N° d'ordre :

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET ENVIRONNEMENTS (ED304)

POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : ÉCOLOGIE ÉVOLUTIVE, FONCTIONNELLE ET DES COMMUNAUTÉS

Sujet :

Conséquences de l'incompatibilité végétative et de l'infection virale sur l'écologie et l'évolution de l'interaction *Cryphonectria parasitica* × Cryphonectria Hypovirus

par

Jérémie BRUSINI

Soutenue publiquement le 9 juillet 2009, devant le jury composé de :

Michel LANGLAIS, Professeur, Université Bordeaux 2	Examinateur
Jacqui SHYKOFF, Directrice de Recherche, Université Paris-Sud 11	Rapporteur
Daniel RIGLING, Senior Lecturer, WSL, Suisse	Rapporteur
Sven SAUPE, Directeur de Recherche, Université Bordeaux 2	Examinateur
Alain FRANC, Directeur de Recherche, INRA Bordeaux	Directeur de thèse
Cécile ROBIN, Chargée de Recherche, INRA Bordeaux	Co-directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants Alain Franc et Cécile Robin sans lesquels cette thèse n'aurait pas pu se réaliser. Je vous suis particulièrement reconnaissant de m'avoir guidé tout en me laissant une grande liberté dans la façon d'aborder les problématiques développées au cours de cette thèse. (Avec un merci spécial pour Cécile qui m'a fait découvrir le monde merveilleux du Crypho !!!)

Merci également à Cyril Dutech pour ses nombreux conseils et les discussions que nous avons pu avoir qui m'ont souvent permis d'avoir un regard différent sur l'idée que je me faisais de mon modèle biologique.

Un grand merci à Olivier Fabreguettes, Martine Martin et Xavier Capdevielle pour l'aide que vous avez apporté à mon travail et pour avoir supporté mon coté "bordélique" avec une relative bonne humeur (ça c'est pour Martine), pour avoir eu avec moi de passionnantes discussions footballistiques et sur les nouvelles stagiaires vues à la cantine (là c'est Olivier) et pour m'avoir fait découvrir son ptit coin des Pyrénées et le fromage allant avec (et ici c'est pour Xavier).

Merci au autres membres de l'équipe de Pathologie forestière, Amira Mougou (élue meilleure voisine de bureau) Brigitte Lung, Corinne Vacher, Jacqueline Lemoine, Marie-Laure Desprez-Loustau, Gilles Saint-Jean, Simone Prospero, Thibaut Decourcelle et Tristan Cordier qui pendant ces 4 ans (en fait 3 ans et 8 mois !!) ont été comme une seconde famille pour moi.

Merci aux membres de la brillante équipe de volley-ball de l'INRA de Bordeaux : Alain K.(dit Kiki), Alain M., Fabien, Gilles, Josselin, Laurent, Patrice, Sylvain, Tovo. Bien que maintenant je porterais les couleurs de l'Université de Floride, je n'oublierais jamais mon

club formateur ;).

Merci à tous ceux qui m'ont rendu mon séjour à Bordeaux plus agréable : Alex, Andry, Amandine, Benoît (aux chiottes l'OM !!), Boris, Cédric (dit le Grantoumou), Doudou, Forough, François, Frédérique, Gaëlle, Heather, Jean-Yves, Landry, Julen, Mélanie, Nathalie, Louise, Lucie, Séverine, Stéphanie, Virginie (d'Ephyse), Virginie (de SV), Xavier G. et à tous les gens de Santé Végétale, Ephyse et Biogeco.

Un grand merci à Tovo (pour le français) et Stéphanie (pour l'anglais) pour les corrections que vous avez apporté à mon manuscrit (avec un merci spécial à Tovo pour ton amitié qui m'a été précieuse).

Merci à mes parents Marie-Paule et Jean-René. Je vous ne le dis pas souvent mais je pense que vous savez à quel point je tiens à vous. Merci à ma petite soeur Perrine en espérant que tu fasses mieux que ton grand frère. Merci aussi à mes grands-parents Simone et Marcel (pour lesquels je pense pouvoir joindre ceux des membres de la pathologie forestière et de SV pour les gâteaux !) et à toute ma famille (avec une petite pensée pour Jean).

Table des matières

1 Introduction Générale **1**

1.1 L'incompatibilité végétative 1

1.1.1 Lien avec les autres systèmes de reconnaissance du soi 1

1.1.2 Description du processus de mort cellulaire 2

1.1.3 Déterminisme génétique 4

1.1.4 Question des pressions de sélection 6

1.2 Les DCE 6

1.2.1 Leur transmission 6

1.2.2 DCE et diversité en GCV : qui fait évoluer qui ? 9

1.3 *C. parasitica* et le CHV 12

1.3.1 *Cryphonectria parasitica* 12

1.3.1.1 Cycle biologique 13

1.3.1.2 Diversité en GCV 14

1.3.2 Cryphonectria Hypovirus 16

1.3.3 Diversité en GCV et en sous-types viraux en France 18

1.4 Problématiques abordées 19

2 L'évolution de la réconnaissance du soi **23**

2.1 Introduction 25

2.2 To fuse 30

2.3 ...or not to fuse 33

2.4 Somatic incompatibility, multicellularity and the concept of individuality . 37

2.5 References 40

3 Pression parasitaire et maintien de la diverisité en GCV 51

3.1 Étude de la transmission inter GCV du CHV-1 en conditions naturelles . . 51

3.1.1 Introduction 51

3.1.2 Matériels et Méthodes 52

3.1.2.1 Transmission sur tige de châtaignier 52

3.1.2.2 Transmission en population naturelle 54

3.1.3 Résultats 55

3.1.3.1 Transmission sur tige de châtaignier 55

3.1.3.2 Transmission en population naturelle 55

3.1.4 Discussion 59

3.2 Etude du lien de cause à effet entre virulence des DCE et diversité en GCV 63

3.2.1 Introduction 65

3.2.2 Material and method 67

3.2.3 Results 69

3.2.4 Discussion 72

3.2.5 Conclusion 78

3.2.6 References 80

3.2.7 Annex 87

4 Évolution de la virulence du CHV-1 89

4.1 Introduction 90

4.2 Material and Method 93

4.3 Results 96

4.4 Discussion 101

4.5 References 106

5 Discussion générale 113

5.1 Interaction champignon/DCE et diversité génétique de la population d'hôte.113

5.1.1 Rôle des DCE sur la diversité en GCV 114

5.1.1.1 sur un hôte asexué : une boucle de rétroaction 114
5.1.1.2 et sur un hôte sexué ? 115
5.1.1.3 Rôle des DCE sur la diversité au sein du GCV 116
5.1.2 Diversité de la population hôte et évolution des DCE 117
5.1.2.1 Rôle de la diversité en GCV sur l'évolution des DCE . . . 117
5.1.2.2 le cas particulier des éléments cytoplasmiques délétères . . 118
5.2 L'évolution de la virulence des populations de CHV-1 119
5.2.1 Le modèle du trade-off hypothesis 119
5.2.2 Les virus CHV-1 du sous-type F : un exemple de parasites qui obéissent au trade-off ? 120
5.2.3 Les virus CHV-1 de sous-type I : virulence ou phénotype étendu ? . 122
5.2.4 Existence et rôle de coinfections multiples et compétition entre sous-types 124
5.3 Conclusion 126

6 Bibliographie **127**

Chapitre 1

Introduction Générale

Le thème central de cette thèse est l'étude d'un système hote-parasite consistant en un champignon ascomycète *Cryphonectria parasitica* et son virus Cryphonectria Hypovirus transmis lors de fusions somatiques. Le but de de ce travail est de comprendre en quoi la relation qui semble exister entre pression parasitaire et diversité des gènes impliqués dans l'incompatibilité végétative des champignons influe sur l'écologie et l'évolution de la relation hôte-parasite.

1.1 L'incompatibilité végétative

1.1.1 Lien avec les autres systèmes de reconnaissance du soi

L'incompatibilité végétative est un système de contrôle de la fusion somatique entre conspécifiques chez les champignons (Todd et Rayner, 1980; Leslie, 1993; Esser et Blaich, 1994; Malik et Vilgalys, 1999), qui a été décrit chez toutes les espèces d'Eumycètes où il a été cherché (Debets *et al.*, 1994). Ce système permet à chaque mycélium de faire la distinction entre :

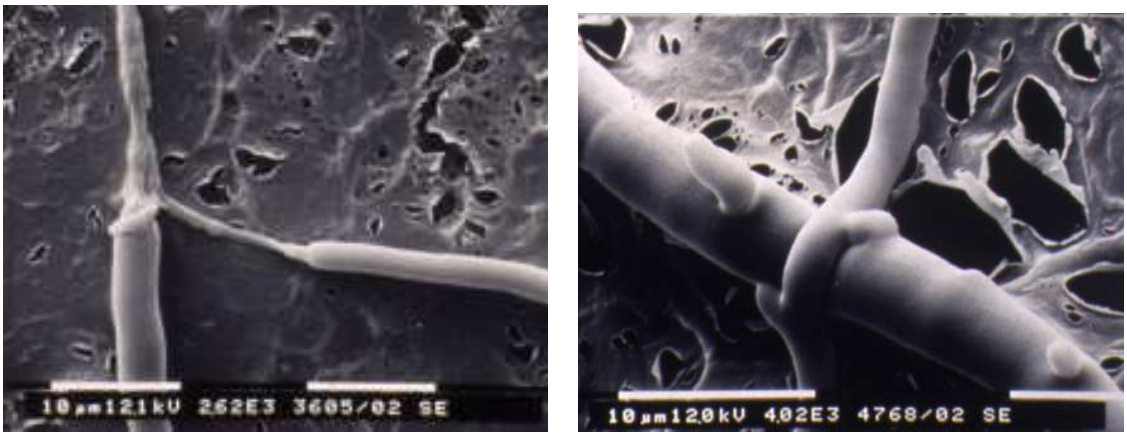
- le soi (c.a.d. le soma produit par l'organisme en question ou par des organismes apparentés), permettant ainsi la formation d'une chimère (hétérocaryion) stable dans le temps, suite à la fusion des deux soma entrés en contact.
- le non-soi (c.a.d. le soma produit par des organismes génétiquement éloignés) dé-

bouchant sur le rejet de la fusion somatique.

Même si la distinction entre le soi et le non-soi est répandue dans l'ensemble du vivant (Grosberg, 1988; Leslie, 1993; Tock et Dryden, 2005; Maizels, 2005; Schwessinger et Zipfe, 2008), l'implication biologique du système de reconnaissance du soi peut changer du tout au tout selon l'organisme étudié. En effet, ces systèmes peuvent intervenir en intra-spécifique (entre deux individus de la même espèce), dans la reconnaissance du soma (Grosberg, 1988; Leslie, 1993) ou dans la reconnaissance sexuelle (Kronstad et Staben, 1997; Nasrallah, 2005), mais aussi en inter-spécifique (entre deux individus d'espèces différentes) (Tock et Dryden, 2005; Maizels, 2005; Schwessinger et Zipfe, 2008). Malgré la diversité des fonctions biologiques que présentent les systèmes de reconnaissance du soi, il semblerait que, chez les Eucaryotes, ces systèmes reposent tous sur un fort polymorphisme allélique au niveau d'un ou de plusieurs gènes spécifiques (Richman, 2000) permettant la production de protéines (1) polymorphes entre individus de la même population (2) capables de reconnaître des variants moléculaires et (3) d'initialiser une réponse cellulaire appropriée (Pinan-Lucarré *et al.*, 2007). Chez les champignons, la réponse cellulaire caractéristique de l'activation du système de reconnaissance du soi consiste en l'apoptose (mort cellulaire) des hyphes entrées en contact (Figure 1.1) , ainsi que, parfois des hyphes voisines (Glass et Kaneko, 2003) permettant l'observation à l'échelle macroscopique de la formation d'un barrage d'incompatibilité.

1.1.2 Description du processus de mort cellulaire

La mort cellulaire activée par la fusion entre hyphes incompatibles suit une série d'étapes (présentées dans la Figure 1.2) qui semblent communes à l'ensemble des champignons (Beisson-Schecroun, 1962b; Ainsworth et Rayner, 1986; Aimi *et al.*, 2002b,a; Glass et Kaneko, 2003). La fusion entre mycéliums incompatibles provoque la formation de granules dans le cytoplasme des hyphes entrées en fusion ainsi que la fermeture des pores septaux délimitant, chez les champignons, la cellule cœnocytique. Les échanges cytoplasmiques entre hyphes ayant fusionné et le reste de l'organisme sont alors interrompus. La formation de vacuoles contenant de nombreuses protéases et autres enzymes de dégrada-



(a) (b)

FIGURE 1.1: Photos prises au microscope électronique à balayage montrant le résultat (a) d'une fusion entre hyphes incompatibles ; (b) d'une fusion entre hyphes compatibles. (Photos : C. Scheidegger).

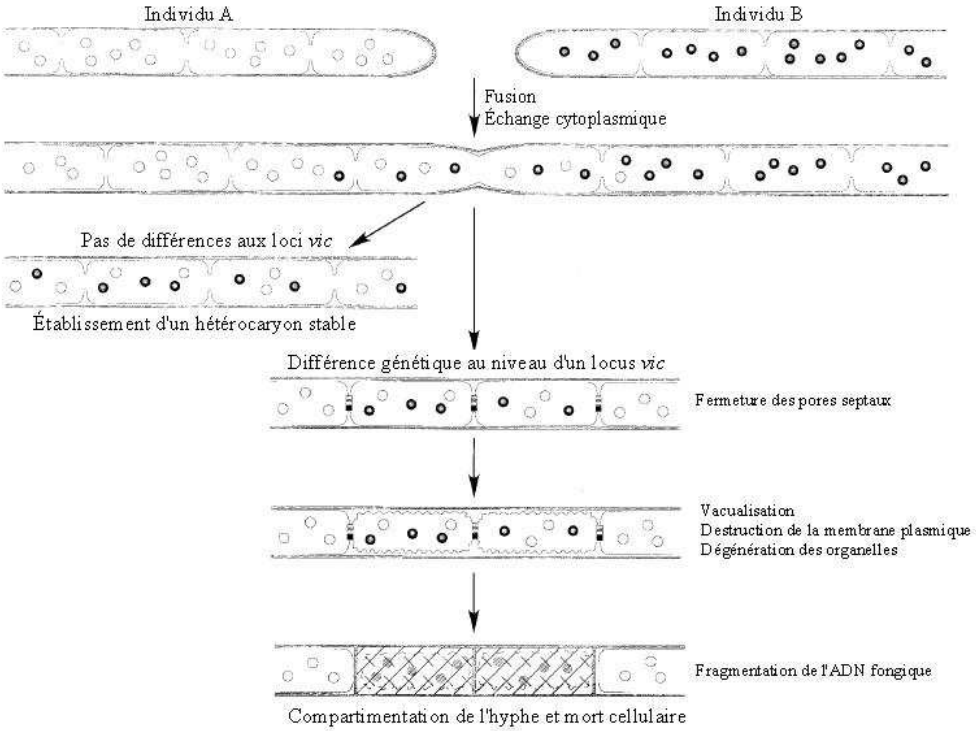


FIGURE 1.2: Représentation des conséquences d'une fusion entre hyphes compatibles ou incompatibles. D'après Glass et Kaneko (2003).

tion est ensuite observée. L'explosion de ces vacuoles et la libération de leurs contenus dans le cytoplasme provoquent la lyse des hyphes concernées. Seulement 30 min peuvent être nécessaires entre le contact entre les hyphes et leur apoptose. Selon Glass et Kaneko (2003), le même processus de mort cellulaire est impliqué dans le phénomène de rejet du non-soi chez toutes les espèces de champignon malgré le fait que différents gènes soient à l'origine de son initialisation. D'ailleurs ces auteurs suggèrent un lien de parenté entre ce mécanisme et le programme de mort cellulaire connu chez les métazoaires multicellulaires.

1.1.3 Déterminisme génétique

Le fait de pouvoir fusionner ou non avec un autre individu est, chez les champignons, déterminé génétiquement. Ce mécanisme de reconnaissance fait intervenir des loci spécifiques appelés loci *het* (pour *het*erokaryon incompatibility) ou loci *vic* (pour *v*egetative *in*compatibility) selon l'organisme étudié. Le second terme étant utilisé chez *C. parasitica*, c'est celui-ci qui servira à designer les loci d'incompatibilité dans ce manuscrit. Un locus *vic* peut être défini comme un locus dont l'héteroallélisme ne peut pas être toléré au sein d'un hétérocaryion (Saupe *et al.*, 2000). Une combinaison spécifique d'allèles des gènes *vic* définit un Groupe de Compatibilité Végétatif (ou GCV). Ainsi, pour que la fusion somatique soit pérenne, il faut que les deux mycéliums appartiennent au même GCV. Lorsque deux champignons génétiquement différents pour un ou plusieurs loci *vic* entrent en contact, l'hyphe hétérocaryotique qui en résulte est plus ou moins rapidement détruite par un processus de mort cellulaire comme cela a été décrit plus haut. Le nombre de ces loci ainsi que leur degré de polymorphisme varient suivant les espèces. Deux stratégies d'augmentation de la diversité génétique de ce système d'incompatibilité semblent avoir évolué : l'un, chez les Basidiomycètes, où la diversité génétique est obtenue via l'existence un fort polymorphisme allélique pour un faible nombre de loci (1 à 4), et l'autre, chez les Ascomycètes présentant un faible polymorphisme allélique (le plus souvent bi-allélique) pour un grand nombre de loci (plus de six chez *C. parasitica* et jusqu'à 17 chez *Podospora anserina*). Chez les Ascomycètes, le déterminisme génétique du système d'incompatibilité végétative a été étudié chez peu d'espèces, principalement : *Neurospora crassa*, *Podospora*

anserina, *Aspergillus nidulans* et *C. parasitica* (Malik et Vilgalys, 1999). Dans la plupart de ces systèmes d'incompatibilité végétative la reconnaissance est de type allélique, c'est à dire que l'interaction concerne des allèles situés au même locus pour les deux protagonistes de la fusion. Cependant, un type de reconnaissance non allélique, impliquant l'interaction de deux gènes situés à des loci différents, a également été décrit chez *P. anserina* (Bernet, 1965).

Les gènes *vic* ont été étudiés plus en détail chez *N. crassa* et *P. anserina* seulement. Il ressort de ces études que les gènes *vic* peuvent coder pour différents types de protéines comme des facteurs de transcriptions ou des protéines de signalisation (Begueret *et al.*, 1994). C'est pourquoi certains auteurs ont proposé que ces mêmes gènes pourraient présenter au sein de la cellules d'autres fonctions que celle de l'incompatibilité végétative (Begueret *et al.*, 1994; Pinan-Lucarré *et al.*, 2007). Malgré la relative proximité phylogénétique entre *N. crassa* et *P. anserina*, aucune homologie entre les gènes *vic* n'a été trouvée entre ces deux espèces d'Ascomycètes. En effet, l'orthologue du gène *het-C* de *N. crassa* chez *P. anserina* ne correspond à aucun des loci *vic* connus chez ce dernier (Saupe *et al.*, 2000). L'inverse semble également être vrai, car les gènes *vic* de *P. anserina* n'ont pas été retrouvés dans les autres génomes de champignons (Pinan-Lucarré *et al.*, 2007). Pour Pinan-Lucarré *et al.* (2007), cette diversité des gènes contrôlant la reconnaissance du soi suggère que ces systèmes ont, chez les champignons, évolué plusieurs fois indépendamment. Cependant des similarités existent malgré tout entre ces gènes qui présentent tous un domaine variable impliqué dans la reconnaissance protéine-protéine ainsi que pour la plus part d'entre eux, un domaine HET (Smith *et al.*, 2000) qui intervient dans le déclenchement du processus de mort cellulaire. Chez *P. anserina*, une famille de gènes appelée HNWD, regroupant au moins six gènes *vic* a pu être identifiée. Des échanges moléculaires entre les domaines variables des membres de cette famille permettraient la génération d'un fort niveau de polymorphisme allélique (Paoletti *et al.*, 2007; Chevanne *et al.*, 2009). Il a d'ailleurs été montré que l'évolution de nouveaux domaines variables au sein de cette famille est soumise à une sélection positive favorisant ainsi l'émergence de nouveaux allèles (Paoletti *et al.*, 2007). Ceci laisse supposer que de fortes pressions de sélection agissent

en faveur de l'évolution du polymorphisme des gènes *vic* chez les champignons. Cette hypothèse est renforcée par l'observation de signatures d'une sélection équilibrante (en anglais : balancing selection) agissant sur le locus *het-C* chez *N. crassa* (Wu *et al.*, 1998).

