ou six pieds, (...) faisans des fleurs blanches, toutes-fois, de nulle valeur. Le fruit naist quand-et les jettons à la fourcheure des nœuds, ainsi que glands de chesne. Il s'engrossit et meurt dans terre, d'où l'on le retire en ressortant les branches provignées, sur la fin du mois de Septembre, lors estant parvenue en parfaite maturité. »

Extrait de *Théâtre d'Agriculture et Mesnage des champs*, Olivier de Serres (1600)

La pomme de terre (*Solanum tuberosum*, Figure 13), décrite par Linné en 1753, est une espèce tubéreuse de la famille des Solanacées (Rossignol & Rousselle-Bourgeois, 1996). Originaires d'Amérique du Sud, elles furent introduites en Europe au XVI<sup>ème</sup> siècle par les conquistadores espagnols. Sa démocratisation en France dut attendre le XVIII<sup>ème</sup> siècle et les efforts d'un certain Antoine-Augustin Parmentier. Loin d'être l'inventeur de la pomme de terre comme le laisse entendre la légende, il fut néanmoins le précurseur de la filière de la pomme de terre, de la production à la consommation (Spire & Rousselle, 1996).

Aujourd'hui, trois types de productions existent : la pomme de terre de consommation (primeur et conservation), destinée au marché du frais ou aux industries alimentaires (frites, chips, flocons) ; la pomme de terre féculière, dont les propriétés gélifiantes sont utilisées dans de diverses productions industrielles (pharmaceutique, chimie, papeterie, biocarburants, ...) ; et le plant ou semence de pomme de terre. Cette culture occupe aujourd'hui le troisième rang mondial, derrière le blé et le riz en termes de consommation humaine (données CIP,

<http://www.cipotato.org/>).

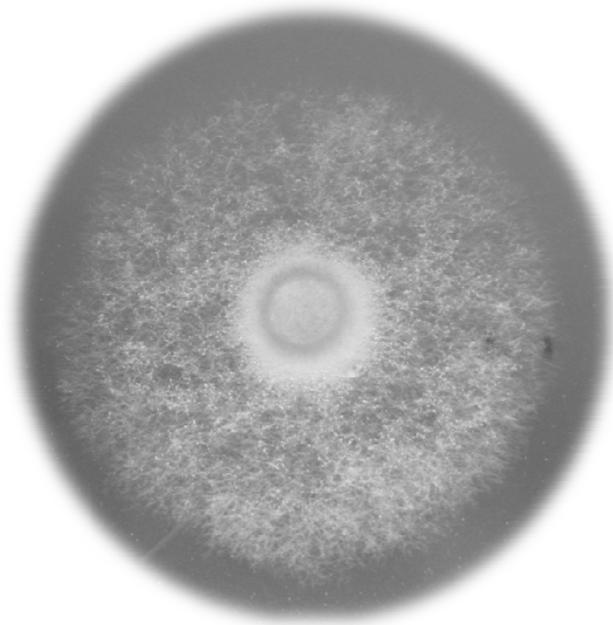
La pomme de terre se propage de façon végétative via les tubercules, ce qui garantit une homogénéité génétique de la descendance. Les tubercules sont formés à partir des stolons de la plante mère. Ils grossissent en emmagasinant des substances de réserve produites à partir des métabolites formés au niveau du feuillage (Jolivet, 1969). Lorsque le feuillage meurt, seuls restent les tubercules pour passer la mauvaise saison. Ils rentrent alors en repos végétatif et ne pourront germer et donner de nouvelles plantes qu'après cette période.

#### 4.4. Avantages du modèle dans notre étude

*Phytophthora infestans* étant l'agent pathogène le plus dommageable des cultures de pomme de terre, l'intérêt économique lié à son étude est évident. Les pertes occasionnées chaque année et les efforts colossaux investis dans la lutte sont incontestablement les principales raisons stimulant le lancement de nouveaux projets construits autour de l'éradication de ce fléau agronomique.

Outre l'importance économique, *P. infestans* est également un bon modèle pour étudier l'évolution des populations pathogènes. Tout d'abord, l'homogénéité génétique de son hôte végétal, conférée par sa multiplication exclusivement végétative, permet d'estomper les variations qui pourraient être dues à l'échantillonnage des populations hôtes. De plus, de nombreuses variétés de pomme de terre présentant une résistance totale ou partielle sont disponibles (Wastie, 1991). *P. infestans* est également connu pour sa variabilité en termes d'agressivité (Lebreton & Andrivon, 1998) et de reproduction sexuée (Stromberg *et al.*, 2001). La maîtrise (encore imparfaite) de sa biologie, la connaissance de son cycle de vie et de l'évolution rapide de ses populations en font un modèle intéressant pour l'étude de ses traits d'histoire de vie. En outre, son caractère hétérothallique à deux types sexuels (Gallegly & Galindo, 1958) permet de contrôler sa reproduction sexuée en jouant sur la compatibilité des isolats testés lors d'infections multiples. Étudier les stratégies de reproduction d'un tel agent pathogène, chez qui sexe rime également avec survie, offre des opportunités originales en termes de questionnement scientifique.

Enfin, ce modèle dispose d'avantages méthodologiques non négligeables. Bien qu'il se comporte comme un biotrophe obligatoire en conditions naturelles (Isaac, 1992) sans capacité de survie prolongée sous forme saprophytique (Andrivon, 1995), *P. infestans* peut être isolé et maintenu en milieu de culture artificiel, par exemple sur un milieu gélosé à base de petit pois (Figure 14). Des tests miniaturisés sur foliole détaché (Figure 15) ont également été mis au point et permettent de mesurer des traits d'histoire de vie liés au pouvoir pathogène de cet Oomycète (Lebreton & Andrivon, 1998). Par ailleurs, *P. infestans* a beaucoup été étudié d'un point de vue moléculaire et son génome est désormais disponible (Haas *et al.*, 2009). Le développement d'outils moléculaires est donc facilité.



**Figure 14:** Isolat de *Phytophthora infestans* en culture sur milieu gélosé à base de petit pois



**Figure 15:** Test d'agressivité de *Phytophthora infestans* sur foliole détaché de pomme de terre

## 5. Objectifs du travail de thèse

Les traits d'histoire de vie des agents pathogènes sont le fruit d'une longue coévolution avec leur(s) hôte(s). Nous avons vu dans la première partie de cette introduction que ces traits d'histoire de vie déterminent leurs capacités de colonisation, de dispersion et de survie, et sont le reflet de leur potentiel d'invasion et de persistance au sein des systèmes naturels et agricoles. Les ressources en hôtes étant bien souvent limitées, les agents pathogènes doivent, tout au long de leur vie, allouer de manière dynamique leur énergie dans ces différentes fonctions. La sélection naturelle favorise alors les schémas de reproduction conférant une fitness optimale. Cependant, ces stratégies de reproduction sont susceptibles d'être modulées par bon nombre de facteurs, comme la résistance de l'hôte ou les infections multiples, qui sont au cœur de ce travail de thèse.

Le modèle d'étude, *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre, est un Oomycète se reproduisant essentiellement de façon clonale (sporulation asexuée). Le sexe est facultatif chez cette espèce hétérothallique : il nécessite la rencontre de deux partenaires compatibles et impose donc la contrainte des infections multiples et le partage des ressources de l'hôte.

Dans ce travail de thèse, mes objectifs se situent à deux échelles d'interactions, l'interaction hôte-pathogène et l'interaction pathogène-pathogène, et sont les suivants :



### **(i) DETERMINER L'IMPACT DES COMPOSANTES DE LA RESISTANCE PARTIELLE DE L'HOTE SUR LA REPRODUCTION SEXUEE DE L'AGENT PATHOGENE**

La résistance quantitative peut être définie comme une altération des traits d'histoire de vie du pathogène impliqués dans la phase épidémique. L'une des façons d'évaluer le potentiel de résistance de nouvelles variétés est d'ailleurs de mesurer certains de ces traits, comme la latence, la croissance des lésions et la production de spores asexuées, décrits alors comme les composantes de résistance. Cependant, *Phytophthora infestans* est capable de se reproduire également de façon sexuée lorsque deux partenaires compatibles se rencontrent. Au-delà de la production de formes de survie très résistantes aux conditions environnementales, le sexe confère des avantages évolutifs non négligeables comme l'adaptation à l'hôte (Théorie de la Reine Rouge). Comprendre comment la résistance de la plante hôte impacte la reproduction sexuée représente donc un grand intérêt que ce soit du point de vue de l'écologue, pour prédire la

dynamique et l'évolution des populations pathogènes, ou du point de vue du sélectionneur, cherchant à maximiser la durabilité de la résistance des plantes sélectionnées.

Les questions soulevées dans cette partie du travail sont donc : (1) Quelles sont les composantes de la résistance quantitative et leurs relations ? (2) Quelles composantes influencent la reproduction sexuée ? (3) Quelles relations quantitatives existent entre le niveau de résistance et l'intensité de la reproduction sexuée ?



## **(II) DEVELOPPER UN OUTIL DE DISCRIMINATION ET DE QUANTIFICATION DES STRUCTURES DE REPRODUCTION DE *P. INFESTANS***

Etudier les stratégies de reproduction d'un agent pathogène en infections multiples implique d'être en mesure de discriminer et de quantifier les structures issues de la reproduction de chaque génotype interagissant. Sans outils moléculaires, cette distinction est impossible pour beaucoup d'agents pathogènes sporulants. Les outils disponibles pour notre modèle d'étude *P. infestans* ne permettaient pas à la fois une discrimination et une quantification au niveau intra-spécifique.

Grâce à une collaboration que j'ai entreprise avec E. Jacquot et T. Baldwin (équipe Biologie et évolution des virus à ARN, INRA Rennes), j'ai développé au cours de ce travail de thèse un outil de PCR quantitative qui a permis de répondre à ces attentes.



## **(III) DECRIRE LA (LES) STRATEGIE(S) DE REPRODUCTION ADOPTEES PAR LE PATHOGENE LORS D'INFECTIONS MULTIPLES IMPLIQUANT DES SOUCHES NON COMPATIBLES SEXUELLEMENT**

Dans les systèmes naturels et cultivés, les infections multiples sont fréquentes. L'interaction pathogène-pathogène est alors inévitable, et engendre un partage des ressources entre les individus. Les traits d'histoire de vie de chaque génotype parasite en interaction peuvent alors être affectés et les stratégies de reproduction modifiées. La théorie prédit que la modulation de ces traits est dépendante de l'apparement entre les génotypes. J'ai donc voulu tester (1) si l'infection double, synonyme de partage des ressources, modifie l'investissement global et individuel dans la reproduction asexuée et (2) si le

génotype du compétiteur (génétiquement identique ou distinct) est un déterminant important de la stratégie de reproduction adoptée lors d'infections multiples.



#### **(IV) COMPARER LES STRATEGIES DE REPRODUCTION EN INFECTIONS MULTIPLES POUR DES INTERACTIONS SEXUELLEMENT COMPATIBLES ET NON-COMPATIBLES**

Les agents pathogènes hétérothalliques comme notre modèle *P. infestans* sont capables, lorsqu'ils rencontrent un partenaire compatible, de se reproduire sexuellement. L'objectif précédent était focalisé sur des infections multiples n'impliquant que des souches non compatibles sexuellement, et ne considérant ainsi que les stratégies de reproduction asexuée. Lorsque les infections multiples engagent des souches compatibles, un ou des nouveaux traits liés à la reproduction sexuée sont exprimés : un nouveau dilemme apparaît donc dans la stratégie de répartition des ressources entre les différentes fonctions de reproduction. De plus, le sexe est reconnu comme un processus coûteux qui pourrait impacter négativement l'investissement dans la reproduction asexuée. Les objectifs de ce travail étaient donc de tester (1) si la compatibilité sexuelle entre isolats interagissant en infections multiples est un facteur déterminant de la stratégie de reproduction, (2) si en plus de sa compatibilité sexuelle, le génotype du partenaire en infections multiples est un facteur déterminant de la stratégie de reproduction, et (3) si l'investissement dans la reproduction sexuée est effectivement coûteux et avait un impact sur l'investissement dans la reproduction asexuée.

# Chapitre I



**La résistance de l'hôte et ses  
conséquences sur la reproduction sexuée**



## 1. Objectifs de travail

Nous avons vu que pour un agent pathogène tel que *Phytophthora infestans*, le sexe peut être un avantage pour plusieurs raisons. Il peut tout d'abord être un avantage évolutif grâce aux nouvelles combinaisons d'allèles qu'il génère et au potentiel adaptatif que celles-ci représentent. La reproduction sexuée de *P. infestans* conduit également à la formation de structures de conservation, les oospores. La persistance en absence d'hôte et la survie intersaison sont alors possibles et ont des conséquences importantes du point de vue de la dynamique épidémique. Le double avantage (potentiel génétique et survie) de la reproduction sexuée chez ce type d'agent pathogène justifie d'autant plus l'intérêt de son étude. Nous avons également postulé que la résistance quantitative de la plante hôte peut être décrite comme un modulateur des traits d'histoire de vie liés au pouvoir pathogène. Contraindre l'agent pathogène sur certains de ces traits pourrait compromettre son investissement dans d'autres traits, comme la reproduction sexuée.

Ainsi, l'objectif de ce chapitre est **d'étudier l'effet de la résistance quantitative de l'hôte sur la capacité du pathogène à investir dans la reproduction sexuée**. Les questions auxquelles nous avons tenté d'apporter des éléments de réponses sont les suivantes :

- 1) Quelles sont les composantes de la résistance quantitative et leurs relations ?
- 2) Quels sont les composantes de la résistance quantitative de l'hôte qui semblent influencer sur l'investissement de *P. infestans* dans la reproduction sexuée ?
- 3) Quelles sont, dans ce cas, les relations quantitatives entre l'intensité de cette résistance et le niveau de sporulation sexuée ?

Pour répondre à ces questions, des expérimentations en conditions contrôlées ont été effectuées sur un panel de neuf génotypes (cultivars) de pomme de terre présentant des niveaux et des composantes de résistance différents. Après caractérisation fine, pour chaque génotype d'hôte, de la modification de trois traits liés à la pathogénicité (latence, croissance de la lésion et sporulation asexuée), nous avons testé l'investissement de plusieurs couples d'isolats dans la reproduction sexuée. Les résultats de ce travail font l'objet d'une publication dans *Journal of Evolutionary Biology* (2010).

## 2. Article 1

Alteration of pathogenicity-linked life-history traits by resistance of its host *Solanum tuberosum* impacts sexual reproduction of the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans*

J. A. J. Clément <sup>a</sup>, H. Magalon <sup>a</sup>, R. Pellé <sup>b</sup>, B. Marquer <sup>a</sup>, D. Andrivon <sup>a</sup>

<sup>a</sup> INRA, Agrocampus Ouest, University of Rennes 1, UMR 1099, Biology of Organisms & Populations Applied to Plant Protection BiO3P, F-35653 Le Rheu, France

<sup>b</sup> INRA, UMR 118 APBV, Ploudaniel, France

*Journal of Evolutionary Biology* 23, 2010

# Chapitre 2



**Détecter et quantifier la fitness  
reproductive en infections multiples**



## 1. Objectifs de travail

Pour pouvoir estimer la fitness reproductive individuelle lors d'infections multiples, il est nécessaire de pouvoir discriminer le parent d'origine des spores obtenues à l'issue des différentes confrontations d'isolats. Chez la plupart des pathogènes sporulants, l'absence de variabilité phénotypique impose l'utilisation d'outils ciblant la variabilité intraspécifique au niveau moléculaire, comme par exemple la PCRq (Polymerase Chain Reaction quantitative). L'essor de cette méthode de quantification durant ces dernières années réside dans la diminution du coût de la réaction mais surtout dans les progrès technologiques récents des appareils de PCR quantitative, dont la fiabilité a été considérablement améliorée.

Afin de répondre aux questions posées dans les chapitres suivants, il a été nécessaire de développer un tel outil permettant d'assigner l'origine des spores collectées. Les spores asexuées (spores / zoospores), développées à la surface de la feuille, peuvent aisément être séparées des spores sexuées (oospores), formées au sein des tissus de la plante hôte. Notre outil de biologie moléculaire permet d'estimer l'investissement de chacun des isolats dans les deux types de reproduction (sexuées ou asexuées selon la fraction testée).

Nous nous sommes basés sur le polymorphisme du gène d'avirulence Avr3a pour développer des amorces et des sondes Taqman<sup>®</sup> spécifiques à l'un ou l'autre des génotypes (virulent ou avirulent face au gène R3a de la pomme de terre). L'efficacité de la quantification d'un génotype en mélange avec un autre génotype à des concentrations croissantes a été testée. Les détails de la mise au point de cet outil et le test de sa fiabilité dans des expériences de compétition font l'objet d'une publication soumise dans *European Journal of Plant Pathology*, le 15 avril 2011.

## 2. Article 2

# Discrimination and quantification of *Phytophthora infestans* isolates using a real-time PCR assay that targets polymorphisms of the Avr3a gene

Julie A.J. Clément <sup>a §</sup>, Thomas K. Baldwin <sup>a 1</sup>, Hélène Magalon <sup>a 2</sup>, Isabelle Glais <sup>a</sup>, Cécile Gracianne <sup>a</sup>,  
Didier Andrivon <sup>a</sup> and Emmanuel Jacquot <sup>a</sup>

<sup>a</sup> INRA, Agrocampus Ouest, University of Rennes 1, UMR 1099, Biology of Organisms & Populations Applied to Plant Protection BiO3P, F-35653 Le Rheu, France

<sup>1</sup> Present address: Vilmorin, Route du Manoir, F-49250 La M  nitr  , France

<sup>2</sup> Present address : Laboratoire d'Ecologie Marine (ECOMAR), Université de la Réunion, 97715 St Denis Messag Cedex 09, La Réunion (France)

### Abstract:

Molecular tools that allow intra-specific quantification and discrimination of pathogen isolates are useful in assessing individual fitness during mixed infections. However, existing methods that were developed for quantifying *Phytophthora infestans* were specific only at the species level. Here, we reported a TaqMan-based real-time PCR assay allowing an accurate quantification of different proportions of two genetically distinct clones of *P. infestans* in mixed fractions. In addition to a primer specific to *P. infestans*, we designed two primers and two Taqman<sup>®</sup> probes that target single nucleotide polymorphisms located in the Avr3a/avr3a virulence gene sequences. We tested the reliability of the method on serially diluted fractions containing, at concentrations ranging from 10<sup>8</sup> to 10<sup>2</sup> targeted sequences/ $\mu$ L, plasmid DNA with either the Avr3a or the avr3a sequences. Based on its specificity, sensitivity and repeatability, the proposed assay allowed a quantification of the targeted DNA sequence in fractions with a Avr3a/avr3a ratio in the range 1/99 to 99/1. The reliability of the test was also checked for counting zoospores. This tool clearly improves previously published methods for specific *P. infestans* detection/quantification. Moreover, the specificity of this Avr3a/avr3A-based assay offers new opportunities for future researches on *P. infestans*.

**Keywords:** *Phytophthora infestans*; Taqman; Avr3a; quantitative PCR

## Introduction

Individual fitness is a common measure found in studies attempting to assess and compare the relative success of particular genotypes in a population of individuals from a particular species (Day & Otto, 2001). As intra-specific competition within a host occurs in many host-pathogen systems (Read & Taylor, 2001), studying the competitive ability of different genotypes is a key issue for numerous research programs linked, for example, to the evolution of virulence of pathogens (Bell et al., 2006; Choisy & de Roode, 2010; de Roode et al., 2005b; Gower & Webster, 2005) and emergence of new variants (Kadish & Cohen, 1988; Rolland et al., 2010). Understanding the molecular dynamics of pathogenic populations requires knowledge of both the identity and the frequency of the different genotypes infecting the hosts. Thus, fitness investigations at intra-species level are only possible within systems in which each individual offspring can be distinguished. Consequently, the majority of spore-producing parasites, in which there are no morphological differences between individuals and/or between their offspring, do not constitute an easy biological model for such type of investigations. Indeed, during a competition assay within a single host, it is impossible to identify the origin of the spores without the use of molecular markers specific for each individual genotype present in the mixture. These specific molecular variations of individuals can either be detected directly at the genomic level by molecular tools based on polymorphism (e.g. microsatellite markers; Montarry et al., 2010) or at the macromolecular level (e.g. use of monoclonal antibodies; Lacroix et al., 2010). Nevertheless, these methods cannot be applied for accurately quantifying multiple infections of closely related individuals.

*Phytophthora infestans* (the causal agent of potato and tomato late blight) is a hemibiotrophic oomycete causing severe yield and quality losses on crops (Robertson, 1991). Its life cycle begins with the penetration of host tissue by germ tubes from sporangia (or zoospores differentiated within the sporangia), followed by mycelial growth within host tissue and formation of new sporangia resulting from clonal (asexual) reproduction, which differentiate uninucleate zoospores (Judelson & Blanco, 2005). As such, the fitness of *P. infestans* can be assessed by quantifying sporangia or zoospores. However, using this approach does not allow the quantification of individual fitness during mixed infections. All existing molecular tools developed for quantification only have a detection resolution at the species level (Atallah & Stevenson, 2006; Bohm et al., 1999). Although intra-specific discrimination

is possible by using genetic profiles from population genetic tools (Montarry et al., 2010), quantification would remain a problem.

In this manuscript, we report a real-time PCR method based on Taqman<sup>®</sup> probes technology that made it possible to accurately quantify the relative proportions of different mixed genotypes for the plant pathogen *P. infestans*. The presented method was developed using the intra-specific variations of the gene coding for the Avr3a effector protein (Armstrong et al., 2005). Avr3a is one of many effectors *P. infestans* secretes within the potato (*Solanum tuberosum*) host tissue to evade, suppress or manipulate host defences (Birch et al., 2006). Avr3a interacts with the product of the R3a gene (Bos et al., 2009; Bos et al., 2006) contained within the R3 resistant locus of potato (Huang et al., 2004). The outcome of this interaction depends on *P. infestans* genotype for Avr3a, virulent or avirulent, that leads to either infection or not, respectively. Because (i) real-time PCR assays make it possible to detect and quantify specific genotypes and (ii) the developed assay is based on genetic differences between alleles of the Avr3a gene, the proposed quantitative diagnostic tool can be efficiently used to screen virulent and avirulent *P. infestans* populations.

## Materials and Methods

### Selection of *P. infestans* reference isolates for Avr3a and avr3a

To develop the assay, six isolates of *P. infestans* (Table 1) were chosen for showing different responses on a potato cultivar containing R3 (R3a + R3b) resistance locus: BP3 and OEK *P. infestans* isolates are avirulent (i.e. inducing a hypersensitive response of the host and no infection), and BEK, BP6, P46 and P8 *P. infestans* isolates are virulent (i.e. developing sporulating lesions). DNA from each *P. infestans* isolate was separately extracted from lyophilized mycelium cultured in liquid pea medium. These DNA extractions were performed using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Avr3a gene was amplified using the Pex147F (5'-CCATGCGTCTGGCAATTATGCT-3') and Pex147R (5'-CTGAAAATAATATCCAGTGA-3') PCR primers (Armstrong et al., 2005). PCR products were sequenced using the Sanger technology (Genoscreen, Lille, France) in both directions. Chromatograms reading/correction and multiple alignments were carried out using the Chromas<sup>®</sup> software version 2.33 (Technelysium Pty Ltd) and the BioEdit<sup>®</sup> sequence alignment editor version 7.0.9.0 (Hall, 1999), respectively. Two independent

PCR/sequencing procedures were performed for each isolate in order to produce error-free data sequence.

**Table1** : Characteristics of *P. infestans* isolates used to develop and test the reliability of the real-time PCR assay

Isolate	Origin	Year	Potato Cultivar	Phenotype on R3 locus
BEK	Northern France	2005	Kaptah-Vandel	+
BP3	Northern France	2005	Bintje	-
BP6	Northern France	2005	Bintje	+
OEK	West France	2005	Kaptah-Vandel	-
P13	West France	2008	Bintje	+
P43	West France	2008	Atlas	+
P46	West France	2006	Bintje	+
P8	West France	2006	Bintje	+
PON05	West France	2008	Atlas	+
PON10	West France	2008	Charlotte	+
PP1	West France	2006	Bintje	NT
Z0	Algeria	2007	Spunta	+

<sup>a</sup> Results of interaction between the isolate and a potato cultivar containing the R3 locus (R3a + R3b resistance genes): +, infection; -, hypersensitive response (no infection); NT: non tested.

### Cloning and creation of standards for real-time PCR assay

Cloning of Avr3a/avr3a genes was performed using the StrataClone™ PCR Cloning Kit (Agilent Technologies - Stratagene Products) in the cloning vector pSC-A-amp/kan following the manufacturer's instructions. The experiment took place in three steps: amplification of products to clone by PCR (using primers Pex147F and Pex147R detailed above), ligation of PCR products in the pSC-A-amp/kan vector and bacterial transformation. Plasmid DNA was purified from recombinant bacteria by using the Miniprep Nucleospin plasmid extraction kit (Macherey-Nagel EURL, Hoerdt, France) and sequenced using appropriate T3 (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3') and M13-20 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') universal primers, that framed the inserted in the pSC-A-amp/kan plasmid. Fractions containing plasmid with BP3 (Avr3a) and BP6 (avr3a) sequence were chosen to constitute the Avr3a and avr3a standards, respectively. The number of plasmid copies in these fractions was assessed by quantifying DNA concentrations with a spectrophotometer. According to the concentration of plasmid in the fractions, the latter were 10-fold serially diluted to create series of fractions containing from 10<sup>8</sup> to 10<sup>2</sup> copies/μL.

## Molecular marker development

Using the Primer Express<sup>®</sup> software (Applied biosystem), primers and Taqman<sup>®</sup>-MGB probes were designed to perform real-time PCR. The sequence of the 'F' forward primer (5'-GCGAATCTAAATGAGGAGATGTTTAAT-3') was selected to be specific to *P. infestans*. The 'R<sup>Avr3a</sup>' reverse primer (5'-CCTGTTGTGCTGCCACCAA-3') and the probe<sup>Avr3a</sup> (5'-FAM-CTGCTCTCTTCGTCAAC-MGB-3') were designed according to the BP3 sequence while the 'R<sup>avr3a</sup>' reverse primer (5'-CCTGTTGTGCTGCCACCAC-3') and the probe<sup>avr3a</sup> (5'-Vic-TGCTCTCTCCGTCAAC-MGB-3') were selected to be specific to BP6 sequence (see Table 2 for complementary information).

**Table 2 :** Characteristics of primers and probes used in the real-time PCR assay.

Probe and Primer	Nucleotide sequence 5'-3'	Position	Tm (°C)
F	<b>GCGAATCTAAATGAGGAGATGTTTAAT</b>	199-225	58.3
R <sup>BP3</sup>	<b>CCTGTTGTGCTGCCACCAA</b>	330-312	60.3
Probe <sup>BP3</sup>	<b>CTGCTCTCTTCGTCAAC</b>	250-237	68.9
R <sup>BP6</sup>	<b>CCTGTTGTGCTGCCACCAC</b>	330-312	59.7
Probe <sup>BP6</sup>	<b>TGCTCTCTCCGTCAAC</b>	249-237	68.9

<sup>a</sup> Probes used in the assay were designed with a FAM (Probe<sup>Avr3a</sup>) and Vic (Probe<sup>avr3a</sup>) reporter linked at the 5' end of the oligonucleotide sequence and a MGB (Minor Groove Binding, Applied Biosystem) quencher linked at the 3' end. Bold letters correspond to the nucleotide specific to *Avr3a* or *avr3a* primers and probes. Tm: Melting temperature of the primers and probes.