1.1.4 Question des pressions de sélection

Se pose donc la question des pressions de sélection agissant pour maintenir cette diversité et donc de la signification biologique du phénomène de mort cellulaire entre hyphes incompatibles. En fait, la question du maintien du polymorphisme allélique dans les systèmes de reconnaissance du soi en général a suscité l'intérêt de nombreux biologistes qui ont cherché comment et pourquoi une telle diversité allélique pouvait être maintenue par la sélection naturelle (Wright, 1939; Bodmer, 1972; Hedrick, 1972; Buss, 1982; Grosberg, 1988; Nauta et Hoekstra, 1994; Deboer, 1995). Chez les champignons, les deux principales hypothèses concernant la force évolutive responsable de l'évolution de l'incompatibilité végétative sont :

- la compétition entre lignées cellulaire au sein de l'hérérocaryion (Buss, 1982; Debets *et al.*, 1994).
- la transmission lors des fusions somatiques de parasites cytoplasmiques (éléments cytoplasmiques délétères) (Caten, 1972; Hartl *et al.*, 1975; Nauta et Hoekstra, 1994).

C'est la seconde hypothèse que nous proposons d'étudier dans le cadre de cette thèse par l'étude du cas particulier de *C. parasitica* et de son virus (Cryphonectria Hypovirus) transmis lors de fusions somatiques.

1.2 Les éléments cytoplasmiques délétères

1.2.1 Leur transmission

Les éléments cytoplasmiques délétères (ou DCE), incluant les mitochondries délétères (Bertrand, 2000), les plasmides délétères (Griffiths, 1995) ainsi que les virus (Ghabrial, 1998) sont communs chez les champignons. La plupart de ces éléments cytoplasmiques peuvent être transmis verticalement (du parent à la descendance) et horizontalement



FIGURE 1.3: Effet du système d'incompatibilité végétative de *C. parasitca* sur la transmission d'un CHV. A gauche, les isolats sont de GCV différents : le CHV n'est pas transmis, le mycelium de l'isolat sain garde sa couleur orange. A droite, les isolats sont de même GCV, la dépigmentation observée de l'isolat sain (caractéristique d'une infection par le CHV) indique que le CHV transmis.

(entre individus au sein de la population sans faire intervenir la reproduction de l'hôte). La transmission verticale peut se faire via les spores issues de la reproduction asexuée (conidies) de leur hôte ou celles issues de la reproduction sexuée (ascospores des Ascomycètes) (Milgroom, 1999). Les DCE ne présentent pas de phases libres, les échanges de cytoplasme lors de contacts entre hyphes constituent donc leur seule possibilité de transmission horizontale (Milgroom, 1999). Hoegger *et al.* (2003) ont réalisé un suivi de la propagation d'un DCE (Cryphonectria Hypovirus) et d'une mitochondrie d'un isolat de *C. parasitica* après son introduction dans une population naturelle du champignon. Deux ans après cette introduction, le virus et le génotype mitochondrial étaient retrouvés dans un tiers des individus de la population de champignon. Cette étude illustre l'efficacité de la propagation des DCE, malgré l'absence de phase libre et la nécessité de contacts mycéliens pour se transmettre.

Cependant, cette étude peut être difficilement généralisable à l'ensemble des systèmes champignon/DCE, car la population de *C. parasitica* étudiée par Hoegger *et al.* (2003), est constituée d'un seul GCV. Or les systèmes d'incompatibilité végétative des champignons agissent comme une barrière sur la transmission des DCE (Figure 1.3) . La mort cellulaire initialisée par la présence dans le même cytoplasme de protéines codées par des gènes *vic* incompatibles limiterait la transmission horizontale de DCE (Liu et Milgroom, 1996;

Cortesi et Milgroom, 1998). Comme l'infection par un DCE provoque une baisse de la fitness de l'hôte, la pression parasitaire exercée par ces DCE pourrait être le moteur de l'évolution de la diversité allélique des gènes *vic* chez les champignons (Caten, 1972). Le principe de cette hypothèse est qu'un champignon de GCV rare aura moins de possibilité de fusionner avec un autre individu de la population et, donc, aura moins de risques d'être infecté par un DCE au contraire des champignons de GCV fréquent. Les allèles rares seraient donc favorisés au niveau des gènes *vic*, au contraire des allèles fréquents. Nauta et Hoekstra (1994) ont d'ailleurs montré à l'aide d'un modèle théorique qu'un parasite cytoplasmique pouvait effectivement être une pression de sélection suffisante pour l'évolution d'un système d'incompatibilité végétative.

Cependant, l'imperméabilité du système d'incompatibilité ne semble pas totale. Par exemple, alors que la fréquence de transmission du virus de *C. parasitica*, Cryphonectria Hypovirus (ou CHV) est de 1 entre deux mycéliums de même GCV, cette fréquence de transmission est de 0.49 entre des GCV différant d'un seul gène *vic*. Lorsque cette différence est supérieure à 2 gènes *vic*, la fréquence de transmission du CHV reste encore possible (proche de quelques centièmes) (Liu et Milgroom, 1996). Donc, même si l'incompatibilité végétative nuit fortement à la transmission horizontale des DCE, elle ne représente pas une barrière imperméable. D'ailleurs, de nombreuses études font état de transmissions de DCE entre GCV : pour une mitonchondrie délétère chez *C. parasitica* (Baidyaroy *et al.*, 2000a) et chez *N. crassa* (Debets *et al.*, 1994), pour le virus D-factor d'*Ophiostoma novo-ulmi* (Brasier, 1984) et pour des plasmides chez *P. anserina* (Gaag *et al.*, 1998). De plus, il a été montré que certains gènes *vic*, bien que contrôlant le succès ou le rejet de la fusion, n'ont que très peu d'effets sur la transmission du DCE (Biella *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2006). En fait, il semblerait exister une fenêtre de temps plus ou moins étroite, suivant le nombre et la nature des gènes *vic* pressentant une différence allélique (Cortesi *et al.*, 2001), durant laquelle les DCE peuvent se transmettre. Cette fenêtre correspondrait au laps de temps nécessaire pour que les hyphes fusionnées meurent par apoptose (ou que leur pores septaux se ferment) (Biella *et al.*, 2002).

La barrière constituée par l'incompatibilité végétative apparaît donc plus comme un

mur fissuré permettant le passage (à plus ou moins faible fréquence) des DCE qu'une véritable barrière imperméable à leur transmission. Or l'ensemble des études faites sur le maintien du polymorphisme des loci *vic* par les DCE est basé sur cette imperméabilité de transmission entre GCV (Hartl *et al.*, 1975; Nauta et Hoekstra, 1994). Car même si les possibilités de transmissions sont faibles entre GCV différents, il suffit d'un seul évènement de transmission pour que tous les individus d'un même GCV soient rapidement infectés. De plus, les résultats de transmission inter-GCV cités plus haut ont tous été réalisés *in vitro*, sur milieu gélosé riche en substances nutritives. La réalité de la transmission des DCE en milieu naturel est donc grandement inconnue. Ceci a été mis en évidence par les résulats de Carbone *et al.* (2004) qui suggèrent, via l'estimation de la transmission du CHV entre GCV par un modèle de coalescence, que les données de transmission *in vitro* sous-estiment la réalité de la transmission de ce DCE dans les population naturelles de *C. parasitica*. **L'étude d'autres populations de champignons et de leur DCE associés apparaît donc nécessaire afin d'avoir une meilleure idée de la réalité de la transmission des DCE en conditions naturelles.**

L'apparente inefficacité des systèmes d'incompatibilité végétative pour garantir une protection totale contre l'infection par des DCE ne semble pas aller dans le sens de l'hypothèse d'une évolution de ce système en réponse à une pression de sélection exercée par des parasites cytoplasmiques. En effet, comment expliquer que les DCE soient la force évolutive à l'origine de la diversité en GCV si la barrière d'incompatibilité est perméable à la transmission de ces parasites ? **Il apparaît donc nécessaire de prendre en compte cette perméabilité dans l'étude des systèmes champignon/DCE afin d'étudier si elle remet vraiment en cause l'hypothèse d'un maintien de la diversité allélique des gènes *vic* des champignons par la pression exercée par des parasites transmis lors de fusions somatiques.**

1.2.2 DCE et diversité en GCV : qui fait évoluer qui ?

La pression parasitaire qu'exerce un parasite sur sa population d'hôte est fonction de sa virulence (baisse de la fitness de l'hôte liée à l'infection par le parasite). Or de nombreuses

études théoriques (Levin et Pimental, 1981; Anderson et May, 1982; Ewald, 1983; Lipsitch *et al.*, 1995, 1996; Frank, 1996a; Gandon, 2004) et expérimentales (Bull *et al.*, 1991; Ebert, 1994; Messenger *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2005; Lambrechts et Scott, 2009) ont montré le lien qui existe entre transmission et virulence. La prise en compte de la perméabilité inter-GCV de transmission des DCE pourrait donc nous permettre d'appréhender le rôle de la diversité en GCV dans l'évolution des DCE, chose qui, au vu de la littérature, a seulement été évoquée (Milgroom, 1999) mais n'a jamais été directement étudiée.

La fitness d'un parasite est fonction de sa capacité à infecter de nouveaux hôtes dans la population (Anderson et May, 1982). Ainsi, lorsqu'un parasite est uniquement transmis verticalement, la descendance de son hôte représente sa seule opportunité de transmission. Donc, toute réduction du potentiel reproductif de l'hôte réduira la reproduction du parasite. En conséquence, pour que la fitness d'un parasite transmis verticalement soit maximisée, il faut que ce dernier évolue vers une faible virulence (Anderson et May, 1982; Ewald, 1983, 1987; Yamamura, 1996). En revanche, le potentiel reproductif d'un parasite transmis horizontalement est moins dépendant de celui de l'hôte. Effectivement, pour un parasite transmis horizontalement, le nombre de nouvelles infections dont il pourra être à l'origine est indépendant du succès reproductif de son hôte. Cependant, même pour un parasite transmis horizontalement, une trop forte virulence peut être néfaste à son potentiel reproductif. En effet, un parasite qui provoque la mort de son hôte avant d'avoir été transmis ne pourra pas être sélectionné. Une faible virulence permet donc d'augmenter la durée de l'infection. Cette durée d'infection apparaît comme un paramètre fondamental de la capacité d'un parasite à infecter horizontalement de nouveaux hôtes (Anderson et May, 1982) car, plus l'infection dure longtemps, plus l'hôte infectieux peut contaminer d'autres individus de la population. Ainsi il a été suggéré que tous les parasites devaient naturellement évoluer vers l'avirulence (c.a.d. virulence faible ou nulle) et que les cas de fortes virulences étaient le fait de systèmes hôte-parasite récents n'ayant pas encore atteint l'équilibre. Cependant, l'observation de parasites évoluant vers une plus forte virulence ainsi que le maintien d'une virulence élevée dans des systèmes supposés anciens contredisent cette hypothèse (Herre, 1993; Read, 1994; Alizon *et al.*, 2008).

Le modèle du trade-off permet d'expliquer l'évolution de parasites vers une forte virulence même si d'autres types de mécanismes, comme la compétition intra-hôte entre différentes souches de parasite (Levin et Bull, 1994; van Baalen et Sabelis, 1995; de Roode *et al.*, 2005; Alizon et van Baalen, 2008) lors de coinfection, ont également été proposés. Le modèle de l'hypothèse du trade-off repose, selon Anderson et May (1982), sur le fait que virulence et transmission horizontale pourraient être intrinsèquement liées. La virulence des parasites serait en fait la conséquence inévitable de leur reproduction intra-hôte, indispensable pour permettre la production de nouvelles particules infectieuses. Ainsi, pour pouvoir se transmettre, un parasite doit nuire à son hôte. Autrement dit, il existerait une pression de sélection qui favoriserait l'évolution des parasites vers des degrés de virulence forte. La fitness de chaque parasite dépendrait donc de l'équilibre entre, d'un coté, augmenter la virulence afin de maximiser sa capacité de transmission et, de l'autre, la diminuer afin d'augmenter la durée de la phase infectieuse (Anderson et May, 1982; Ewald, 1983, 1987; Frank, 1992; Lipsitch *et al.*, 1995, 1996). Cette théorie, appelé modèle du trade-off (ou hypothèse du trade-off), implique qu'il existe pour tout système hôte-parasite une virulence intermédiaire optimale, dépendante du taux de transmission horizontale, maximisant le potentiel reproductif du parasite (Figure 1.4).

La diversité de la population d'hôte en GCV en modifiant la capacité de dispersion des DCE devrait donc agir sur l'évolution de ces derniers, notamment si, dans ces systèmes hôte-parasite, le modèle du trade-off gouverne l'évolution de la virulence des DCE. **Ainsi se pose la question de qui fait évoluer qui ? Est-ce les DCE qui maintiennent la diversité en GCV par la pression qu'ils exercent sur leur population d'hôte ou serait-ce la diversité en GCV et leur degré de perméabilité qui sélectionne les DCE en contrôlant leur capacité à se transmettre horizontalement ?**

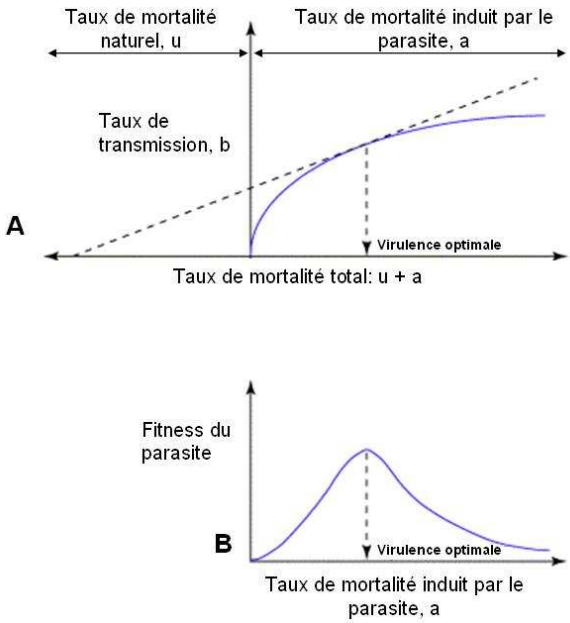


FIGURE 1.4: Modèle du trade-off entre agressivité et transmission. D'après Ebert et Bull (2003). A : Le modèle suppose une relation décélérante entre taux de transmission b et le taux de mortalité totale (u + a). B : Conséquence de A au niveau de la relation entre fitness du parasite et taux de mortalité induite par le parasite permettant de déterminer une virulence optimale intermédiaire pour le parasite.

1.3 Cas particulier de *Cryphonectria parasitica* et de son hypovirus Cryphonectria Hypovirus

1.3.1 *Cryphonectria parasitica*

Cryphonectria parasitica est un champignon du phylum des Ascomycètes (champignon dont les spores sont contenues dans des asques) parasite du châtaignier (Figure 1.5a). Il est originaire d'Asie où il infecte les espèces locales de châtaignier (principalement *Castanea mollissima* en Chine et *C. crenata* au Japon) . Il a été introduit au début du siècle dernier aux États-Unis, premier cas décrit en 1904 et en Europe, premier cas décrit en 1938 (Milgroom et Cortesi, 2004). Contrairement à ce qui est observé en Asie, où le pathogène semble ne pas nuire aux espèces locales de châtaignier, *C. parasitica* a provoqué d'importants dégâts dans les populations de châtaigniers européens et surtout américains (dont les espèces dominantes respectives sont *C. sativa* et *C. dentata*). En effet, ce champignon est responsable de la quasi-disparition du châtaignier aux États-Unis, faisant passer cette d'espèce d'essence dominante de la canopée nord-américaine une espèce marginale



(a) *C. parasitica* sur son hôte naturel



(b) Châtaignier infecté par C. parasitica présentant des signes de dépérissement

FIGURE 1.5

en moins de 50 ans. L'exemple de *C. parasitica* aux États-Unis est d'ailleurs un des cas de désastre écologique lié à l'introduction d'une espèce invasive les plus couramment cités. En Europe, les dégâts ont été beaucoup moins importants, notamment grâce à la prévalence d'un mycovirus Cryphonectria Hypovirus (ou CHV) diminuant les effets du champignon sur la fitness du châtaignier par un phénomène appelé hypovirulence. Cette hypovirulence causée par le CHV est à la base des programmes de lutte biologique contre le chancre du châtaignier développés en Europe et tout particulièrement en France (Nuss, 1992).

1.3.1.1 Cycle biologique

Une nouvelle infection commence par la germination d'une spore sur l'écorce d'un châtaignier sain (Figure 1.6). Le mycélium se développe dans un premier temps dans la partie corticale de l'arbre, puis le mycélium pénètre plus en profondeur dans le cambium et le bois perturbant les échanges hydriques. C'est alors qu'apparaissent les premiers symptômes qui sont caractérisés par un dessèchement puis un dépérissement des parties de l'arbre qui se retrouvent isolées du système racinaire (Figure 1.5b). Le mycélium produit en permanence et de façon asexuée des spores (les conidies) qui sous l'effet du vent ou du ruissellement des pluies sur le tronc peuvent réinfecter à plusieurs endroits le même

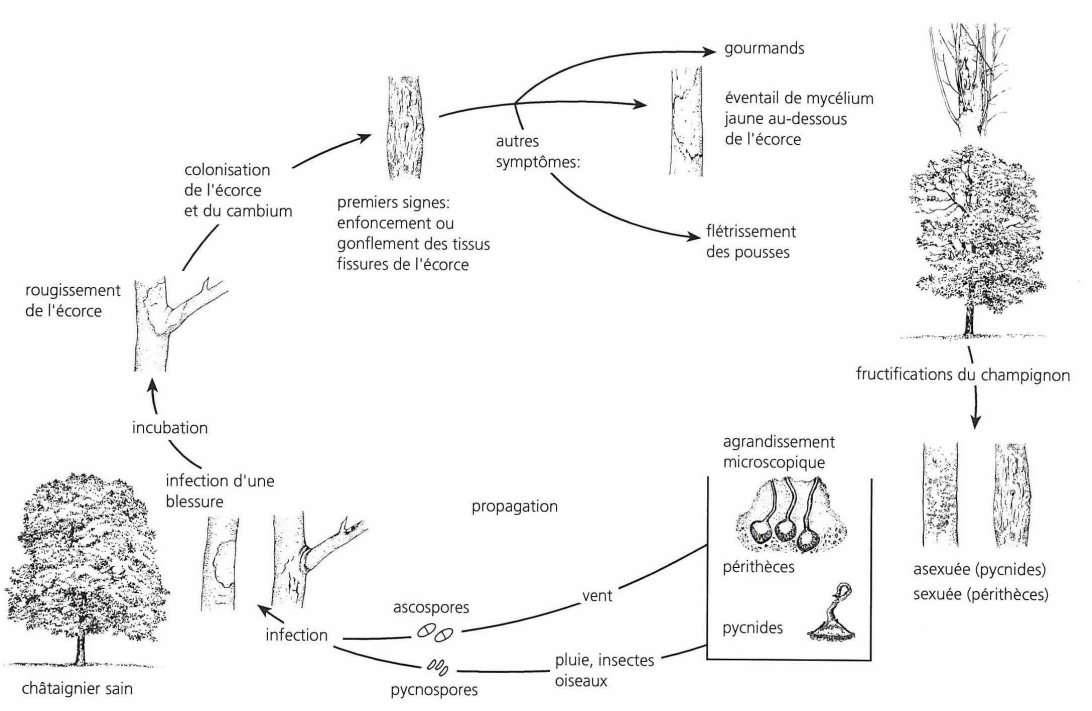


FIGURE 1.6: Cycle biologique de *C. parasitica*. D'après Heiniger (1997). (Dessin : Verena Fataar)

arbre. Il est d'ailleurs fréquent dans les zones fortement infectées de voir des arbres avec plusieurs chancres à différentes hauteurs. Quand la lésion se situe dans la partie basse du tronc, c'est toute la partie aérienne du châtaignier qui n'est plus alimentée en eau, l'arbre tout entier dépérit alors rapidement. Les conidies jouent aussi le rôle de gamètes mâles lors de la reproduction sexuée. La fécondation chez *C. parasitica*, comme chez la plupart des Ascomycètes (Nelson, 1996), nécessite que le gamète mâle fusionne avec la structure femelle d'un mycélium de type sexuel opposé pour former un dicaryion (n+n). Chacune de ces cellules ainsi formées, donnera à terme huit ascospores. Ainsi, durant la durée de l'infection, *C. parasitica* un nombre incalculable de spores auront eu le temps de se répandre dans l'environnement.

1.3.1.2 Diversité en GCV

C. parasitica étant un pathogène forestier important, la diversité de ses populations en GCV a été particulièrement étudiée dans l'optique d'améliorer l'efficacité des programmes de lutte biologique (Milgroom et Cortesi, 2004). Le déterminisme génétique du système d'incompatibilité végétative des populations européennes et américaines est connu, ce-

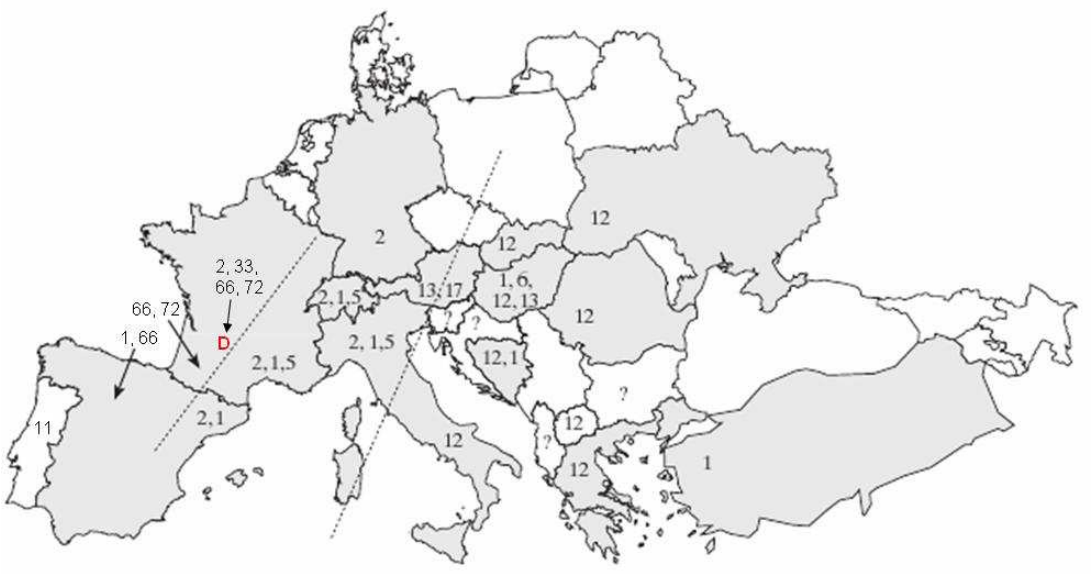


FIGURE 1.7: Carte de l'Europe présentant pour chaque pays le ou les GCV dominants de *C. parasitica*. D : Dordogne située au niveau du front de rencontre entre populations de C. parasitica du Sud-Est et de Sud-Ouest de la France. D'après Robin et Heiniger (2001).

pendant, contrairement à ceux de *N. crassa* et *P. anserina*, les gènes *vic* de *C. parasitica* n'ont toujours pas été identifiés. Des études de descendances sexuées entre souches incompatibles ont permis d'établir que, chez *C. parasitica*, l'incompatibilité végétative est contrôlée par au moins six gènes *vic* bialleliques non liés (Cortesi et Milgroom, 1998). Ce chiffre pourrait être en fait sous-estimé. En effet, des études en France (Robin *et al.*, 2000) et en Asie (Liu *et al.*, 2007) ont respectivement montré que les 128 combinaisons que permettent les six gènes *vic* biallélіques identifiés par Cortesi et Milgroom (1998) ne suffisaient pas à expliquer l'incompatibilité observée avec certains GCV européens ni l'extrême diversité en GCV de *C. parasitica* dans son aire d'origine. Selon les auteurs de ces études, d'autres gènes *vic* ou une plus grande diversité allélique au niveau des gènes *vic* connus pourraient expliquer ce résultat. L'étude de la diversité des populations de *C. parasitica* en GCV a également montré d'importantes différences entre les populations des aires d'introduction du pathogène que sont l'Europe et les États-Unis. Les populations européennes de *C. parasitica* sont dominées en moyenne par deux ou trois GCV caractéristiques de grandes aires géographiques (Figure 1.7) , alors que les populations américaines présentent en moyenne plus d'une vingtaine de GCV par population sans que distinguent des GCV majoritaires (Milgroom et Cortesi, 1999; Robin et Heiniger, 2001;



FIGURE 1.8: Illustration des effets d'une souche CHV-1 sur la croissance et la pigmentation de son hôte. A gauche un isolat sain ; A droite un isolat infecté par une souche de CHV-1.

Milgroom et Cortesi, 2004). Cette situation pourrait être en grande partie due à l'absence de reproduction sexuée dans les populations européennes malgré la coexistence des deux types sexuels (Milgroom *et al.*, 2008; Dutech *et al.*, 2008).

1.3.2 Cryphonectria Hypovirus

Le CHV est un virus à double brin d'ARN de la famille des Hypoviridae infectant *C. parasitica*, comme son nom l'indique.

Il existe plusieurs espèces de CHV n'ayant pas toutes les mêmes effets sur leur hôte. Parmi ces espèces, CHV-1 (Shapira *et al.*, 1991; Allemann *et al.*, 1999) et CHV-4 (Peever *et al.*, 1997) sont les plus courantes, la première infectant les populations européennes et la seconde les populations américaines de *C. parasitica*. L'infection par le CHV-1 provoque une baisse de la virulence du champignon sur le châtaignier, la lésion provoquée par le champignon virosé restant superficielle et n'affectant pas la survie de l'arbre. Le CHV-1 est également responsable de la stérilité femelle de son hôte (Zhang *et al.*, 1998). En culture *in vitro* l'infection par CHV-1 est caractérisée par la dépigmentation du mycélium de *C. parastica* qui, lorsqu'il n'est pas infecté, est de couleur orange, ainsi que, parfois, par des perturbations de la croissance mycelienne (Figure 1.8). L'espèce CHV-4 quant à elle semble avoir très peu d'effets sur la biologie du champignon (Milgroom et Cortesi, 2004). Comme tous les mycovirus, le CHV ne présente pas de phase libre. Sa transmission horizontale se fait donc uniquement lors d'anastomoses (Figure 1.3 ; c.f. Sections 1.2.1 et

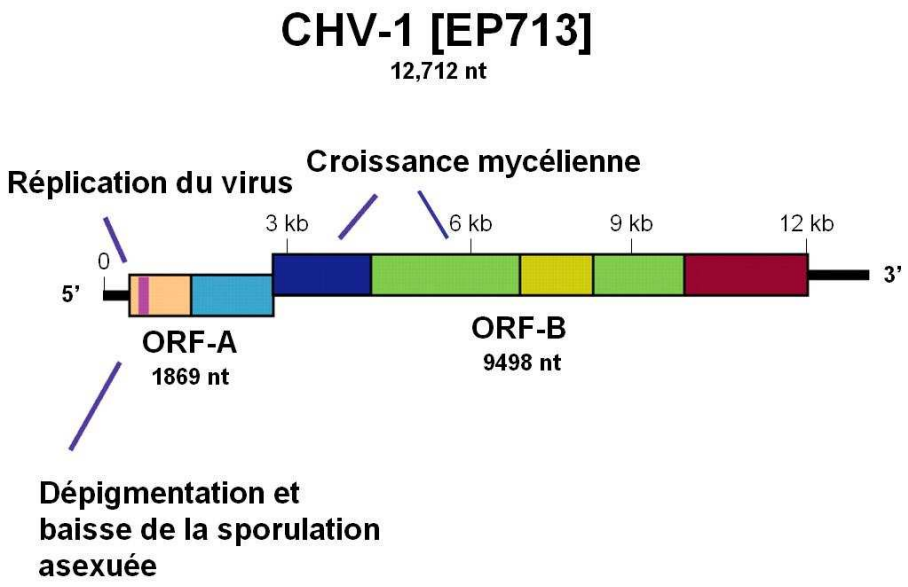


FIGURE 1.9: Organisation du génome du CHV-1 [EP713] présentant la localisation des régions génétiques pour lesquelles un symptôme ou une fonction semble être associés. D'après Dawe et Nuss (2003).

1.2.2). Il est également transmis verticalement uniquement via les conidies (Anagnostakis, 1987; Peever *et al.*, 2000). Sa transmission via les ascospores n'a jamais pu être observée et semble donc impossible (Anagnostakis, 1987; Carbone *et al.*, 2004).

La particule virale de CHV-1 consiste en une molécule d'ARN à double brins de 12 712 nucléotides (queue poly(A) exclue) contenant deux cadres ouverts de lecture (open reading frame en anglais), l'ORF-A (1869 nucléotides) et l'ORF-B (9498 nucléotides) (Shapira *et al.*, 1991). Il semblerait que l'ORF-A intervienne dans l'inhibition de la sporulation asexuée, dans la dépigmentation du mycélium et dans la réplication du virus (Choi et Nuss, 1992) mais pas dans l'inhibition de la croissance mycélienne ni dans la réduction de la virulence sur châtaignier qui semblent être dépendantes de l'ORF-B (Chen *et al.* 2000; Dawe et Nuss 2003 ; Figure 1.9).

Une partie des résultats montrant les effets des ORF sur les symptômes de l'infection lié au CHV-1 a été obtenue grâce à la construction de virus chimériques entre deux souches de CHV-1 présentant des niveaux de virulence différents : [Ep713] et [Euro7] (les crochets servant à distinguer la souche du virus de l'isolat fongique), isolés respectivement en France en 1977 et en Italie en 1978 (Chen et Nuss, 1999). Une souche de *C. parasitica*

infectée par [Ep713] présente une croissance fortement réduite et irrégulière ainsi qu'une forte inhibition de sa production de spores asexuée. En revanche une souche infectée par [Euro7] garde des taux de croissance mycélienne et de sporulation asexuée relativement importants, même s'ils sont plus faibles que pour une souche non infectée (Chen et Nuss, 1999). Des études sur la diversité du CHV-1 dans les populations européennes de C. parasitica ont révélé l'existence d'au moins deux sous-types viraux : le sous-type I (pour Italien) et le sous-type F (pour Français), ce dernier pouvant en fait être constitué de deux sous-groupes (Allemann *et al.*, 1999; Gobbi *et al.*, 2003). Selon les auteurs de ces études, cette différence génétique serait due à l'introduction en Europe de souches de CHV-1 provenant de Japon et de Chine ayant déjà divergé. Ces travaux ont également montré que [Ep713] était associé au sous-type F et [Euro7] au sous-type I. Le sous-type I est répandu dans toute l'Italie, le Sud-Est de la France, le Massif alpin et les Balkans alors que le sous-type F est retrouvé uniquement dans le Sud-Ouest de la France et le Nord de l'Espagne (Montenegro *et al.*, 2008). Plusieurs études ont montré la plus grande virulence de la souche de sous-type F de référence, [Ep713] par rapport à des souches de sous-type I, autre que Euro7 (Peever *et al.*, 2000; Allen et Nuss, 2004). Par exemple, Peever *et al.* (2000) ont montré que, des champignons infectés par un CHV-1 de sous-type I présentaient (1) une sporulation, (2) des tailles moyennes de lésions sur arbre inoculé et (3) des taux de germination moyen des conidies plus élevés que les mêmes champignons infectés par [Ep713]. Ce résultat, associé aux différences génétiques et géographiques, suggère donc qu'il existe des différences phénotypiques entre les deux sous-types viraux infectant *C. parasitica* en Europe. Cependant, le fait que la virulence du sous-type F ait toujours été caractérisée par la même souche virale dont l'isolement date de plus 30 ans ne permet pas de généraliser les résultats obtenus à l'ensemble du (ou des) sous-type(s) F.

1.3.3 Diversité en GCV et en sous-types viraux en France

Les populations françaises de *C. parasitica* présentent la particularité d'être infectées par les deux sous-types viraux. Les populations du Sud-Est du pays sont majoritairement

infectées par des virus de sous-type I alors que celles du Sud-Ouest sont majoritairement infectées par des virus du sous-type F (Schafleitner *et al.* 2004a, Robin et al., soumis). De plus, il existe d'importantes différences de composition en GCV entre les populations de *C. parasitica* du Sud-Ouest et du Sud-Est, chacune étant dominée par deux ou trois GCV spécifiques. Les populations de champignons du Sud-Ouest sont dominées par les GCV EU-72 et EU-66 alors que les populations du Sud-Est sont dominées par les GCV EU-1, EU-2 et EU-5 (Robin et Heiniger, 2001). Ces différences génétiques partagées entre les populations de champignon et de virus entre le Sud-Ouest et le Sud-Est du pays laissent suggérer que les populations françaises de *C. parasitica* sont en fait issues de deux évènements introductifs distincts. Une autre particularité de la population française de *C. parasitica* est qu'il existerait un front de rencontre entre ces deux populations passant par la Dordogne. En effet, ces GCV spécifiques des populations du Sud-Est et du Sud-Ouest ainsi que les deux sous-types viraux ont été retrouvés dans les mêmes populations de Dordogne (Breuillin *et al.*, 2006; Dutech *et al.*, 2008, Robin et al, soumis).

1.4 Problématiques abordées

Trois problématiques, concernant le rôle de l'incompatibilité végétative sur l'écologie et l'évolution de l'interaction *C. parasitica*/CHV ont été abordées, avec trois approches différentes :

- une approche conceptuelle générale portant sur l'évolution des systèmes de reconnaissance du soi, incluant les invertébrés marins coloniaux.
- une approche de modélisation sur le maintien du polymorphisme par des modèles démographiques.
- une approche expérimentale, pour étudier d'une part la perméabilité de la barrière d'incompatibilité végétative et d'autre part l'interaction *C. parasitica*/CHV et les liens existant entre transmission et virulence du CHV

L'évolution des systèmes de reconnaissance du soi

Une étude bibliographique incluant les champignons et les invertébrés marins coloniaux a été réalisée sur les avantages et dangers de la fusion somatique chez ces organismes, permettant d'évaluer les forces de sélection à l'origine du maintien de la diversité allélique des gènes intervenants dans la reconnaissance du soi. Cette étude, présentée dans le chapitre suivant (Chapitre 2), permet de situer la question, abordée dans le reste de cette thèse, du rôle des DCE dans le maintien de la diversité en GCV au sein de la problématique générale que constitue l'évolution d'un système de reconnaissance du soi.

Pression parasitaire exercée par les DCE et maintien de la diversité génétique des populations d'hôte

Étude de la transmission inter GCV du CHV-1 en conditions naturelles

Dans la première partie du Chapitre 3, nous étudions, à partir du modèle biologique *C. parasitica*/CHV, l'efficacité de la transmission inter-GCV du CHV en population naturelle. En effet, les nombreuses observations concernant la perméabilité de la barrière d'incompatibilité végétative à la transmission des DCE ont toutes été réalisées *in vitro* sur milieux artificiels. Or, il semblerait que les données de transmission *in vitro* sous-estiment la réalité de la transmission de ce DCE dans les population naturelles de champignon (Carbone *et al.*, 2004). Il serait donc intéressant de tester la réalité de cette perméabilité dans les populations naturelles de champignons. Le cas particulier des populations de Dordogne de *C. parasitica*, décrit dans la Section 1.3.3, représente un laboratoire idéal pour ce genre d'étude et pour confirmer les résultats obtenus par Carbone *et al.* (2004). En Dordogne sont présents des GCV originaire du Sud-Ouest et du Sud-Est de la France, et les deux sous-types viraux F et I. Il est donc possible de tester si, dans une population donnée, ces sous-types viraux ont pu se transmettre dans plusieurs GCV. En parallèle à cette étude, nous proposons de tester l'efficacité de la transmission du CHV entre GCV différents lorsque le champignon croît sur son substrat naturel : le bois de châtaignier (sous forme de tige excisée). Ceci permettra de comparer les résultats de transmission sur

tige avec ceux obtenus in vitro.

Etude du lien de cause à effet entre virulence des DCE et diversité en GCV

La prise en compte de la perméabilité de l'incompatibilité végétative pourrait nous permettre de mieux comprendre les mécanismes intervenant dans l'évolution des interactions des systèmes DCE/champignon, ainsi que de leur diversité. C'est pourquoi, dans la deuxième partie du Chapitre 3, nous décrivons un modèle mathématique épidémiologique adapté à une population de champignon constituée de plusieurs GCV et intégrant la perméabilité de la transmission du DCE entre GCV. L'étude de l'effet de DCE plus ou moins virulents et plus ou moins bien transmis entre GCV sur le maintien de la diversité en GCV nous a permis d'analyser le rôle de la perméabilité de la barrière de l'incompatibilité végétative sur le maintien de la diversité en GCV par la pression exercée par un DCE. De plus l'effet de cette diversité sur la prévalence des DCE nous a donné une indication sur la pression de sélection qu'exerce cette diversité en GCV sur l'évolution de la virulence des DCE.