## Real-time PCR assay

The reactions were performed in a final volume of 25  $\mu$ L using 12.5  $\mu$ L of the Taqman<sup>®</sup> Master Mix reagent kit. In addition to the 'F' primer, reactions were set up with *Avr3a*- or *avr3a*-specific reverse primer and probe. Each reaction required 0.8  $\mu$ M of forward and reverse primers, 0.2  $\mu$ M of Taqman<sup>®</sup>-MGB probe and 1  $\mu$ L of DNA sample. PCR were performed using the Roche LightCycler 480. The amplification programme comprised an initial step at 95 °C for 10 min followed by 45 cycles corresponding to (i) denaturation at 95 °C for 15 s and (ii) hybridization and elongation at 60 °C for 60 s. The fluorescent signal was acquired at the end of each hybridization/elongation step.

The 10-fold serially diluted fractions of *Avr3a* and *avr3a* plasmids were used as quantification standards for the LightCycler 480 calibration curves specific to *Avr3a* and *avr3a* quantification assays, respectively. To ensure a specific detection of each type of sequence, fractions containing *Avr3a* DNA

and *avr3a* DNA were analyzed using the F-R<sup>*avr3a*</sup>-Probe<sup>*avr3a*</sup> and the F-R<sup>*Avr3a*</sup>-Probe<sup>*Avr3a*</sup>, respectively. Finally, artificial mixtures containing from 10<sup>2</sup> to 10<sup>8</sup> of each of the two types of DNA sequences (both *Avr3a* and *avr3a* DNA) were prepared and analysed using the different primers/probe combinations to test both the reliability and the specificity of the real-time PCR assay. This complete procedure was repeated four times.

### Extending the reliability of the real-time PCR assay and counting zoospores

To extend the reliability of the real-time PCR assay, in addition to the isolates described in §2.1, 6 *P. infestans* isolates (P13, P43, PON05, PON10, PP1, Z0) with different geographical origin (northern France, western France and Algeria) and collected between 2005 and 2008 (Table 1) were tested. DNA, extracted from lyophilised mycelium according to the procedure described in §2.1, was quantified with the developed real-time PCR assay. Moreover, the *Avr3a* gene sequence of these *P. infestans* isolates was determined according to the procedure described in §2.1.

Suspensions of zoospores from *avr3a/avr3a* BEK, BP6, P46, PON05, PON10, PP1 and Z0 homozygous isolates obtained from infected leaflets were counted eight times each in 10 µL with a microscope. Suspensions (5 mL) were individually centrifuged during 10 min. at 13000 rpm. DNA extractions were carried out using the resulting pelleted zoospores as samples with the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Quantification was performed using the appropriate real-time PCR assay to assess DNA copy number of each sample.

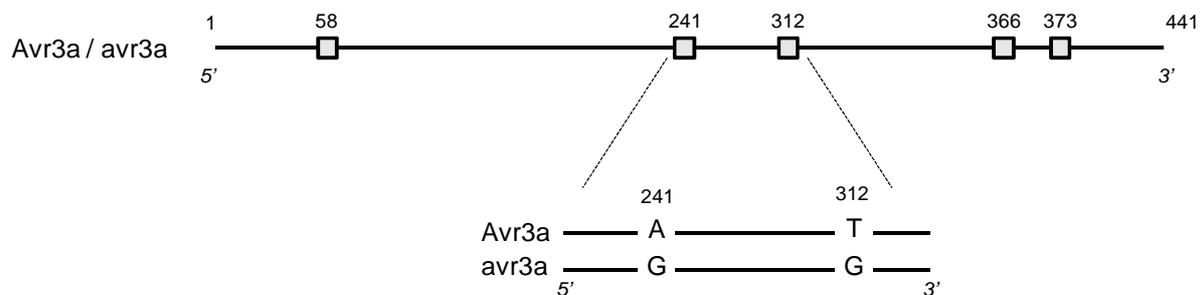
### Data Analysis

All the fluorescence data were analysed with the LightCycler 480 software (v 1.5.0) using the fit-point method. For each theoretical number of DNA copies present in the tested *Avr3a* and *avr3a* pure fractions, the means on the four replicated quantification were calculated. This procedure was extended to mixed fraction containing *Avr3a/avr3a* ratios corresponding to 50/50, 10/90, 90/10, 1/99 and 99/1. Multiple mean comparisons between theoretical and estimated quantifications were performed using `pairwise.t.test` function of the R software version 2.11.1 (R Development Core Team, 2005). Finally, the correlation between means of zoospore counting and the real-time PCR quantification associated to the corresponding extracted DNA fraction was tested using the `cor.test` function.

## Results

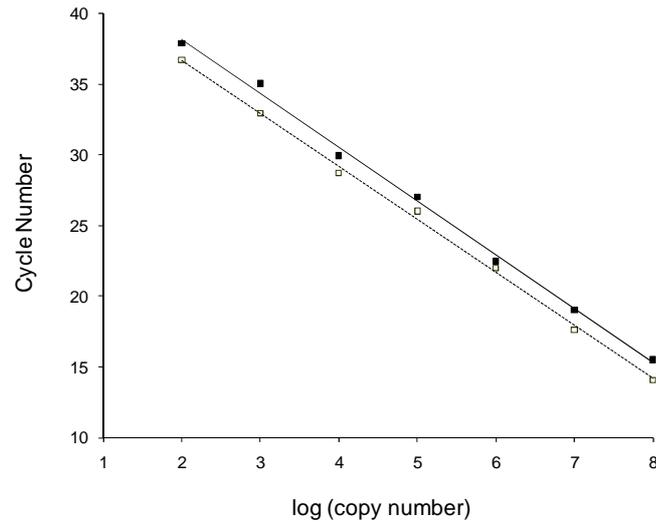
### Avr3a- and avr3a-specific detection/quantification

Sequence alignment obtained with the sequence of the Avr3a gene from the BP3, OEK, BEK, BP6, P46 and P8 *P. infestans* isolates revealed five single-nucleotide polymorphisms (SNP) among which two (located at positions 241 and 312 in the Avr3a sequence) were used as targets in the intra-specific primers and probes design procedure (Figure 1). The BP3 and OEK isolates, exhibiting the avirulent (Avr3a) genotype whereas the four other isolates, including BP6 are associated to the virulent (avr3a) genotype. As both BP3 and BP6 are homozygous, these isolates were selected as reference isolates in the presented work.



**Figure 1 :** Schematic representation of the Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) identified on the Avr3a gene from six sequenced isolates. SNPs localisation and position were represented by squares and the associated number, respectively. Avr3a and avr3a SNP identities were specified for SNPs 241 and 312 used for the real-time PCR assay.

When the appropriate primer pair and probe (F-R<sup>Avr3a</sup>-Probe<sup>Avr3a</sup> or F-R<sup>avr3a</sup>-Probe<sup>avr3a</sup>) were used with the corresponding serially diluted fractions (Avr3a or avr3a, respectively) containing from 10<sup>2</sup> to 10<sup>8</sup> copies/ $\mu$ L, the increase of fluorescence signal observed during the PCR reaction allowed the calculation of standard curves associated to the two developed real-time PCR assays (Figure 2). The slopes of the produced curves (-3.81 and -3.76 for Avr3a and avr3a quantification assays, respectively) and the determination coefficient ( $R^2=0.99$  for the two assays) indicated that these two real-time PCR assays produce accurate quantification (in the range 10<sup>2</sup>-10<sup>8</sup> DNA copies per tested sample) of the targeted sequences (Avr3a and avr3a). Moreover, no fluorescence signal was monitored during the 45 cycles of the PCR when F-R<sup>avr3a</sup>-Probe<sup>avr3a</sup> primer/probe mixture was used to detect/quantify the Avr3a DNA sequence or when F-R<sup>Avr3a</sup>-Probe<sup>Avr3a</sup> primer/probe mixture was used to detect/quantify avr3a DNA.



**Figure 2 :** Standard curves for the Avr3a and avr3a specific real-time PCR assays. Standard curves are illustrated in plain (slope=3.81,  $R^2=0.99$ ) and dotted (slope=3.76,  $R^2=0.99$ ) lines for Avr3a (dark squares) and avr3a (open squares) DNA quantifications, respectively.

### Reliability in mixed DNA fractions

The reliability of the assay was tested using the targeted sequences (Avr3a or avr3a) mixed with the non-targeted one. This procedure was performed with the two DNA sequences (Avr3a and avr3a) at concentration in a range from  $10^2$  to  $10^8$  copies per reaction. Thus, 49 mixtures (Table 3) were twice quantified, once using F-R<sup>Avr3a</sup>-Probe<sup>Avr3a</sup> primers and probes combination, and once using F-R<sup>avr3a</sup>-Probe<sup>avr3a</sup> primers and probes combination. Both detection and quantification of the Avr3a sequence failed at the lowest concentration (i.e.  $10^2$  and  $10^3$  copies/reaction, Table 3, NC) when the competitor (i.e. avr3a) was at least  $10^4$  times more concentrated (i.e.  $10^7$  and  $10^8$  copies/ $\mu$ L). This phenomenon occurs also for quantification of the avr3a target as noticed in the data results illustrated in Table 3 (NC in bold). However, for most (84/98) of the tested artificial mixtures, the Avr3a- and avr3a-specific quantitative assays provided a suitable quantification of the targeted sequence in a mixture containing up to  $10^4$  times more of competitor DNA sequence.

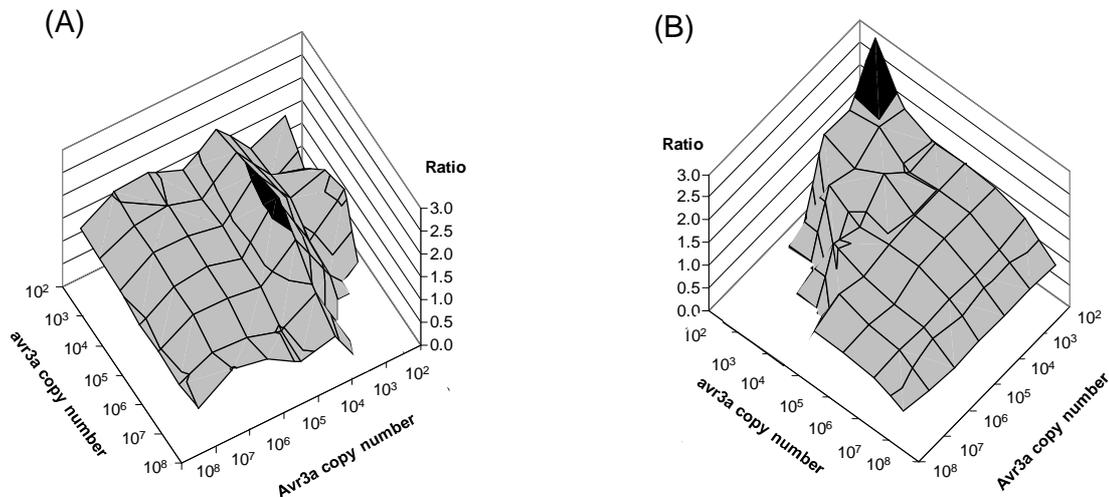
According to the acceptable -2/+2 magnitude in the quantification results, the sequence-dependent specificity of this new assay can be defined using ratios [calculated DNA target quantity (Avr3a or avr3a)/theoretical DNA target quantity present in samples (Avr3a or avr3a)] ranged between 0.5 and 2 as proposed by Balme-Sinibaldi *et al.* (2006). Using a three-dimensional representation of the collected data (Figure 3), the accurate quantification of the target in the tested samples as well as the over- or under-estimations (black areas) can be mapped in the area of tested Avr3a/avr3a mixtures

(ratios in the range  $1/10^6$  to  $10^6/1$ ). Moreover, when competitors (*Avr3a/avr3a*) are present at a ratio in a range 1/99 to 99/1, the calculated/theoretical ratio values associated to these samples were between 0.5 and 2 except for 3 *Avr3a/avr3a* mixtures (Table 3, underlined quantification results). Nevertheless, under our experimental conditions, the calculated/theoretical ratio values, obtained whatever the tested *Avr3a/avr3a* ratios, were not below 0.82 or above 2.35.

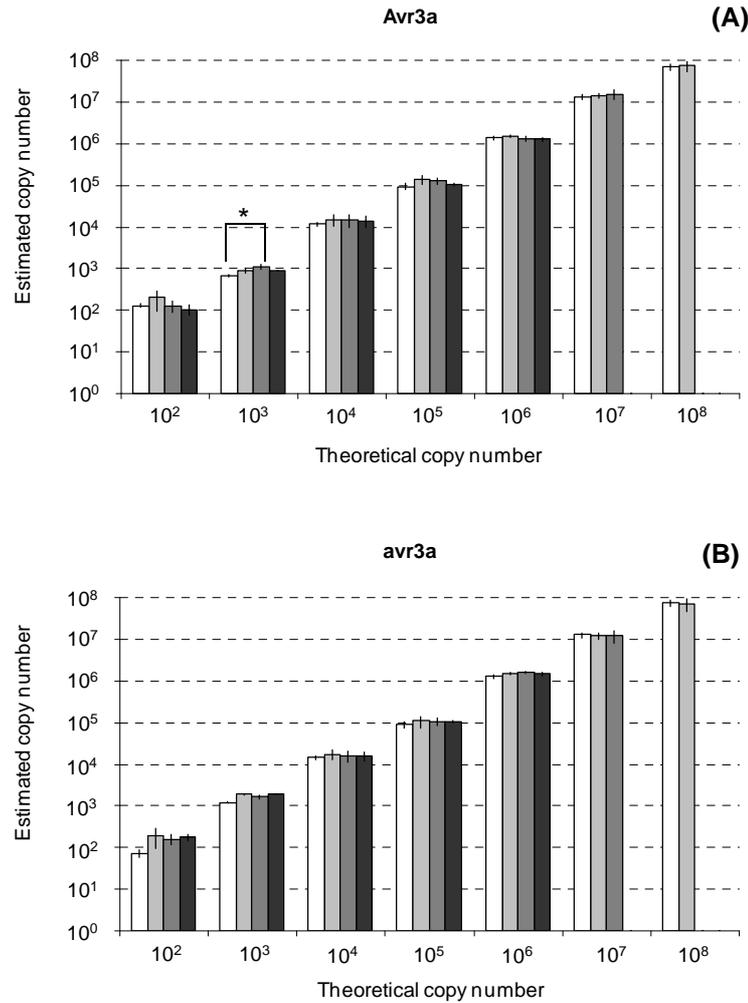
**Table 3** : Quantification of the *Avr3a* and *avr3a* DNA molecules present in mixed fractions.

<i>avr3a</i> copy number	<i>Avr3a</i> copy number							
	1.0E+08	1.0E+07	1.0E+06	1.0E+05	1.0E+04	1.0E+03	1.0E+02	
1.0E+08	1.0E+08 <b>9.9E+07</b>	1.5E+07 <b>8.3E+07</b>	1.3E+06 <b>7.3E+07</b>	9.2E+04 <b>7.5E+07</b>	1.1E+04 <b>7.5E+07</b>	NC <b>7.4E+07</b>	NC <b>7.7E+07</b>	
1.0E+07	9.1E+07 <b>1.1E+07</b>	1.2E+07 <b>1.2E+07</b>	1.2E+06 <b>1.1E+07</b>	9.6E+04 <b>1.1E+07</b>	1.4E+04 <b>1.0E+07</b>	NC <b>1.1E+07</b>	NC <b>1.2E+07</b>	
1.0E+06	9.8E+07 <b>1.1E+06</b>	1.4E+07 <b>1.2E+06</b>	1.4E+06 <b>1.2E+06</b>	1.3E+05 <b>1.3E+06</b>	2.0E+04 <b>1.3E+06</b>	8.0E+02 <b>1.4E+06</b>	NC <b>1.4E+06</b>	
1.0E+05	9.2E+07 <b><u>3.8E+04</u></b>	1.4E+07 <b>1.3E+05</b>	1.5E+06 <b>1.3E+05</b>	1.2E+05 <b>1.3E+05</b>	<b><u>2.2E+04</u></b> <b>1.4E+05</b>	8.9E+02 <b>1.4E+05</b>	1.7E+02 <b>1.4E+05</b>	
1.0E+04	1.0E+08 NC	1.5E+07 NC	1.5E+06 <b>1.4E+04</b>	1.3E+05 <b>1.4E+04</b>	<b><u>2.1E+04</u></b> <b>1.6E+04</b>	1.2E+03 <b>1.4E+04</b>	1.4E+02 <b>1.4E+04</b>	
1.0E+03	1.1E+08 NC	1.4E+07 NC	1.5E+06 NC	1.3E+05 <b>1.7E+03</b>	1.9E+04 <b>1.4E+03</b>	1.1E+03 <b>1.5E+03</b>	8.2E+01 <b>1.6E+03</b>	
1.0E+02	1.1E+08 NC	1.5E+07 NC	1.6E+06 NC	1.3E+05 NC	1.8E+04 <b>1.6E+02</b>	1.0E+03 <b>1.6E+02</b>	1.4E+02 <b><u>2.4E+02</u></b>	

<sup>a</sup> Normal font and bold font numbers correspond to *Avr3a* and *avr3a* quantifications respectively. Underlined numbers correspond to quantification results associated to fractions with a calculated DNA target quantity/theoretical DNA target quantity ratio below 0.5 or above 2.0. NC: not calculated.



**Figure 3** : Three-dimensional representation of calculated DNA target quantity/theoretical DNA target quantity ratios resulting from *Avr3a* (A) and *avr3a* (B) real-time PCR assays performed using mixed samples containing from 108 to 102 *Avr3a* and from 108 to 102 *avr3a* DNA copies. Grey and black areas illustrate calculated ratios in and out the range of 0.5-2.0 values, respectively.



**Figure 4 :** Mean of Avr3a (A) and avr3a (B) targeted DNA copy numbers calculated for the four repetitions of real-time PCR assay. Pure fraction (white) and 50/50 (light grey), 10/90 (dark grey) and 1/99 (black) mixed fractions are represented. A unique significant difference (\* ,  $P < 0.05$ ) was found between the two means when multiple comparisons were performed between fractions within a theoretical copy number value.

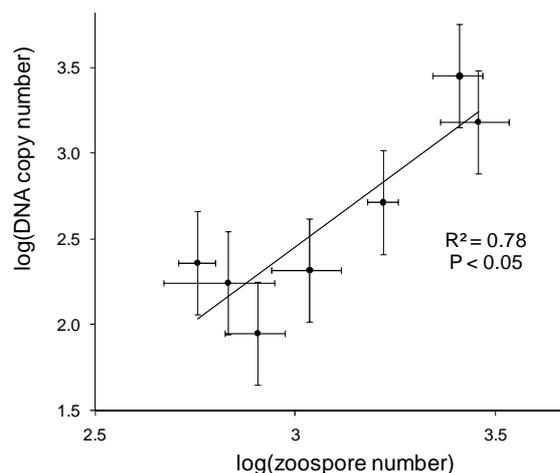
### Between test variation (reproducibility)

Based on the -2/+2 magnitude in quantification used above, the three other repetitions of the test for both targets (i.e. Avr3a- and avr3a) gave satisfactory results (data not shown). Detection of the target when the competitor was present up to a 100-fold higher concentration is an acceptable range for fitness measures. For each theoretical copy number of target, the mean quantification of four replicates of pure Avr3a, pure avr3a and Avr3a/avr3a quantifications associated to ratios corresponding to 50/50, 10/90, 90/10, 1/99 and 99/1 were compared. Because of the design of the experiment (mixture of fractions containing targeted sequences at concentrations in the range  $10^8$  to  $10^2$  copies/reaction), some restrictions in the tested ratios were applied to fractions containing  $10^8$  and  $10^7$  copies of the targeted sequence. An accurate and similar (all  $P > 0.05$ ) quantification was observed

when multiple comparisons were performed for each theoretical copy number of the target (Figure 4). However, a significant difference between the pure fraction and ratio 10/90 for the theoretical  $10^3$  copy number of the *Avr3a* target ( $P < 0.05$ ) was found. Although this significant difference between these two means was observed, both belonged to the  $-2/+2$  magnitude around the  $10^3$  theoretical value ( $6.74 \times 10^2$  and  $1.1 \times 10^3$  for pure and 10/90 mixed fractions, respectively).

### Extending the reliability of the test and counting zoospores

Analysis of the DNA fraction from the 12 different *P. infestans* isolates tested in this work using the real-time PCR assays allow the identification of ten homozygous genotypes [one *Avr3a/Avr3a* (isolate BP3) and nine *avr3a/avr3a* (isolates BEK, BP6, P13, P43, P46, PON05, PON10, PP1 and Z0)] and 2 *Avr3a/avr3a* heterozygous genotypes (isolates OEK and P8). These results have been confirmed by the sequence data of the *Avr3a* gene (data not shown). Finally, zoospore DNA quantification obtained from a subsample of 7 isolates was correlated with zoospores counting obtained from classical microscopy observation. As illustrated in Figure 5, these two methods do not strictly produce similar quantification results. However, the number of zoospores estimated by visual counting and the number of DNA copies obtained by real-time PCR assay are correlated ( $P < 0.05$ ,  $R^2 = 0.78$ ) making possible the replacement of classical quantification of zoospores by the molecular quantification procedure.



**Figure 5 :** Dotplot of zoospore DNA quantification versus zoospore counting for seven *avr3a/avr3a* homozygous isolates of *P. infestans*. Horizontal bars represent standard errors of the mean for eight replicates of optical quantifications; vertical bars represent the  $-2/+2$  magnitude of acceptable error for real-time PCR quantification. The correlation was significant ( $R^2 = 0.78$ ,  $P < 0.05$ ).

## Discussion

We reported here a method for quantifying zoospores of *Phytophthora infestans* isolates. Previous methods for quantifying *P. infestans* in its host plant were developed to be species specific (Atallah & Stevenson, 2006; Bohm et al., 1999). The aim of this work was to establish whether it was possible to create a real-time PCR method for an accurate detection and measurement of the proportions of two genetically distinct isolates of *P. infestans*. To our knowledge, this approach has not been previously reported for this pathogenic oomycete. The proposed technical approach was based on the polymorphism of the Avr3a virulence gene (Armstrong et al., 2005). Samples containing a calculated number of the cloned alleles demonstrated that the described molecular tool is an accurate and sensitive method to detect and quantify different proportions of *P. infestans* isolates in samples corresponding to pure fractions (i.e. a single isolate) or to *P. infestans* mixtures containing at least 1% of the targeted genotype in presence of competitors (i.e. other genotypes). Characteristics of the test were estimated. Resulting data demonstrated that the developed method is sensitive (detection/quantification of samples containing  $10^2$  copies of the targeted *P. infestans* DNA), specific (Avr3a/avr3a specificity in mixed fractions) and reliable. Moreover, the developed assay allows also a satisfying quantification of zoospores from different isolates. Because zoospore counting is fastidious and time-consuming (i.e. counting under a microscope), the presented real-time PCR assay must be considered as a quick and reliable method to assess and compare zoospore production of different *P. infestans* isolates. Finally, the data collected from this work confirmed the reliability of this method on DNA extracted from *P. infestans* zoospores and oospores collected from plant tissue (according to the method proposed by Clément et al., 2010) after mixed clone infections on detached leaflets (results not shown). We aim to use this method to further explore competitive ability of *P. infestans* isolates and the impact of mixed infection on the reproduction strategy of this pathogen.

In many host-pathogen systems, multiple infections by different isolates of the same pathogen often occur in natural conditions (Read & Taylor, 2001). This within-host pathogen diversity has direct consequences on the host-pathogen interaction outcome (Ben-Ami et al., 2008; de Roode et al., 2005a; Jager & Schjorring, 2006) and could affect the pathogen evolution (May & Nowak, 1995; Nowak & May, 1994; van Baalen & Sabelis, 1995). Assessment of the pathogen competitive ability has to be taken into account in studies that aim to understand the life history and evolution of host-pathogen interactions. Thus, the possibility of intra-specific quantification made available with this molecular test allows the

exploration of new questions on the ecology, evolution and epidemiology of the pathogen *P. infestans* such as the measurement of competitive ability.

Avr3a is one of many effectors the pathogen secretes within the potato (*Solanum tuberosum*) (Birch et al., 2009). The Avr3a pathogen gene product interacts with a resistance gene product of the host and results either in a defence response of the plant leading to an absence of infection (i.e. the hypersensitivity response HR) or in an absence of response leading to an infection (Armstrong et al., 2005). The interaction outcome depends on the alleles the pathogen possesses (Armstrong et al., 2005; Bos et al., 2009). Thus, the method presented in this paper will be very useful for screening *P. infestans* isolates for their genotype at the Avr3a locus. Indeed, it provides a faster method than the usual time-consuming biotests in which isolates have to be inoculated on the potato host containing the R3 resistance to determine the outcome of their interaction (i.e. infection or not) (Andriveau, 1994). Moreover, Huang *et al.* (2004) showed that the R3 resistance to *P. infestans* in potato is conferred by two closely linked R genes named R3a and R3b. Biotests do not indicate which process leads to the bypassing of the R3 resistance locus. A *P. infestans* isolate is considered to have overcome the R3 locus when it can infect potato containing this R3 resistance locus. However, nothing is known about how mutations occur both in the Avr3a and the Avr3b genes and how they are selected in populations. In conclusion, the presented molecular-based technique for specific detection/quantification provides a new tool to screen Avr3a/avr3a genotypes, one of these two *P. infestans* virulence genes.

## Acknowledgements

We thank Franck Panabières (INRA, UMR 1301) for his valuable advice about Avr3a virulence gene and Kevin Gazengel, Stephanie Morlière and Agnès Delaunay (INRA, UMR 1099) for technical advice on quantitative PCR and fluorescence analyses, Roselyne Corbière, Claudine Pasco (INRA, UMR 1099) and Z. Bouznad (INA Alger) for providing *P. infestans* isolates. This research was part of the projects 'Invasion and persistence of plant pathogens' funded by INRA and BBSRC, EMERFUNDIS (Agence Nationale de la Recherche grant 07-BDIV-003) and BIOExploit (EU integrated project FOOD-CT-2005-513959).

## References

- Andrivon, D. (1994). Races of *Phytophthora infestans* in France, 1991-1993. *Potato Research*, 37, 279-286.
- Armstrong, M. R., Whisson, S. C., Pritchard, L., Bos, J. I. B., Venter, E., Avrova, A. O., et al. (2005). An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene Avr3a, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 7766-7771.
- Atallah, Z. K., & Stevenson, W. R. (2006). A methodology to detect and quantify five pathogens causing potato tuber decay using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 96, 1037-1045.
- Balme-Sinibaldi, V., Tribodet, M., Croizat, F., Lefeuvre, P., Kerlan, C., & Jacquot, E. (2006). Improvement of Potato virus Y (PVY) detection and quantitation using PVYN- and PVYO-specific real-time RT-PCR assays. *Journal of Virological Methods*, 134, 261-266.
- Bell, A. S., De Roode, J. C., Sim, D., & Read, A. F. (2006). Within-host competition in genetically diverse malaria infections: Parasite virulence and competitive success. *Evolution*, 60, 1358-1371.
- 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.
- Birch, P. R. J., Armstrong, M., Bos, J., Boevink, P., Gilroy, E. M., Taylor, R. M., et al. (2009). Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Journal of Experimental Botany*, 60, 1133-1140.
- Birch, P. R. J., Rehmany, A. P., Pritchard, L., Kamoun, S., & Beynon, J. L. (2006). Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends in Microbiology*, 14, 8-11.
- Bohm, J., Hahn, A., Schubert, R., Bahnweg, G., Adler, N., Nechwatal, J., et al. (1999). Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*, 147, 409-416.
- Bos, J. I. B., Chaparro-Garcia, A., Quesada-Ocampo, L. M., Gardener, B. B. M., & Kamoun, S. (2009). Distinct Amino Acids of the *Phytophthora infestans* Effector AVR3a Condition Activation of R3a Hypersensitivity and Suppression of Cell Death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22, 269-281.