L'évolution de la virulence des populations de CHV-1

Le Chapitre 3, quand à lui, fera l'objet d'un autre objectif qui est de comprendre l'évolution de la virulence du CHV-1 dans les populations européennes et, notamment, la différence de virulence observée entre virus de sous-type F et virus de sous-type I. Les populations européennes de *C. parasitica* présentant une faible diversité en GCV, la virulence du CHV-1 pourrait avoir évolué en réponse à un fort taux de transmission horizontale afin de maximiser son infectivité comme le modèle du trade-off le prédit. La différence de virulence entre la souche [Ep713] et les virus de sous-type I amène à se poser la question des pressions responsables de l'évolution de la virulence dans chaque sous-type de CHV-1. Même si ces différences entre sous-types peuvent être antérieures à l'introduction des virus en Europe comme laissent supposer les résultats de Gobbin *et al.* (2003), il serait surprenant que les souches de virus introduites en Europe il y a plus de 50 ans ne se soient pas adaptées à leur populations d'hôtes respectives. C'est pourquoi

dans ce Cchapitre nous proposons de tester l'hypothèse de l'existence d'une relation entre infectivité et virulence dans les populations européennes de CHV-1. Ceci dans le but de tester si le modèle de le modèle du trade-off est bien à l'origine de la différence de virulence observée entre les deux sous-types viraux de CHV-1 présents en France.

Chapitre 2

L'évolution des systèmes de reconnaissance du soi chez les champignons et les invertébrés marins coloniaux

Le thème majeur de cette thèse concerne l'interaction entre l'évolution du système d'incompatibilité végétative des champignons et celle des interactions champignon/DCE. Cependant, le cadre de l'évolution d'un tel système de reconnaissance du soi dépasse celui de l'étude des systèmes hôte-parasite. En effet l'émergence d'un mécanisme capable de distinguer le soi du non-soi questionne sur l'évolution de l'individualité chez des organismes comme les champignons et les invertébrés ou le concept d'individu comme unité de selection peut paraitre inadapté (Buss, 1987). De plus d'autres hypothèses que celles d'une pression parasitaire exercée par les DCE ont été avancées afin d'expliquer l'évolution de système contrôlant la formation de chimères. C'est pourquoi nous proposons dans ce chapitre une étude bibliographique exposant les danger, ainsi que les avantages, que représente la fusion somatique entre conspécifiques chez les champignons mais aussi chez les invertébré marins coloniaux (coraux, cnidaires, urochordés...). En effet, champignons et invertébrés marins coloniaux présentent d'importantes similarités écologiques et biolo-

giques (notamment un mode de vie sessile et colonial). Ceci laisse suggérer que les mêmes pressions de sélection agiraient dans l'évolution de ces deux systèmes de reconnaissance du soi. Les objectifs de cette étude sont donc :

- d'apporter un éclairage sur les forces évolutives, liées à la biologie et à l'écologie particulière de ces espèces, qui pourraient expliquer l'émergence d'un système de contrôle de la fusion somatique entre individus conspécifiques.
- d'analyser des conséquences de l'évolution d'un tel système de reconnaissance du soi.

Ce travail à fait l'objet de l' article suivant, soumis à *Journal of Evolutionary Biology*.

To fuse or not to fuse ? An evolutionary view of self/non-self recognition systems

Jérémie Brusini, Cécile Robin and Alain Franc

INRA, UMR 1202 BIOGECO, F-33140 Villenave d'Ornon, France

Corresponding author : Brusini, J. (jbrusini@bordeaux.inra.fr)

Somatic incompatibility mechanisms preventing fusion between members of the same species have evolved only in certain phyla (e.g. Fungi, Cnidarians, Poriferans, Bryozoa, Urochordates). This makes it possible to study the evolutionary forces driving or preventing fusion in these organisms, which have several key ecological and biological features in common. A link has been established between the possibility of fusing with other members of the same species and a sessile lifestyle. Colonial sessile organisms are vulnerable in several ways : they lack germ-line integrity, are exposed to the risk of parasitism and face potential genetic conflicts. These drawbacks led to the emergence of individuality (i.e. the ability to discriminate self from non-self) during the evolution of these organisms, through a subtle trade-off of factors promoting and preventing fusion. We conclude that somatic incompatibility systems have played an essential role in the evolution of individuality in fungi and marine invertebrates and we extend this discussion to early multicellular organisms.

2.1 Introduction

Chimeras have long been known in several phyla, including fungi (Todd and Rayner, 1980), algae (Santelices, 2004b) and several invertebrate phyla (Grosberg, 1988), but genetic heterogeneity within single organisms has often been underestimated. Recent findings

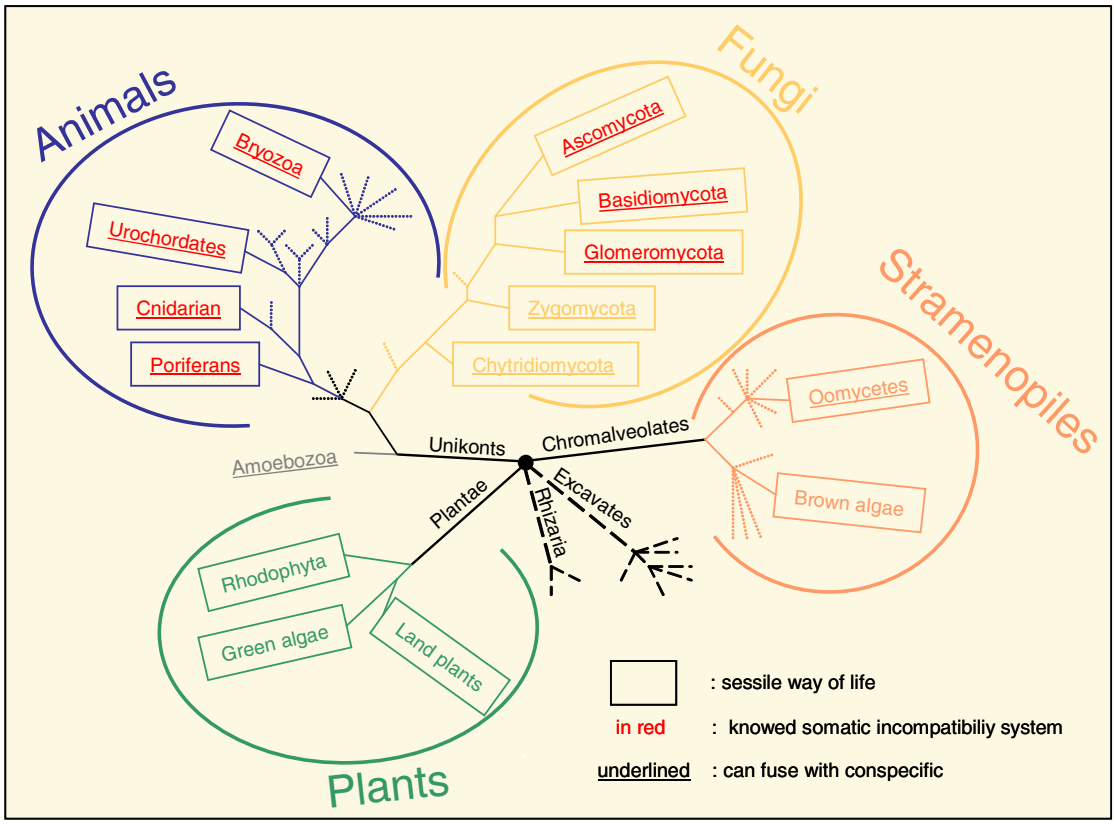


FIGURE 2.1: The occurence of somatic fusion and somatic incompatibility in the Tree of life

concerning microchimerism in humans (O'Donoghue et al., 2004), the canine transmissible venereal tumour(Vonholdt and Ostrander, 2006) and several mosaic plants (Pineda-Krch and Lehtila, 2004) have dramatically changed the prevailing view of this phenomenon. Chimerism and mosaicism both generate heterogeneity within single organisms (Pineda-Krch and Lehtila, 2004), but the processes underlying these two phenomena are entirely different. Mosaic individuals result from genetic changes within a single germ line, whereas chimeras result from somatic fusion between different (but conspecific) germ lines.

Cell fusion is a ubiquitous mechanism, occurring in all taxa of sexually reproducing organisms. By contrast, vegetative cellular fusion has evolved in a limited number of taxa (in the three multicellular taxa of Eukaryotes, Figure 2.1). Somatic fusion (also called anastomosis) frequently occurs in fungi (Leslie, 1993), resulting in the formation of heterokaryons, in which genetically different nuclei and organelles may coexist. Evidence of somatic fusion has also been found in Stramenopiles (Hulbert and Michelmore, 1988). Natural chimerism has been described in several taxa of marine invertebrates (Buss, 1982)

and somatic fusion has been reported in land plants (reviewed in Pineda-Krch and Fagerstrom, 1999) and algae (Santelices, 2004b).

Self/non-self recognition (SNSR) systems regulating the outcome of fusions (formation of a chimera or rejection of non-self) have evolved in only a few taxa (Figure 2.1) : fungi (Leslie, 1993; Aanen et al., 2008) and colonial marine invertebrates (poriferans (Gaino et al., 1999), cnidarians (Cadavid, 2005), urochordates (De Tomaso et al., 2005), Bryozoa (Hughes et al., 2004). Two fungi or two colonial marine invertebrates can form a stable chimera only if they have the same alleles at specific recognition loci. If they have different alleles at one of these loci, strong rejection reactions may occur. For example, 30 minutes after incompatible fungal hyphae come into contact, compartmentalisation is observed and the cells of the fused hyphae, often with the surrounding cells, die (Glass and Kaneko, 2003). In colonial marine invertebrates, inflammatory reactions causing cell death and local tissue destruction have been described (De Tomaso et al., 2005). Another example of rejection reactions is provided by the production, after contact between two unrelated sea anemones, of a specialised structure responsible for directly attacking the incompatible soma and inducing its necrosis (Grosberg and Quinn, 1989). These SNSR systems display high levels of allelic (inter or intragenic) diversity : with a few highly polymorphic genes or a larger number of genes with fewer alleles define the different "recognition" groups (Box 1). This high level of allelic diversity suggests that negative frequency-dependent selection, driven by strong evolutionary pressures (such as germ-line competition or pathogen transmission), occurs in both fungi and marine colonial invertebrates (Buss, 1982; Grosberg, 1988). This hypothesis is supported by the identification of traces of balancing selection for some of loci of a fungal SNRS system (Wu et al., 1998). Extremely high levels of polymorphism, maintained by the selection of rare alleles, is a characteristic feature of other discriminating systems, such as the mating-recognition systems in plants, fungi and insects and the vertebrate major histocompatibility complex (Richman, 2000).

The evolution of such allelic polymorphism and the strength of rejection and incompatibility reactions highlight the risk represented by conspecific somatic fusion in fungi and marine invertebrates. So, why did these organisms evolve the ability to fuse if chimera

TABLE 2.1: Genetic determinism of somatic incompatibility systems in Fungi and colonial marine Invertebrates.
N : Number of incompatible loci; Ref.: References

Organism	Taxa	N	loci polymorphism	Ref.
Cryphonectria parasitica	Ascomycete	6	biallelic	(Cortesi and Milgroom, 1998)
Neurospora crassa	Ascomycete	10	biallelic	(Perkins and C., 1988)
Podospora anserina	Ascomycete	17	multiallelic	(Glass and Kuldau, 1992)
Aspergillus nidulans	Ascomycete	8	biallelic	(Croft and Jinks, 1977)
Armillaria ostoyae	Basidiomycete	2	multiallelic	(Guillaumin, 1998)
Heterobadision annosum	Basidiomycete	3 or 4	al lest one multiallelic	(Hansen et al., 1993)
Pleurotus ostreatus	Basidiomycete	3 or more	multiallelic	(Malik and Vilgalys, 1999)
Phellinus gilvus	Basidiomycete	1	multiallelic	(Rizzo et al., 1995)
Collybia fusipes	Basidiomycete	3-5	multiallelic	(Marcais et al., 2000)
Glomus spp	Glomus	?	?	(Giovannetti et al., 2003)
Botryllus schlosseri	Ascidian	1	multiallelic	(De Tomaso et al., 2005)
Ciona intestinalis	Ascidian	1	multiallelic	(Azumi et al., 2003)
Hydractinia symbiolongicarpus	Cnidarian	1 or 2	multiallelic	(Cadavid, 2005)

Box 1 : Allelic polymorphism of genes involved in somatic incompatibility in fungi and colonial marine invertebrates

The polymorphism of SNSR system genes may be achieved in two ways : one or a few loci may have a large number of alleles or a large number of loci may have a limited number of alleles. Both strategies exist in fungi, whereas colonial marine invertebrates display only polymorphism based on a small number of genes with a large number of alleles (Table 2.1). The somatic incompatibility system of diploids (or diploid-like) organisms often depends on a small number of highly polymorphic loci whereas, in haploids (ascomycetes only), a dozen of so biallelic loci generally control the SNSR. However, the true level of allelic diversity behind these SNSR systems is almost certainly underestimated. For example, for vic loci (vic : vegetative incompatibility), the ascomycete C. parasitica has been estimated to have six biallelic genes(Cortesi and Milgroom, 2001). However population studies in France and in Asia, where *C. parasitica* originated, suggested a larger number of *vic* loci or the existence of more than two alleles per locus (Robin and Heiniger, 2001; Liu et al., 2007). Moreover, the extensive diversification of the het-d and *het-e* genes (*het* : heterokaryon incompatibility genes ; actually *vic* and *het* refer to the same genes in different biological models), which had been shown to result from hypermutation in the ascomycete *P. anserica*, provides additional evidence that the natural diversity of these genes has been underestimated (Paoletti et al., 2007).

formation is so costly ? Why do fungi and colonial marine invertebrates display antagonistic patterns of behaviour, in which they may or may not fuse with a member of the same species ? The answer to these questions may lie in the lifestyle traits common to fungi and colonial marine invertebrates. These two groups of organisms have major ecological and biological attributes in common, in addition to their ability to discriminate self from non-self. Both have heterotrophic and sessile lifestyles (at least during the asexual phase), resulting in intense competition for space and resources between the individuals living on the same substrate, and modular and indeterminate growth associated with frequent clonal reproduction, resulting in very long longevity and a mode of development based on somatic embryogenesis. Given the ecological and biological convergence between fungi and colonial marine invertebrates, it seems likely that similar forces were involved in the evolution of the SNSR systems of both groups. Moreover, somatic fusion, very long longevity and somatic embryogenesis all call into question the suitability of the concept of the individual as the unit subject to selection in both fungi and marine invertebrates (Buss, 1987). The main aim of this review is to present the principal driving forces potentially accounting for the evolution in fungi and colonial marine invertebrates of these convergent SNSR systems, which promote somatic fusion with self (and kin) only. We also

consider the limits of individuality in fungi and colonial marine invertebrates and discuss, more generally, the different roles of SNSR systems during the evolution of multicellular eukaryotes.

2.2 To fuse ...

As early as 1931, Buller (cited by Todd and Rayner, 1980) suggested that fungal populations displaying co-operative behaviour could be compared with socially organised eusocial insect populations. This hypothesis was based on the observation, in the basidiomycete *Coprinus sterquilinus*, of a positive correlation between the occurrence of fusion between germinating spores and the size of the fruiting bodies produced. This co-operative behaviour between germinating spores may be accounted for by the limited resources available to these fungi. One of the possible strategies for colonies generated from these spores would be to produce a single physiological unit capable of fruiting. Unlike motile organisms, fungi and colonial marine invertebrates cannot simply move on to a new environment when the environment around them becomes detrimental. The foraging capacities of these sessile organisms are therefore directly correlated with the surface area of their soma : the more spread out the boundaries of the soma, the greater the area over which exchange can occur between substrate and organism and the more diverse the substrates exploited can be (Rayner et al., 1999). This kind of co-operative behaviour to increase access to nutrients is thought to occur in communities of land plants, through mycorrhizal associations, as the mycorrhizal network has been shown to allow the transfer of nutrients between trees of the same, or even different species (Selosse et al., 2006). Thus, fusion with members of the same species may constitute co-operative behaviour to extend the soma, making it possible to increase foraging capacity. Its occurrence in sessile organisms is almost certainly underestimated.

In fungi and colonial marine invertebrates, size-dependent selection is also thought to act on other major fitness components, such as reproduction and the likelihood of survival. Size-specific relationships with age at maturity and fecundity rates have been reported in some lichenised fungi and corals (Beiring and Lasker, 2000; Pringle et al., 2003;

Tsounis et al., 2006; Kai and Sakai, 2008). Moreover, in colonial marine invertebrates, the barrier of incompatibility is more easily bypassed during juvenile stages (Wilson and Grosberg, 2004; McGhee, 2006), when size-dependent selection is known to be particularly important for survival (Marshall et al., 2006). Similarly, in some fungi, specialised hyphae called conidial anastomosis tubes are formed from spore germlings and fuse with other young mycelia, which may be vegetatively incompatible or compatible (Roca et al., 2005). All these reports suggest that strong selection pressures act on fungi and colonial marine invertebrates, which adopt a "sink or swim" mechanism to grow and survive (and to reproduce). In this context, somatic fusion is an efficient mechanism for increasing the fitness of the organism, as indicated by studies demonstrating an increase in fitness after somatic fusion for fungi and colonial marine invertebrates (Hyakumachi and Ui, 1987; Poudyal et al., 2007). Moreover, for fungi and most colonial marine invertebrates, contact with conspecific soma systematically induces fusion, with incompatibility reactions generally affecting only the stability of the chimera, and only rarely its actual formation. As a result, fusion with conspecific soma appears to be an intrinsic feature of these organisms, and involves the formation of closely woven three-dimensional networks to support colony growth and homeostasis (Glass et al., 2004).

Similar co-operative fusion behaviour also evolved in social Amoebozoa, with unfavourable environmental conditions triggering the aggregation of numerous single-celled amoeboid organisms into a multicellular chimeric fruiting structure, facilitating dispersal of the genotypes of most of the co-operative cells. In one social species belonging to the Amoebozoa, *Dictyostelium discoideum*, the initiation of aggregation has been shown to result from a green beard effect (Queller et al., 2003), as also proposed for the common recognition alleles of fusible multicellular organisms (Aanen et al., 2008). The green beard effect consists of co-operation between organisms that have demonstrated their "honesty" by displaying a specific phenotype : "the green beard". In the case of somatic fusion, the signal for honesty (the green beard) is the presence of identical alleles at the recognition loci. Even if genetically different, two fungi or two colonial marine invertebrates can fuse if they have the same green beard. Thus, as siblings are more likely to co-operate than

unrelated organisms, kin selection is thought to be responsible for the maintenance of somatic fusion in fungi and colonial marine invertebrates (Buss, 1982).

Heterokaryosis and the coexistence of different nuclei in the same cytoplasm may be an important source of recombination and genetic exchange. This phenomenon of parasexuality was described as early as 1953 (Pontecorvo et al., 1953) and is thought to be a major source of recombination, particularly in fungi with no known sexual structures (Taylor et al., 1999). However, the importance of genetic exchange during somatic fusion for the ecology and evolution of natural fungal populations remains poorly understood due to the lack of data. One group of fungi, the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), have been studied on several occasions because they provide an interesting example of ancient asexual interactions and are of considerable ecological and economic importance (Sanders, 1999). Hyphal fusion and genetic exchange have been proposed as mechanisms accounting for the multigenomic nature and widespread occurrence of these fungi (Pawlowska and Taylor, 2004; Bever and Wang, 2005). Evidence has recently been obtained to suggest that connections between genetically different isolates may be accompanied by heterokaryosis, genetic exchange and recombination in *Glomus intraradices* (Croll and Sanders, 2009). In a few ascomycetes, evidence of natural heterokaryon formation and recombination has been obtained, at least for *Cryphonectria parasitica*(McGuire et al., 2005) and *Plasmopara halstedii* (Spring and Zipper, 2006). Supernumerary chromosomes are genetic elements that can be transferred across vegetative barriers (He et al., 1998). They provide evidence to suggest that horizontal gene transfer between members of the same species may drive evolutionary changes in fungi. The transfer of such chromosomes may be a key element in the evolution of soil-inhabiting fungi, playing a role similar to that of plasmid transfer in plant bacteria (Rodriguez-Carres et al., 2008). Another example is provided by genes conferring wilting in tomato, which were shown to spread between clonal lineages of *Fusarium oxysporum* by horizontal gene transfer (van der Does et al., 2008). Interspecific gene transfers between related species have provided indirect evidence for such transfers (Rosewich and Kistler, 2000). Thus, a rare anastomosis event between two fungi pathogenic on rice may have allowed the transfer and fusion of nuclei and crossing-over

events (Xie et al., 2008). The emergence of a new disease on wheat would be the direct consequence of the transfer of a virulence gene between two pathogenic fungi (Friesen et al., 2006).

2.3 . . .or not to fuse

Somatic fusion also seems to have drawbacks dangerous enough to require the maintenance of high levels of allelic diversity. We review here the main hypotheses concerning the driving force (germ-line competition, horizontal pathogen transmission and genetic conflict) behind this allelic diversity.

As pointed out by Aanen et al. (2008), somatic fusion results in the soma being a "public good", and for the control of which the germ lines of the chimera compete strongly. This competition is particularly strong in fungi and colonial marine invertebrates, because of their mode of development involving somatic embryogenesis (Buss, 1987). Throughout the life of these organisms, propagules are continually produced through hyphal or stem cell differentiation. By letting in conspecific nuclei, these organisms run a perpetual risk of parasitic genome invasion, with the somatic structure of co-operative strains being used by the parasitic genome for its own gene dissemination. For example, in the colonial ascidian, *Botryllus schlosseri*, fusion between genetically different colonies results in a hierarchical organizstion of two germ lines of the newly formed chimera, potentially leading to replacement of the somatic and germinal cells of the "losing" germ line by those of the "winning" germ line (Stoner and Weissman, 1996; Stoner et al., 1999). Laird et al. (2005) studied the mechanisms of this case of cell parasitism in detail, by transferring a single "winner" stem cell into somatically compatible and incompatible "loser" colonies via a colony-wide vascular network. They reported the contamination of propagule production by the genome of the transferred stem cells in three of ten cases for histocompatible colonies and in no case for incompatible colonies. They suggested that this situation resulted from competition between stem cells within the colony for access to the nascent gonads and the blastogenic buds, which are important niches. This result highlights both the risk of germ-line invasion linked to somatic fusion and the key role of SNSR systems in

maintaining the genotypic identities of the germ and somatic cell lines of fusible organisms. Very similar results have been obtained in fungi, for the ascomycete *Neurospora crassa*, in which nuclear parasitism seems to be regulated by vic genes. Following contact between asexual spores of a wild phenotype and a compatible mature mycelium harbouring a mutant phenotype, both phenotypes are observed in the fruiting structures of the mature mycelium (Debets and Griffiths, 1998). Nuclear migration after fusion is a well documented phenomenon (Dodge, 1935; Davis, 1959; Hintz et al., 1988; May and Taylor, 1988; Lee and Taylor, 1993; Debets and Griffiths, 1998; Giovannetti et al., 2003) and has also been described in sponges (Van de Vyver, 1988). This illustrates the importance of mechanisms allowing fusion with kin only, invasion by a sibling genome being evolutionarily less costly. Moreover, despite the existence of SNSR systems in fungi and colonial marine invertebrates, chimera formation is a major source of heterogeneity within individual organisms, for these fusible organisms. However, germ-line parasitism is not the only kind of competition that may occur between the two cell lineages. Contributions to supportive functions within chimera may also be disproportionate. This aspect was highlighted by Bishop and Sommerfeldt (1999), who showed that the presence of a vascular network between the colonial entities, which is thought to be necessary for stem cell migration, is not absolutely indispensable for the maintenance of somatic incompatibility in ascidians. These authors suggested that non-self recognition in these organisms was maintained by the different germ-cell lines making differential investments in tunic production. Thus, germ-line competition, whatever its nature, appears to exert a selective pressure on fusible organisms that may be strong enough to drive the evolution of SNSR systems. Moreover, it also provides additional evidence for kin selection of the SNSR systems of fungi and colonial marine invertebrates.

Somatic fusions also allow the transmission of cytoplasmic elements, which are thought to exert selection pressures on SNSR systems (Caten, 1972; Nauta and Hoekstra, 1994; Milgroom, 1999). In fungi, such cytoplasmic agents are even thought to maintain a higher level of polymorphism for SNSR system genes than for parasitic genes (Nauta and Hoekstra, 1994). Viruses infect many fungi, but only a few of these viruses are highly

virulent in their fungal hosts (Ghabrial, 1998). These virulent viruses include Cryphonectria Hypovirus 1 (or CHV-1), a double-stranded RNA virus that infects the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, and has been intensively studied due to its use as a biological control agent (Nuss, 1992; Milgroom and Cortesi, 2004). Like all known mycovirus, CHV-1 has no extracellular phase and hyphal fusions provide it with its only opportunity for horizontal transmission. Such transmission can occur between different vegetatively compatible types, but the frequency of transmission decreases with increasing vc type dissimilarity (Liu and Milgroom, 1996). The prevalence of this virus is higher in European populations of C. parasitica, which have a low allelic diversity for vic genes, than in American populations, in which vc types are much more diverse (Milgroom and Cortesi, 1999). Fungi may also encounter diverse parasitic cytoplasmic elements other than viruses. Many cases of deleterious mitochondria (Bertrand, 2000) and plasmids (Griffiths, 1995) have been described in fungi, particularly for *C. parasitica*, *Neurospora crassa*, *N. intermedia*, *Podospora anserina*, *A. amstelodami* and *Ophiostoma novo-ulmi*. The ecological and epidemiological characteristics of these deleterious cytoplasmic elements are poorly understood, due to a lack of field studies of the type conducted by Hoegger et al. (2003). These authors monitored viral and mitochondrial dispersion from a strain of *C. parasitica* released in the field. Within two years, the introduced viral and mitochondrial genomes had spread independently to the resident host population of fungus. Fungi are thus continually at risk of becoming infected by parasitic cytoplasmic elements. Such a risk may also exist for marine invertebrates, although no experimental data are currently available to confirm this.

Hoegger et al. (2003) also demonstrated the independence of the nuclear and cytoplasmic genomes in fungi, and the resulting possibility of genetic conflict within the mycelium. Mitochondrial migration after fusion has repeatedly been reported in fungi (Hintz et al., 1988; May and Taylor, 1988; Smith et al., 1990; Lee and Taylor, 1993), and the replacement of resident mitochondria by migrant mitochondria has even been described (Lee and Taylor, 1993). Horizontal transfer would account for fungal organelles never reaching the same degree of domestication by the nuclear genome as observed in animals. This hypo-

thesis is supported by the difference in size between the animal and fungal mitochondrial DNA (mtDNA) genome. Animal mtDNA has been gradually eroded by the transfer of mitochondrial genes to the nuclear genome, possibly due to intracytoplasmic competition for rapid replication (Selosse et al., 2001). However, this does not seem to have occurred in fungi. The coenocytic states of fungi, their regular cytoplasmic exchanges and high rate of mtDNA recombination (Barr et al., 2005) have not allowed the same degree of mitochondrial coevolution in fungi as in animals. Moreover, these conditions would allow subindividual levels of selection in fungi, potentially resulting in the evolution of deleterious cytoplasmic elements (Bertrand, 2000). As a consequence, the mutualism between the cytoplasmic and nuclear genomes occurring in all eukaryotes is more likely to evolve towards parasitism in fungi than in any other kingdom. The occurrence of deleterious mitochondria in fungi illustrates the potential risk of subcellular evolution in fungi and the need for fungi to regulate horizontal transmission. Similarly, almost all species of fungi display predominantly uniparental inheritance of mtDNA, as in plants and animals ; this pattern of inheritance may be an adaptation to prevent heteroplasmy, which would promote genome conflicts (Hurst, 1992). The vegetative incompatibility system of fungi, by limiting the horizontal transmission of cytoplasmic elements, may be a complementary counterpart of sexual reproduction for limiting genetic conflicts within the organism.

The risk represented by conspecific fusion cannot be the only cause of the allelic diversity of SNSR system genes (Begueret et al., 1994; Muirhead et al., 2002). Polymorphism may also be an indirect consequence of selection pressures acting on functions other than SNSR. For example, in *P. anserina* and *N. crassa*, the properties of vegetative incompatibility genes suggest that they have other cellular functions (Begueret et al., 1994). This would imply that genes interacting during recognition may also be involved in the intrinsic fitness of the organisms and that selection fixes specific loci in each subpopulation. In fungi, the *mt* locus of *N. crassa*, which is also the mating type locus regulating choice of mating partner, has been shown to have a pleiotropic function. A recent study also showed that, in *N. crassa*, bacterial infection may induce an incompatibility reaction, limiting the spread of the pathogen into the mycelium (Wichmann et al., 2008). Thus, the

SNSR systems of marine invertebrates and fungi may, like the vertebrate MHC, operate at interspecific level, to detect pathogen infection. However, even if confirmed, this hypothetical pleiotropy does not eliminate the risks of fusion described above and the benefits of vegetative incompatibility with non-siblings, particularly for colonial organisms. Nonetheless, the possibility of many levels of selection acting on the genes involved in somatic incompatibility may complicate the detection of a clear signature of balancing selection (Milgroom and Cortesi, 1999).

2.4 Somatic incompatibility, multicellularity and the concept of individuality

It would be naive to think that the allelic diversity of the loci involved in self-recognition in fungi and colonial marine invertebrates results from a single well defined selective pressure. The evolution of self-recognition mechanisms in these organisms is more probably the result of a trade-off between the complex networks of selection pressures in favour of fusion or non-fusion behaviour. The emergence of self-recognition, and consequently of individuality, appears to be an indirect consequence of selection pressures acting at different levels of selection in these fusible organisms. For this reason, analogies can be drawn between the "to fuse or not to fuse" dilemma of colonial organisms and the "live together or apart" dilemma continuously faced by the cells of all multicellular organisms. First, both result from trade-offs between selfishness and altruism for the entities concerned. Second, greater selection for individuality has emerged from both dilemmas. Indeed, the dynamics of embryogenesis in animals can be seen as an organised competition between different cell lineages within an entity (the individual), which promotes their co-operation (Buss, 1987). Moreover, the ancestral trade-off between survival and reproduction for unicellular organisms would result, during the transition to multicellularity, in the specialisation of cells into germ line and soma within a given entity (Michod et al., 2006). However, there are differences between these two dilemmas. For the "to fuse or not to fuse" dilemma, individuality results from interactions between different entities

Box 2 : Strategies for "living together" in cells of fungi, plants and animals and the dangers of somatic fusion

Cellular organisation in plants, fungi and animals differs in terms of two traits : cellularity and the presence or absence of a cell wall. As a result of these basic cellular differences, different strategies allowing cells to "live together" have emerged, as shown in the Figure 2.2 (Buss, 1987). In plants, each cell is isolated by a rigid cell wall, which is thought to provide natural protection against replacement by competitive germ-line cells (Buss, 1987; Santelices, 2004b), infection with pathogens (Wu and Dimitman, 1984) and, perhaps, deleterious organelles. This might explain why plants constitute the only multicellular eukaryote phylum in which somatic incompatibility system have never evolved. By contrast, animals, which lack cell walls, and fungi, which display lower levels of cellularity, are thought to be more vulnerable to the dangers associated with somatic fusion. Nevertheless, the emergence of SNSR systems may depend on different levels of selection in fungi and animals. In fungi, the disappearance of the cellular state to generate a coenocytic organisation results in the SNSR system acting at the cytoplasmic level whereas, in animals, recognition acts between cells. For this reason, wall digestion and contact between two cytoplasms is required to activate the fungal SNSR. Consequently, somatic fusion has more advantages and potential dangers in fungi than in animals. However, despite the action of selection pressures at different levels, similar SNSR systems have evolved in fungi and marine invertebrates, the main difference in the mechanisms underlying both types of SNSR system being the site of the active proteins (mainly in the cytosol for fungi and in the membrane for animals).

(or germ lines) whereas, for the "living together or apart" dilemma, all interactions occur within the same entity (or germ line). Thus, for "the to fuse or not to fuse" dilemma, the definition of individual genetic and somatic boundaries results less from an intrinsic process than from extrinsic interactions between a group of co-operative cells in the same biotic environment.

The transition from unicellularity to multicellularity has occurred several times during evolution, but only three lineages, corresponding to three kingdoms, have reached a high degree of complexity (Grosberg and Strathmann, 2007). Coloniality, a global trend in the emergence of multicellularity in plants, animals and fungi (Marfenin, 1997), has certainly been a key element in the evolution of the individual as an evolutionary entity. Indeed, altruistic and selfish interactions within the same colony, between groups of various degrees of relatedness, would be likely to disrupt continually the subtle equilibrium of the multicellular state of these forms of life, particularly in fungi and animals (Box 2). Consequently, self/non-self discrimination through the detection of allelic polymorphism can be viewed as an indirect consequence of the unicellular-multicellular transition, and

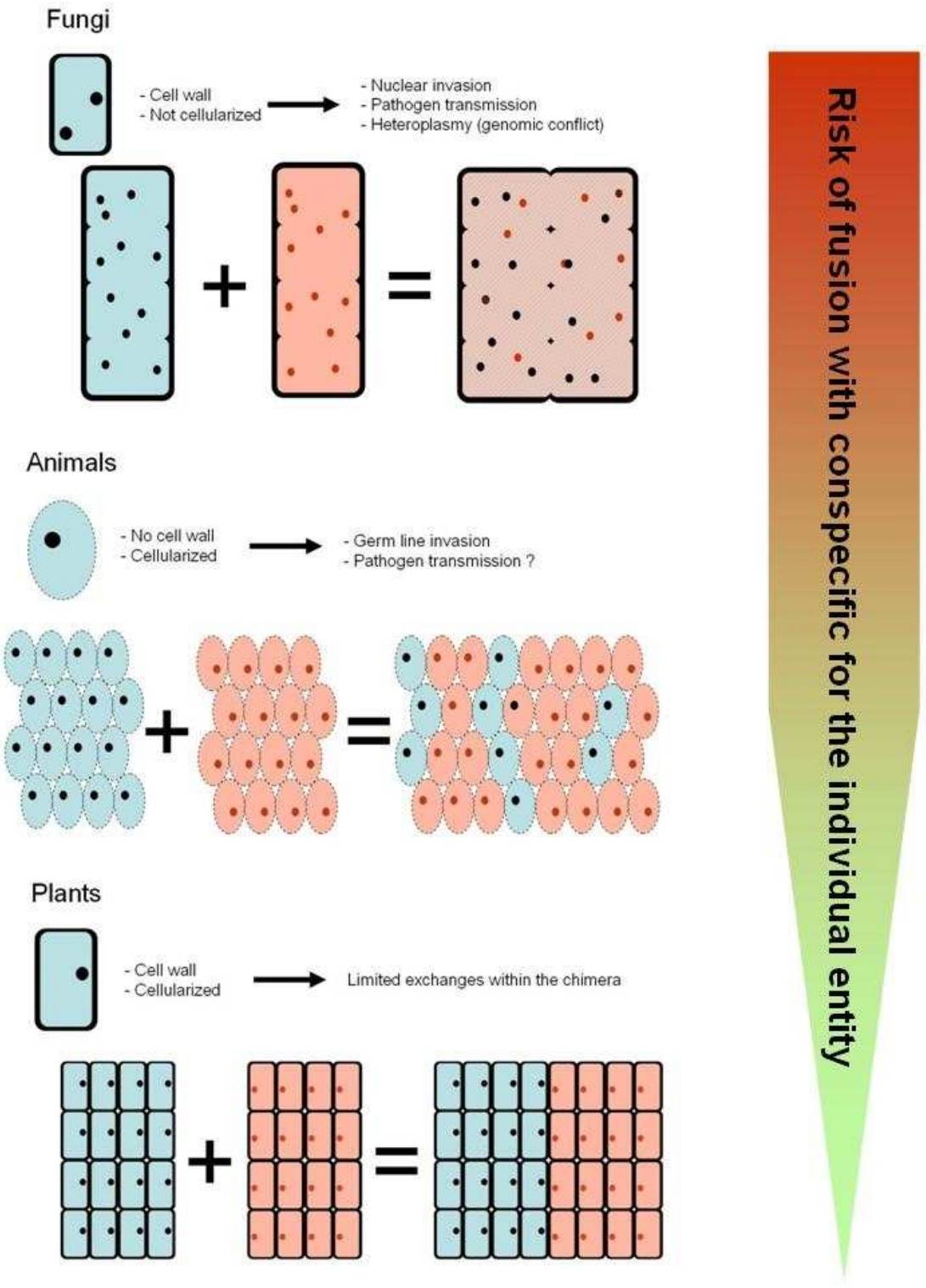


FIGURE 2.2: Risks of fusion with conspecific and celluar organisation of Fungi, Animals and Plants

clearly represents the first expression of individuality. During evolution, mechanisms such as germ-line sequestration, the inclusion of clonal development in the life cycle, and maternal control over early embryonic development have placed the individual at the heart of the selection process. As the boundaries between individuals are strengthened, the risk of conspecific fusion decreased, and SNSR systems evolved towards protection against mosaicism or pathogen recognition (Rinkevich and Shapira, 1999), rather than as a means of preventing chimera formation. Nonetheless, the somatic incompatibility systems of colonial invertebrates illustrate the primordial function of SNSR systems in the limitation of chimera formation and shed light on the evolutionary pressures governing the evolution of individuality in these simple organisms.

Acknowledgements

This work was funded by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Région Aquitaine. We thank Sven Saupe and Rémy Petit for their helpful comments on the manuscript.

2.5 References

Aanen, D. K., Debets, A. J., de Visser, J. A., and Hoekstra, R. F. (2008). The social evolution of somatic fusion. *Bioessays*, 30 :1193–1203.

Azumi, K., Santis, R. D., Tomaso, A. D., Rigoutsos, I., Yoshizaki, F., Pinto, M. R., Marino, R., Shida, K., Ikeda, M., Ikeda, M., Arai, M., Inoue, Y., Shimizu, T., Satoh, N., Rokhsar, D. S., Pasquier, L. D., Kasahara, M., Satake, M., and Nonaka, M. (2003). Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system : "waiting for Godot". *Immunogenetics*, 55(8) :570–581.

Barr, C. M., Neiman, M., and Taylor, D. R. (2005). Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytologist*, 168(1) :39–50.

Begueret, J., Turcq, B., and Corinne Clavé (1994). Vegetative incompatibility in filamentous fungi : *het* genes begin to talk. *Trends in Genetics*, 10 :441–446.

Beiring, E. A. and Lasker, H. R. (2000). Egg production by colonies of a gorgonian coral. *Marine Ecology-Progress Series*, 196 :169–177.

Bertrand, H. (2000). Role of mitochondrial DNA in the senescence and hypovirulence of fungi and potential for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 38 :397–422.

Bever, J. D. and Wang, M. (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi : Hyphal fusion and multigenomic structure. *Nature*, 433(7022) :E3–E4.

Bishop, J. D. D. and Sommerfeldt, A. D. (1999). Not like Botryllus : indiscriminate post-metamorphic fusion in a compound ascidian. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 266 :241–248.

Buss, L. W. (1982). Somatic cell parasitism and the evolution of somatic tissue compatibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79 :5537–5541.