Bos, J. I. B., Kanneganti, T. D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., et al. (2006). The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal*, *48*, 165-176.

Choisy, M., & de Roode, J. C. (2010). Mixed Infections and the Evolution of Virulence: Effects of Resource Competition, Parasite Plasticity, and Impaired Host Immunity. *American Naturalist*, *175*, E105-E118.

Clément, J. A. J., Magalon, H., Pelle, R., Marquer, B., & Andrivon, D. (2010). Alteration of pathogenicity-linked life-history traits by resistance of its host *Solanum tuberosum* impacts sexual reproduction of the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans*. *Journal of Evolutionary Biology*.

Day, T., & Otto, S. P. (Eds.). (2001) Encyclopedia of Life Science. Nature Publishing Group.

de Roode, J. C., Helinski, M. E. H., Anwar, M. A., & Read, A. F. (2005a). Dynamics of multiple infection and within-host competition in genetically diverse malaria infections. *American Naturalist*, *166*, 531-542.

de Roode, J. C., Pansini, R., Cheesman, S. J., Helinski, M. E. H., Huijben, S., Wargo, A. R., et al. (2005b). Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*, 7624-7628.

Gower, C. M., & Webster, J. P. (2005). Intraspecific competition and the evolution of virulence in a parasitic trematode. *Evolution*, *59*, 544-553.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, *41*, 95-98.

Huang, S. W., Vleeshouwers, V., Werij, J. S., Hutten, R. C. B., van Eck, H. J., Visser, R. G. F., et al. (2004). The R3 resistance to *Phytophthora infestans* in potato is conferred by two closely linked R genes with distinct specificities. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *17*, 428-435.

Jager, I., & Schjorring, S. (2006). Multiple infections: Relatedness and time between infections affect the establishment and growth of the cestode *Schistocephalus solidus* in its stickleback host. *Evolution*, *60*, 616-622.

Judelson, H. S., & Blanco, F. A. (2005). The spores of *Phytophthora*: Weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*, *3*, 47-58.

Kadish, D., & Cohen, Y. (1988). Competition between metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in the absence of metalaxyl. *Plant Pathology*, *37*, 558-564.

Lacroix, C., Glais, L., Kerlan, C., Verrier, J. L., & Jacquot, E. (2010). Biological characterization of French Potato virus Y (PVY) isolates collected from PVY-susceptible or -resistant tobacco plants possessing the recessive resistance gene *va*. *Plant Pathology*, *59*, 1133-1143.

May, R. M., & Nowak, M. A. (1995). Coinfection and the evolution of parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, *261*, 209-215.

Montarry, J., Andrivon, D., Glais, I., Corbiere, R., Mialdea, G., & Delmotte, F. (2010). Microsatellite markers reveal two admixed genetic groups and an ongoing displacement within the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Ecology*, *19*, 1965-1977.

Nowak, M. A., & May, R. M. (1994). Superinfection and the evolution of parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, *255*, 81-89.

R Development Core Team. (2005). R: a language and environment for statistical computing (Version 2.11.1). Vienna.

Read, A. F., & Taylor, L. H. (2001). The ecology of genetically diverse infections. *Science*, *292*, 1099-1102.

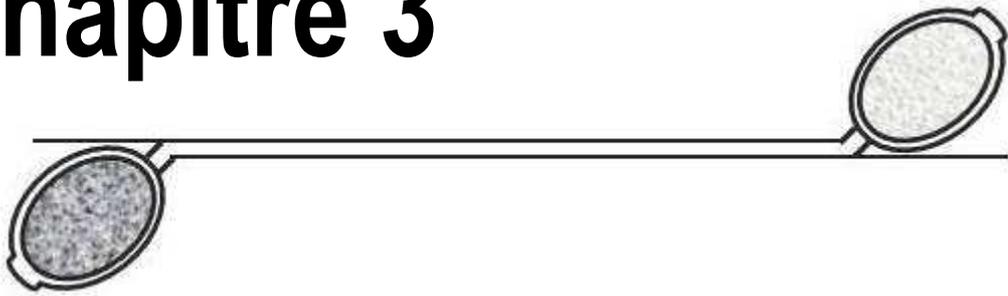
Robertson, N. F. (1991). The Challenge of *Phytophthora infestans*. In D. S. Ingram & P. H. Williams (Eds.), *Phytophthora infestans, the cause of late blight of potato* (Vol. 7): Academic press.

Rolland, M., Delaunay, A., Baldwin, T. K., Kerlan, C., & Jacquot, E. (2010). Complementations and exclusions between mutated versions of a potato virus Y genotype during mixed infections of *Nicotiana* hosts. *Virus Research*, *153*, 197-204.

van Baalen, M., & Sabelis, M. W. (1995). The dynamics of multiple infection and the evolution of virulence. *American Naturalist*, *146*, 881-910.



# Chapitre 3



**Infections multiples et leurs  
conséquences sur la reproduction asexuée**



## 1. Objectifs de travail

La reproduction sexuée chez les agents pathogènes hétérothalliques comme *Phytophthora infestans* impose la rencontre de deux partenaires compatibles et impose donc une nouvelle contrainte: les infections multiples. Avant de s'intéresser plus précisément au cas où les isolats peuvent effectivement se reproduire de façon sexuée, nous nous sommes tout d'abord penchés sur l'impact qu'aurait le partage des ressources en hôte sur la reproduction asexuée de deux isolats non compatibles sexuellement. En effet, nous avons vu dans l'introduction générale que les infections multiples ont des conséquences indiscutables sur l'expression des traits d'histoire de vie, notamment à cause de la réduction des ressources en hôte disponibles mais également à cause de l'interaction inévitable entre les agents pathogènes eux-mêmes. En outre, la théorie prédit que la modulation de ces traits est dépendante de l'appariement entre les génotypes.

**L'objectif de ce chapitre est donc de comprendre comment l'infection par deux isolats sexuellement incompatibles impacte leur investissement dans la reproduction asexuée.** Les questions auxquelles nous avons tenté de répondre sont les suivantes :

- 1) L'infection double, synonyme de partage des ressources, modifie-t-elle l'investissement global et individuel dans la reproduction asexuée?
- 2) Le génotype du compétiteur (génétiquement identique ou distinct) est-il un déterminant important de la stratégie de reproduction adoptée lors d'infections multiples?

Pour cela, plusieurs isolats sexuellement incompatibles (c'est-à-dire appartenant tous au même type sexuel, en l'occurrence A1) ont été expérimentalement testés en conditions contrôlées. Le plan expérimental comportait des infections simples et des infections doubles pour lesquelles les isolats étaient en compétition avec eux-mêmes ou avec un génotype distinct. Nous avons testé la réponse de 4 isolats face à un même compétiteur de référence et parallèlement, la réponse de cet isolat de référence face aux 4 compétiteurs différents.

Ces expérimentations ont montré deux types de réponses aux infections multiples. Certains isolats ont un taux de reproduction asexuée plus important alors que d'autres sont négativement affectés par les infections multiples. Le génotype du compétiteur (identique ou différent) impacte l'intensité de la réponse mais ne change pas le schéma global observé. Ces résultats sont exposés et discutés en détail dans le manuscrit suivant, qui sera soumis prochainement à la revue *Plos Pathogens*.

## 2. Article 3

### To be or not to be competitive: *Phytophthora infestans*' dilemma for optimizing its asexual reproductive strategy in intra- and intergenotype multiple infections.

Julie A.J. Clément<sup>1§</sup>, Hélène Magalon<sup>1</sup>, Isabelle Glais<sup>1</sup>, Emmanuel Jacquot<sup>1</sup> and Didier Andrivon<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, Agrocampus Ouest, University of Rennes 1, UMR 1099, Biology of Organisms & Populations Applied to Plant Protection BiO3P, F-35633 Le Rheu, France

#### Abstract

The possibility for a host to be multiple infected by different pathogens or different strains of a given pathogen implies that pathogens have to interact with each other when sharing host resources. Pathogen life history traits, such as virulence or reproduction, can also be altered in response to within-host competition. Competition effects on pathogen reproductive fitness therefore result from the combination of two factors: multiple infections, generally tested as a dose effect, and challenging a genetically distinct isolate. Using the filamentous spore-producing oomycete *Phytophthora infestans*, we performed single infections, as well as intra- and intergenotype multiple infections, and quantified the asexual reproductive fitness of one reference and four challenger isolates. The five isolates split between two reproductive strategies according to their response to multiple infections: some isolates reproduced better in multiple than in single infections, they had a competitive behaviour; the others appeared fitter alone and negatively affected by multiple infections, they had a prudent behaviour. These plastic responses were interpreted as a shift within the growth-reproduction balance or within the time to reproduction. Challenging itself (intra-genotype multiple infection) or a different genotype (intergenotype multiple infection) clearly affects the competitive outcome of isolates. The existence of both strategies within a same species accounts for a higher adaptive potential to changes in within-host environments (i.e. presence versus absence of competition). The coexistence and maintenance of both strategies in nature could be explained by the fluctuating frequency of competition over the course of an epidemic.

## Author summary

Multiple infections are common in natural pathosystems. It is thus important to understand how they shape the evolution of infectious pathogens. When the parasite has to share host resources, its life history strategy can be modified as a response to the presence of a competitor. Furthermore, theoretical work predicts that challenging itself (intra-genotype competition) or a different parasite genotype (inter-genotype competition) should result in different life history changes: a higher cooperative behaviour is expected when pathogen isolates are related. We tested these predictions in multiple intra- or intergenotype infections of the potato *Solanum tuberosum* with the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*, by measuring modifications of the asexual reproductive fitness of pathogenic isolates. We highlighted two patterns of response to multiple infections, surely arising from two contrasted reproductive strategies. Prudent isolates were negatively affected during multiple infections, while competitive isolates were able to enhance their reproduction. Both strategies could reflect an adaptation to fluctuating frequencies of multiple infections in nature, particularly arising from variations in disease pressure over the course of an epidemic.

## Introduction

Understanding why and how infectious diseases develop and evolve is a fundamental issue to improve disease management. Because the main concern in infectious diseases is the disease outcome itself, most studies focus on the evolution of parasites towards less or more virulence (*i.e.* pathogen-induced host damages or death), rather than on the parasite life history strategy. Virulence, as a result from the expression of pathogen traits linked to host exploitation, is assumed to evolve quickly, depending on ecological and environmental factors, such as within-host multiple infections [1].

Improved detection methods (particularly molecular techniques) have revealed that multiple infections are frequent in natural populations [2], which enticed evolutionary ecologists to consider multiple infections to explain the evolution of parasite life history traits. Many theoretical and empirical studies were interested in the shift of the optimal virulence level during multiple infections. Classical theoretical models predict an increase of parasite virulence over time [3-6] assuming that the faster exploiter (*i.e.* generally the more virulent strains) had a competitive advantage over the more prudent genotypes (generally the less virulent). However, empirical studies did not always support the model

predictions; their results indeed sometimes suggest a competitive advantage to the most virulent [7-10], but in other instances to the least virulent strains [10-11] or exhibited more complex patterns suggesting interference [12-14].

Focusing on virulence evolution when dealing with the outcome of competition is fully justified, but a great attention has to be paid to parasite strategies adopted in response to multiple infections. Particularly, the reproductive strategy and fitness of parasite have direct consequences on the epidemic dynamic. Although in most cases, both strains suffered from competition (i.e. parasite replication rates were lower in multiple infection than in single infection) [7-10,12-13,15], the host often carried higher parasite density [7,13,15-16] in multiple than in single infections. Mixed infection can also enhance the replication rate of one parasite, leading to higher final density [11]. Within-host interactions thus represent an important selective force to take into account in pathogen life history trait evolution [17]. Because of its great implication in understanding the epidemiology of the host-pathogen dynamics [18], pathogen replication strategy is probably one of the major traits to hold in during multiple infections.

Theoretical approaches further predict that competition would affect more genetically unrelated strains [5,19]. Recently, López-Villavicencio *et al.* [14] experimentally showed that relatedness reduces the impact of competition between strains of a fungal pathogen. The extreme case of relatedness between infecting strains is the multiple infection by the same parasite genotype. Most models used for addressing issues on multiple infections were not suitable to test multiple infections by the same genotype of parasite but rather allowed testing the double dose effect [8,15,20]. In these works using microparasite models, a double dose consisted in host exposure to twice the quantity of parasite through the same route.

In this study, we propose to unravel intra- and intergenotype multiple infections effects on the pathogen reproduction strategy. We performed experiments by using five isolates of the oomycete *Phytophthora infestans* (Table 1), known to be a great potato culture destroyer [21] on the potato plant *Solanum tuberosum* (cultivar Bintje) as a host. *P. infestans* is a filamentous hemibiotroph pathogen requiring living host tissue to initiate its development [21]. At the beginning of infection, spores present on the host foliage germinate and penetrate host tissue. The pathogen establishes through an unavoidable phase of exclusive mycelia growth during which no sporulation is possible (latent period). Mycelial growth and asexual reproduction then occur simultaneously, leading to the

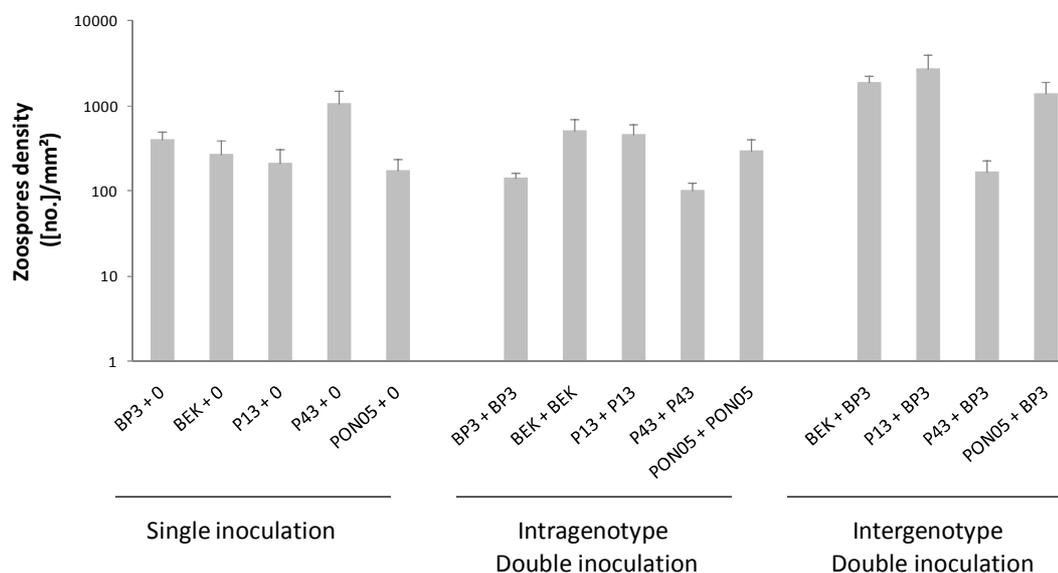
radial expansion of the sporulating lesion until the whole host tissue is exploited. The life history of *P. infestans* is thus governed by the well-known constraint of resources allocation strategy between growth and reproduction [22-25]. Sharing limited resources during multiple infections could thus impact the optimal strategy of resource allocation of each strain on its own, and consequently impacts their reproductive fitness. *P. infestans* is able to reproduce sexually when compatible strains (A1 and A2 mating types) are into contact [26]. It means that this system allows a control of the sexual reproduction during mixed infection, by inoculating compatible or non-compatible strains. Here we focused on the asexual reproduction strategies of the pathogen, so only non-compatible mating types challenged during multiple infections. By carrying out the experiments this way, we prevented to have supplementary factors that could have masked the real effects of multiple infections on the asexual reproductive fitness, such as the investment of resources in the sexual reproduction that are consequently not invested in asexual reproduction [27].

We found phenotypic polymorphism for the pathogen reproduction strategy in response to multiple infections. In multiple infections, some isolates were competitive and reproduced better while others displayed a lower reproductive fitness. These experimental results suggested the existence of mechanisms inducing the shift of reproduction rate, maybe by an indirect action through other life history traits of the pathogen. Coexistence of competitive and prudent strategies could be explained by the epidemiological dynamic. Relationships with parasite virulence could also be discussed.

## Results

Six of the 168 inoculated leaflets failed to produce a sporulating lesion, and were thus excluded from analyses. Because our molecular quantification test had a detection threshold of  $10^2$  DNA copy number/ $\mu\text{L}$  (Clément *et al.*, 2011, submitted), quantification below this value were considered to be missing data in our analyses. Quantification of isolate P13 failed for two leaflets in single infection (SI) and quantification of BP3 failed for 8 leaflets in intergenotype multiple infections (MI), certainly due to its lower reproductive fitness compared to all the challengers.

## Total reproductive fitness

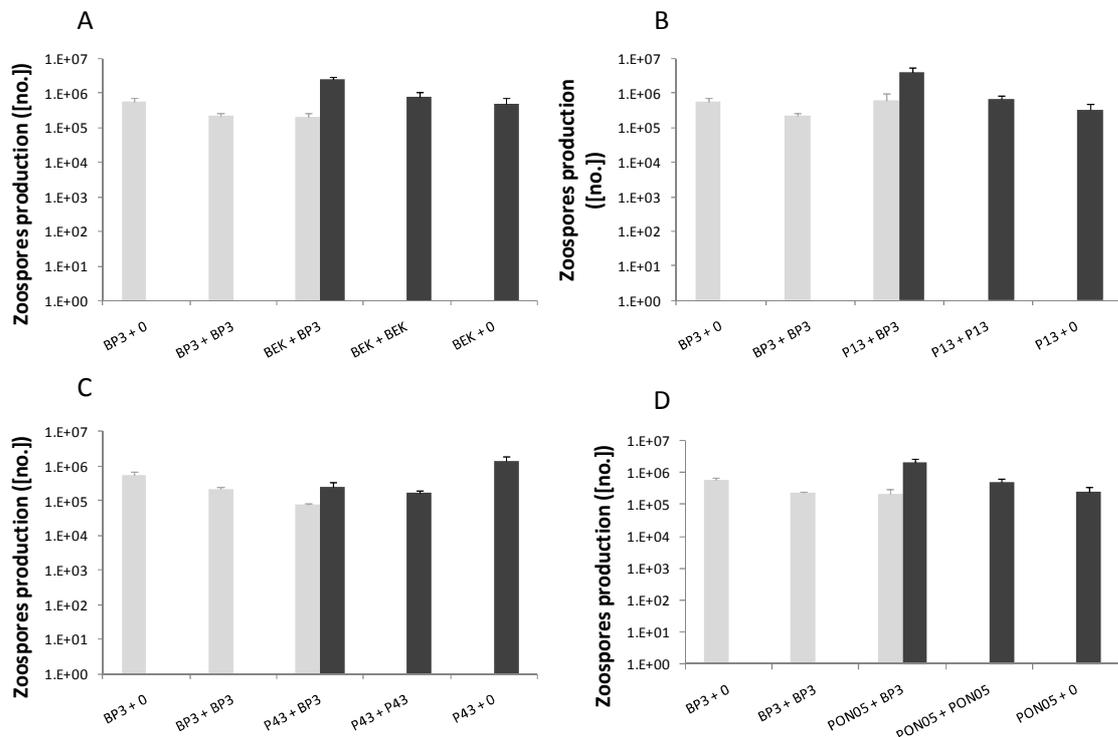


**Figure 1:** Overall zoospores density (Means + SE) in single, in intra- and intergenotype multiple infections.

**Table 1:** Analyses of variance contrasts for global (i) and individual reproductive strategy (ii). Non-significant interactions ( $P > 0.05$ ) were removed from models before computing F statistics and significance of others effects. Bold typeface indicates significant effects.

	i- Global strategy			ii- Individual Strategy			
	df	F	P	focus on	df	F	P
<b>Infection treatment contrasts</b>							
A- SI vs. Intra-genotype MI	1	0.047	0.828	all	1	0.097	0.757
B- SI vs. (Intra- and Inter-genotype MI)	1	12.308	<b>&lt;0.001</b>	BP3	1	7.311	<b>0.009</b>
				Others	1	17.885	<b>&lt;0.001</b>
C- Intra- vs. Inter-genotype MI	1	61.575	<b>&lt;0.001</b>	BP3	1	0.121	0.730
				Others	1	42.581	<b>&lt;0.001</b>
<b>Pathogen Isolate</b>							
D- Within SI	4	4.444	<b>0.004</b>	all	4	4.743	<b>0.003</b>
E- Within Intra-genotype MI	4	6.502	<b>&lt;0.001</b>	all	4	5.556	<b>&lt;0.001</b>
F- BP3's challenger within intergenotype MI	3	15.145	<b>&lt;0.001</b>	BP3	3	1.368	0.270
G- "Competitive" vs "Prudent" BP3's challenger within intergenotype MI	1	43.076	<b>&lt;0.001</b>	BP3	1	1.778	0.191
<b>Interactions</b>							
H- A * Pathogen isolate	4	9.311	<b>&lt;0.001</b>	all	4	9.010	<b>&lt;0.001</b>
I- B * Pathogen isolate	4	15.307	<b>&lt;0.001</b>	BP3	-	-	-
				Others	3	15.662	<b>&lt;0.001</b>
J- C * Pathogen isolate	3	2.639	0.0539	BP3	-	-	-
				Others	3	2.586	0.058
K- A * Strategy of the pathogen isolate ("competitive" or "prudent")	1	34.380	<b>&lt;0.001</b>	all	1	32.598	<b>&lt;0.001</b>
L- B * Strategy of the pathogen isolate	1	59.358	<b>&lt;0.001</b>	BP3	-	-	-
				Others	1	46.626	<b>&lt;0.001</b>
M- C * Strategy of the pathogen isolate	1	59.358	<b>&lt;0.001</b>	BP3	-	-	-
				Others	1	7.550	<b>&lt;0.001</b>

Infection treatments (SI, intra- and intergenotype MI) affected the overall zoospore density of *P. infestans* ( $F_{2,146} = 33.83$ ,  $P < 0.001$ ). Inoculation with two (identical or different) instead of one isolate always significantly altered total zoospore density (Table 1i B, Figure 1), but the direction of the change depended on the isolates (or combination of isolates), as supported by the significant interaction term (Table 1i D). No significant overall difference between SI and intragenotype MI was demonstrated (Table 1i A), due to contrasted results between isolates (Table 1i H). Two isolates (BP3 and P43) were less competitive (i.e. produced fewer zoospore numbers) in intragenotype MI than in SI, while the three others (BEK, P13 and PON05) were more efficient in intragenotype MI than in SI (Figure 1). These prudent or competitive behavioural strategies greatly explained the decrease or increase in total reproductive fitness between SI and MI, respectively (Table 1i K & L, Figure 1). In all cases, challenge between genetically different isolates enhanced the total reproductive fitness compared to the challenge between identical isolates (Table 1i C & J, Figure 1) without changing the tendency (increase or decrease) compared to SI. The total reproductive fitness in intergenotype MI clearly depends on the BP3's challenger genotype (Table 1i F) and particularly on their strategy (Table 1i G).

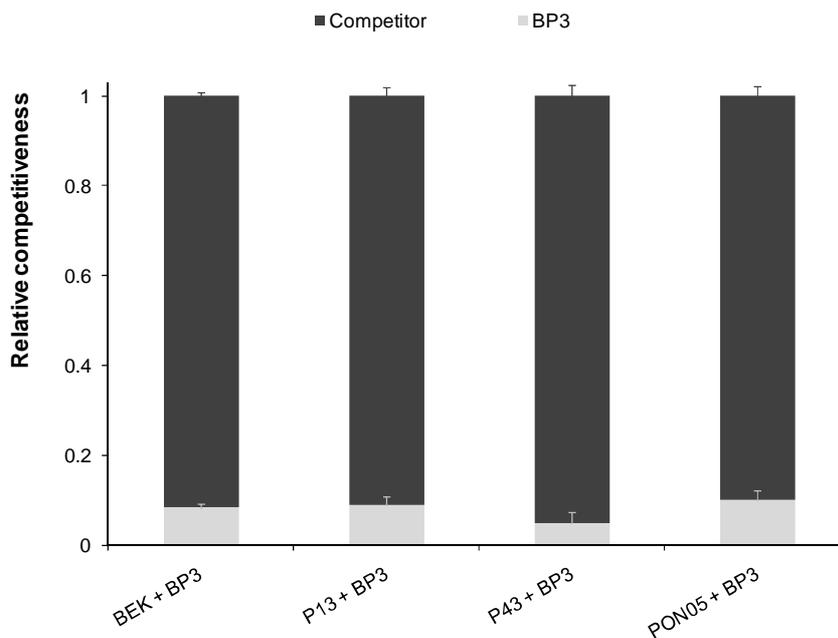


**Figure 2:** Individual zoospores production per leaflet (Means + SE) in single and multiple infections for the BP3 reference isolate (grey bars) and BEK (A), P13 (B), P43 (C) and PON05 (D) isolates (black bars).

### Individual reproductive strategy

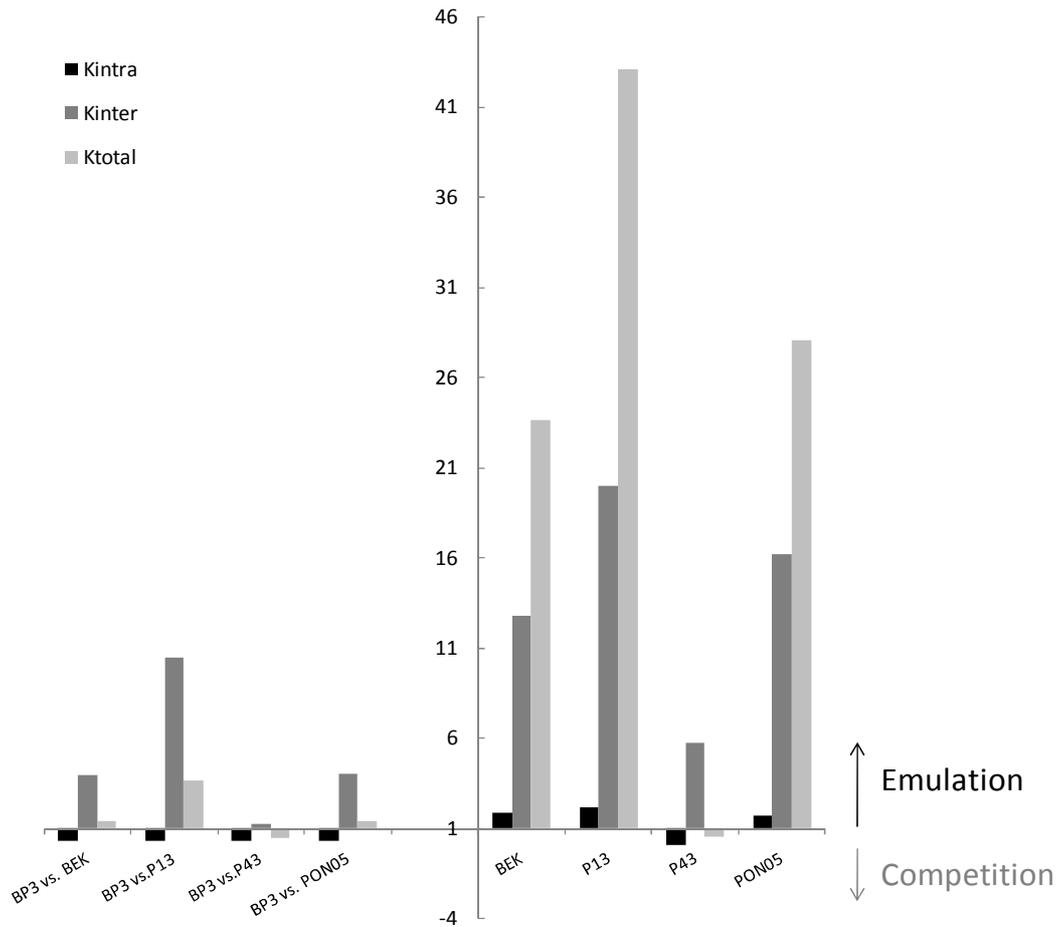
Significant differences between individual reproductive fitness in SI and intragenotype MI (and SI and both MI types) indicated that overall differences described above were due to individual fitness changes (Table 1ii A & B, Figure 2). The nature of these differences was clearly dependent on the isolate (Table 1ii H & I, Figure 2), and even more on the prudent or competitive strategy (Table 1ii K & L).