Buss, L. W. (1987). *The evolution of individuality*. Princeton University, Princeton.

Cadavid, L. F. (2005). Selftnon-self discrimination in basal metazoa : Genetics of allorecognition in the hydroid *Hydractinia*. *Integrative and Comparative Biology*, 45(4) :623–630.

Caten, C. E. (1972). Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. *Journal Of General Microbiology*, 72(2) :221–229.

Cortesi, P. and Milgroom, M. G. (1998). Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8) :2988–2994.

Cortesi, P. and Milgroom, M. G. (2001). Outcrossing and diversity of vegetative compatibility types in populations of *Eutypa lata* from grapevines. *Journal of Plant Pathology*, 83(2) :79–86.

Croft, J. and Jinks, J. L. (1977). Aspects of the population genetics of *Aspergillus nidulans*. In Smith, J. E. and Pateman, J. A., editors, *Genetics and Physiology of Aspergillus*, pages pp. 339–360. Academic Press, London.

Croll, D. and Sanders, I. (2009). Recombination in *Glomus intraradices*, a supposed ancient asexual arbuscular mycorrhizal fungus. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1) :13.

Davis, R. (1959). Asexual selection in *Neurospora Crassa*. *Genetics*, 44 :1291–1308.

De Tomaso, A. W., Nyholm, S. V., Palmeri, K. J., Ishizuka, K. J., Ludington, W. B., Mitchel, K., and Weissman, I. L. (2005). Isolation and characterization of a protochordate histocompatibility locus. *Nature*, 438(7067) :454–459.

Debets, A. J. M. and Griffiths, A. J. F. (1998). Polymorphism of *het*-genes prevents resource plundering in *Neurospora crassa*. *Mycological Research*, 102 :1343–1349.

Dodge, B. O. (1935). The mechanisms of sexual reproduction in *Neurospora*. *Mycologia*, 27 :418–438.

Friesen, T. L., Stukenbrock, E. H., Liu, Z. H., Meinhardt, S., Ling, H., Faris, J. D., Rasmussen, J. B., Solomon, P. S., McDonald, B. A., and Oliver, R. P. (2006). Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature Genetics*, 38(8) :953–956.

Gaino, E., Bavestrello, G., and Magnino, G. (1999). Self/non-self recognition in sponges. *Italian Journal of Zoology*, 66(4) :299–315.

Ghabrial, S. A. (1998). Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*, 16(1) :119–131.

Giovannetti, M., Sbrana, C., Strani, P., Agnolucci, M., Rinaudo, V., and Avio, L. (2003). Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 :616–624.

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

Glass, N. L. and Kuldau, G. A. (1992). Mating Type and Vegetative Incompatibility in Filamentous Ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 30 :201–224.

Glass, N. L., Rasmussen, C., Roca, M. G., and Read, N. D. (2004). Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends in Microbiology*, 12(3) :135–141.

Griffiths, A. J. F. (1995). Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiological Reviews*, 59(4) :673–685.

Grosberg, R. K. (1988). The evolution of allorecognition specificity in clonal invertebrates. *Quarterly Review of Biology*, 63(4) :377–412.

Grosberg, R. K. and Quinn, J. F. (1989). The evolution of selective aggression conditioned on allorecognition specificity. *Evolution*, 43(3) :504–515.

Grosberg, R. K. and Strathmann, R. R. (2007). The evolution of multicellularity : A minor major transition ? *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 38 :621–654.

Guillaumin, J. (1998). Genetic control of somatic incompatibility in *Armillaria ostoyae* -a preliminary analysis. In Delatour, C., Guillaumin, J. J., Lung-Escarmant, B., and Marçais, B., editors, *Proceedings of the ninth International Conference on Root and Butt Rots of Forest Trees. France, Colloques de l'INRA, no. 89.*, pages 31–38.

Hansen, E. M., Stenlid, J., and Johansson, M. (1993). Genetic-Control of Somatic Incompatibility in the Root-Rotting Basidiomycete *Heterobasidion annosum*. *Mycological Research*, 97 :1229–1233.

He, C., Rusu, A. G., Poplawski, A. M., Irwin, J. A., and Manners, J. M. (1998). Transfer of a supernumerary chromosome between vegetatively incompatible biotypes of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Genetics*, 150(4) :1459–1466.

Hintz, W., Anderson, J. B., and Horgen, P. A. (1988). Nuclear migration and mitochondrial inheritance in the mushroom *Agaricus bitorquis*. *Genetics*, 119 :35–41.

Hoegger, P. J., Heiniger, U., Holdenrieder, O., and Rigling, D. (2003). Differential transfer and dissemination of hypovirus and nuclear and mitochondrial genomes of a hypovirus-infected *Cryphonectria parasitica* strain after introduction into a natural population. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7) :3767–3771.

Hughes, R. N., Manriquez, P. H., Morley, S., Craig, S. F., and Bishop, J. D. D. (2004). Kin or self-recognition ? Colonial fusibility of the bryozoan *Celleporella hyalina*. *Evolution & Development*, 6(6) :431–437.

Hulbert, S. H. and Michelmore, R. W. (1988). DNA restriction fragment length polymorphism and somatic variation in the lettuce downy mildew fungus, *Bremia lactucae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1 :17–24.

Hurst, L. D. (1992). Intragenomic Conflict as an Evolutionary Force. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 248(1322) :135–140.

Hyakumachi, M. and Ui, T. (1987). Non-self-anastomosing isolates of *Rhizoctonia solani* obtained from fields of surgarbeet monoculture. *Transactions of the British Mycological Society*, 89 :155–159.

Kai, S. and Sakai, K. (2008). Effect of colony size and age on resource allocation between growth and reproduction in the corals *Goniastrea aspera* and *Favites chinensis*. *Marine Ecology-Progress Series*, 354 :133–139.

Laird, D. J., De Tomaso, A. W., and Weissman, I. L. (2005). Stem cells are units of natural selection in a colonial ascidian. *Cell*, 123(7) :1351–1360.

Lee, S. B. and Taylor, J. W. (1993). Uniparental inheritance and replacement of mitochondrial DNA in *Neurospora tetrasperma*. *Genetics*, 134 :1063–1075.

Leslie, J. F. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annu Rev Phytopathol*, 31 :127–50.

Liu, Y. and Milgroom, M. G. (1996). Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (*vic*) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology*, 86(1) :79–86.

Liu, Y.-C., Dynek, J. N., Hillman, B. I., and Milgroom, M. G. (2007). Diversity of viruses in *Cryphonectria parasitica* and *C. nitschkei* in Japan and China, and partial characterization of a new chrysovirus species. *Mycological Research*, 111 :433–442.

Malik, M. and Vilgalys, R. (1999). Somatic Incompatibility in Fungi. In Worrall, J. J., editor, *Structure and Dynamics of Fungal Populations*, pages 123–138. Chapman and Hall, London.

Marcais, B., Cael, O., and Delatour, C. (2000). Genetics of somatic incompatibility in *Collybia fusipes*. *Mycological Research*, 104 :304–310.

Marfenin, N. N. (1997). Adaptation capabilities of marine modular organisms. *Hydrobiologia*, 355 :153–158.

Marshall, D. J., Cook, C. N., and Emlet, R. B. (2006). Offspring size effects mediate competitive interactions in a colonial marine invertebrate. *Ecology*, 87(1) :214–225.

May, G. and Taylor, J. W. (1988). Patterns of mating and mitochondrial DNA inheritance in the agaric basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Genetics*, 118 :213–220.

McGhee, K. E. (2006). The importance of life-history stage and individual variation in the allorecognition system of a marine sponge. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 333(2) :241–250.

McGuire, I. C., Davis, J. E., Double, M. L., MacDonald, W. L., Rauscher, J. T., McCawley, S., and Milgroom, M. G. (2005). Heterokaryon formation and parasexual recombination between vegetatively incompatible lineages in a population of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Mol Ecol*, 14(12) :3657–69.

Michod, R. E., Viossat, Y., Solari, C. A., Hurand, M., and Nedelcu, A. M. (2006). Life-history evolution and the origin of multicellularity. *Journal of Theoretical Biology*, 239(2) :257–272.

Milgroom, M. G. (1999). Viruses in fungal populations. In Woral, J., editor, *Structure and Dynamics of Fungal Population*, pages 283–305. Dordrecht, The Netherlands : Kluwer.

Milgroom, M. G. and Cortesi, P. (1999). Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18) :10518–10523.

Milgroom, M. G. and Cortesi, P. (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence : a critical analysis. *Annu Rev Phytopathol*, 42 :311–38.

Muirhead, C. A., Glass, N. L., and Slatkin, M. (2002). Multilocus self-recognition systems in fungi as a cause of trans-species polymorphism. *Genetics*, 161(2) :633–641.

Nauta, M. J. and Hoekstra, R. F. (1994). Evolution of vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes .1. Deterministic models. *Evolution*, 48(4) :979–995.

Nuss, D. L. (1992). Biological control of chestnut blight : an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiol Rev*, 56(4) :561–76.

O'Donoghue, K., Chan, J., de la Fuente, J., Kennea, N., Sandison, A., Anderson, J. R., Roberts, I. A. G., and Fisk, N. M. (2004). Microchimerism in female bone marrow and bone decades after fetal mesenchymal stem-cell trafficking in pregnancy. *Lancet*, 364(9429) :179–182.

Paoletti, M., Saupe, S. J., and Corinne Clavé (2007). Genesis of a fungal Non-Self recognition repertoire. *PLoS ONE*, 2(3) :e283.

Pawlowska, T. E. and Taylor, J. W. (2004). Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 427(6976) :733–737.

Perkins, D. D. and C., T. B. (1988). *Neurospora* from natural populations : toward the population biology of a haploid eukaryote. *Experimental mycology*, 12 :91–131.

Pineda-Krch, M. and Fagerstrom, T. (1999). On the potential for evolutionary change in meristematic cell lineages through intraorganismal selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 12(4) :681–688.

Pineda-Krch, M. and Lehtila, K. (2004). Challenging the genetically homogeneous individual. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(6) :1192–1194.

Pontecorvo, G., Roper, J. A., and Forbes, E. (1953). Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Journal Of General Microbiology*, 8 :198–210.

Poudyal, M., Rosa, S., Powell, A. E., Moreno, M., Dellaporta, S. L., Buss, L. W., and Lakkis, F. G. (2007). Embryonic chimerism does not induce tolerance in an invertebrate model organism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 :4559–4564.

Pringle, A., Chen, D., and Taylor, J. W. (2003). Sexual fecundity is correlated to size in the lichenized fungus *Xanthoparmelia cumberlandia*. *Bryologist*, 106(2) :221–225.

Queller, D. C., Ponte, E., Bozzaro, S., and Strassmann, J. E. (2003). Single-Gene Greenbeard Effects in the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Science*, 299(5603) :105–106.

Rayner, A. D. M., Beeching, J. R., Crowe, J. D., and Watkins, Z. R. (1999). Defining individual fungal boundaries. In Worrall, J. J., editor, *Structure and Dynamics of Fungal Populations*, pages 19–42. Chapman and Hall, London.

Richman, A. (2000). Evolution of balanced genetic polymorphism. *Molecular Ecology*, 9(12) :1953–1963.

Rinkevich, B. and Shapira, M. (1999). Multi-partner urochordate chimeras outperform two-partner chimerical entities. *Oikos*, 87(2) :315–320.

Rizzo, D. M., Rentmeester, R. M., and Burdsall, H. H. (1995). Sexuality and somatic incompatibility in *Phellinus gilvus*. *Mycologia*, 87 :805–820.

Robin, C. and Heiniger, U. (2001). Chestnut blight in Europe : diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research*, 76(3) :361–367.

Roca, M. G., Read, N. D., and Wheals, A. E. (2005). Conidial anastomosis tubes in filamentous fungi. *Fems Microbiology Letters*, 249(2) :191–198.

Rodriguez-Carres, M., White, G., Tsuchiya, D., Taga, M., and VanEtten, H. D. (2008). The supernumerary chromosome of *Nectria haematococca* that carries Pea-

Pathogenicity-Related genes also carries a trait for pea rhizosphere competitiveness. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(12) :3849–3856.

Rosewich, U. L. and Kistler, H. C. (2000). Role of horizontal gene transfer in the evolution of fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 38 :325–+.

Sanders, I. R. (1999). Evolutionary genetics - No sex please, we're fungi. *Nature*, 399(6738) :737–739.

Santelices, B. (2004b). Mosaicism and chimerism as components of intraorganismal genetic heterogeneity. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(6) :1187–1188.

Selosse, M. A., Albert, B. R., and Godelle, B. (2001). Reducing the genome size of organelles favours gene transfer to the nucleus. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(3) :135–141.

Selosse, M. A., Richard, F., He, X. H., and Simard, S. W. (2006). Mycorrhizal networks : des liaisons dangereuses ? *Trends in Ecology & Evolution*, 21(11) :621–628.

Smith, M., Duchesne, L. C., Bruhn, J. N., and Anderson, J. B. (1990). Mitochondrial genetics in a natural population of the plant pathogen *Armillaria*. *Genetics*, 126 :575–582.

Spring, O. and Zipper, R. (2006). Evidence for asexual genetic recombination in sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*. *Mycological Research*, 110(Pt 6) :657–663.

Stoner, D. S., Rinkevich, B., and Weissman, I. L. (1999). Heritable germ and somatic cell lineage competitions in chimeric colonial protochordates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16) :9148–9153.

Stoner, D. S. and Weissman, I. L. (1996). Somatic and germ cell parasitism in a colonial ascidian : Possible role for a highly polymorphic allorecognition system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26) :15254–15259.

Taylor, J. W., Jacobson, D. J., and Fisher, M. C. (1999). The evolution of asexual fungi : Reproduction, speciation and classification. *Annual Review of Phytopathology*, 37 :197–246.

Todd, N. K. and Rayner, A. D. M. (1980). Fungal individualism. *Science Progress*, 66 :331–354.

Tsounis, G., Rossi, S., Aranguren, M., Gili, J. M., and Arntz, W. (2006). Effects of spatial variability and colony size on the reproductive output and gonadal development cycle of the Mediterranean red coral (*Corallium rubrum* L.). *Marine Biology*, 148(3) :513–527.

Van de Vyver, G. (1988). Histocompatibility responses in freshwater sponges : A model for studies of cell-cell interactions in natural populations and experimental systems. In *Inverlebrafe Hislorecognition*, pages pp. 1–14. R. K. Grosberg, D. Hedgecock, and R. K. Nelson, New York.

van der Does, H. C., Lievens, B., Claes, L., Houterman, P. M., Cornelissen, B. J. C., and Rep, M. (2008). The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. *Environmental Microbiology*, 10(6) :1475–1485.

Vonholdt, B. M. and Ostrander, E. A. (2006). The singular history of a canine transmissible tumor. *Cell*, 126 :445–447.

Wichmann, G., Sun, J., Dementhon, K., Glass, N. L., and Lindow, S. E. (2008). A novel gene, phcA from *Pseudomonas syringae* induces programmed cell death in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology*, 68 :672–689.

Wilson, A. C. C. and Grosberg, R. K. (2004). Ontogenetic shifts in fusion-rejection thresholds in a colonial marine hydrozoan, *Hydractinia symbiolongicarpus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 57(1) :40–49.

Wu, J., Saupe, S. J., and Glass, N. L. (1998). Evidence for balancing selection operating at the *het-c* heterokaryon incompatibility locus in a group of filamentous fungi. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(21) :12398–12403.

Wu, J. H. and Dimitman, J. E. (1984). Increased resistance to the spread of tobacco mosaic virus in pinto bean leaves caused by sugar and light. *Journal of Phytopathology*, 110(1) :37–48.

Xie, J., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Huang, J., Li, B., Hsiang, T., and Peng, Y. (2008). Intergeneric transfer of ribosomal genes between two fungi. *BMC Evolutionary Biology*, 8 :87.

Chapitre 3

Pression parasitaire exercée par les DCE et maintien de la diversité génétique des populations d'hôte

3.1 Étude de la transmission inter GCV du CHV-1 en conditions naturelles

3.1.1 Introduction

L'introduction générale de ce manuscrit a fait référence à de nombreuses études montrant que les systèmes d'incompatibilité végétative des champignons ne constituent pas une barrière imperméable à la propagation des DCE. Cependant à notre connaissance, toutes ces données de transmission ont été obtenues in vitro. De plus la seule étude de la transmission inter GCV d'un DCE en population naturelle ne repose pas sur l'observation de ces transmissions mais d'une estimation d'un flux de migration de la population de DCE entre GCV (Carbone et al., 2004). La réalité de la transmission des DCE dans les populations naturelles de champignons reste encore largement inexplorée. Le but de cette partie est donc d'étudier la propagation du CHV-1 en conditions naturelles, en analysant :

- la transmission du virus entre GCV lorsque le champignon croît sur son substrat naturel (le châtaignier)
- la transmission du virus au sein d'une population naturelle de C. parasitica constituée de différents GCV.

Pour comparer la transmission du CHV-1 en conditions *in planta* et *in vitro*, des confrontations entre isolats de GCV différents (un isolat donneur contre un isolat receveur) ont été réalisées à la fois sur boite de Petri et sur tiges de châtaignier. Le deuxième point consiste en l'étude de la diversité génétique de l'hypovirus CHV-1 infectant une population de C. parasitica de Dordogne. La Dordogne est au centre du front de rencontre des deux populations de C. parasitica, du Sud-Est et du Sud-Ouest de la France (Robin et al., 2009 ; Dutech et al., in prép). Cette région représente un laboratoire naturel idéal pour tester l'efficacité du système d'incompatibilité végétative dans la transmission des DCE en populations naturelles. L'utilisation de marqueurs moléculaires (10 marqueurs microsatellites) a permis de mettre en évidence l'existence dans une population de C. parasitica (à Saint-Cernin, Dordogne) de quatre lignées clonales dominantes, (regroupant à elles seules 56% des isolats étudiés et présentant la même combinaison allélique pour 10 marqueurs microsatellites (Dutech et al., 2008). Chacune de ces lignées clonales correspond à un GCV (respectivement, EU-2, EU-33, EU-66 et EU-72). EU-66 et EU-72 sont des GCV caractéristiques du Sud-Ouest de la France, EU-2 du Sud-Est de la France, EU-33 a été détecté jusqu'à présent principalement en Dordogne (Robin et al., 2000 ; Robin et al., 2009). Dans cette même population, 51% des isolats de C. parasitica étaient blancs et supposés infectés par le CHV-1 (Dutech et al., 2008). L'objectif de cette étude était donc de caractériser les souches de CHV-1 infectant les différentes lignées présentes dans cette population.

3.1.2 Matériels et Méthodes

3.1.2.1 Transmission sur tige de châtaignier

Des tiges saines de châtaignier (sans trace de chancre) ont été prélevées sur le site de Pierroton (INRA Bordeaux). Ces tiges ont été découpées en 192 fragments de 15 à

20 cm de long et de 2 à 5 cm de diamètre qui ont été répartis aléatoirement en quatre lots. Chacune de ces tiges a été inoculée avec un isolat (isolat receveur) en déposant une pastille de 5 mm de diamètre d'une culture de l'isolat (sur PDA et âgée de 8 jours) sur une blessure de même taille réalisée à l'aide d'un emporte-pièce dans les tissus corticaux de la tige. Le point d'inoculation est entouré d'un film plastique. Les tiges inoculées ont été conservées à température et à luminosité ambiante pendant 3 semaines, dans un bac contenant de l'eau afin qu'elles ne dessèchent pas. Les tiges où le champignon s'était bien développé et a induit une lésion, ont ensuite été inoculées par un isolat virosé (isolat donneur). L'inoculation de ces isolats virosés s'est faite en quatre points dans les marges de la lésion. Nous avons utilisé, par GCV, trois isolats donneurs différents et un isolat receveur (l'isolat servant de testeur), et quatre GCV différents (EU-2, EU-33, EU-5 et EU-72). Quatre répétitions ont été réalisées par couple isolat donneur/isolat receveur. Après 21 jours d'incubation (température et à luminosité ambiantes), cinq prélèvements de 0.7 cm de diamètre ont été réalisés au centre de la lésion de façon à privilégier le prélèvement de l'isolat receveur. Ces prélèvements ont été déposés sur PDA en boite de pétri pendant quatre jours à l'obscurité puis à luminosité naturelle. L'aspect des isolats obtenus a été caractérisé. L'objectif était de mettre en évidence l'infection de l'isolat receveur par l'isolat donneur, c.a.d. d'identifier des isolats infectés du même GCV que celui du receveur. Pour cela, le GCV des isolats présentant les symptômes d'une infection par le CHV-1 (dépigmentés et/ou avec une croissance irrégulière) a été déterminé par confrontation avec l'isolat receveur non infecté. En parallèle à cette expérience sur tige, la transmission virale entre les mêmes couples d'isolats de GCV (avec les mêmes couples isolat donneur/isolat receveur) a également été testée *in vitro* en boite de pétri sur PDA (potato-dextrose agar) comme décrit par Liu et Milgroom (1996). Pour chacun de ces couples entre 12 et 24 tentatives de conversion ont été réalisées.

Pour ces expérience l'efficacité de la transmission du CHV a été estimée en calculant le pourcentage de lésions pour lesquelles nous avons observé la transmission du CHV entre isolats donneurs et isolats receveurs entre différents couples de GCV (entre 5 et 12 lésions par couple d'isolats) et en calculant le pourcentage de conversion observée en boite de

pétri (entre 36 et 72 tentatives de conversion par couple d'isolats)

3.1.2.2 Transmission en population naturelle

A partir de la population de C. parasitica de Saint-Cernin (Dordogne), déjà échantillonnée et dont la diversité génétique est connue (Dutech et al., 2008), nous avons extrait et séquencé (sens 5' – 3' ; par l'intermédiaire de GATC-biotech : https ://www.gatc-biotech.com) le CHV-1 de 54 isolats, présentant les caractéristiques d'une infection virale. L'extraction et la RT-PCR de l'ARN viral ont été réalisées en suivant les protocoles décris dans Gobbin et al. (2003). Deux régions du génome du virus ont ensuite été séquencées :

- une région de 266 paires de bases située dans l'ORF-A entre les nucléotides 1495 et 1792 de la séquence de la souche référence [EP713] (Gobbin et al., 2003)
- et une région de 436 paires de bases dans l'ORF-B située entre les nuléotides 6711 et 6807 de la séquence de la souche référence [EP713] (OrfB_12F : 5 - ATCGGGTCTCCCTTCAAGTT - 3 et OrfB_12R : 5 - CACGACGAGTTCGTTGAGRA - 3).

Chacun des deux sous-types I et F ayant déjà été entièrement séquencés (respectivement [Euro7] et [Ep713], nous avons pu déterminer à quel sous-type viral chacun des virus analysés était le plus proche à partir des données de séquençage, et rechercher la présence de séquence issues d'éventuelles recombinaisons. Les arbres phylogénétiques ont été obtenu par la méthode de Neighbour-joining (Saitou et Nei, 1987) en procedant à un test phylogénique de type bootstrap (1000 répétitions). Les différences de longueur de branche font référence au nombre de sites nucléotides différents entre séquences (voir échelle). Ces arbres phylogénétiques ont été obtenus avec le logiciel MEGA 4 (http ://www.megasoftware.net/) après vérification des chromatogrammes de chaque séquence obtenue.

Donneur		Eu2	Eu5	Eu33	Eu72
Receveur					
Eu2	*in vitro*	100%	0%	0%	0%
	in planta	90%	58%	58%	18%
Eu5	*in vitro*	0%	90%	0%	0%
	in planta	91%	100%	50%	56%
Eu33	*in vitro*	0%	16%	62%	0%
	in planta	.*	.*	100%	100%
Eu72	*in vitro*	0%	5%	4%	80%
	in planta	40%	25%	64%	95%

TABLE 3.1: Pourcentage moyen de transmission en fonction des GCV des isolats donneur et receveur : *in vitro* suivant le milieu de culture : le pourcentage est calculé en fonction du nombre de confrontations réalisées ; *in planta* : le pourcentage est calculé en fonction du nombre de lésions obtenues. * : données manquantes car l'isolat receveur n'a pas réussi à se développer sur tige après inoculation.

3.1.3 Résultats

3.1.3.1 Transmission sur tige de châtaignier

Les taux de transmission moyen entre GCV ont été calculés à partir des donnés obtenues entre isolats donneurs appartenant au même GCV. Lorsque les isolats receveur et donneur était tous les deux du même GCV, nous avons obtenu respectivement en moyenne, 83% et 95% de transmission du CHV *in vitro* et *in planta*. La transmission entre isolats de GCV différents varie de 18% à 100% *in planta*. Ces taux sont toujours supérieurs à ceux observés *in vitro*. De plus alors que *in vitro* la transmission du virus n'a pas été observée pour huit de ces confrontations, elle s'est avérée possible *in planta* à un taux moyen de 41% (Tableau 3.1). Pour un couple donné de GCV utilisé, les taux de transmission ne sont pas similaires en fonction du sens de transmission par exemple la transmission est de 18% entre EU-72 et EU-2 (sens donneur –receveur) mais de 40% dans le sens (EU-2 vers EU-72).

3.1.3.2 Transmission en population naturelle

Pour l'ORF A, 73% d'homologie entre les 266 sites nucléotides des 53 séquences analysées a été obtenu L'ORF-B a présenté un pourcentage d'homologie de 77% pour les 436 sites nucléotidique des 47 séquences analysées. L'arbre phylogénétique construit avec

l'ORF A indique que 27 séquences sont regroupées (51 % des séquences obtenues pour ce ORF) avec la souche [Ep713] appartenant au sous-type F, et 26 (49%) à la souche [Euro7] appartenant au sous-type I. Avec l'ORF B, 19 séquences sont regroupées (40 %) avec la souche [Ep713] de sous-type F, 26 (56%) à la souche [Euro7] de sous-type I et 2 (5%) ont présenté une séquence issue de la recombinaison entre les deux (Figures 3.1 et 3.2).

Au sein des sous types F et I, nous avons trouvé respectivement 94% et 95% d'analogie entre les sites nucléotidiques des séquences de l'ORF-A et 93% et 94% d'analogie entre les séquences de l'ORF-B.

L'arbre obtenu à partir des séquences de l'ORF-A permet de distinguer un groupe clonal au sein du sous-type I infectant les huit souches suivantes :sc4.5A ; sc35. 4A ; sc6.2A ; sc6.4A ; sc6.3A ; sc76.4C ; sc6.3B ; sc35.2B. Ce même groupe de souche est retrouvé avec l'analyse des séquences provenant de la région de l'ORF-B étudié. Ceci suggère que les virus infectant ces souches, bien que non-clonaux, sont suffisamment proches phylogénétiquement pour les regrouper au sein du même groupe que nous avons appelé I-1.

Nous avons trouvé six génotypes recombinés, trois présentant un ORF-A de type F et un ORF-B de type I (sc6.2B, sc36.3A et sc64.1A), un autre présentant un ORF-A de type I et un ORF-B de type F (sc1.2B) et trois dont l'ORF-B intermédiaire entre les deux sous-types (sc77.1D, sc77.4C).

Chaque sous-type viral a été retrouvé dans les quatre GCV majoritaires de la population (Tableau 3.2). Les GCV EU-2 et EU-33 sont majoritairement infectés par des virus de sous-type I (64% des infections hors recombinants) alors que les GCV EU-66 et EU-72 sont majoritairement infectés par des virus de sous-types F (63% des infections hors recombinants). La nature des virus de 11 isolats de champignons n'appartenant à aucun des quatre GCV dominants a également été étudiée. Ces GCV Min, qui regroupent des isolats de huit haplotypes différents, semblent être majoritairement infectés par des virus de sous-type I (60% des infections, hors recombinants). Le sous-type I-1 a été majoritairement trouvé associé à des isolats de GCV EU-2 (63%). De plus 71% des virus de sous-type I infectant des isolats de GCV EU-2 appartiennent au groupe I-1 (Figures 3.1

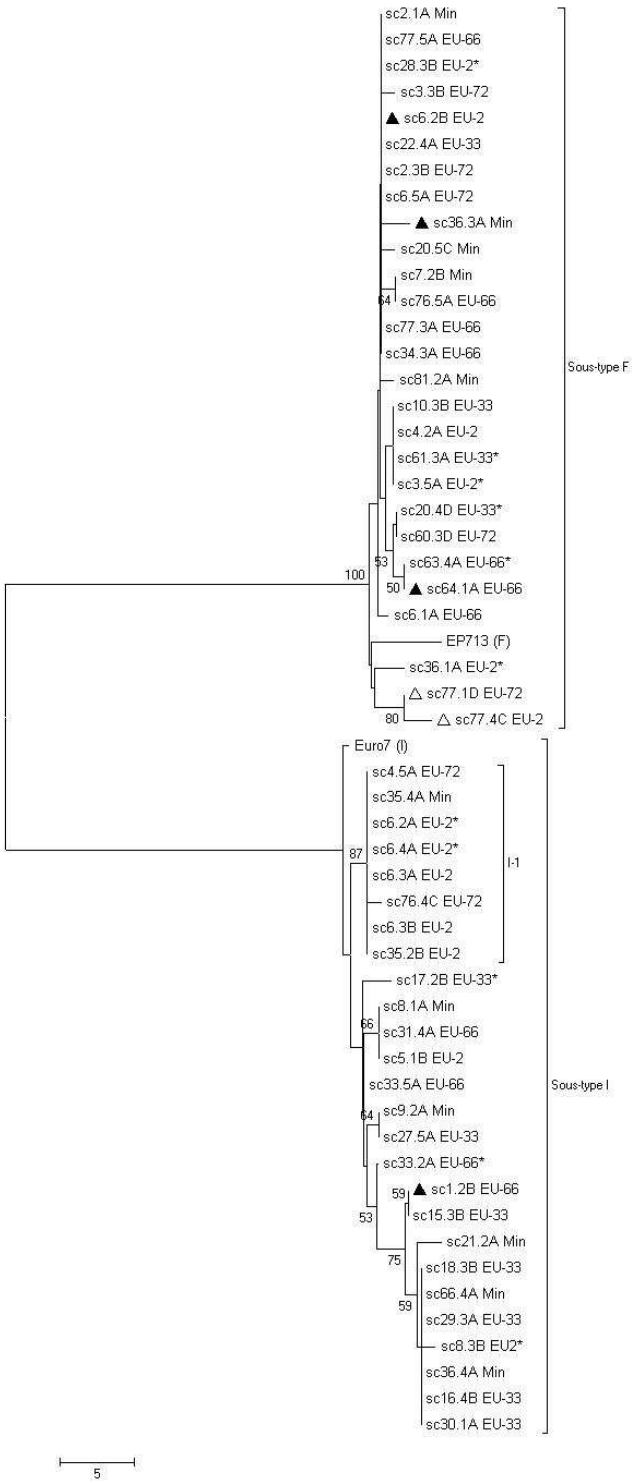


FIGURE 3.1: Arbre phylogénétique (methode de Neighbour-Joining) obtenu à partir de 55 séquences de la région de l'ORF-A (266 nucléotides) de souches de CHV-1. Les souches virales sont identifiées par le nom de l'isolat fongique suivi de son GCV. Seuls les neuds présentant une valeur de boostrap (1000 répétitions) supérieurs à 50 ont été conservés. Les séquences correspondantes des souches de références [EP713] et [Euro7] ont été ajoutées. L'échelle en bas à gauche de la figure correspond à une différence de 5 nucléotides entre séquences. *: isolat fongique donc le GCV n'a pas été testé mais déduit de l'haplotype. ▲: souches recombinées dont le type de la séquence de l'ORF-A n'est pas le même que celui de l'ORF-B. △: souches recombinées au sein de la région séquencée de l'ORF-B

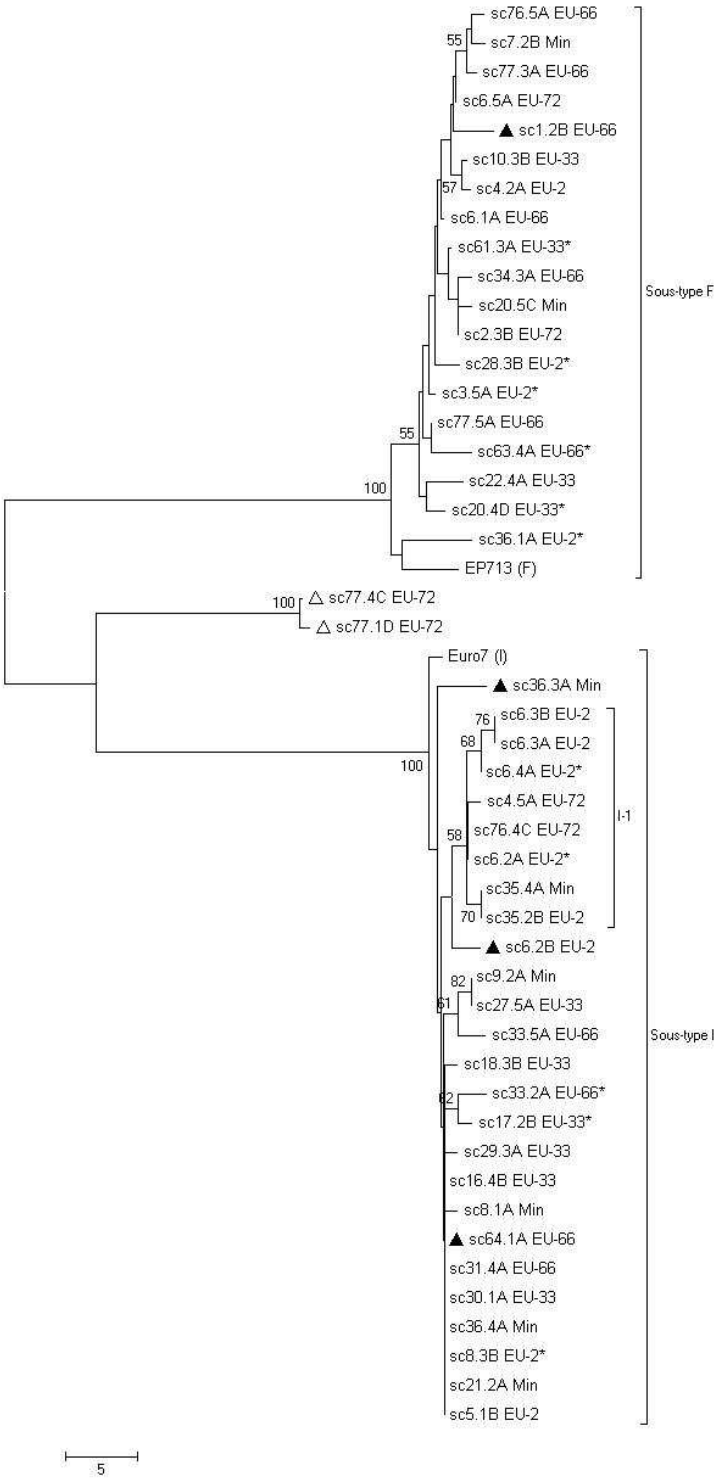


FIGURE 3.2: Arbre phylogénétique (methode de Neighbour-Joining) obtenu à partir de 49 séquences de la région de l'ORF-B (436 nucléotides) de souches de CHV-1. Les souches virales sont identifiées par le nom de l'isolat fongique suivi de son GCV. Les séquences correspondantes des souches de références [EP713] et [Euro7] ont été ajoutées. Seuls les neuds présentant une valeur de boostrap (1000 répétitions) supérieurs à 50 ont été conservés. L'échelle en bas à gauche de la figure correspond à une différence de 5 nucléotides entre séquences. *: isolat fongique donc le GCV n'a pas été testé mais déduit de l'haplotype. ▲: souches recombinées dont le type de la séquence de l'ORF-A n'est pas le même que celui de l'ORF-B. △: souches recombinées au sein de la région séquencée de l'ORF-B.

GCV	EU-2	EU-33	EU-66	EU-72	Min	total
Sous-type F	4	4	6	4 (2)	4 (2)	22 (4)
Sous-type I	7	7 (1)	3	2	6 (1)	25 (2)
Récombinés	1	0	2	2	1	6
total	12	11	11	8	11 (3)	53 (6)

TABLE 3.2: Répartition des différents sous-types viraux et des génotypes recombinés entre les différents GCV de la parcelle de Saint-Cernin. Min : GCV minoritaires. Entre parenthèse figure le nombre de virus pour lesquels seul l'ORF-A a été séquencé.

et 3.2).

3.1.4 Discussion

Les résultats provenant des deux approches vont dans le même sens : l'incompatibilité végétative ne confère pas à C. parasitica une protection efficace contre la transmission du CHV-1. Nos résultats obtenus sur tige laissent également supposer que les expérimentations de transmission *in vitro* de la littérature sous-estiment la capacité de transmission des DCE en conditions naturelles. Cette différence entre transmission *in vitro* et *in planta* peut s'expliquer par la différence de richesse des deux milieux (Glass et Fleissner, 2006). La fusion somatique peut être considérée chez les organismes sessiles comme un comportement de coopération (Cf chapitre 2). En milieu pauvre, les gains liés à la coopération sont sûrement plus importants que sur milieu riche, ce qui peut favoriser la fusion entre mycélium et donc la transmission des DCE entre mycéliums incompatibles. Une autre possibilité serait qu'il existe une corrélation négative entre richesse du substrat et temps pendant lequel le DCE peut se transmettre avant que le mécanisme d'incompatibilité déclenche la mort des hyphes entrées en fusion. Ceci pourrait être dû au fait que le processus de la réaction d'incompatibilité végétative prenne plus de temps sur milieu pauvre que sur milieu riche.

Sur les quatre GCV dominants de la population de Saint-Cernin en Dordogne, trois ont servi à tester la transmission des DCE sur tiges de châtaignier. Au vu des résultats de transmission *in planta* entre ces GCV, il apparaît normal que les sous-types viraux se soient transmis entre les GCV dominants de la parcelle de Saint-Cernin. Carbone et al.