The reproductive fitness of BP3 was not affected by the challenger features: no significant differences were found between itself and another genotype (Table 1ii C), between different challenger genotypes (Table 1ii F) or between both challenger strategies (Table 1ii G). Moreover, in all intergenotype MI, the relative proportion of BP3 asexual offspring did not differ with either the challenger genotype ( $F_{3,33} = 1.91$ ,  $P = 0.15$ ) or the challenger reproductive strategy ( $F_{1,35} = 0.08$ ,  $P = 0.78$ ), and reached 8.24% in average (Figure 3).



**Figure 3:** Relative proportion (Means + SE) of zoospores density of interacting isolates in intergenotype multiple infections.

The reproductive fitness of the four other isolates in mix depended on the genotype of the challenger (the isolate itself or the reference challenger BP3; Table 1ii C, Figure 2). The reproductive strategy clearly played a role in the response variable (Table 1ii M): the three “competitive” isolates were fitter when challenged with BP3 than in self-competition, whereas the prudent P43 isolate was not (Figure 2).



**Figure 4:** Competitive coefficients assessing the deviation of observed zoospore production ( $ZP^{obs}$ ) to theoretical value ( $ZP^{theor}$ ) supposing no competition.  $\kappa_{intra}$  measured the deviation of  $ZP^{obs}$  in intragenotype multiple infection to  $ZP^{theor}$  estimated from  $ZP^{obs}$  in single infection.  $\kappa_{inter}$  measured the deviation of  $ZP^{obs}$  in intergenotype multiple infection to  $ZP^{theor}$  estimated from  $ZP^{obs}$  in intragenotype multiple infection.  $\kappa_{total}$  combined both  $\kappa_{intra}$  and  $\kappa_{inter}$ .  $\kappa > 1$  if  $ZP^{obs}$  is enhanced (i.e. emulation),  $0 < \kappa < 1$  if  $ZP^{obs}$  is reduced (i.e. competition) and  $\kappa = 0$  if  $ZP^{obs}$  is null (i.e. suppression).

Values of the  $\kappa_{intra}$  competition index depended on the reproductive strategy of the isolates. This index was below 1 for the two prudent BP3 and P43 isolates, which pointed to a reduction in the reproductive fitness, but ranged between 1.73 and 2.15 for the competitive isolates BEK, P13 and PON05 (Figure 4). In all interactions and for all isolates, challenging a different genotype always resulted in an emulation of the reproductive fitness compared with challenging itself ( $\kappa_{inter} > 1$ ). Moreover, the intensity of this emulation depended on the reproductive strategy of the isolate ( $\kappa_{inter} < 11$  for prudent and  $\kappa_{inter} > 11$  for competitive) and on the reproductive strategy of the BP3's challenger ( $\kappa_{inter} > 4$  when the challenger is a competitive isolate,  $\kappa_{inter} = 1.28$  for BP3 challenged with the P43 prudent isolate; Figure 4). The  $\kappa_{total}$  composite index illustrated the variation in the reproductive fitness during intergenotype MI compared to SI. Thus, even if the challenge with a

genetically distinct isolate always resulted in an emulation of the asexual reproduction, the interaction outcome was clearly linked to the reproductive strategy of the isolate and that of its challenger (Figure 4).

## Discussion

Reproductive strategies of plant pathogens during intra- and intergenotype multiple infections have to our knowledge rarely been studied. In our experiment, we tried to disentangle the multiple infection effect from the impact of sharing host resources with another genotype. The particular life cycle of filamentous spore-producing pathogen was well suited to do this. Indeed, unlike other parasites that have been abundantly studied in multiple infections, *P. infestans* is not a within-host free living organism. After inoculation, it has to penetrate host tissue and to invest in mycelial growth to move within the host and to acquire the nutrient resources it needs for reproduction. This specificity allowed to dissociate a double dose inoculation from a double infection with the same genotype, and thus to test double genotype infections.

We found higher or lower overall asexual zoospores density for (inter- and intragenotype) multiple infections of the *P. infestans* oomycete, depending on pathogen isolates and their specific combination. Higher [7,13,15,16] or lower [8,12] level of total parasite density within the host have been demonstrated experimentally for different systems. But, to our knowledge, it never had been shown that within a same system both interaction outcomes could occur. We also had the ability to assess individual reproductive fitness in intergenotype interactions (i.e. via the isolate specific quantitative PCR tool) and so to determine the relative contribution of each isolate to the total zoospores density. These results confirmed that individual investment in asexual reproduction depended on the infection, the pathogen genotype and the challenger genotype. They also revealed different pattern of isolate response to multiple infections.

Indeed, two different reproductive strategies could be highlighted in this experimental study. “Competitive” isolates (i.e. BEK, P13 & PON05) displayed until 40 times higher reproductive fitness in multiple than in single infection, while “non-competitive” isolates (i.e. BP3 & P43) reproduced better when they were inoculated alone (Figure 3 & 5). Moreover, “non-competitive” isolates were the fittest in single infection compared to the “competitive” (Figure 2). The infection outcome clearly depended on the reproductive strategy of the isolate and on the reproductive strategy of the challenger for

multiple infections. These conclusions were applicable as for intra- than for intergenotype multiple infections. We thus noted that the combination of two “non competitive” isolate (e.g. BP3+P43 or BP3+BP3) decreased the overall but also individual reproductive fitness (Figure 2 & 3C), while the interaction of two “competitive” isolates (e.g. P13+P13, Figure 3B & 5) enhanced the reproductive fitness. What appeared more original in these results was the outcome of interaction between isolates from the two strategies. In this case, the “non-competitive” isolate seemed to be stimulated by the “competitive” behaviour of the challenger, which was illustrated by a higher (but non significant) asexual reproduction (see e.g. BP3 faced to P13, Figure 3B & 5).

In all multiple infections, each interacting partner (i.e. “competitive” or “non-competitive”) reproduced better when they were confronted to a different genotype than when they were confronted to themselves. In other words, by sharing host resources with a non-related partner, isolates received more positive feedback in terms of asexual reproductive fitness than when challenging on their own. It also means that *P. infestans* is able to recognize itself and to adopt a different reproductive strategy in response to this detection. We know that recognition between compatible strains is possible through hormonal exchanges [28] but distinction mechanisms within a mating type are not elucidated. This conclusion could never have been done without decomposing inter- and intragenotype multiple infection.

### **Putative mechanisms of variation in asexual reproduction investment**

The *P. infestans* investment in asexual reproduction is well known to be a plastic trait in single infection. Different constraints are behind this plastic response, including abiotic [29] and biotic [30] factors. Our data support the idea that the number of infections greatly influences the plasticity of the investment in asexual reproduction. How the pathogen adapts its response to the imposed sharing of resources remains unclear, but several hypotheses exist [17]. First, the pathogen could enhance host exploitation either by diversifying its resources uptake from the host or by improving its ability to acquire these resources. Second, shifting the resources allocation could lead to favour asexual reproduction over mycelia growth (*i.e.* host colonization) in competition. Indeed, as for other spore-producing pathogens [31], *P. infestans* has to trade-off the resources invested in different biological functions such as growth and reproduction [22-25]. Higher reproductive fitness could result from the displacement of the growth-reproduction balance, as shown for *Plasmodium chabaudi* [13]. A third way to change the reproductive fitness could be to acquire host resources as quickly as possible.

Adaptation for the timing to reproduction (i.e. the latent period) could impact the cumulative production of asexual spores. This had been theoretically demonstrated for such pathogens in single infection [31] but there is no prediction regarding multiple infections. This thus remains an interesting view for future investigation. Most life history traits take a range of values from a minimum to a maximum threshold (e.g. latency period could not equal to zero) and are under trade-off constraints [22,25]; it thus could be sometimes difficult to shift towards a higher (or lower) value to adapt to multiple infections. It was evidently the case for “non-competitive” isolates, which failed to enhance their asexual reproduction in multiple infections.

### **Coexistence of strategies over time**

The existence and maintenance of the two strategies are probably linked to the epidemic dynamic. At the beginning of the epidemics, the competitive pressure is low. Predominant isolates were thus expected to be the “prudent” ones. Over the course of each epidemic, the frequency of multiple infections will increase, giving the advantage to “competitive” isolates, which are then fittest then finish inevitably by decreasing with the host resources availability. It is difficult to predict experimentally if this balancing selection is responsible for the existence and maintenance of these two strategies but nested models could provide elements of response by linking within- and between-host dynamics [32].

### **Consequences on virulence**

Although virulence is assumed to be a direct consequence of within-host pathogen multiplication, this direct causative relationship can be questioned [33]. At the scale of the lesion for instance, lesion area can be regarded as a measure of virulence [34]. At the end of our experiment, every leaflet was covered by a sporulating lesion. Using this previous definition of virulence, multiple infections led to a higher asexual reproduction rate for a similar virulence level (i.e. a similar sporulating lesion area). This could indicate that within-host replication does not necessary correlate with a higher virulence for such pathogens. However, at the scale of one infection generation and without information about between host dynamics, it is impossible to predict the long term evolution of virulence [35].

## Conclusion

This study showed the diversity of *P. infestans* response to multiple infections. Enhancing asexual reproduction when the partner is unrelated could thus be a form a competitive adaptation by investing more in dispersal, but this assumption had to be confirmed.

As *P. infestans* is a heterothallic facultative-sexual species, multiple infections involving sexually compatible isolates could expand our understanding of within-host dynamics and more particularly, the life history strategy of this plant pathogen.

## Methods

### Host-pathogen system

Five *Phytophthora infestans* isolates, sampled from the two major basins of potato production in France, were chosen from our lab collection (Table 2): BP3, BEK, P13, P43 and PON05. We selected them to be of the same mating type (A1), which allowed us to control the absence of sexual reproduction. We took advantage of allelic differences at the *avr3a* locus to easily quantify asexual spores of BP3 on one hand, and of the other four isolates on the other hand using a quantitative PCR tool we developed earlier (Clément et al., 2011, submitted). We thus used BP3 as a reference isolate for all multiple infection experiments.

**Table 2:** Origins and features of the five *P. infestans* isolates

Isolate	Mating type	Sampling year	Sample origin	Profil virulence
BEK	A1	2005	Nord France	1 3 4 6 7 10 11
BP3	A1	2005	Nord France	1 4
P13	A1	2008	West France	1 3 4 7 10 11
P43	A1	2008	West France	1 3 4 7 8 10 11
PON05	A1	2008	West France	1 3 4 7 10 11

Because the potato is vegetatively propagated, all potato plants we used were clones. These plants were grown from tubers in 12-cm-diameter pots, in a glasshouse maintained at a minimum of 18°C, under natural light supplemented with sodium lamps for a 16h-photoperiod. They were fertirrigated weekly with a 7:12:40 N:P:K fertilizer solution. For detached leaf tests, leaflets

approximately similar in size were picked from fully expanded leaves from the median area of 6- to 8-week-old plants. They were transferred to the laboratory in watertight boxes to prevent drying before inoculation.

## **Experimental setup**

Strains maintained in axenic cultures were first multiplied separately once on potato leaves before starting the experiments. To this end, suspensions of sporangia were prepared by flooding 4-week-old cultures on pea agar dishes in 5 mL of deionised sterile water (DSW). Suspensions were kept at 4°C for approximately 3 h to promote zoospore release. Leaflets from 8-week-old plants, placed on the lids of inverted Petri dishes containing water agar to obtain near 100% relative humidity, were inoculated by depositing droplets containing about 1000 sporangia each. After 8 days incubation under controlled conditions (18–15°C day/night temperature, 16 h daylight), newly formed sporangia were washed from leaflets in 10 mL DSW. The concentration of the resulting suspensions was adjusted to  $5.10^4$  sporangia.mL<sup>-1</sup> using a haemocytometer.

Calibrated suspensions were inoculated onto detached leaflets to generate single, intragenotype double or intergenotype double infections. Droplets were always deposited onto the middle right (or left) side of the vein of each leaflet. For multiple infections, droplets were deposited always at the same distance from each other. In single infections, each strain was inoculated in front of a DSW droplet. In double infections, we inoculated either two droplets of the same suspension (intragenotype interaction) or one droplet of BP3 isolate on one side and one droplet of one of the four other strains on the other side (intergenotype interaction). The whole experimental set\_up thus included 14 treatments (5 single infections + 5 intragenotype double infections + 4 intergenotype double infections) each repeated 12 times, for a total of 168 experimental units. Inoculated leaflets were incubated during 10 days as described for inoculum multiplication. At the end of the experiment, the whole leaflet area was colonized by sporulating lesions. Spores were then collected by washing leaflets in 10 mL DSW. A sample of 2 mL of the resulting suspension was centrifuged for 10 minutes at 13000 rpm, and the supernatant was removed. DNA extraction was performed on the pellet with the NucleoSpin 96 Tissue Core Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG), and 1 µL of purified DNA was quantified with the qPCR protocol we developed (Clément et al., 2011, submitted), which allowed a suitable quantification of zoospores, the uninucleate structures from asexual reproduction

## Defining competitiveness

We used several measures of competitive outcome for the study of individual strategies. First, relative competitiveness was calculated for each isolate in intergenotype mixed infection as the zoospore density of the target isolate divided by the total zoospore density on leaflet (sum of the target and competitor isolates) following Bell & al [15]. It gave the frequency of each genotype for the interactions we tested. We also proposed to compare observed values of zoospore production of each isolate in mixed infection to theoretical values we calculated by supposing no competition occurred. Let  $ZP_{intra}^{theor}$  be the theoretical zoospore production of isolate X in intragenotype mixed infection expressed as:

$$ZP_{intra}^{theor} = (ZP_{alone}^{obs} * 2) \times (LAX_{intra} / LAX_{alone}) \quad [1]$$

where  $ZP_{alone}^{obs}$  is the observed zoospore production in single infection of isolate X, and  $LAX_{intra}$  and  $LAX_{alone}$  the available leaflet areas in intragenotype interaction or single infection respectively. Assuming no competition, the theoretical zoospore production on double infecting leaflet is expected to be doubled, hence the multiplicative factor 2 for  $ZP_{alone}^{obs}$ . In the same way, let  $ZP_{inter}^{theor}$  be the theoretical zoospore production in intergenotype mixed infection of isolate X expressed as:

$$ZP_{inter}^{theor} = (ZP_{intra}^{obs} / 2) \times (LAX_{inter} / LAX_{intra}) \quad [2]$$

where  $ZP_{intra}^{obs}$  was the observed zoospore production in intragenotype mixed infection of isolate X,  $LAX_{inter}$  and  $LAX_{intra}$  the available leaflet areas in inter and intragenotype interactions, respectively.  $ZP_{intra}^{obs}$  value was the total zoospore production of both inoculation points of isolate X on the leaflet. So, supposing no effect of the competitor strain identity, the value was corrected by a factor of 2. We chose to express  $ZP_{inter}^{theor}$  as a function of  $ZP_{intra}^{obs}$  and not  $ZP_{alone}^{obs}$  directly, because intragenotype interaction is the direct reference (avoiding dose effects) for a mixed intergenotype interaction. We then defined two competition coefficients,  $\kappa_{intra}$  and  $\kappa_{inter}$ , by comparing observed values to theoretical ones, and defined as:

$$ZP_{intra}^{obs} = \kappa_{intra} \times ZP_{intra}^{theor} \quad [3]$$

$$ZP_{inter}^{obs} = \kappa_{inter} \times ZP_{inter}^{theor} \quad [4]$$

These measures of competitive ability are indicators for the type of interaction.  $\kappa$  equals zero, when the competitor totally suppresses the reproduction of the strain X, lies between 0 and 1 when the competitor has a negative impact and equals 1 if the competitor has no impact, and is greater than 1 when the reproductive performance of the strain X is enhanced in the presence of a competitor.

By combining equation detailed above, it is possible to express  $ZP_x^{\text{obs}}$  as a function of  $ZP_x^{\text{alone}}$  and  $\kappa_{\text{intra}} \times \kappa_{\text{inter}}$ , where the latter is the total competition coefficient ( $\kappa_{\text{total}}$ ). This allows the decomposition of competition outcomes into one coefficient describing the effect of multiple infections ( $\kappa_{\text{intra}}$ ), and another describing the effect of genetically distinct infections ( $\kappa_{\text{inter}}$ ).

## Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the general statistical software package R GUI version 2.11.1[36]. Data of zoospores density or zoospores production were log-transformed to meet normality and homogeneity-of-variance assumptions for analysis of variance. Contrasts were used to test specific hypotheses in subsets of the total dataset. We always constructed full models, including all relevant variables and their interactions and removed the ones that were not significant ( $P > 0.05$ ) to fit the most parsimonious model. We tested whether the BP3 proportional contribution in the total asexual reproduction differed depending on the challenger by fitting a general linear model with a quasi-binomial error distribution. With this error distribution, the significance of the explanatory variable (challenger identity) was tested with a F test rather than a  $\chi^2$ [37] by adding terms sequentially in analysis of deviance.

## Acknowledgments

We thank R. Pellé and J.E. Chauvin (UMR APBV, INRA Rennes) for providing host plant materials, R. Corbière and C. Pasco for providing *P. infestans* isolates, M. Plantegenest, C. Lannou, F. Hamelin for helpful discussions, and C. Gracianne, G. Angot and B. Marquer for technical support.

**Funding.** This research was part of the projects ‘Invasion and persistence of plant pathogens’ funded by INRA and BBSRC, EMERFUNDIS (Agence Nationale de la Recherche grant 07-BDIV-003) and BIOExploit (EU integrated project FOOD-CT-2005-513959).

**Authors' contributions:** JAJC, DA & HM formulated the ideas and hypotheses, JAJC, HM, EJ & IG designed the experiments; JAJC & IG performed the experiments, JAJC analysed the data, and drafted the manuscript; all authors discussed the results, revised and approved the final script.

## Literature cited

1. Bull JJ (1994) Perspective - Virulence. *Evolution* 48: 1423-1437.
2. Read AF, Taylor LH (2001) The ecology of genetically diverse infections. *Science* 292: 1099-1102.
3. May RM, Nowak MA (1995) Coinfection and the evolution of parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 261: 209-215.
4. van Baalen M, Sabelis MW (1995) The dynamics of multiple infection and the evolution of virulence. *American Naturalist* 146: 881-910.
5. Frank SA (1996) Models of parasite virulence. *Quarterly Review of Biology* 71: 37-78.
6. Brown SP, Hochberg ME, Grenfell BT (2002) Does multiple infection select for raised virulence? *Trends in Microbiology* 10: 401-405.
7. de Roode JC, Pansini R, Cheesman SJ, Helinski MEH, Huijben S, et al. (2005) Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 7624-7628.
8. 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.
9. de Roode JC, Helinski MEH, Anwar MA, Read AF (2005) Dynamics of multiple infection and within-host competition in genetically diverse malaria infections. *American Naturalist* 166: 531-542.
10. Staves PA, Knell RJ (2010) Virulence and competitiveness: testing the relationship during inter- and intraspecific mixed infections. *Evolution* 64: 2643-2652.
11. Gower CM, Webster JP (2005) Intraspecific competition and the evolution of virulence in a parasitic trematode. *Evolution* 59: 544-553.
12. Balmer O, Stearns SC, Schotzau A, Brun R (2009) Intraspecific competition between co-infecting parasite strains enhances host survival in African trypanosomes. *Ecology* 90: 3367-3378.

13. Wargo AR, De Roode JC, Huijben S, Drew DR, Read AF (2007) Transmission stage investment of malaria parasites in response to in-host competition. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 274: 2629-2638.
14. López-Villavicencio M, Courjol F, Gibson AK, Hood ME, Jonot O, et al. (2010) Competition, cooperation among kin, and virulence in multiple infections. *Evolution*.
15. Bell AS, De Roode JC, Sim D, Read AF (2006) Within-host competition in genetically diverse malaria infections: Parasite virulence and competitive success. *Evolution* 60: 1358-1371.
16. Davies CM, Fairbrother E, Webster JP (2002) Mixed strain schistosome infections of snails and the evolution of parasite virulence. *Parasitology* 124: 31-38.
17. Mideo N (2009) Parasite adaptations to within-host competition. *Trends in Parasitology* 25: 261-268.
18. Bonsall MB (2010) Parasite Replication and the Evolutionary Epidemiology of Parasite Virulence. *Plos One* 5.
19. Buckling A, Brockhurst MA (2008) Kin selection and the evolution of virulence. *Heredity* 100: 484-488.
20. Vizoso DB, Ebert D (2005) Mixed inoculations of a microsporidian parasite with horizontal and vertical infections. *Oecologia* 143: 157-166.
21. Robertson NF (1991) The Challenge of *Phytophthora infestans*. In: Ingram DS, Williams PH, editors. *Phytophthora infestans, the cause of late blight of potato*. London: Academic press.
22. Stearns SC (1992) *The Evolution Of Life Histories*. New York.
23. Perrin N, Sibly RM (1993) Dynamic-models of energy allocation and investment. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 379-410.
24. 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.
25. Roff DA (1992) *The evolution of life histories: theory and analysis*. New York.
26. Gallegly ME, Galindo J (1958) Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology* 48: 274-277.
27. Chamberlain M, Ingram DS (1997) The balance and interplay between asexual and sexual reproduction in fungi. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, Vol 24. London: Academic Press Ltd. pp. 71-87.

28. Ko WH (2007) Hormonal regulation of sexual reproduction in *Phytophthora*. *Botanical Studies* 48: 365-375.
29. Maziero JMN, Maffia IA, Mizubuti ESG (2009) Effects of temperature on events in the infection cycle of two clonal lineages of *Phytophthora infestans* causing late blight on tomato and potato in Brazil. *Plant Disease* 93: 459-466.
30. Clément JAJ, Magalon H, Pelle R, Marquer B, Andrivon D (2010) Alteration of pathogenicity-linked life-history traits by resistance of its host *Solanum tuberosum* impacts sexual reproduction of the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans*. *Journal of Evolutionary Biology*.
31. Andanson A (2010) Evolution of phytopathogenic fungi aggressiveness, linking theoretical and empirical approaches [PhD Thesis]. Nancy: Université Nancy I - Henri Poincaré.
32. 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.
33. Day T (2002) Virulence evolution via host exploitation and toxin production in spore-producing pathogens. *Ecology Letters* 5: 471-476.
34. Pariaud B, Ravigne V, Halkett F, Goyeau H, Carlier J, et al. (2009) Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* 58: 409-424.
35. Choisy M, de Roode JC (2010) Mixed Infections and the Evolution of Virulence: Effects of Resource Competition, Parasite Plasticity, and Impaired Host Immunity. *American Naturalist* 175: E105-E118.
36. R Development Core Team (2005) R: a language and environment for statistical computing. 2.11.1 ed. Vienna.
37. Crawley M (2007) *The R book*: John Wiley & Sons Ltd.



# Chapitre 4



**Infections multiples et  
investissement différentiel dans les  
reproductions sexuée et asexuée**



## 1. Objectifs de travail

Dans le chapitre précédent, nous avons restreint notre étude aux infections multiples n'impliquant que des isolats sexuellement incompatibles, et ne considérant ainsi que les stratégies de reproduction asexuée. Les agents pathogènes hétérothalliques comme *P. infestans* sont capables, lorsqu'ils rencontrent un partenaire compatible, de se reproduire sexuellement. Lorsque les infections multiples engagent des souches compatibles, un ou des nouveaux traits liés à la reproduction sexuée sont exprimés : un nouveau dilemme apparaît donc dans la stratégie de répartition des ressources entre les différentes fonctions de reproduction. De plus, le sexe est reconnu comme un processus coûteux qui pourrait balancer négativement l'investissement dans la reproduction asexuée.

**L'objectif de ce chapitre est donc de comprendre comment les isolats répondent aux infections multiples en termes de stratégie de reproduction lorsqu'il leur est donné ou non la possibilité d'investir dans le sexe.** Les questions auxquelles nous avons tenté de répondre sont les suivantes :

- 1) La compatibilité sexuelle entre isolats interagissant en infections multiples est-elle un facteur déterminant de la stratégie de reproduction adoptée par *P. infestans*?
- 2) Outre sa compatibilité sexuelle, le génotype du partenaire est-il un facteur déterminant de la stratégie de reproduction adoptée?
- 3) L'investissement dans la reproduction sexuée est-il un processus coûteux chez *P. infestans* et a-t-il un impact sur l'investissement dans la reproduction asexuée?

Pour cela, plusieurs isolats ont été expérimentalement testés en conditions contrôlées. Le plan expérimental comportait des infections simples et des infections doubles pour lesquelles les isolats étaient face à eux-mêmes et face à un génotype distinct, sexuellement compatible ou non. La réponse de 8 isolats face à un même compétiteur de référence a été testée: 4 interactions étaient sexuellement compatibles et 4 ne l'étaient pas. Parallèlement, la réponse de l'isolat de référence face aux 8 compétiteurs différents a pu être étudiée, selon la compatibilité sexuelle également.

Les principaux résultats de ce travail sont (1) la compétitivité des isolats s'inverse selon qu'ils aient ou non la possibilité d'investir dans le sexe, (2) la fitness des isolats se reflète conjointement dans les reproductions sexuée et asexuée, qui sont corrélées positivement, (3) plus un génotype investit dans la reproduction asexuée, plus la proportion investie dans le sexe est faible. Ces résultats sont exposés et discutés en détail dans le manuscrit suivant qui devrait être soumis d'ici quelques semaines à la revue *Ecology Letters*.

## 2. Article 4

# Love and hate in the heterothallic Oomycete *Phytophthora infestans* : how multiple infections impact reproductive strategies.

Julie A. J. Clément, Didier Andrivon, Isabelle Glais, and Hélène Magalon

INRA, UMR 1099, Biology of Organisms & Populations Applied to Plant Protection BiO3P, F-35633 Le Rheu, France

### Abstract

Life history theory postulates that all organisms, including parasites, have to cope with trade-offs in resource allocation between their different functions. The resources allocation pattern to different reproductive structures is a key issue in the study of disease evolution. Therefore, dealing with this issue in heterothallic species, for which sex occurs only between compatible individuals implies to consider multiple infections and the sexual compatibility of challengers. We experimentally explored how *Phytophthora infestans* invest in sexual and asexual reproductive spores during multiple infections involving isolates sexually compatible or not. Two strategies were highlighted according to the modulation of reproduction during compatible or incompatible interactions. Some isolates appeared competitive (reproduction enhanced) only for incompatible interactions others are competitive only when sex was possible with the partner. Sexual reproduction was positively correlated to asexual reproduction but the higher the asexual performance, the lower the proportion devoted to sex. Sex is undoubtedly a costly process for *P. infestans*. The diversity of strategy could be explained by different patterns of resource allocation to other function than reproduction and by the variability in pair fertility. Adaptation to changes in multiple infections frequencies over the course of an epidemic is discussed.

**Key words:** multiple infections, sexual reproduction, life history, trade-off, *Phytophthora infestans*, cost of sex, phenotypic plasticity

## Introduction

In the world of parasites, the use of host resources has to be optimized to maximise the parasite fitness. The resources allocation theory assumes that individuals assign resources to different vital functions, such as growth, survival and reproduction, but could not maximise all of them simultaneously: a perfect organism (a Darwinian demon) does not exist (Roff 1992; Stearns 1992). At each time of their life history, parasites must thus face the dilemma of allocating energy to one or more functions requiring the same resources, and consequently trade-off one over the other. For example, the well-known growth versus reproduction trade-off was found in many organisms (Kozłowski 1992; Perrin & Sibly 1993; Gauslaa 2006). These trade-offs have a key role in the evolution of life history traits, because they are responsible for the existence of multiple reproductive strategies (e.g. r and K strategies) that are shaped by natural selection.

The reproduction of parasites undergoing complex life cycles commonly involve different forms of propagules, whose functions in life history could largely differ. Parasitic oomycetes, for example, differentiate asexual spores allowing rapid transmission between hosts (Hardham 2009), and sexual spores whose resistance to adverse environmental conditions enable inter-season survival (Judelson 2009). As postulated above, both asexual and sexual reproduction could not be maximized, due to energetic constraints. The resulting balance between both reproduction forms could then vary along the continuum of possible strategies (i.e. from 0 to 100% of sexuality), but its equilibrium among populations will depend on factors such as nutrient availability or competition between pathogen genotypes (Chamberlain & Ingram 1997). Sexual reproduction is assumed to be a costly process, due to the costs of meiosis on one side, and of males production on the other side (Williams 1975; Maynard Smith 1978). The cost of sexual reproduction could even exceed the theoretical two-fold factor over asexual reproduction when it results in the formation of more complex structures (e.g. thick-walled resting organs of oomycetes) requiring more resources or energy.

In the majority of cases, the quantity of resources available for the parasite is finite, and often very limited. This restriction is related to host availability, which is further reduced during multiple infections. This leads to an unavoidable sharing of resources between challenging parasites. It was well demonstrated that multiple infections could have consequences on parasite life history modification and evolution (Read & Taylor 2001; Brown *et al.* 2002; Mideo 2009). More particularly, modulations of parasite investment in reproduction, either enhanced (Davies *et al.* 2002; Gower & Webster 2005;

Clément *et al.*, article 3) or reduced (de Roode *et al.* 2005a; de Roode *et al.* 2005b; Bell *et al.* 2006; Wargo *et al.* 2007; Ben-Ami *et al.* 2008; Balmer *et al.* 2009), were observed in response to multiple infections.

For heterothallic species, sexual reproduction occurs only when two compatible isolates meet each other. In other words, sex in such species requires both multiple infections and sharing resources with sexual partners. The effects of multiple infections could thus be radically different depending on the sexual compatibility or incompatibility of competing isolates, simply because compatible individuals have the possibility to invest in another form of reproduction.

Here we investigated how sexual reproduction could shape reproductive strategies during multiple infections compared to situations involving incompatible isolates of *Phytophthora infestans*, a heterothallic oomycete infecting the potato (*Solanum tuberosum*). *P. infestans*, the great potato culture destroyer (Fry 2008), is a filamentous hemibiotroph pathogen requiring living tissue to initiate its development (Robertson 1991). Asexual reproduction consists in the production of multinucleate sporangia, each differentiating uninucleate zoospores (Judelson & Blanco 2005). *P. infestans* is able to reproduce sexually when compatible strains (named A1 and A2 mating types) come into contact (Gallegly & Galindo 1958). This biological system therefore allows to control sexual reproduction during mixed infections, by choosing compatible or incompatible isolates. In a previous paper (Clément *et al.*, Article 3), we found two contrasted outcomes when analysing the reproductive fitness in double versus single infections with sexually incompatible isolates: competitive (C) isolates reproduced more in multiple than in single infections, whereas non-competitive (NC) isolates did the opposite.

Here, we extended the experimental study to both sexually incompatible and sexually compatible pairs of isolates, and measured the asexual and sexual (when it occurred) reproductive outcome of each partner in each condition. We showed that sexual compatibility inverted the competitive status (i.e. C or NC) of isolates. We also showed that isolates which asexually reproduced the best were also those that generated the more sexual offspring; however, the more an isolate reproduced asexually, the less it invested in sexual reproduction relatively to its total reproduction. We discuss these results regarding the probable cost of sex, but also the fertility of mating pairs.

## Materials and Methods

### *Phytophthora infestans* isolates

Nine *Phytophthora infestans* isolates, sampled from the two major basins of potato production in France, were chosen from our lab collection: BEK, BP3, BP6, P13, P43 belonged to the A1 mating type, and PON05, PON10, PP1, Z0 to the A2 mating type. Allelic differences at the *avr3a* locus between BP3 and the eight other isolates allowed us to easily quantify both asexual and sexual spores of each isolate during multiple infections with a quantitative PCR tool we developed earlier (Clément *et al.*, 2011, Article 2). Using BP3 as a reference isolate for all multiple infection experiments, we thus formed 4 sexually compatible and 4 sexually incompatible pairs for which we were able to differentiate the reproductive fitness of each isolate of the pair.

### Plant material

Because the potato is vegetatively propagated, all potato plants used were clones. These plants were grown from tubers in 12-cm-diameter pots, in a glasshouse maintained at a minimum of 18 °C, under natural light supplemented with sodium lamps for a 16h photoperiod. They were fertirrigated weekly with a 7:12:40 N:P:K fertilizer solution. For detached leaf tests, leaflets approximately similar in size were picked from fully expanded leaves from the median part of 6- to 8-week-old plants. They were transferred to the laboratory in watertight boxes to prevent drying before inoculation.

### Inoculum preparation

Strains maintained in axenic cultures were first multiplied separately once on potato leaves before starting the experiments. To this end, suspensions of sporangia were prepared by flooding 4-week-old cultures on pea agar dishes in 5 mL of deionised sterile water (DSW). Suspensions were kept at 4 °C for approximately 3 h to promote zoospore release. Leaflets from 8-week-old plants, placed on the lids of inverted Petri dishes containing water agar to obtain near 100% relative humidity, were inoculated by depositing droplets containing about 1000 sporangia each. After 8 days incubation under controlled conditions (18–15 °C day/night temperature, 16 h daylight), newly formed sporangia were washed from leaflets in 10 mL DSW. The concentration of the resulting suspensions was adjusted to  $5.10^4$  sporangia mL<sup>-1</sup> using a haemocytometer.

## Experimental setup

Calibrated suspensions were inoculated onto detached leaflets to generate single or double infections. Droplets were always deposited onto the middle right (or left) side of the main vein of each leaflet, always at the same distance from each other. In single infections, each strain was inoculated in front of a DSW droplet. In double infections, we inoculated either two droplets of the same suspension (intragenotype interaction) or one droplet of isolate BP3 on one side and one droplet of one of the eight other strains on the other side (intergenotype interaction). The whole experimental setup thus included 26 treatments (9 single infections + 9 intragenotype double infections + 8 intergenotype double infections) each repeated 12 times, for a total of 312 experimental units (leaflets). Inoculated leaflets were incubated during 10 days as described for inoculum multiplication. At the end of the experiment, the whole leaflet area was colonized by sporulating lesions. Asexual spores were then collected by washing leaflets in 10 mL DSW. Sexual spores of sexually compatible pairs were also removed from plant tissue, using an adaptation of a protocol developed by Geert Kessel and Petra Van Bekum (personal communication). Each leaflet was mixed with a blender in a 10 mL-solution containing cellulase, pectinase and ice. The homogenate was stirred at room temperature for 2 hours, sonicated during  $2 \times 5$  minutes, and stirred again for an extra 22 hours, before successive filtrations on 80  $\mu\text{m}$  and 10  $\mu\text{m}$  sieves. Oospores trapped onto the 10  $\mu\text{m}$  sieve were suspended in 2 mL DSW by vigorously shaking. Then, 2 mL- and 750  $\mu\text{L}$ -samples from the asexual and sexual suspensions, respectively, were centrifuged for 10 minutes at 13000 rpm, and the supernatant was removed to concentrate spores. DNA extractions were performed on the pellets with the NucleoSpin 96 Tissue Core Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG), and 1  $\mu\text{L}$  of purified DNA was included in the qPCR protocol developed earlier (Clément *et al.*, 2011, Article 2) to quantify offspring from each isolate.

## Statistical analyses

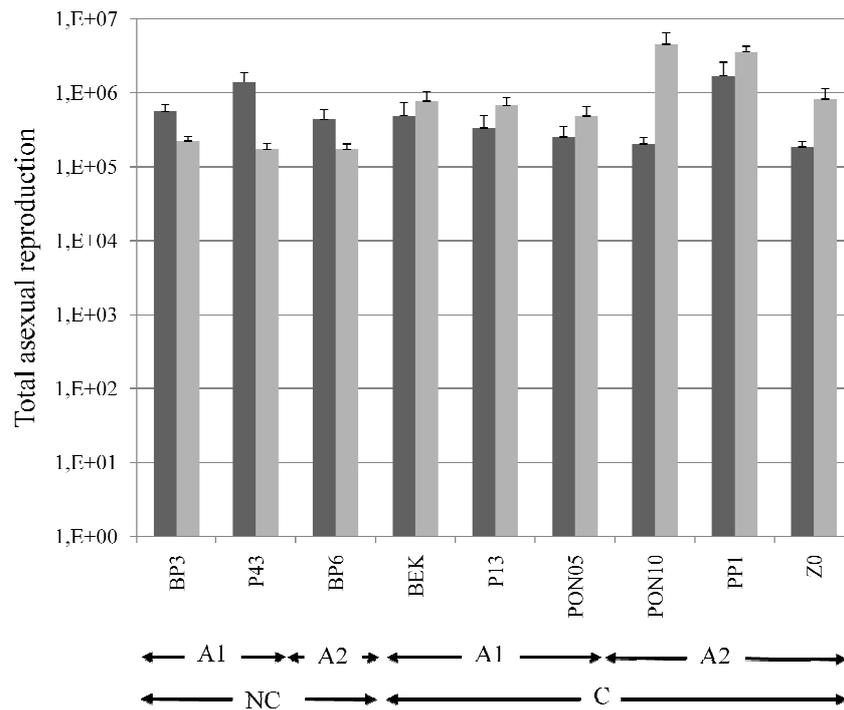
All statistical analyses were carried out using the R software v. 2.11.1 (R Development Core Team 2005). Some results of quantification were behind the minimum detection threshold of  $10^2$  DNA copies. It was particularly the case for the reference isolate, which failed to be quantified when it challenged sexually compatible isolates. To use the maximum information from our data set, we used Delta models combining binary and quantitative responses (Stefansson 1996) to predict sporulation

values (asexual or sexual) for each isolate. To this end, a generalized linear model (GLM) was first adjusted to the binary response of BP3 spore detection, with challenger isolate as explanatory variable and supposing a Poisson error. This gave the probability  $p$  to detect spores for each interaction. Then, GLM was fitted to variations in the number of DNA copies of BP3 spores detected supposing a gamma error distribution, with the challenger isolate as explanatory variable. When it was not necessary to test for spore detection (i.e.  $p=1$  for isolates other than BP3), only gamma (or log-normal) models were fitted to data. The resulting prediction of spore production was given by  $p$  times the predicted values from gamma (or log-normal) models. The variance of these parameters was calculated as proposed by Stefansson (1996). Competitive performances of challengers and the BP3 reference were examined separately by analysis of deviance of appropriate GLM with mating type (A1 or A2), Strategy (C or NC) and Inoculation type (one or two genotypes during double infections) as explanatory variables. Non-significant terms ( $P < 0.05$ ) were sequentially removed from models by beginning with interactions to obtain a minimal model. Correlations were tested on predicted means by including covariates in the analysis and the isolate type (reference or challenger). When we tested total reproduction, sexual and asexual sporulations were simply added.

## Results

### Competitive and non competitive status of isolates

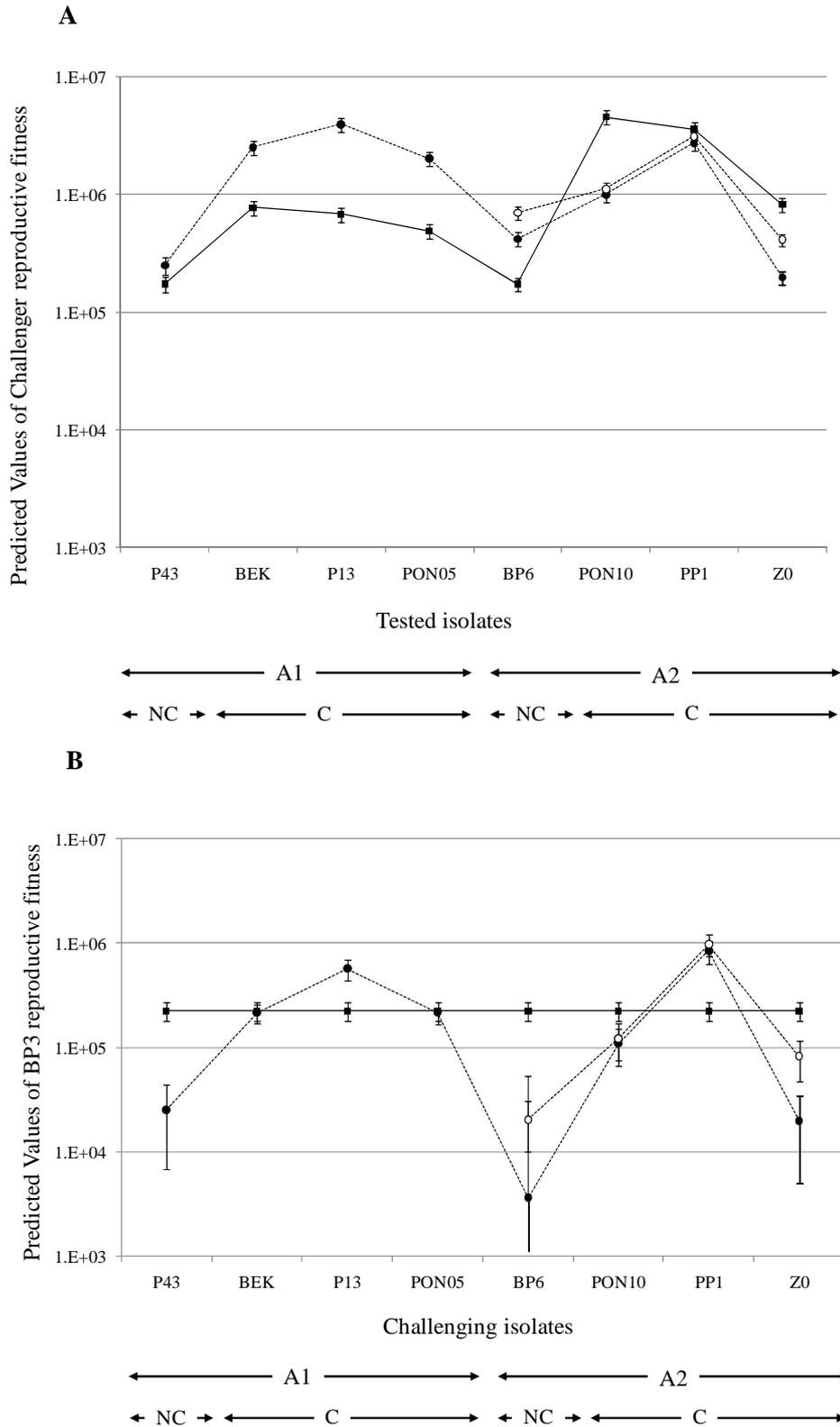
Testing chosen isolates for their competitiveness dealt with single and double inoculations of the same isolate on detached leaflets. The direction of change in asexual sporulation between single versus double infection was clearly dependent on the isolate (inoculation type  $\times$  isolate interaction:  $F_{8, 176} = 8.28, P < 0.001$ ). BP3, BP6 and P43 isolates were non-competitive isolates, while the others were considered as competitive (Figure 1), in the sense of Clément *et al.* (Article 3). Two of the three NC isolates belonged to the A1 mating type.



**Figure 1** Mean of total asexual reproduction of each of nine isolates of *Phytophthora infestans* during single or double infection. A1 and A2 refers to mating type of the isolates, and C and NC to competitive and non-competitive status determined according to Clément *et al.* (Article 3) from these data. Bars correspond to standard errors.

### Sex-compatible vs. Sex-incompatible multiple infections

Response patterns of NC and C isolates were reversed depending on whether sex was possible or not with the reference challenging isolate. As we have shown earlier (Clément *et al.*, Article 3), when sex was impossible in double infection (i.e. two different A1 challenged), C and NC isolates enhanced their asexual reproduction and this emulation is much greater for C (+ 339% in average) than for NC isolates (+ 44%, Figure 2A). When challenging isolates were sexually compatible, the infection outcome appeared to be reversed (Significant Mating Type × Strategy × Inoculation type interaction term, Table 1A, Figure 2A). In fact, asexual sporulation was enhanced for the NC isolate BP6 (+142%) while it was considerably reduced for the C isolates (-59%). Adding sexual to asexual reproduction to consider the total reproduction did not change the pattern observed for asexual reproduction only (Table 1B, Figure 2A): sexual reproduction allowed C isolates to decrease their reproductive fitness loss (-46% instead of -59% if only asexual reproduction is considered), but further increased the total reproductive fitness of the NC isolate (from + 142% to + 303%).



**Figure 2** (A) Sporulation of the eight *Phytophthora infestans* isolates challenging the reference BP3, as predicted from gamma generalized linear models. (B) Sporulation of the reference BP3 challenging the eight *P. infestans* isolates, as predicted from delta-gamma generalized linear models. Squares correspond to asexual reproduction when isolates were inoculated alone but in double infections. Circles correspond to only asexual (black circles) or to sexual plus asexual (open circles, for sexually compatible interactions) reproduction of isolates during competition. Bars represent standard errors of predicted values.

The response pattern of the reference isolate BP3 depended on the competitive status of the challenger. Its sexual reproduction clearly depends on the challenger genotype (for binary response of detection:  $\chi^2_8 = 62.84$ ,  $P < 0.001$ ; for quantification:  $\chi^2_8 = 37.38$ ,  $P < 0.01$ ) and more precisely on their competitive strategy (for binary response of detection:  $\chi^2_1 = 7.57$ ,  $P < 0.01$ ; for quantification:  $\chi^2_1 = 7.26$ ,  $P = 0.13$ ; Figure 2B). Moreover, the response pattern (increase or decrease of asexual reproduction compared to alone double infection) did not depend on the possibility to have sex with the challenging partner (for binary response of detection:  $\chi^2_1 = 0.31$ ,  $P = 0.58$ ; for quantification:  $\chi^2_1 = 1.70$ ,  $P = 0.46$ , Figure 2B). NC challenging isolates decreased BP3 asexual reproduction (-89% and -98% for sex-incompatible and sex-compatible interactions, respectively) in both cases. However, challenging sexually non-compatible C isolates increased (for P13, Figure 2B) or maintained (for BEK and PON05, Figure 2B) asexual reproduction, while competition with sexually compatible isolates either increased (for PP1, Figure 2B) or decreased (for PON10 and Z0, Figure 2B) asexual and total reproduction. Adding sexual to asexual reproduction kept the same global response pattern.

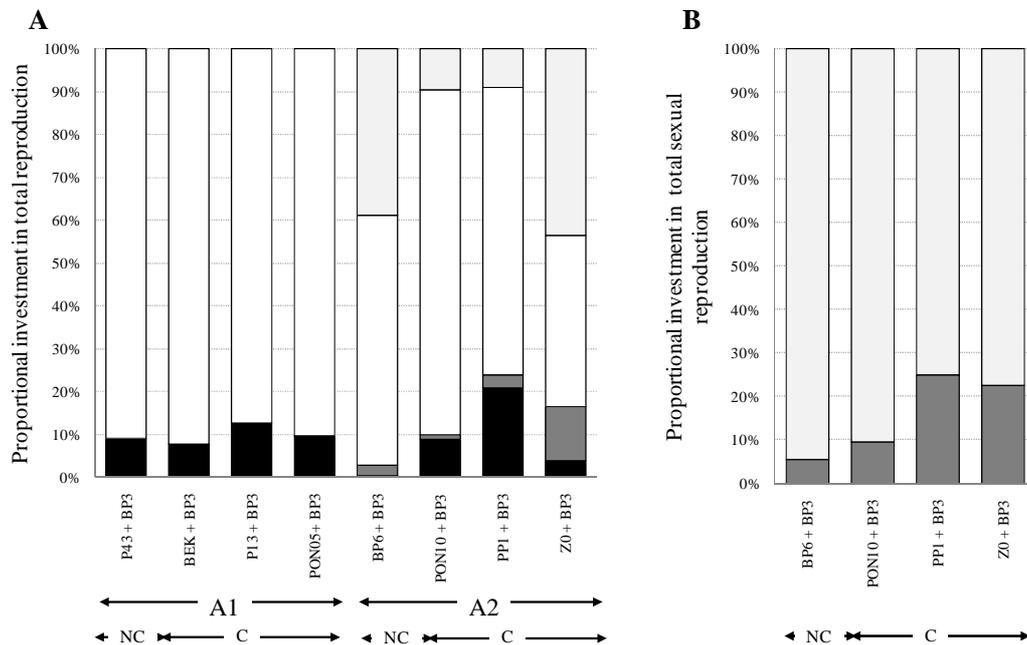
**Table 1:** Deviance analysis of log-normal generalized linear models (GLMs) fitted to results for challenger isolates obtained during experimental double infections involving *Phytophthora infestans* sexually compatible or incompatible isolates. Variations in asexual sporulations (A) and total (asex + sex) sporulations (B) were tested with Mating type (A1 or A2), Strategy (Competitive or Non-competitive) and Inoculation Type (Alone or Competition) and their interactions as explaining factors.

	A - Asexual sporulation					B - Total sporulation				
	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	P(> Chi )	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	P(> Chi )
NULL			186	332.34				186	323.98	
Mating Type	1	0.09	185	332.25	0.772	1	3.80	185	320.18	0.056 .
Strategy	1	77.74	184	254.51	<0.001 ***	1	75.88	184	244.30	<0.001 ***
Inoculation type	1	7.87	183	246.64	0.008 **	1	25.54	183	218.76	<0.001 ***
Mating Type x Strategy	1	0.94	182	245.71	0.362	1	1.31	182	217.45	0.261
Mating Type x Inoculation type	1	27.61	181	218.09	<0.001 ***	1	13.12	181	204.34	<0.001 ***
Strategy x Inoculation type	1	0.37	180	217.72	0.568	1	0.52	180	203.81	0.477
Mating Type x Strategy x Inoculation type	1	16.37	179	201.35	<0.001 ***	1	18.32	179	185.49	<0.001 ***

### Relative contributions to reproductive success

The BP3 reference never reached more than 24% (among which 21% were asexual reproduction) of the total reproduction when it challenged any of the eight isolates (Figure 3A). Even if its relative reproductive success was always low compared to challengers, it was never totally suppressed. Both proportions of asexual or sexual reproduction always were lower for BP3 than for challengers (Figure 3A). Within sexual reproduction, BP3 never exceeded 25% of total sexual offspring

produced (Figure 3B), confirming its relative disadvantage in term of reproductive success compared to challengers.



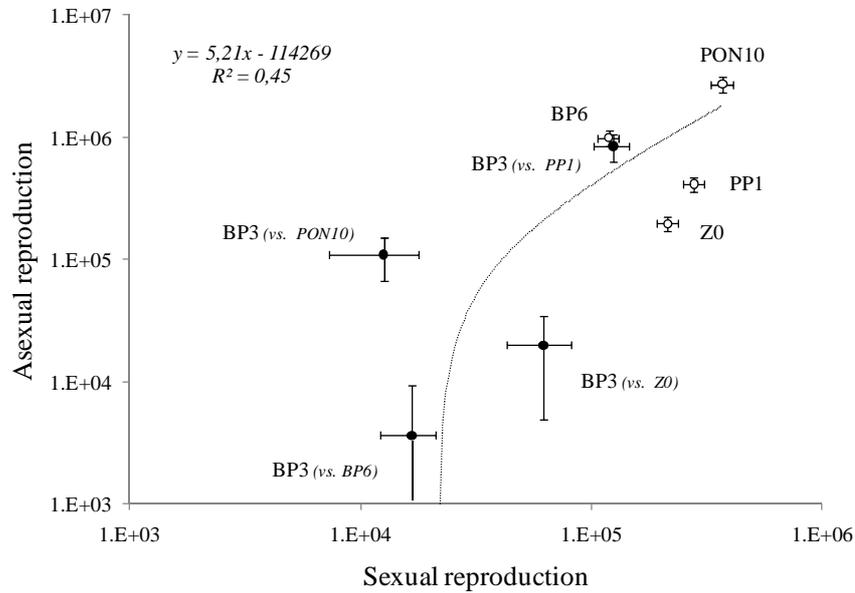
**Figure 3** Relative contributions of each partner (A) to the total reproduction or (B) to the sexual reproduction in mixed infections with pairs of *Phytophthora infestans* isolates. Proportions of asexual reproduction (reference isolate BP3: black bars, challengers: open bars) and sexual reproduction (BP3: dark grey bars, challengers: light grey bars) were calculated by using predicted values from delta-gamma (for BP3) or gamma (for challengers) generalized linear models.

### Sexual versus asexual reproduction

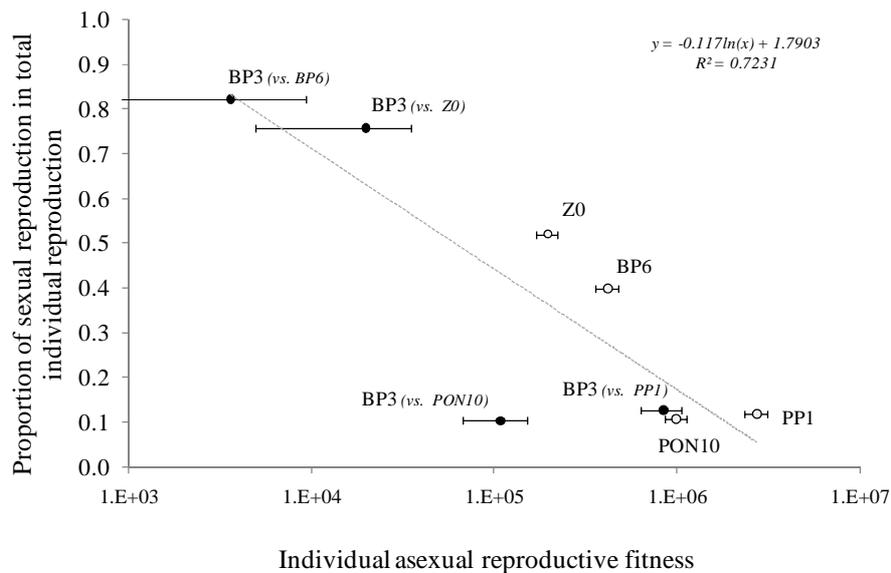
At the individual level, investment in asexual reproduction was positively correlated (Adjusted-R<sup>2</sup> = 0.45, P < 0.05; Figure 4) to investment in sexual reproduction, without any significant difference in correlation between challengers and the reference isolate BP3 (isolate type: F<sub>1,5</sub> = 0.26, P = 0.63; isolate type × covariate (sex): F<sub>1,4</sub> = 0.0003, P = 0.98). The slope of the curve (Figure 4) indicated that about five asexual spores were formed for each sexual spore.

The proportion of total sexual reproduction (i.e. sexual reproductions of both reference and challenger) within the total reproduction ranged between 11% and 56% (for PON10 + BP3 and Z0 + BP3 interactions, respectively; Figure 3A). These relative proportions invested into sex were clearly not linked to the competitive ability of isolates. However, the proportion of individual reproduction that was invested into sex was negatively correlated with the (log) asexual reproduction (Adjusted-R<sup>2</sup> =

0.68,  $P < 0.01$ , Figure 5). Moreover, the proportion of asexual reproductive performance that was lost during mixed infections compared to infection alone was positively correlated to the proportion of reproduction invested into sex (Adjusted- $R^2 = 0.52$ ,  $P < 0.05$ , data not shown).



**Figure 4** Asexual versus sexual individual reproduction of *Phytophthora infestans* isolate BP3 (mating type A1) faced with four A2 isolates (black circles), and of the four A2 isolates faced with BP3 isolates (open circles). Bars correspond to standard errors. Correlation was significant ( $P < 0.05$ ).



**Figure 5** Proportion of sexual reproduction within total individual reproduction plotted against individual asexual reproduction. Bars correspond to standard errors. The negative linear relationship was significant ( $P < 0.05$ ).

## Discussion

Reproductive strategies of plant pathogens have to our knowledge never been studied during intraspecific multiple infections. Using a heterothallic species allowed us to control sexual reproduction during multiple infections, and thus to deal with issues which could not have been investigated otherwise. We confirmed the existence of two types of competitive status for sexually non-compatible isolates, as reported elsewhere (Clément *et al.*, Article 3); however, we could also show that this status was reversed when sex was possible between partners. In other words, isolates that were characterized as competitive isolates appeared less efficient in asexual and total reproduction when they have the possibility to reproduce sexually, and vice-versa. We could thus refine our description of the two reproductive strategies existing for *P. infestans* in multiple infections. Since C-isolates were more performing for competition without sex, they can be best described as asexual competitors, while NC-isolates, fitter when they had the possibility to invest in sex, can be seen as sexual competitors.

The cost of reproducing sexually (Williams 1975; Maynard Smith 1978) could explain a decrease in the number of alleles transmitted. About five asexual spores were formed on average for each sexual spore produced (Figure 4), indicating a 5-fold cost of sexual reproduction in *Phytophthora infestans* relatively to the cost of asexual sporulation. Supposing a constant investment of resources in reproduction and combining this cost with the resource allocation theory (Kozlowski 1991; Roff 1992; Stearns 1992; Perrin & Sibly 1993), we suggest that available resources are removed from allocation to asexual reproduction and reallocated to sex, which higher cost implies a decrease of total progeny number. This negative relation between sexual and asexual reproduction was confirmed by our data (Figure 5). In fact, the higher the investment was for asexual reproduction, the lower the proportion of total reproduction was devoted to sex. Because oospores of *P. infestans* have different functions (survival, inter-season transmission, and sexuality) than asexual sporangia, the trade-off we found mirrors other well-known trade-offs between survival or future reproduction and current reproduction (Roff 1992; Stearns 1992).

One complexity we cannot completely rule out was the possible modification of the proportion of resources that was allocated to total reproduction. Two mechanisms of competition could switch the part of resources allocated to reproduction and then explain the patterns we observed. First, the growth versus reproduction allocation strategy could be displaced by many environmental and

ecological factors (Roff 1992; Stearns 1992), including multiple infections which lead to the exploitation competition, one of the three described mechanism of competition (Read & Taylor 2001). Resource availability is one of the most important factors that could affect infection dynamics and life history strategy. If there was neither resource alternative nor divergence in resource use, the parasite could modify how much and how fast it invested its resources to its different functions (Mideo 2009). Second, direct pathogen-pathogen interaction could occur during multiple infections via chemical compound release, a mechanism known as interference competition (Read & Taylor 2001). If this microbial communication is well studied for bacteria (Brown *et al.* 2009; Czarán & Hoekstra 2009), it is so far poorly examined in oomycetes. However, *in vitro* tests indicated us that competition between sexual compatible or incompatible isolates of *P. infestans* could modify mycelial growth (data not shown): when isolates were sexually incompatible, a reduction of mycelial growth rate was observed on the front side of isolate interaction while attraction even overlap of mycelium was observed when isolates were compatible (Clément *et al.*, personal observations). Investing more (or less) in mycelial growth inevitably leads to a negative (or positive) impact on reproduction.

The plasticity of isolate response to the competitor genotype was demonstrated by studying the reproductive strategy of the BP3 reference isolate. Our results indicated first that within sexually incompatible interactions, BP3 was able to modulate its absolute fitness (i.e. its investment in asexual reproduction depends on the challenger strategy; Figure 2B), without modification of its relative fitness (i.e. BP3 proportion within total reproduction always is about 10%; Figure 3A). We also observed in sexually compatible interactions that BP3 was able to adopt different strategies, always depending on the challenger (Figure 2B & 3A), and invested from 10 to 80% of its total reproduction in sex (Figure 5). A greater investment in sexual reproduction was observed when competitors invested themselves a major part of their resources in sexual reproduction (BP6 and Z0, Figure 3A & 5). These pairs appeared clearly more sexually fertile than the others. For *P. infestans*, fertility is mainly governed by specific hormonal exchange (Ko 2007). As proposed for other *Phytophthora* species (Ko & Kunimoto 1981), each partner isolate probably has its own potential for emitting specific sexual hormones and its own potential for receiving hormones from the partners (linked to numbers (or density) of hormonal receptors). Even if BP3\*BP6 and BP3\*Z0 pairs appeared the most fertile (i.e. invested more in sex), BP3 represented only 5.6% and 22.5% of total sexual reproduction, respectively. It was also true for the two other pairs, where BP3 never reached more than 25% (Figure 3B). Consequently, isolates challenging BP3 performed self-fertilization at a high rate (at least 50%). Self-

fertilization could be viewed as a way to preserve well adapted combination of genes and to give them a higher chance to overwinter. However, hybrids could have higher germination rate, as it was shown for *Phytophthora infestans* (Mayton *et al.* 2000) or another *Phytophthora* species (Boutet *et al.* 2010). Investing in sexual progenies could thus be a waste in case of self-fertilization.

Despite the fact that sex is costly and does not always give viable progeny, its maintenance in most species indicates that it could be balanced by at least one advantage (i.e. the balance argument, Williams 1975). In fact, mechanisms specific to sexuality, such as new allele combinations or intragenic recombination, could facilitate the adaptation of the parasite to its abiotic environment but also to its host (Wolf *et al.* 1987; Yang & Gabriel 1995; Zhan *et al.* 2007; Michod *et al.* 2008). Sexual spores of *Phytophthora* species are thick-walled resting organs that can survive for extended periods in soil in the absence of the host, and can serve as primary soil-borne inoculum for at least 2–3 years (Andersson *et al.* 1998). They are reported to cause infections early in the growing season (Lehtinen & Hannukkala 2004; Hannukkala *et al.* 2007; Widmark *et al.* 2007) and may result in the development of invasive genotypes with higher adaptive potential.

The existence of these strategies resulted from selection under agricultural conditions and their sampling indicated that they could have been successful enough to develop within an. Unfortunately, we did not have enough information about the conditions under which isolates have evolved (e.g. the frequency of multiple infections at the sampling date) to determine whether these strategies could coexist at the same time of an epidemics or whether their frequencies change during the infection dynamic. The frequency of multiple infections and also the frequency of both mating types are key factors that could shape the evolution of host exploitation strategies. In fact, our heterothallic system is particular because the pathogen-pathogen interaction outcome depends on sexual compatibility. Thus, when they are compatible, collective action take place: partners exchange hormones that are beneficial to each other because they allow their sexual reproduction. On the contrary, when competing isolates are not compatible, no benefit could be derived from their interaction. They also have to share host resources and to adopt an individual reproduction strategy as proposed by the ‘tragedy of the commons’ model (Hardin 1968). Evolutionary consequences of ‘tragedy’ versus ‘collective’ exploitation traits appear contrasted and can lead to different evolutionary trajectories (Brown *et al.* 2002). Only the implementation of adaptive dynamics models could help us to test such assumptions. Our present results and other already available datasets would be useful to develop a model which would be well adapted to our system exhibiting a complex life cycle.

To conclude, we showed that isolates of *P. infestans* plastically responded to multiple infections for their reproductive strategy. These modulations of life history traits remain under evolutionary and physiological constraints, as described for some years in the life history theory (Roff 1992; Stearns 1992). Our study was the first to address the question of multiple infections for a heterothallic species, including inevitably the question of the cost to reproduce sexually. It gave important clues about the complex life history of *P. infestans* and help for understanding why and under which conditions its epidemic dynamic and its populations could evolve. In an agronomic context, a clear understanding of such interactions between individuals and their implications for the evolution of populations is fundamental to take into account in the development of sustainable control methods.

## Acknowledgements

We thank Roland Pellé and Jean-Eric Chauvin for providing host plant material; Roselyne Corbière and Claudine Pasco for providing *P. infestans* isolates; Manuel Plantegenest, Christian Lannou, Frederic Hamelin and Emmanuel Jacquot for helpful discussions; Etienne Rivot and Melen Leclerc for help with Delta models; and Bruno Marquer, Cécile Gracianne and Gersende Angot for technical support.

This research was part of the projects 'Invasion and persistence of plant pathogens' funded by INRA and BBSRC, EMERFUNDIS (Agence Nationale de la Recherche grant 07-BDIV-003) and BIOExploit (EU integrated project FOOD-CT-2005-513959).

## References

- Andersson B., Sandstrom M. & Stromberg A. (1998). Indications of soilborne inoculum of *Phytophthora infestans*. *Potato Res.*, 41, 305-310.
- Balmer O., Stearns S.C., Schotzau A. & Brun R. (2009). Intraspecific competition between co-infecting parasite strains enhances host survival in African trypanosomes. *Ecology*, 90, 3367-3378.
- Bell A.S., de Roode J.C., Sim D. & Read A.F. (2006). Within-host competition in genetically diverse malaria infections: Parasite virulence and competitive success. *Evolution*, 60, 1358-1371.

- 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.
- Boutet X., Vercauteren A., Heungens K., Laurent F. & A. C. (2010). Oospores progenies from *Phytophthora ramorum*. *Fungal Biol.*, 114, 369-378.
- Brown S.P., Hochberg M.E. & Grenfell B.T. (2002). Does multiple infection select for raised virulence? *Trends Microbiol.*, 10, 401-405.
- Brown S.P., Inglis R.F. & Taddei F. (2009). Evolutionary ecology of microbial wars: within-host competition and (incidental) virulence. *Evol. Appl.*, 2, 32-39.
- Chamberlain M. & Ingram D.S. (1997). The balance and interplay between asexual and sexual reproduction in fungi. In: *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, Vol 24. Academic Press Ltd London, pp. 71-87.
- Czaran T. & Hoekstra R. (2009). Microbial communication, cooperation and cheating : Quorum sensing drives the evolution of cooperation in bacteria. *Plos One*, 4, 1-10.
- Davies C.M., Fairbrother E. & Webster J.P. (2002). Mixed strain schistosome infections of snails and the evolution of parasite virulence. *Parasitology*, 124, 31-38.
- de Roode J.C., Helinski M.E.H., Anwar M.A. & Read A.F. (2005a). Dynamics of multiple infection and within-host competition in genetically diverse malaria infections. *Am. Nat.*, 166, 531-542.
- de Roode J.C., Pansini R., Cheesman S.J., Helinski M.E.H., Huijben S., Wargo A.R., Bell A.S., Chan B.H.K., Walliker D. & Read A.F. (2005b). Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102, 7624-7628.
- Fry W. (2008). *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Mol. Plant Pathol.*, 9, 385-402.
- Gallegly M.E. & Galindo J. (1958). Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology*, 48, 274-277.
- Gauslaa Y. (2006). Trade-off between reproduction and growth in the foliose old forest lichen *Lobaria pulmonaria*. *Basic Appl. Ecol.*, 7, 455-460.
- Gower C.M. & Webster J.P. (2005). Intraspecific competition and the evolution of virulence in a parasitic trematode. *Evolution*, 59, 544-553.
- Hannukkala A.O., Kaukoranta T., Lehtinen A. & Rahkonen A. (2007). Late-blight epidemics on potato in Finland, 1933-2002; increased and earlier occurrence of epidemics associated with climate change and lack of rotation. *Plant Pathology*, 56, 167-176.

- Hardham A.R. (2009). The asexual life cycle. In: Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools (eds. Lamour K & Kamoun S). John Wiley & Sons New Jersey.
- Hardin G. (1968). The tragedy of the commons. *Science*, 162, 1243-1248.
- Judelson H.S. & Blanco F.A. (2005). The spores of *Phytophthora*: Weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 47-58.
- Ko W.H. (2007). Hormonal regulation of sexual reproduction in *Phytophthora*. *Bot. Stud.*, 48, 365-375.
- Ko W.H. & Kunimoto R.K. (1981). Hormone production and reception among different isolates of *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora palmivora*. *Mycologia*, 73, 440-444.
- Kozłowski J. (1991). Optimal energy allocation models - an alternative to the concepts of reproductive effort and cost of reproduction. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology*, 12, 11-33.
- Kozłowski J. (1992). Optimal allocation of resources to growth and reproduction - implications for age and size at maturity. *Trends Ecol. Evol.*, 7, 15-19.
- Lehtinen A. & Hannukkala A. (2004). Oospores of *Phytophthora infestans* in soil provide an important new source of primary inoculum in Finland. *Agr. Food Sci.*, 13, 399-410.
- Maynard Smith J. (1978). *The evolution of sex*. Cambridge University press, Cambridge.
- Mayton H., Smart C.D., Moravec B.C., Mizubuti E.S.G., Muldoon A.E. & Fry W.E. (2000). Oospore survival and pathogenicity of single oospore recombinant progeny from a cross involving US-17 and US-8 genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.*, 84, 1190-1196.
- Michod R.E., Bernstein H. & Nedelcu A.M. (2008). Adaptive value of sex in microbial pathogens. *Infect. Genet. Evol.*, 8, 267-285.
- Mideo N. (2009). Parasite adaptations to within-host competition. *Trends Parasitol.*, 25, 261-268.
- Perrin N. & Sibly R.M. (1993). Dynamic-models of energy allocation and investment. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 379-410.
- R Development Core Team (2005). *R: a language and environment for statistical computing*. In: Vienna.
- Read A.F. & Taylor L.H. (2001). The ecology of genetically diverse infections. *Science*, 292, 1099-1102.
- Robertson N.F. (1991). The Challenge of *Phytophthora infestans*. In: *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato (eds. Ingram DS & Williams PH). Academic press London.

Roff D.A. (1992). The evolution of life histories: theory and analysis. Chapman and Hall edn, New York.

Stearns S.C. (1992). The Evolution Of Life Histories. Oxford University Press edn, New York.

Stefansson G. (1996). Analysis of groundfish survey abundance data: Combining the GLM and delta approaches. ICES J. Mar. Sci., 53, 577-588.

Wargo A.R., de Roode J.C., Huijben S., Drew D.R. & Read A.F. (2007). Transmission stage investment of malaria parasites in response to in-host competition. Proc. R. Soc. B-Biol. Sci., 274, 2629-2638.

Widmark A.K., Andersson B., Cassel-Lundhagen A., Sandstrom M. & Yuen J.E. (2007). *Phytophthora infestans* in a single field in southwest Sweden early in spring: symptoms, spatial distribution and genotypic variation. Plant Pathology, 56, 573-579.

Williams G.C. (1975). Sex and evolution. Princeton University Press, Princeton.

Wolf H.G., Wohrmann K. & Tomiuk J. (1987). Experimental evidence for the adaptive value of sexual reproduction. Genetica, 72, 151-159.

Yang Y.O. & Gabriel D.W. (1995). Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution of new host specificities. J. Bacteriol., 177, 4963-4968.

Zhan J., Mundt C.C. & McDonald B.A. (2007). Sexual reproduction facilitates the adaptation of parasites to antagonistic host environments: Evidence from empirical study in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* system. Int. J. Parasit., 37, 861-870.



# **Discussion générale**



# 1. Stratégies de reproduction et concept de fitness

Les stratégies de reproduction de l'Oomycète hétérothallique *Phytophthora infestans* étaient au cœur de ce travail de thèse. Les particularités de notre système modèle *P. infestans/S. tuberosum* (deux modes de reproduction, hétérothallisme et résistance partielle de l'hôte) ont favorisé la discussion autour de nombreuses thématiques comme l'évolution des traits d'histoire de vie et l'allocation des ressources, les infections multiples, l'évolution des régimes de reproduction et les interactions hôte-pathogène.

Au début de ce travail de thèse, nous avons défini la fitness (ou valeur sélective en français) comme la contribution d'une entité aux générations ultérieures (Thomas *et al.*, 2010) impliquant alors des traits d'histoire de vie ayant un rôle dans la survie et le succès reproducteur (Day & Otto, 2001). La fitness est donc le résultat d'une stratégie de reproduction adoptée par un individu ou un génotype.

Cependant, pour les agents pathogènes sporulants, il ne semble pas si simple de définir la fitness et d'en choisir une mesure qui fasse consensus au sein de la communauté scientifique (Day & Otto, 2001; Pringle & Taylor, 2002). Le débat est loin d'être clos, mais fort heureusement, les travaux menés en connexion avec ce sujet permettent d'alimenter les réflexions. Les travaux de thèse présentés ici n'ont pas la prétention d'avancer une définition ni une mesure universelle de la fitness pour les agents pathogènes sporulants. Cependant, ils m'ont permis d'identifier plusieurs aspects qu'il est essentiel de prendre en compte dans l'étude de la fitness.

## 1.1. La fitness d'un couple, un problème propre aux hétérothalliques

La question de la définition de la fitness peut s'avérer complexe pour les agents pathogènes disposant des deux modes de reproduction : sexué et asexué. Faut-il différencier les deux types de descendants produits? Puisque l'individu contribue aux générations ultérieures, que ce soit par le processus de reproduction sexué ou asexué, la réponse à cette question serait *a priori* qu'il ne faut pas différencier les deux types de descendants. Cependant, il est évident que la sexualité et la clonalité n'ont pas les mêmes implications évolutives (Maynard Smith, 1971). Il est donc tout à fait justifié d'essayer d'évaluer la contribution de chacun des modes de reproduction à la fitness totale d'un génotype ou d'une espèce, dans la mesure du possible.

Mais évaluer la fitness, et la manière dont le sexe y contribue, se révèle plus complexe que prévu pour les agents pathogènes hétérothalliques. Sans partenaire, pas de sexe. La rencontre de deux partenaires compatibles est donc indispensable pour espérer quantifier le potentiel de reproduction sexuée des différents isolats. Ceci pose pourtant de nouvelles difficultés: celles des infections multiples et de l'inévitable partage des ressources, avec leur lot de conséquences sur les traits de chacun des partenaires (Read & Taylor, 2001; Brown *et al.*, 2002; Mideo, 2009), dont leur reproduction asexuée. La fitness est donc altérée en cas de partage des ressources (c'est ce que nous avons vérifié au Chapitre 3). Le concept de fitness devrait-il alors s'appliquer au couple plutôt qu'à l'individu?

La réponse pourrait être affirmative dans notre cas: nos résultats (Chapitre 4) indiquent que la production de descendants sexués et asexués de chacun des partenaires au sein du couple dépend crucialement du génotype auquel il est confronté. Il est donc impossible de prédire la fitness d'un individu puisqu'elle est dépendante de l'interaction avec l'autre partenaire. Ceci justifie amplement le raisonnement à l'échelle du couple, c'est-à-dire à l'échelle de l'interaction pathogène-pathogène.

Sachant que, chez *P. infestans*, la reproduction sexuée est induite par les échanges d'hormones spécifiques entre les partenaires de type sexuel A1 et A2 (Ko, 2007), l'une des possibilités à envisager pour l'estimation d'un potentiel de reproduction sexuée au niveau individuel serait d'induire cette reproduction sexuée indépendamment de la présence d'un partenaire compatible. L'utilisation de membranes semi-perméables (c'est-à-dire évitant le contact entre isolats mais autorisant les échanges de molécules) en milieu artificiel a permis de prouver l'existence des échanges hormonaux induisant la reproduction sexuée (Shaw *et al.*, 1985; Shattock *et al.*, 1986). Les employer dans le but d'estimer le potentiel de reproduction sexuée serait envisageable *in vitro* mais cela n'a que peu d'intérêt car la fitness d'un agent pathogène ne prend tout son sens qu'en interaction avec son hôte. L'utilisation de membranes pour des tests *in planta* comporte cependant de nombreux verrous techniques qui n'ont pu être levés au cours de ce travail de thèse.

## 1.2. Fitness absolue ou relative?

Si l'évaluation de la part du sexe dans la fitness totale chez une espèce hétérothallique passe clairement par un raisonnement à l'échelle du couple, il reste indispensable d'évaluer la contribution de chacun des partenaires au sein du couple pour l'étude de l'évolution des populations. Comprendre l'investissement de chaque partenaire dans chacun des modes de reproduction, relativement à la

fitness globale du couple est essentiel pour estimer la performance relative de chacun des génotypes de l'agent pathogène et donc pour estimer leur potentiel d'invasion et de persistance au sein des populations.

Selon qu'il s'agisse d'une mesure absolue ou relative, l'estimation de la fitness peut contribuer différemment à la compréhension du système. Ainsi, la fitness absolue, correspondant au nombre total de descendants produits (Day & Otto, 2001), a une valeur démographique. Il est important d'avoir une idée de cette production absolue dans l'étude de la dynamique des populations. Cependant, la fitness relative s'avère nécessaire et suffisante pour la prédiction de l'évolution des populations (Day & Otto, 2001). Dans ce cas, la fitness d'un individu (ou d'un génotype) n'a d'intérêt que relativement aux autres individus (ou génotypes) présents dans l'environnement ou la population. Les deux mesures ont été effectuées dans les travaux présentés ici (Chapitres 3 et 4), et confirment la complémentarité de ces deux mesures (Day & Otto, 2001), surtout lors d'expériences en infections multiples.

### 1.3. Fitness et dynamique épidémique

*Phytophthora infestans*, en tant qu'hémibiotrophe, est capable de sporuler de façon continue après la phase de latence : seule la disponibilité en tissu hôte vivant est limitante pour poursuivre son développement (Agrios, 2005; Hammerschmidt, 2006). Comment décrire la fitness alors que le processus de reproduction est dynamique? Quand décider de compter le nombre de descendants? Plusieurs solutions s'offrent à ce problème. Il est tout d'abord possible de se placer en conditions de ressources finies et mesurables. Les tests sur folioles détachées mis au point dans l'équipe (Lebreton & Andrivon, 1998) permettent cela. Il est préférable dans ce cas de réaliser les mesures lorsque la totalité des ressources est consommée (option choisie pour les travaux des Chapitres 3 et 4), correspondant alors au plateau de sporulation (voir Annexe 1). La quantité de descendants produits représente alors une efficacité de conversion d'une quantité donnée de tissu hôte en structures de reproduction, et donc, donne une mesure de la fitness du génotype testé. L'autre option est d'estimer une vitesse de production instantanée: c'est la fitness Malthusienne (Day & Otto, 2001; Pringle & Taylor, 2002), préconisée pour les organismes à temps de génération court, et valable également dans notre cas de reproduction continue. Il reste néanmoins important de considérer que les agents pathogènes comme le notre sont dotés d'une période de latence qui peut être variable (Pariaud *et al.*, 2009a) et dont il faut tenir compte dans le calcul du taux de reproduction (c'est l'option choisie pour les travaux du

Chapitre 1). D'autre part, bien qu'il soit acceptable d'assimiler la phase de sporulation à un processus linéaire lors des calculs de taux de sporulation 6 jours post-inoculation, cela n'est pas complètement exact puisque la sporulation suit une loi proche de la logistique (Declerck *et al.*, 2001), ce que nous avons confirmé sans surprise pour notre modèle d'étude (voir Annexe 1).

Par ailleurs, chez beaucoup d'agents pathogènes, la reproduction (sexuée ou asexuée) peut soit alimenter la dynamique épidémique, soit aboutir à la formation de structures de survie (Agrios, 2005). Ainsi, ces deux types de descendants contribuent à des générations positionnées différemment sur l'échelle de temps, c'est-à-dire des générations respectivement inter- et intra-saison. Cette situation est développée dans la littérature respectivement sous les termes de reproductions future et présente, entre lesquelles de nombreux compromis ont été observés (Stearns, 1992). Nos résultats ne confirment qu'en partie cette théorie (Chapitre 4): il est possible pour *P. infestans* d'investir efficacement dans ces deux types de reproduction simultanément, mais plus l'investissement dans la reproduction à court terme est élevé, plus la proportion investie dans la reproduction à long terme diminue. Cependant, au sein d'une même espèce, différentes stratégies peuvent coexister (Stearns, 1992), ce que nous avons également constaté pour *P. infestans*. La fitness associée à ces stratégies de reproduction reste malheureusement difficile à évaluer par l'expérimentation. C'est pourquoi nous préconisons l'utilisation de modèles d'écologie évolutive pour aborder cette délicate question. Ce projet a d'ailleurs été lancé au sein de l'équipe (Thèse de Magda Castel) à la suite de premiers résultats très encourageants (Castel, 2010), et s'appuiera sur des données et résultats qui ont été acquis au cours du travail présenté ici.

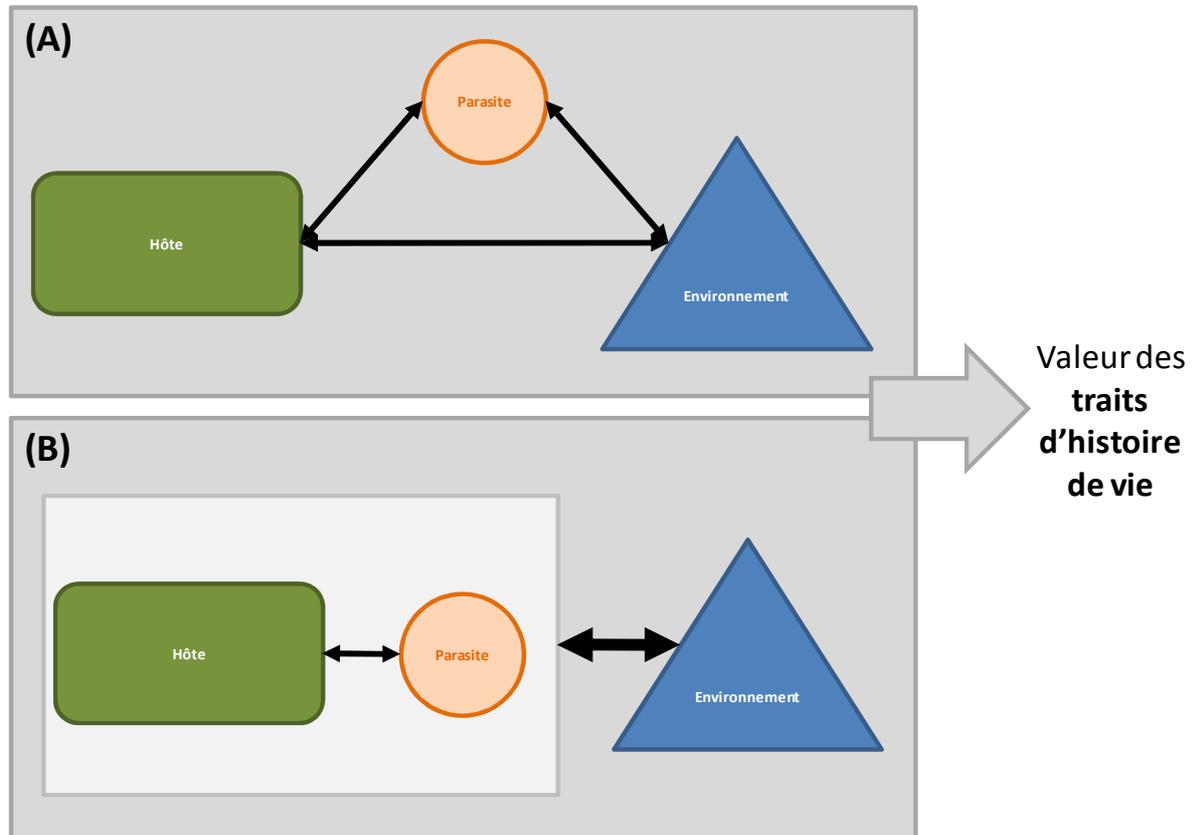
Chez beaucoup d'agents pathogènes de plante, la phase de reproduction sexuée alterne avec la phase de reproduction asexuée (Agrios, 2005). La reproduction sexuée peut tout d'abord apparaître tardivement dans la saison, étant par exemple déclenchée par la sénescence ou la mort de la plante (c'est le cas par exemple des agents pathogènes responsables des Ascochytozes; Tivoli & Banniza, 2007). Le sexe peut dans ce cas être vu comme une adaptation à des contraintes particulières (Maynard Smith, 1989). Les deux processus de reproduction étant alors découplés dans le temps, comment estimer correctement la fitness? Ce problème peut être abordé de la même manière que celui lié aux formes de survie et de colonisation, c'est-à-dire par modélisation mathématique. Ceci est souvent vrai dans le cas des agents pathogènes, puisque bien souvent, la phase de reproduction sexuée en fin de saison correspond à la formation de structures de survie (Agrios, 2005).

L'alternance des phases de reproductions sexuée et asexuée est également observée pour les espèces exploitant différents hôtes pour achever leur cycle de vie. C'est le cas par exemple des rouilles hétéroïques comme *Melampsora larici-populina* (Frey & Pinon, 2004), dont la reproduction asexuée a lieu sur le peuplier (appelé hôte télén) et la reproduction sexuée sur le mélèze (appelé hôte écidien). La fitness d'un génotype est dans ce cas délicate à définir. La considération du cycle dans sa totalité pourrait bien être une solution, mais l'alternance d'hôte fait ressurgir une nouvelle problématique propre aux agents pathogènes: l'importance et la place de l'hôte dans la définition de la fitness.

#### 1.4. Place de l'hôte dans la définition de la fitness

La présence de tissu hôte vivant est une condition *sine qua non* pour le développement des agents pathogènes biotrophes ou hémibiotrophes (Gay, 1984). Ainsi, sans hôte, leurs traits d'histoire de vie sont impossibles à mesurer car ils sont tout simplement inexistantes. La vision classique de van der Plank (1968), appelée triangle de la maladie (Figure 16A) et considérant l'hôte et l'agent pathogène comme des entités indépendantes qui interagissent entre elles et avec l'environnement serait donc obsolète. Les traits mesurés comme la latence ou le taux de sporulation seraient, de façon plus pertinente, des traits propres à l'interaction hôte-pathogène plutôt qu'au pathogène seul. Ainsi, l'interaction de l'hôte avec son pathogène formerait un nouvel organisme interagissant lui-même avec l'environnement au sein duquel il exprime ses nouveaux traits (Figure 16B et Loegering, 1978). Cette vision quelque peu originale, bien qu'étant applicable aux biotrophes et hémibiotrophes, reste pourtant extrémiste. Définir la fitness dans ce cas supposerait d'être capable de quantifier des descendants à l'image de ce nouvel organisme. Cette situation est applicable uniquement aux maladies transmises verticalement, c'est-à-dire lorsqu'effectivement les descendants de l'hôte (par exemple les graines) sont infectés par le parasite. Mais dans les autres cas, l'hôte et le pathogène vont plutôt produire indépendamment leurs propres descendants, chacun ayant néanmoins un effet sur la descendance de l'autre. De plus, il ne faudrait pas oublier que les pathogènes sont des organismes à part entière, coévoluant certes avec leur hôte mais par leurs propres mécanismes. Même fortement dépendants de leur(s) hôte(s), ils restent néanmoins capables de survivre en son absence, au moins sur de très courtes périodes, ne serait-ce que lors de la phase de dissémination (Agrios, 2005). Il est à

noter que cela peut s'appliquer également au cas de la symbiose: n'est-il alors pas plus pertinent de parler de fitness de l'holobionte?



**Figure 16 :** Traits d'histoire de vie et interaction hôte  $\times$  parasite  $\times$  environnement: (A) vision classique: triangle épidémiologique de van der Plank (1968) ou (B) vision selon laquelle les traits exprimés dans un environnement donné sont propres à l'interaction hôte  $\times$  parasite et non plus indépendants pour le parasite et l'hôte.

L'hôte peut alors être considéré comme un environnement proposé au parasite pour exprimer ses traits. Cet environnement hôte est plus ou moins hostile selon le degré et la nature de sa résistance. Comme tout organisme, l'agent pathogène est capable de s'adapter à son nouvel environnement par sélection naturelle (Darwin, 1859), les individus les plus performants étant favorisés par la pression de sélection exercée par cet environnement.

Par ailleurs, la fitness des différents génotypes d'agents pathogènes n'est pas toujours maximisée dans les mêmes environnements hôtes: c'est l'interaction génotype du pathogène – génotype de la plante hôte, qui influence les stratégies de reproduction et donc la fitness du pathogène (Salvaudon *et al.*, 2005; 2007). Il est donc capital d'évaluer quelle importance aura le génotype de l'hôte dans les questionnements scientifiques nécessitant des mesures de fitness de l'agent pathogène. Nos questions

relatives à l'investissement dans les reproductions asexuée et sexuée en infections multiples ne nécessitaient pas, dans un premier temps, de faire des mesures sur plusieurs génotypes d'hôtes. Cependant, il serait intéressant de regarder si les stratégies de reproduction établies sur le génotype de référence sensible sont modifiées, conservées ou accentuées sur des hôtes exprimant un niveau de résistance partielle plus élevé. Les données déjà acquises durant la thèse pour une autre variété hôte pourront être exploitées rapidement dans ce but.

La fitness est un concept universel créé pour expliquer comment la sélection naturelle peut retenir certains individus plutôt que d'autres (Darwin, 1859) et comment cela peut conduire à l'évolution des traits d'histoire de vie (Roff, 1992; Stearns, 1992). Cependant, la performance d'une espèce voire d'un individu est difficilement réductible à une mesure unique et universelle. Il est indispensable de tenir compte du cycle de vie, du mode de reproduction et de la relation de cette espèce avec son milieu pour définir la mesure de la fitness la plus encline à répondre aux questionnements scientifiques qui nécessitent d'en obtenir une estimation.

## 2. Stratégies de reproduction et dynamique des populations

Ce travail de thèse ouvre sans équivoque des pistes de travail intéressantes. Comprendre le maintien des stratégies de reproduction que nous avons identifiées en fait partie. Pour cela, il est indispensable de prendre en compte un nombre de générations suffisamment grand pour pouvoir déterminer si ces stratégies sont évolutivement stables. Les résultats présentés dans ce manuscrit ont tous été obtenus après un cycle unique de maladie, c'est-à-dire une seule séquence des phases d'infection, de latence et de reproduction (Figure 1). Il est primordial d'étudier les processus biologiques à des niveaux aussi fins que celui de la dynamique intra-hôte et celui du monocycle épidémique pour mieux comprendre à quelle échelle s'opère la sélection. Cependant, il est également important de savoir revenir à la dynamique épidémique au cours d'une saison et même à la dynamique épidémique à une échelle de temps supérieure (plusieurs saisons, échelle évolutive du temps) si l'objectif est d'obtenir une vision à plus long terme du potentiel évolutif des populations (Mideo *et al.*, 2008).

Nos travaux ne permettent pas de créer directement ce lien. Il est nécessaire de faire appel aux outils de modélisation, plus particulièrement aux modèles emboîtés comprenant différents niveaux hiérarchiques (intra-hôte, inter-hôte et inter-saison) afin de quantifier les différents processus aux différentes échelles. Cependant, nous pouvons d'ores et déjà fournir une trame de travail basée sur nos résultats, qui pourra être enrichie par les résultats obtenus par ailleurs au sein de l'équipe. Toutes les valeurs, proportions ou tendances proposées dans les schémas qui vont suivre ne sont données qu'à titre hypothétique. Les schémas proposés (Figures 17 et 18) servent d'illustrations aux propositions qui sont avancées, sans valeur de résultat à ce stade.

### 2.1. Stratégies de reproduction en phase épidémique

L'hypothèse qui peut être faite pour expliquer l'évolution de la fréquence des deux stratégies de reproduction au sein d'une saison est que les fréquences de rencontre évoluent au cours de la dynamique épidémique (Figure 17B): elles sont faibles en début d'épidémie car la population pathogène est en densité faible, augmentent avec la taille de la population jusqu'à un maximum puis

diminuent par raréfaction de tissu hôte sain. Nous avons conclu dans ce travail de thèse que la fitness des isolats de *P. infestans* dépend (1) de la stratégie propre à l'isolat, (2) de son interaction ou non avec un autre isolat, et (3) quand une interaction existe, de la compatibilité sexuelle et de la stratégie de cet autre isolat. Durant chaque monocycle épidémique, tous les isolats rencontrent ou non un compétiteur et se reproduisent alors en fonction de ce critère. A la fin du monocycle épidémique N, la densité en spores asexuées obtenue pour chaque isolat (seules les spores asexuées contribuent à alimenter la dynamique épidémique en cours) permet le calcul des fréquences de rencontre pour le monocycle N+1, conditionnant alors l'issue du monocycle N+1 en termes de stratégies de reproduction et donc de fitness.

Lorsque la totalité des monocycles est réalisée (dépendant de la disponibilité en hôte restant), la densité totale de spores asexuées et sexuées constitue le stock qui devra affronter l'hiver et donc survivre jusqu'à la prochaine saison (Figure 17A).

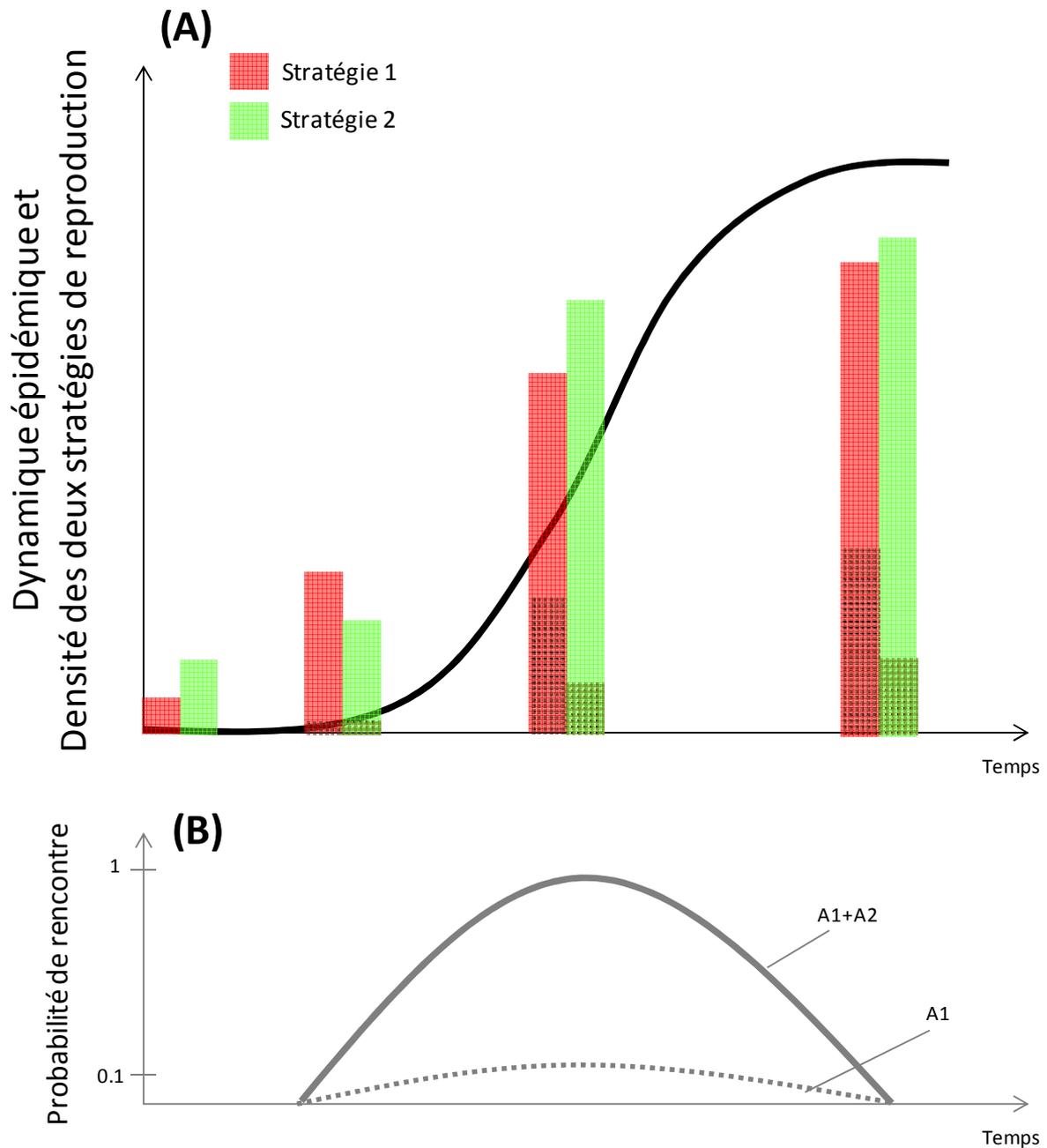
## 2.2. Stratégies de reproduction et survie

La survie hivernale de *P. infestans* dépend crucialement des conditions climatiques (Figure 18) : la survie sous forme d'oospores (qui sont des structures résistantes) est majoritaire dans les régions à hivers rigoureux, par exemple dans les pays nordiques (Widmark, 2010), alors que la survie sous forme asexuée (mycélium dans les tubercules ou débris de culture) est possible dans les régions tempérées comme l'Europe occidentale (Andrison, 1995).

*A priori*, rien n'indique que les survies hivernales sous forme asexuée soient identiques pour les deux stratégies énoncées, d'où les hypothétiques variations dans les proportions de chacune des stratégies à l'issue de la phase de survie (Figure 18). Il a déjà été mis en évidence que la transmission hivernale des isolats de *P. infestans* pouvait être négativement corrélée à leur agressivité (Pasco *et al.*, 2008). Des expérimentations de ce type pourraient être utiles pour vérifier si la transmission intersaison dépend effectivement de la stratégie des isolats. Le cas échéant, il serait intéressant d'estimer les paramètres correspondants.

A l'issue de la phase hivernale, les spores sexuées et asexuées ayant survécu et la proportion de chacune des stratégies constituent alors l'inoculum primaire pour la saison suivante. Un nouveau cycle épidémique peut s'amorcer, et sélectionner à nouveau les différentes stratégies pendant la saison

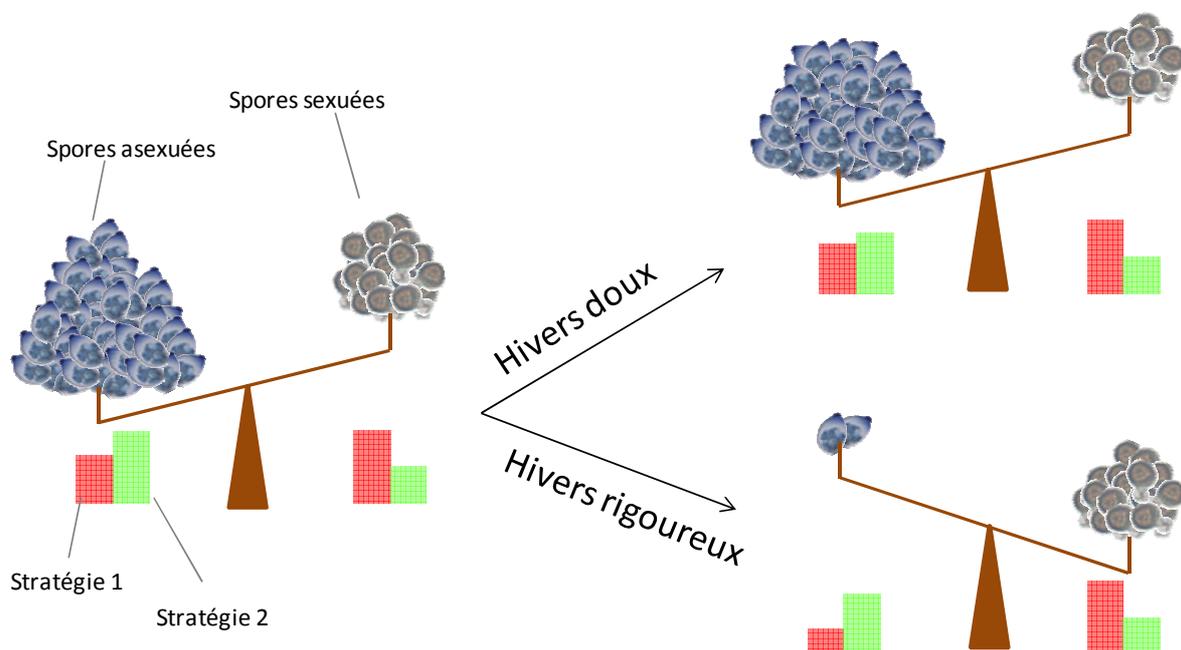
(Figure 17). A terme, il serait donc possible de prédire le maintien ou l'exclusion de l'une ou l'autre des stratégies.



**Figure 17 :** (A) Evolution hypothétique des densités de chacune des deux stratégies (en rouge et vert) et de la proportion investie dans la reproduction sexuée (zone couverte par les pois) au cours de la dynamique épidémique observée au cours d'une saison. (B) Evolution hypothétique des fréquences de rencontre de deux génotypes (différents ou non), rencontrer un isolat A1 est moins fréquent ici, en accord avec les proportions observées actuellement dans les populations françaises. La stratégie 1 (rouge) correspondrait aux isolats plus performants seuls ou avec un partenaire sexuel compatible, la stratégie 2 (vert) aux isolats plus performants avec un partenaire non compatible.

Bien plus qu'étudier le maintien de ces stratégies, tenir compte des infections multiples et des stratégies de reproduction dans ce type de modèle d'écologie évolutive permettrait d'aborder d'autres questions avec une nouvelle approche, comme par exemple celle des remplacements périodiques de populations (Spielman *et al.*, 1991; Fry *et al.*, 1993; Montarry *et al.*, 2010a). En effet, jusqu'au début des années 1980, seules les souches A1 étaient échantillonnées en Europe, le type sexuel A2 n'étant présent qu'au Mexique. En France, les premières souches de type sexuel A2 n'ont été détectées qu'en 1997 et 1998 sur tomate et dans les jardins privés (Lebreton & Andrivon, 1998) puis les populations essentiellement de type A1 ont progressivement été remplacées par les souches de type A2 (environ 90% des populations aujourd'hui). Les raisons de ce remplacement restent encore floues pour l'instant.

Cette proposition peut constituer une base de réflexion autour de questions similaires répondant aux attentes du projet plus vaste qu'est celui de l'équipe. L'étude de l'adaptation des populations d'agents pathogènes à leur(s) plante(s) hôte(s) passe en effet par le couplage des approches expérimentales et théoriques. A terme, ces recherches devraient contribuer à l'élaboration de stratégies de gestion des résistances dans le but d'en maximiser la durabilité.



**Figure 18:** Evolution hypothétique des proportions d'inoculum asexué et sexué (spores sur les balances) et des proportions de chacune des stratégies pour chaque type d'inoculum (barres rouges et vertes sous chaque type de spores) après la survie hivernale dans deux situations climatiques contrastées.

### 3. Conséquences pour l'adaptation des populations et la durabilité des résistances

Les travaux réalisés dans cette thèse s'inscrivent dans le contexte agronomique plus large de la durabilité des résistances. Evaluer cette durabilité passe par une meilleure compréhension de la biologie des interactions Oomycète-plante (van West & Vleeshouwers, 2004). Les connaissances apportées sur la biologie du système, et plus particulièrement sur les stratégies de reproduction de *P. infestans* en réponse à la résistance partielle et aux infections multiples, constituent de nouvelles pierres dans l'édifice de la gestion durable des résistances génétiques de la pomme de terre:

(i) Avoir établi que la résistance partielle impose le même effet sur les reproductions sexuée et asexuée de *P. infestans* est un avantage pour le sélectionneur, qui n'aura à mesurer qu'un seul des deux traits pour évaluer son matériel (de préférence la reproduction asexuée, plus simple et plus rapide à estimer). Par ailleurs, la latence et la sporulation semblent négativement corrélées. On ne pourrait s'affranchir dans ces circonstances de la mesure de la latence, puisqu'elle permet d'indiquer le début de la sporulation et donc de calculer le taux de reproduction. Cependant, plutôt que d'effectuer des mesures telles que nous les avons faites dans le premier chapitre, je préconiserais des mesures de dynamique de sporulation (voir Annexe 1) à partir desquelles la période de latence peut être recalculée et qui en disent beaucoup plus sur la nature de la résistance du génotype testé. Ce type de mesure est certes plus lourd du point de vue expérimental, mais l'utilisation en aval d'un outil de biologie moléculaire pour quantifier les spores représente un gain en temps et en précision.

(ii) Les oospores présentent un risque épidémiologique fort, puisque leur responsabilité dans la précocité accrue des épidémies est soupçonnée (Hannukkala *et al.*, 2007). Bien que n'étant pas la source d'inoculum primaire majoritaire dans nos régions de production, des épidémies plus précoces sur des plantes alors plus jeunes pourraient avoir des conséquences négatives sur l'utilisation de traitements fongicides. Utiliser des variétés qui réduiraient cette pression d'inoculum dans les régions concernées constitue l'un des premiers leviers en termes de réduction de l'utilisation de produits phytosanitaires. Evaluer la pression d'inoculum nécessite la mise en place d'outils d'évaluation tels que celui proposé au Chapitre 2.

(iii) L'existence de stratégies de reproduction répondant différemment aux infections multiples et à la compatibilité sexuelle du partenaire constitue une nouvelle explication au potentiel adaptatif

important des populations de *P. infestans* à leur environnement. Ces stratégies représentent un nouveau niveau de complexification du système, l'interaction pathogène-pathogène, qui gagnerait à être prise en compte dans les nouvelles questions. La capacité des isolats de *P. infestans* à moduler leur investissement dans leur reproduction leur permet de répondre rapidement aux changements de contexte (augmentation de la fréquence des infections multiples, par exemple) et donc de s'adapter plus facilement à leur hôte, constituant alors un potentiel d'érosion de la résistance partielle plus important.

(iv) La mise en évidence d'une corrélation positive entre la reproduction sexuée et la reproduction asexuée et d'un coût de la reproduction sexuée constitue les hypothèses de base fortes devant être émises dans des modèles d'écologie évolutive. Le fait d'avoir établi leur sens de variations ouvre de nouvelles perspectives en termes d'études de l'adaptation des populations à leur hôte.

## **4. Conclusion**

Les agents pathogènes disposent de cycles de vie particuliers et extrêmement diversifiés en termes de modes de reproduction, de dispersion ou de survie. Ceci leur confère un pouvoir d'adaptation spectaculaire aux organismes sans qui ils ne subsisteraient pas: leurs hôtes. Jouer de ces adaptations et tenter de les freiner est le propre du phytopathologiste moderne. Des siècles de coévolution ne peuvent être contrés facilement par les quelques connaissances que nous commençons à accumuler sur la richesse du monde qui nous entoure. Cependant, les nouvelles visions procurées par le mariage ingénieux de disciplines nouvelles et plus anciennes sont prometteuses et feront sans doute naître de nouvelles stratégies pour déjouer l'ennemi qui, espérons-le, sauront briller par leur durabilité.

# **Références bibliographiques**



---

**A**

---

- Abrams, P.A. 1987a. Alternative models of character displacement and niche shift .2. Displacement when there is competition for a single resource. *American Naturalist* **130**: 271-282.
- Abrams, P.A. 1987b. Alternative models of character displacement and niche shift .1. Adaptive shifts in resource use when there is competition for nutritionally nonsubstitutable resources. *Evolution* **41**: 651-661.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*, 5th edn. Elsevier Academic Press, London.
- 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.
- Alizon, S., Luciani, F. & Regoes, R.R. 2011. Epidemiological and clinical consequences of within-host evolution. *Trends in Microbiology* **19**: 24-32.
- Andanson, A. 2010. Evolution of phytopathogenic fungi aggressiveness, linking theoretical and empirical approaches, Université Nancy I - Henri Poincaré. Nancy.
- Andersson, B., Sandstrom, M. & Stromberg, A. 1998. Indications of soilborne inoculum of *Phytophthora infestans*. *Potato Research* **41**: 305-310.
- Andriveau, D. 1993. Nomenclature for pathogenicity and virulence - the need for precision. *Phytopathology* **83**: 889-890.
- Andriveau, D. 1995. Biology, ecology, and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil. *Phytopathology* **85**: 1053-1056.
- Andriveau, D., Lucas, J.M. & Ellisseeche, D. 2003. Development of natural late blight epidemics in pure and mixed plots of potato cultivars with different levels of partial resistance. *Plant Pathology* **52**: 586-594.
- Andriveau, D., Pelle, R. & Ellisseeche, D. 2006. Assessing resistance types and levels to epidemic diseases from the analysis of disease progress curves: Principles and application to potato late blight. *American Journal of Potato Research* **83**: 455-461.
- Andriveau, D., Pilet, F., Montarry, J., Hafidi, M., Corbiere, R., Achbani, E.H., Pelle, R. & Ellisseeche, D. 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: Evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* **97**: 338-343.

---

**B**

---

- Bai, J.F., Choi, S.H., Ponciano, G., Leung, H. & Leach, J.E. 2000. Xanthomonas oryzae pv. oryzae avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1322-1329.
- Balmer, O., Stearns, S.C., Schotzau, A. & Brun, R. 2009. Intraspecific competition between co-infecting parasite strains enhances host survival in African trypanosomes. *Ecology* **90**: 3367-3378.
- Barton, N.H. 1995. A general model for the evolution of recombination. *Genetical Research* **65**: 123-144.
- Bell, A.S., de Roode, J.C., Sim, D. & Read, A.F. 2006. Within-host competition in genetically diverse malaria infections: Parasite virulence and competitive success. *Evolution* **60**: 1358-1371.

- 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.
- Bernstein, H. 1977. Germ line recombination may be primarily a manifestation of DNA-repair processes. *Journal of Theoretical Biology* **69**: 371-380.
- Boyd, A.E.W. 1974. Sources of potato blight (*Phytophthora infestans*) in the east of Scotland. *Plant Pathology* **23**: 30-36.
- Brown, S.P. 2001. Collective action in an RNA virus. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 821-828.
- Brown, S.P., Hochberg, M.E. & Grenfell, B.T. 2002. Does multiple infection select for raised virulence? *Trends in Microbiology* **10**: 401-405.
- Brun, H., Chevre, A.M., Fitt, B.D.L., Powers, S., Besnard, A.L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M. & Andrivon, D. 2010. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* **185**: 285-299.
- Buckling, A. & Brockhurst, M.A. 2008. Kin selection and the evolution of virulence. *Heredity* **100**: 484-488.
- Bull, J.J. 1994. Perspective - Virulence. *Evolution* **48**: 1423-1437.

## C

---

- Carlisle, M.J. 1988. Motility, taxis, and tropism in *Phytophthora*. In: *Phytophthora - its biology, taxonomy, ecology, and pathology* (D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia & P. H. Tsao, eds), pp. 95-107. American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota.
- Castel, M. 2010. Plant pathogens life history evolution: insights from semi-discrete epidemic models with a focus on *Phytophthora infestans*, Université de Rennes 1. Rennes. **Master**.
- Chamberlain, M. & Ingram, D.S. 1997. The balance and interplay between asexual and sexual reproduction in fungi. In: *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology, Vol 24*, Vol. 24, pp. 71-87. Academic Press Ltd, London.
- Charlesworth, B. 1980. The cost of sex in relation to mating system. *Journal of Theoretical Biology* **84**: 655-671.
- Choisy, M. & de Roode, J.C. 2010. Mixed Infections and the Evolution of Virulence: Effects of Resource Competition, Parasite Plasticity, and Impaired Host Immunity. *American Naturalist* **175**: E105-E118.
- Clay, K. & Kover, P.X. 1996. The Red Queen Hypothesis and plant/pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology* **34**: 29-50.
- Coffey, M.D. & Gees, R. 1991. The cytology of development. In: *Phytophthora infestans, the cause of late blight fo potato*, Vol. 7 (D. S. Ingram & P. H. Williams, eds), pp. 31-51. Academic press.
- Combes, C. 1997. Fitness of parasites: Pathology and selection. *International Journal for Parasitology* **27**: 1-10.
- Cook, R.J. & Yarham, D.J. 2006. Epidemiology in sustainable systems. In: *The epidemiology of plant diseases*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

---

**D**

---

Darwin, C. 1859. *On the origin of species*. John Murray, London.

Davies, C.M., Fairbrother, E. & Webster, J.P. 2002. Mixed strain schistosome infections of snails and the evolution of parasite virulence. *Parasitology* **124**: 31-38.

Day, T. & Otto, S.P. 2001. Fitness. *Encyclopedia of Life Science*. Wiley-Blackwell, Nature Publishing Group.

Day, T. 2002. Virulence evolution via host exploitation and toxin production in spore-producing pathogens. *Ecology Letters* **5**: 471-476.

Dayan, T. & Simberloff, D. 2005. Ecological and community-wide character displacement: the next generation. *Ecology Letters* **8**: 875-894.

de Roode, J.C., Helinski, M.E.H., Anwar, M.A. & Read, A.F. 2005a. Dynamics of multiple infection and within-host competition in genetically diverse malaria infections. *American Naturalist* **166**: 531-542.

de Roode, J.C., Pansini, R., Cheesman, S.J., Helinski, M.E.H., Huijben, S., Wargo, A.R., Bell, A.S., Chan, B.H.K., Walliker, D. & Read, A.F. 2005b. Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 7624-7628.

Declerck, S., D'Or, D., Cranenbrouck, S. & Le Boulenge, E. 2001. Modelling the sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in monoxenic culture. *Mycorrhiza* **11**: 225-230.

Dowley, L.J. & Osullivan, E. 1991. Changes in the distribution of phenylamide-resistant strains of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Ireland 1985-89. *Potato Research* **34**: 67-69.

Duvauchelle, S. 1991. Lutte contre le mildiou de la pomme de terre en France: modèles de prévision pour les avertissements agricoles et stratégie d'utilisation des spécialités contenant des matières actives systémiques face à la résistance. *EPPO Bulletin* **21**: 49-55.

Duvauchelle, S. & Andrivon, D. 1996. Le mildiou et son agent *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. In: *La pomme de terre* (P. Rousselle, Y. Robert & J. C. Crosnier, eds). INRA, Paris.

---

**E**

---

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. & Bull, J.J. 2008. The evolution and expression of virulence. In: *Evolution in health and disease* (S. C. Stearns & J. C. Koella, eds). Oxford University Press, New York.

---

**F**

---

Flor, H.H. 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275-296.

Frank, S.A. 1996. Models of parasite virulence. *Quarterly Review of Biology* **71**: 37-78.

Frey, P. & Pinon, J. 2004. La rouille du peuplier, un pathosystème modèle. *Biofutur* **247**: 28-32.

Fry, W. 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* **9**: 385-402.

Fry, W.E., Goodwin, S.B., Dyer, A.T., Matuszak, J.M., Drenth, A., Tooley, P.W., Sujkowski, L.S., Koh, Y.J., Cohen, B.A., Spielman, L.J., Deahl, K.L., Inglis, D.A. & Sandlan, K.P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans* - chronology, pathways, and implications. *Plant Disease* **77**: 653-661.

---

## G

---

Gallegly, M.E. & Galindo, J. 1958. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology* **48**: 274-277.

Galvani, A.P. 2003. Epidemiology meets evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 132-139.

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.

Gay, J.L. 1984. Mechanisms of biotrophy in fungal pathogens. In: *Plant diseases: infection, damage and loss* (R. K. S. Wood & J. Jellis, eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Gemmill, A.W., Viney, M.E. & Read, A.F. 1997. Host immune status determines sexuality in a parasitic nematode. *Evolution* **51**: 393-401.

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.

Gilles, T., Fitt, B.D.L., McCartney, H.A., Papastamati, K. & Steed, J.M. 2001. The roles of ascospores and conidia of *Pyrenopeziza brassicae* in light leaf spot epidemics on winter oilseed rape (*Brassica napus*) in the UK. *Annals of Applied Biology* **138**: 141-152.

Gilligan, C.A. 2002. An epidemiological framework for disease management. *Advances in Botanical Research, Vol 38* **38**: 1-64.

Gilligan, C.A. & van den Bosch, F. 2008. Epidemiological models for invasion and persistence of pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 385-418.

Glass, N.L. & Kaneko, I. 2003. Fatal attraction: Nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell* **2**: 1-8.

Gower, C.M. & Webster, J.P. 2005. Intraspecific competition and the evolution of virulence in a parasitic trematode. *Evolution* **59**: 544-553.

Grigg, M.E., Bonnefoy, S., Hehl, A.B., Suzuki, Y. & Boothroyd, J.C. 2001. Success and virulence in toxoplasma as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science* **294**: 161-165.

---

## H

---

Haas, B.J., Kamoun, S., Zody, M.C., Jiang, R.H.Y., Handsaker, R.E., Cano, L.M., Grabherr, M., Kodira, C.D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T.O., Ah-Fong, A.M.V., Alvarado, L., Anderson, V.L., Armstrong, M.R., Avrova, A., Baxter, L., Beynon, J., Boevink, P.C., Bollmann, S.R., Bos, J.I.B., Bulone, V., Cai, G.H., Cakir, C., Carrington, J.C., Chawner, M., Conti, L., Costanzo, S., Ewan, R., Fahlgren, N., Fischbach, M.A., Fugelstad, J., Gilroy, E.M., Gnerre, S., Green, P.J., Grenville-Briggs, L.J., Griffith, J.,

- Grunwald, N.J., Horn, K., Horner, N.R., Hu, C.H., Huitema, E., Jeong, D.H., Jones, A.M.E., Jones, J.D.G., Jones, R.W., Karlsson, E.K., Kunjeti, S.G., Lamour, K., Liu, Z.Y., Ma, L.J., MacLean, D., Chibucos, M.C., McDonald, H., McWalters, J., Meijer, H.J.G., Morgan, W., Morris, P.F., Munro, C.A., O'Neill, K., Ospina-Giraldo, M., Pinzon, A., Pritchard, L., Ramsahoye, B., Ren, Q.H., Restrepo, S., Roy, S., Sadanandom, A., Savidor, A., Schornack, S., Schwartz, D.C., Schumann, U.D., Schwessinger, B., Seyer, L., Sharpe, T., Silvar, C., Song, J., Studholme, D.J., Sykes, S., Thines, M., van de Vondervoort, P.J.I., Phuntumart, V., Wawra, S., Weide, R., Win, J., Young, C., Zhou, S.G., Fry, W., Meyers, B.C., van West, P., Ristaino, J., Govers, F., Birch, P.R.J., Whisson, S.C., Judelson, H.S. & Nusbaum, C. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**: 393-398.
- Hadany, L. & Comeron, J.M. 2008. Why Are Sex and Recombination So Common? In: *Year in Evolutionary Biology 2008*, Vol. 1133, pp. 26-43. Blackwell Publishing, Oxford.
- Hamilton, W.D. 1964. The genetic evolution of social behavior. *Journal of Theoretical Biology* **7**: 1-16.
- Hammerschmidt, R. 2006. Hemibiotrophic growth: Combining two forms of fungal parasitism. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **69**: 1-2.
- Hannukkala, A.O., Kaukoranta, T., Lehtinen, A. & Rahkonen, A. 2007. Late-blight epidemics on potato in Finland, 1933-2002; increased and earlier occurrence of epidemics associated with climate change and lack of rotation. *Plant Pathology* **56**: 167-176.
- Hardin, G. 1968. The tragedy of the commons. *Science* **162**: 1243-1248.
- Hemmes, D.E. 1988. Cytology of *Phytophthora*. In: *Phytophthora - its biology, taxonomy, ecology, and pathology* (D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia & P. H. Tsao, eds). American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota.
- Howard, R.S. & Lively, C.M. 2002. The Ratchet and the Red Queen: the maintenance of sex in parasites. *Journal of Evolutionary Biology* **15**: 648-656.

## I-J

- Imhoof, B. & Schmid-Hempel, P. 1998. Single-clone and mixed-clone infections versus host environment in *Crithidia bombi* infecting bumblebees. *Parasitology* **117**: 331-336.
- Isaac, S. 1992. *Fungal-plant interaction*. Chapman and Hall, London.
- Jager, I. & Schjorring, S. 2006. Multiple infections: Relatedness and time between infections affect the establishment and growth of the cestode *Schistocephalus solidus* in its stickleback host. *Evolution* **60**: 616-622.
- Janzac, B., Montarry, J., Palloix, A., Navaud, O. & Moury, B. 2010. A Point Mutation in the Polymerase of Potato virus Y Confers Virulence Toward the Pvr4 Resistance of Pepper and a High Competitiveness Cost in Susceptible Cultivar. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 823-830.
- Johnson, R. 1984. A critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **22**: 309-330.
- Jolivet, E. 1969. Physiologie de la tubérisation. *Annales de Physiologie Végétale* **11**: 265-301.
- Judelson, H.S. 1997. The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge. *Fungal Genetics and Biology* **22**: 65-76.
- Judelson, H.S. & Blanco, F.A. 2005. The spores of *Phytophthora*: Weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 47-58.

---

**K**

---

- Klarfeld, S., Rubin, A. & Cohen, Y. 2009. Pathogenic fitness of oosporic progeny isolates of *Phytophthora infestans* on late-blight-resistant tomato lines. *Plant Disease* **93**: 947-953.
- Ko, W.H. & Kunimoto, R.K. 1981. Hormone production and reception among different isolates of *Phytophthora parasitica* and *Phytophthora palmivora*. *Mycologia* **73**: 440-444.
- Ko, W.H. 1988. Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 57-73.
- Ko, W.H. 2007. Hormonal regulation of sexual reproduction in *Phytophthora*. *Botanical Studies* **48**: 365-375.
- Kochin, B.F., Bull, J.J. & Antia, R. 2010. Parasite Evolution and Life History Theory. *Plos Biology* **8**.
- Koella, J.C. & Antia, R. 1995. Optimal pattern of replication and transmission for parasites with 2 stages in their life-cycle. *Theoretical Population Biology* **47**: 277-291.
- Kondrashov, A.S. 1993. Classification of hypotheses on the advantage of amphimixis. *Journal of Heredity* **84**: 372-387.
- Koskella, B., Giraud, T. & Hood, M.E. 2006. Pathogen relatedness affects the prevalence of within-host competition. *American Naturalist* **168**: 121-126.

---

**L**

---

- Laguerre, C., Poulin, R. & Keeney, D.B. 2009. Effects of clonality in multiple infections on the life-history strategy of the trematode *Coitocaecum parvum* in its amphipod intermediate host. *Evolution* **63**: 1417-1426.
- Large, E.C. 1940. *The advance of the fungi*. Dover Publications Inc., New York.
- Lebreton, L. & Andrivon, D. 1998. French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 583-594.
- Lefèvre, T., Renaud, F., Selosse, M.-A. & Thomas, F. 2010. Evolution des interactions entre espèces. In: *Biologie évolutive* (F. Thomas, T. Lefèvre & M. Raymond, eds). De Boeck Université, Bruxelles.
- Lenormand, T., Roze, D., Cheptou, P.-O. & Maurice, S. 2010. L'évolution du sexe: un carrefour pour la biologie évolutive. In: *Biologie évolutive* (F. Thomas, T. Lefèvre & M. Raymond, eds). De Boeck Université, Bruxelles.
- Lively, C.M. 2001. Parasite-host interactions. In: *Evolutionary ecology* (C. W. Fox, D. A. Roff & D. J. Fairbairn, eds). Oxford University Press, New York.
- Lo-Pelzer, E., Bousset, L., Jeuffroy, M.H., Salam, M.U., Pinochet, X., Boillot, M. & Aubertot, J.N. 2010. SIPPOM-WOSR: A Simulator for Integrated Pathogen POPulation Management of phoma stem canker on Winter OilSeed Rape I. Description of the model. *Field Crops Research* **118**: 73-81.
- Loegering, W.Q. 1978. Current concepts in interorganismal genetics. *Annual Review of Phytopathology* **16**: 309-320.
- 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.
- López-Villavicencio, M., Courjol, F., Gibson, A.K., Hood, M.E., Jonot, O., Shykoff, J. & Giraud, T. 2010. Competition, cooperation among kin, and virulence in multiple infections. *Evolution*.

---

**M**

---

- Madden, L.V., Hughes, G. & van den Bosch, F. 2007. *The study of plant disease epidemics*. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota.
- Magalon, H., Nidelet, T., Martin, G. & Kaltz, O. 2010. Host growth conditions influence experimental evolution of life history and virulence of a parasite with vertical and horizontal transmission. *Evolution* **64**: 2126-2138.
- May, R.M. & Anderson, R.M. 1983. Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **219**: 281-313.
- May, R.M. & Nowak, M.A. 1995. Coinfection and the evolution of parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **261**: 209-215.
- Maynard Smith, J. 1964. Group selection and kin selection. *Nature* **201**: 1145-1147.
- Maynard Smith, J. 1971. What use is sex? *Journal of Theoretical Biology* **30**: 319-335.
- Maynard Smith, J. 1978. *The evolution of sex*. Cambridge University press, Cambridge.
- Maynard Smith, J. 1989. Why sex? In: *Did Darwin get it right?*, pp. 165-179. Chapman and Hall, New York.
- McDonald, B.A. & Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349-+.
- Mennerat, A., Nilsen, F., Ebert, D. & Skorpung, A. 2010. Intensive Farming: Evolutionary Implications for Parasites and Pathogens. *Evolutionary Biology* **37**: 59-67.
- Michalakakis, Y., Charmentier, A., Gaillard, J.M., Sorci, G., Tully, T. & Ronce, O. 2010. Evolution des traits d'histoire de vie. In: *Biologie Evolutive* (F. Thomas, T. Lefèvre & M. Raymond, eds). De Boeck Université, Bruxelles.
- Michelmore, R.W. & Ingram, D.S. 1980. Heterothallism in *Bremia lactucae*. *Transactions of the British Mycological Society* **75**: 47-56.
- Michod, R.E., Bernstein, H. & Nedelcu, A.M. 2008. Adaptive value of sex in microbial pathogens. *Infection Genetics and Evolution* **8**: 267-285.
- 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.
- Mideo, N. & Day, T. 2008. On the evolution of reproductive restraint in malaria. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **275**: 1217-1224.
- Mideo, N. 2009. Parasite adaptations to within-host competition. *Trends in Parasitology* **25**: 261-268.
- Miller, J.S. & Johnson, D.A. 2000. Competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates under semiarid field conditions. *Phytopathology* **90**: 220-227.
- Mogie, M. & Ford, H. 1988. Sexual and asexual *Taraxacum* species. *Biological Journal of the Linnean Society* **35**: 155-168.
- 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.

Montarry, J., Andrivon, D., Glais, I., Corbiere, R., Mialdea, G. & Delmotte, F. 2010a. Microsatellite markers reveal two admixed genetic groups and an ongoing displacement within the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Ecology* **19**: 1965-1977.

Montarry, J., Hamelin, F.M., Glais, I., Corbi, R. & Andrivon, D. 2010b. Fitness costs associated with unnecessary virulence factors and life history traits: evolutionary insights from the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *Bmc Evolutionary Biology* **10**.

Mousseau, T.A. & Roff, D.A. 1987. Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity* **59**: 181-197.

Muller, H. 1964. The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research* **1**: 2-9.

## N

---

Newton, M.R., Wright, A.S., Kinkel, L.L. & Leonard, K.J. 1999. Competition alters temporal dynamics of sporulation in the wheat stem rust fungus. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* **147**: 527-534.

Nidelet, T., Koella, J.C. & Kaltz, O. 2009. Effects of shortened host life span on the evolution of parasite life history and virulence in a microbial host-parasite system. *Bmc Evolutionary Biology* **9**.

Nowak, M.A. & May, R.M. 1994. Superinfection and the evolution of parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **255**: 81-89.

## O-P

---

Olaya, G. & Abawi, G.S. 1994. Influence of inoculum type and moisture on development of *Rhizoctonia solani* on foliage of table beets. *Plant Disease* **78**: 805-810.

Otto, S.P. 2003. The advantages of segregation and the evolution of sex. *Genetics* **164**: 1099-1118.

Palloix, A., Ayme, V. & Moury, B. 2009. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist* **183**: 190-199.

Pariaud, B., Ravigne, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J. & Lannou, C. 2009a. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology* **58**: 409-424.

Pariaud, B., Robert, C., Goyeau, H. & Lannou, C. 2009b. Aggressiveness Components and Adaptation to a Host Cultivar in Wheat Leaf Rust. *Phytopathology* **99**: 869-878.

Parlevliet, J.E. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology* **17**: 203-222.

Pasco, C., Marquer, B., Douchy, H., Magalon, H. & Andrivon, D. 2008. Aggressiveness and transmission: does a correlation exist in *P. infestans*? *Euroblight Workshop*. H. T. A. M. Shepers, Applied Plant research, Wageningen. Hamar, Norway.

Pedersen, W.L. & Leath, S. 1988. Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. *Annual Review of Phytopathology* **26**: 369-378.

Pigliucci, M. 2001. *Phenotypic plasticity - beyond nature and nurture*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Pink, D.A.C. 2002. Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica* **124**: 227-236.

Pittis, J.E. & Shattock, R.C. 1994. Viability, germination and infection potential of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* **43**: 387-396.

Pollitt, L.C., Mideo, N., Drew, D.R., Schneider, P., Colegrave, N. & Reece, S.E. 2011. Competition and the Evolution of Reproductive Restraint in Malaria Parasites. *American Naturalist* **177**: 358-367.

Pringle, A. & Taylor, J.W. 2002. The fitness of filamentous fungi. *Trends in Microbiology* **10**: 474-481.

## R

Radtke, W. & Rieckmann, W. 1991. *Maladies et ravageurs de la pomme de terre*. Th Mann, Gelsenkirchen-Buer.

Read, A.F. & Taylor, L.H. 2001. The ecology of genetically diverse infections. *Science* **292**: 1099-1102.

Reboud, X. & Sicard, D. 2010. Evolution expérimentale. In: *Biologie évolutive*. De Boeck University, Bruxelles.

Reznick, D.N., Shaw, F.H., Rodd, F.H. & Shaw, R.G. 1997. Evaluation of the rate of evolution in natural populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Science* **275**: 1934-1937.

Riley, M.A. & Gordon, D.M. 1999. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology* **7**: 129-133.

Robertson, N.F. 1991. The Challenge of *Phytophthora infestans*. In: *Phytophthora infestans, the cause of late blight of potato*, Vol. 7 (D. S. Ingram & P. H. Williams, eds). Academic press, London.

Roff, D.A. 1992. *The evolution of life histories: theory and analysis*, Chapman and Hall edn, New York.

Rolland, M., Kerlan, C. & Jacquot, E. 2009. The acquisition of molecular determinants involved in potato virus Y necrosis capacity leads to fitness reduction in tobacco plants. *Journal of General Virology* **90**: 244-252.

Rossignol, L. & Rousselle-Bourgeois, F. 1996. Botanique, morphologie et taxonomie. In: *La pomme de terre* (P. Rousselle, Y. Robert & J. C. Crosnier, eds). INRA, Paris.

Ryley, M.J., Herde, D.J., Bhuiyan, S.A., Henzell, R.G. & Jordan, D.R. 2003. *An overview of the biology of sorghum ergot*. Iowa State Univ Press, Ames.

## S

Salathe, M., Kouyos, R.D. & Bonhoeffer, S. 2008. The state of affairs in the kingdom of the Red Queen. *Trends in Ecology & Evolution* **23**: 439-445.

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**.

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.

Shattock, R.C., Tooley, P.W. & Fry, W.E. 1986. Genetics of *Phytophthora infestans* - Characterization of single oospore cultures from A1 isolates induced to self by intraspecific stimulation. *Phytopathology* **76**: 407-410.

Shaw, D.S., Fyfe, A.M., Hibberd, P.G. & Abdelsattar, M.A. 1985. Occurrence of the rare A2 mating type of *Phytophthora infestans* on imported Egyptian potatoes and the production of sexual progeny with A1 mating types from the UK. *Plant Pathology* **34**: 552-556.

Smith, T. 1904. Some problems in the life-history of pathogenic microorganism. *Science* **20**: 817-832.

Spielman, L.J., Drenth, A., Davidse, L.C., Sujkowski, L.J., Gu, W., Tooley, P.W. & Fry, W.E. 1991. A second worldwide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* **40**: 422-430.

Spire, D. & Rousselle, P. 1996. Origine socio-historique. In: *La pomme de terre* (P. Rousselle, Y. Robert & J. C. Crosnier, eds). INRA, Paris.

St Clair, D.A. 2010. Quantitative Disease Resistance and Quantitative Resistance Loci in Breeding. In: *Annual Review of Phytopathology, Vol 48*, Vol. 48 (N. K. vanAlfen, G. Bruening & J. E. Leach, eds), pp. 247-268. Annual Reviews, Palo Alto.

Stearns, S.C. 1992. *The Evolution Of Life Histories*, Oxford University Press edn, New York.

Stearns, S.C. & Koella, J.C. 2008. *Evolution in health and disease*. Oxford University Press, Oxford.

Stromberg, A., Bostrom, U. & Hallenberg, N. 2001. Oospore germination and formation by the late blight pathogen *Phytophthora infestans* in vitro and under field conditions. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* **149**: 659-664.

## T

---

Taylor, L.H., Mackinnon, M.J. & Read, A.F. 1998. Virulence of mixed-clone and single-clone infections of the rodent malaria *Plasmodium chabaudi*. *Evolution* **52**: 583-591.

Thomas, F., Lefèvre, T. & Raymond, M. 2010. *Biologie évolutive*. De Boeck Université, Bruxelles.

Tivoli, B. & Banniza, S. 2007. Comparison of the epidemiology of ascochyta blights on grain legumes. *European Journal of Plant Pathology* **119**: 59-76.

Turner, P.E. & Chao, L. 1999. Prisoner's dilemma in an RNA virus. *Nature* **398**: 441-443.

## V

---

van Baalen, M. & Sabelis, M.W. 1995. The dynamics of multiple infection and the evolution of virulence. *American Naturalist* **146**: 881-910.

van den Berg, F., Bacaer, N., Metz, J.A.J., Lannou, C. & van den Bosch, F. 2011. Periodic host absence can select for higher or lower parasite transmission rates. *Evolutionary Ecology* **25**: 121-137.

van der Plank, J.E. 1963. *Plant diseases: epidemics and control*. Academic Press, New York.

van der Plank, J.E. 1968. *Disease resistance in plants*. Academic Press (New-York - USA).

van Valen, L. 1973. A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* **1**: 1-30.

van West, P. & Vleeshouwers, V.G.A.A. 2004. The *Phytophthora infestans*–potato interaction. In: *Plant-pathogen interactions* (N. J. Talbot, ed. Blackwell Publishing Ltd Oxford).

Victoir, K. & Dujardin, J.C. 2002. How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. *Trends in Parasitology* **18**: 81-+.

---

## W

---

Waard, M.A., Georgopoulos, S.G., Hollomon, D.W., Ishii, H., Leroux, P., Ragsdale, N.N. & Schwinn, F.J. 1993. Chemical Control of Plant Diseases: Problems and Prospects. *Annual Review of Phytopathology* **31**: 403-421.

Wargo, A.R., de Roode, J.C., Huijben, S., Drew, D.R. & Read, A.F. 2007. Transmission stage investment of malaria parasites in response to in-host competition. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **274**: 2629-2638.

Wastie, R.L. 1991. Breeding for resistance. In: *Advances in plant pathology - Phytophthora infestans, the cause of late blight of potato* (D. S. Ingram & P. H. Williams, eds). Academic press, London.

Watson, I.A. 1970. Changes in virulence and population shifts in plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **8**.

West, S.A., Griffin, A.S. & Gardner, A. 2007. Evolutionary explanations for cooperation. *Current Biology* **17**: R661-R672.

Widmark, A.K. 2010. The late blight pathogen, *Phytophthora infestans*: Interaction with the potato plant and inoculum sources, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.

Widmer, T.L. 2009. Infective Potential of Sporangia and Zoospores of *Phytophthora ramorum*. *Plant Disease* **93**: 30-35.

Williams, G.C. 1975. *Sex and evolution*. Princeton University Press, Princeton.

Williams, P.H. 1992. Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* **14**: 30-35.

---

## Y-Z

---

Yang, Y.O. & Gabriel, D.W. 1995. Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution of new host specificities. *Journal of Bacteriology* **177**: 4963-4968.

Zhan, J., Mundt, C.C. & McDonald, B.A. 2007. Sexual reproduction facilitates the adaptation of parasites to antagonistic host environments: Evidence from empirical study in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* system. *International Journal for Parasitology* **37**: 861-870.

Zhang, P., Sandland, G.J., Feng, Z., Xu, D. & Minchella, D.J. 2007. Evolutionary implications for interactions between multiple strains of host and parasite. *Journal of Theoretical Biology* **248**: 225-240.