(2004) en étudiant la diversité génétique de virus de deux populations italiennes de *C. parasitica* était arrivé à la même conclusion, c'est-à-dire que les données de transmission *in vitro* du CHV-1 sous-estiment la capacité naturelle du virus à se transmettre entre GCV. Cependant dans cette étude concernant des populations de virus uniquement infectées par des virus de sous-types I, les taux de transmission entre GCV ont été estimés à partir d'un modèle de coalescence. L'originalité de notre étude vient donc du fait que la Dordogne est située au niveau de front de rencontre entre des deux populations de CHV-1. Ainsi nous pouvons confirmer avec certitude que le transfert de virus entre GCV différent chez *C. parasitica* est bien une réalité. Ces résultats pourraient remettre en cause l'hypothèse de l'évolution de la diversité des gènes *vic* par une sélection fréquence dépendante dirigée par les DCE. Cependant, il est intéressant de constater que, même si les deux sous-types viraux sont présents dans chacun des GCV dominants de Saint-Cernin, nous avons trouvé plus d'isolats de GCV caractéristiques du Sud-Est infectés par le sous-type I que par le F (respectivement 58% et 33%). Et inversement plus d'isolats de GCV caractéristiques du Sud-Ouest infectés par le sous-type F que par le I (respectivement 52% et 33%). Il semblerait donc que les GCV restent majoritairement associés au sous-type qui devait infecter leur hôte d'origine. Ceci apparaît encore plus clairement lorsque nous regardons le sous-type I. En effet, les séquences de l'ORF-A des virus du groupe I-1 sont parfaitement identiques suggérant une origine commune et récente de ces huit souches virales. De plus il apparaît dans cette études que les virus du groupe I-1 sont majoritairement associés à des GCV EU-2 et inversement. Ceci nous permet de supposer qu'il y aurait eu à Saint-Cernin une vague de migration récente des virus du groupe I-1 associé au GCV EU2. Au vu de ces résultats, il est tentant de conclure que le système d'incompatibilité végétative, joue le rôle de frein dans la propagation du virus, permettant une compartimentation de la population d'hôte. Cependant, ce pattern pourrait être également lié à un effet géographique, les GCV majoritaires n'étant pas repartis aléatoirement sur la parcelle (Dutech et al, 2008). Il serait donc intéressant de de séquencer plus de virus pour avoir une meilleure idée de l'importance de leur localisation dans la dispersion.

Six des 49 virus séquencés pour les deux ORF ont présenté un génotype recombiné. Cela suggérerait qu'environ 12% des virus de la population de CHV de Saint-Cernin seraient des recombinants entre les deux sous-types. Des génotypes recombinant entre [EP713] et [Euro] ont déjà été obtenus artificiellement en laboratoire (Chen et al., 2000), via l'utilisation de plasmides vecteurs. Cependant des cas de recombinaisons naturelles entre des virus de sous-types I et F n'avait encore jamais été décrit. Comme le CHV-1 n'a pas de phase libre, ceci suggère fortement que des coinfections par plusieurs souches virales peuvent intervenir au sein d'un mycélium de *C. parasitica*. Le nombre de recombinants trouvés dans cette étude doit même sous-estimer la fréquence des cas de coinfection par deux sous-types viraux dans la parcelle de Saint-Cernin. En effet, il est possible d'imaginer que l'une des deux souches virales soit éliminée par l'autre sans que cela débouche sur la formation d'un génotype recombinant. De plus, l'observation de génotypes recombinants signifie que ces derniers ont réussit à atteindre une charge virale suffisamment importante pour se transmettre malgré la présence des deux génotypes parentaux. Pourtant le signal des chromatographes obtenu après chaque séquençage n'a jamais indiqué par la présence de virus de sous-types différents dans le même mycélium. Si ces cas de coinfection existent, un des deux sous-types doit donc subsister dans le mycélium à une concentration très faible. Il est d'ailleurs intéressant de remarquer que sur les six génotypes recombinés trouvés, la séquence provenant d'une partie l'ORF-A était de type "sous-type F". L'ORF-A contrôle le taux de réplication du virus (Choi et Nuss, 1992). On peut émettre l'hypothèse qu'en cas de coinfection, la souche virale présentant le taux de multiplication intra-hôte le plus important sera favorisée (Levin et Bull, 1994 ; van Baalen et Sabelis, 1995 ; de Roode et al., 2005 ; Alizon et van Baalen, 2008). Il serait donc intéressant de vérifier si une ORF-A de type " sous-type F " peut conférer un avantage pour les souches de CHV en mesurant la charge virale (par PCR-quantitative) afin de vérifier si les souches possédant cet ORF-A ont bien un taux de multiplication intra-hôte supérieur aux autres.

En conséquence, il serait important de surveiller l'apparition ainsi que la propagation de nouvelles souches recombinées. En effet certaines de ces souches recombinées pourraient présenter une meilleure fitness que les souches parentales, ce qui pourrait avoir comme

conséquence le remplacement des deux sous-types par un génotype recombiné et modifier les effets de la maladie de chancre de châtaignier en Europe.

3.2 Etude du lien de cause à effet entre virulence des DCE et diversité en GCV

L'objet ce cette étude théorique est de mettre en lumière le rôle de la perméabilité du système d'incompatibilité végétative, qui viens juste d'être illustré, dans l'évolution de l'interaction entre les populations de champignons et de DCE. Plus précisément nous proposons d'étudier les pressions de sélection exercées par les DCE sur la diversité en GCV, ainsi que les conséquences de cette diversité en GCV sur la propagation des DCE. Ceci dans le but de mieux comprendre le rôle des systèmes d'incompatibilité végétatif dans l'évolution des interactions champignons/DCE.

Ce travail a fait l'objet de l' article suivant, soumis à *Ecology letters*.

Parasitism and maintenance of diversity in fungal vegetative incompatibility systems : the role of selection by deleterious cytoplasmic elements

Jérémie Brusini, Cécile Robin and Alain Franc

INRA, UMR 1202 Biodiversity, Genes & Communities, 69 Route d'Arcachon, F-33610 Cestas, France

keywords : vegetative incompatibility, allelic polymorphism, frequency dependent selection, virulence, coexistence, parasite mediated selection

Corresponding author : Alain Franc, email :Alain.Franc@pierroton.inra.fr, phone : +33 (0)5 57 12 28 13, fax : +33 (0)5 57 12 28 81

Abstract

In fungi, parasite-mediated selection is a possible cause of the maintenance of allelic diversity of the somatic incompatibility system which controls fusions between conspecifics. Using an epidemiological model we aimed to highlight the role of the permeability of the incompatibility barrier for pathogen transmission in the maintenance of allelic diversity of genes involved in this self/non-self recognition mechanism. Simulations showed that, in spite of permeability, parasites can maintain diversity, thus enhancing the hypotheses of a parasite-mediated selection of fungal somatic incompatibly systems.. Moreover, we showed that by a feedback mechanism, virulent parasites, may promote conditions for their own extinction when maintaining the vc type diversity. This last point suggests a selection for low virulence, and may explain the general avirulence of most mycoviruses. This work highlights that it is possible to gain a better understanding of the driving force shaping the coevolution of fungi and their cytoplasmic parasite populations if the permeability of a somatic incompatibility system is taken into consideration .

3.2.1 Introduction

Why and how the polymorphism of genes involved in the self/non-self recognition (SNSR) systems evolves has focused the interest of numerous evolutionary biologists(Wright, 1939; Bodmer, 1972; Hartl et al., 1975; Buss, 1982; Grosberg, 1988; Nauta and Hoekstra, 1994; Deboer, 1995). Balancing selection seems to be the answer to the how (i.e. the mechanism at the origin) of the evolution of these allelic diversities (Grosberg, 1988; Takahata and Nei, 1990; Richman, 2000). But the nature of the evolutionary pressures driving this selection (i.e. the why question) remains unresolved for some of these systems. This is notably the case for fungal somatic incompatibility systems , which prevent the vegetative fusion (anastomose) between unrelated conspecifics. In order to work, the filamentous fungi (Ascomycete) somatic incompatibility system , as in all SNSR systems , needs allelic diversity at specific genes, called *vic* or *het* genes according to the study model (for *v*egetative *in*compatibility or *het*erokaryon incompatibility genes). Thus, anastomis, which is an ubiquitous phenomenon in fungi (Glass et al., 2004), needs to end to the formation of a stable chimera that the two fusing mycelia share the same combination of alleles at *vic* loci (i.e that the two mycelia belong to the same vc type). Between 6 and 11 biallelic vic loci have been described in ascomycetes species allowing a great vc type diversity (Leslie, 1993). Evidence of balancing selection has been found at a *het* gene in Neurospora and related taxa(Wu et al., 1998) suggesting that strong driving forces are associated with the control of somatic fusion in fungi

Some authors hypothesized that a frequency-dependant selection mediated by parasite transmission may be the driving force of the vc type diversity of fungal populations. (Day, 1968; Caten, 1972; Hartl et al., 1975; Nauta and Hoekstra, 1994). This is because individuals which belong to rare vc types, for which somatic fusion is unlikely, are expected to be selected for since they have the lowest probability to be infected by a DCE. Several deleterious cytoplasmic elements (DCE) including deleterious mitochondria (Bertrand, 2000), deleterious plasmids (Griffiths, 1995) and viruses (Ghabrial, 1998) have been described in fungi. These DCE have no extracellular form and need anastomosis to be horizontally transmitted. Severe decreases in fungal fitness caused by these DCE have been reported

(Brasier, 1983; Griffiths, 1992; Bertrand, 2000; Baidyaroy et al., 2000b; Peever et al., 2000; Allen and Nuss, 2004). However, the hypothesis of a parasite-mediated selection of somatic incompatibility systems in fungi and the ensuing theoretical works (Hartl et al., 1975; Nauta and Hoekstra, 1994) relies on the fact that vegetative incompatibility of fungi is an absolute barrier for DCE. In fact, several studies have shown that this barrier is permeable to DCE transmission. For example, it is known that the virus Cryphonectria Hypovirus infecting the ascomycete *Cryphonectria parasitica* can be transmitted between different vc types (Liu and Milgroom, 1996; Cortesi and Milgroom, 2001; Papazova-Anakieva et al., 2008). Liu and Milgroom (1996) found frequencies of *Cryphonectria Hypovirus* transmission of 1 between similar vc types, of 0.50 and 0.48 between vc types differing by 1 vic gene only and of 0.03 and 0.04 when vc types differed by more than 2 vic genes. Similar inter vc type transmissions have been observed for different DCE/fungus systems : transmission of deleterious mitochondria in *C. parasitica* (Baidyaroy et al., 2000a) and in *Neurospora crassa* (Debets et al., 1994), transmission of the *Ophiostoma novo-ulmi* D factor virus (Brasier, 1984), or of plasmids in *Podospora anserina* (Gaag et al., 1998).Actually, formation of a stable chimera is not an obligate prerequisite for DCE transmission, which can occur during the narrow windows between the cytoplasmic melting, following fusion and fusion rejection (Biella et al., 2002; Smith et al., 2006). Thus vegetative fungal incompatibility systems can be compared to a cracked wall through which DCE can spread, rather than to a waterproof barrier. This questions the real impact of DCE on the evolution of *vic* loci polymorphism . In other words, can the balancing selection still act on vc type diversity if vegetative incompatibility systems do not provide a total protection against DCE infection ?

Moreover, inter vc type permeability, in acting on horizontal transmission of DCE (its infectivity) could also have a consequence on DCE prevalence (i.e the proportion of infected hosts) and on DCE virulence (i.e. the reduction in host fitness due to infection by a parasite) (Anderson and May, 1982). The strength of parasite mediated selections depends on both these two values. Indeed, virulent DCE could exert higher selection pressures on *vic* loci than avirulent DCE, because the advantage of rare vc types decreases

logically with parasite virulence. However, even when virulent a parasite will not represent a strong selective force, if the chances of being infected for its hosts are scarce. In fact, high degrees of virulence are suspected to reduce parasite lifetime transmission success and prevalence by increasing the host mortality rate (Anderson and May, 1982; Ewald, 1983; Antia et al., 1994; Lenski and May, 1994). A textbook example of the existence of such trade-off is the myxomatose virus which was introduced in Australia to control rabbit populations (Fenner and Ratcliffe, 1965). A quick decrease of the virulence of the disease was observed, which was considered as an adaptation of the parasite to maximise its transmission (and consequently its prevalence). In fungi/DCE systems, the spread of parasites is mostly controlled by host genotype and by genotype diversity in the host population (i.e. diversity in vc types), which is thought to evolve in response to parasite mediated selection. This paradox in the coevolutionary process between fungal somatic incompatibility and DCE virulence, highlighted by the consideration of permeability between vc type, can be summarised in the following question : is it DCE virulence that promotes vc type diversity or vc type diversity that promotes DCE virulence ?

To shed some light on this "chicken or the egg" causality dilemma , we propose to asses the effects of the permeability of the vegetative incompatibility barrier and of the virulence of horizontally transmitted DCE on the maintenance of vc type diversity in fungi. Inspired by the biology of a DCE infected ascomycete clonal population , we developed an epidemiological model to study parasite transmission and population dynamics. Using simulations, we showed that under certain conditions of virulence and transmission, a DCE can maintain a high level of vc type diversity, which in some cases proved to be the highest for intermediate levels of permeability.

3.2.2 Material and method

Our model has been built for an ascomycete fungus infected by a DCE which can be vertically and horizontally transmitted. The vertical transmission of this DCE is through asexual spores which are produced all year round by the fungal thallus (i.e. the whole mycelium issued from the germination and growth of a unique spore). The horizontal transmission occurred during the cytoplasmic exchange following the contact between

two mycelia or between a germinating spore and a thallus. We considered an asexual population of thalli structured in N different vc types. Each vc type represented a fraction x_i of the total population, and y_i and y'_i as the uninfected and infected sub-fraction respectively, so that$\sum_i x_i = \sum_i (y_i + y'_i) = 1$. The global DCE prevalence was defined as the proportion of infected thalli in the whole population ($\sum_i y'_i$), and the DCE prevalence of each vc type was defined as the proportion of infected thalli within each vc type (y'_i/x_i). The DCE horizontal transmission rate from vc type i to vc type j was called β_{ji}, and the transmission rate within thalli of vc type i was called β_{ii}. The DCE is transmitted to a fraction of spores produced by an infected thallus only (Pearson et al., 2008). We called c ($0 < c < 1$) this fraction, which can also be seen as the DCE vertical transmission rate. Uninfected and infected thalli grow with a rate ν_i and ν'_i, respectively. DCE virulence (α) was defined as the decrease in the population growth, with $\nu'_i = (1-\alpha)\nu_i$ and $0 < \alpha < 1$. The rates of change of y_i and y'_i are (see mathematical annex) :

$$\begin{cases} \frac{dy_i}{dt} = (\nu_i - \bar{\nu})y_i + (1-c)\nu'_i\, y'_i - (\sum_j \beta_{ji} y'_j) y_i \\ \frac{dy'_i}{dt} = (c\,\nu'_i - \bar{\nu})y'_i + (\sum_j \beta_{ji} y'_j) y_i \end{cases} \tag{3.1}$$

with $\bar{\nu} = \sum_i (\nu_i y_i + \nu'_i y'_i)$.

To study the effects of (1) the permeability of the vegetative incompatibility system and (2) other parameters on the diversity in vc types, we considered an ideal fungal population in which all thalli had the same intra and inter vc type transmission rate . Therefore, β_{ji} and β_{ii} were respectively equal to β_b (between vc types) and β_w (within a vc type), which were invariant for all (i, j) pairs of vc types with $i \neq j$, and initially fixed before each simulation. As a result, only two values were applied for the horizontal transmission matrix between vc types : β_w in the diagonal, and β_b in the rest of the matrix.

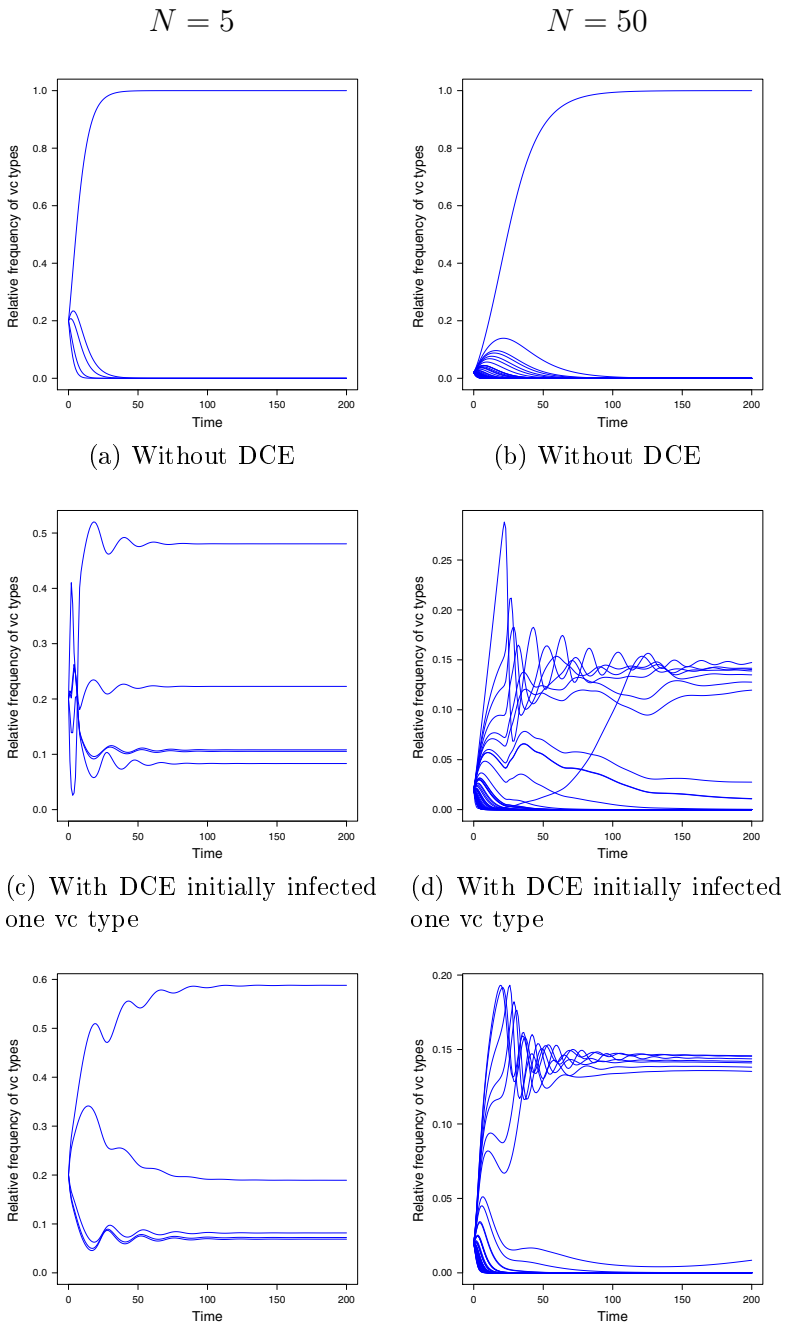
Permeability of the vc system was analyzed using two parameters : the ratio $R_{ht} = \beta_b/\beta_w$, and the percentage P, which is the percentage of pairs of vc types (i, j) for which $\beta_{ij} = \beta_w$ in the non-diagonal elements of the transmission matrix. When $P = 0\%$, only the element in the diagonal of the transmission matrix were equal to β_w, while the others were equal to β_b. When $P = 100\%$, all the elements of the transmission matrix were equal

to β_w, as if only one vc type was present in the population.

For each simulation, the pairs of vc types (i, j) for which $\beta_{ij} = \beta_w$ were randomly chosen. Different levels of permeability (R_{ht} and P) were separately studied. First, the effects of parameters such as DCE virulence, rates of vertical and horizontal DCE transmissions (ratio R_{ht}) on the final vc type diversity and on the global DCE prevalence at equilibrium were investigated with $P = 0\%$. When $P = 0\%$, we also tested the effect of the number of vc types initially infected by the DCE (none, one or all) and the effect of the initial number of vc types in the population on these same variables. The effects of P, and of its interaction with DCE virulence on the final vc type diversity, as well as on the global DCE prevalence at equilibrium, were then tested for a fixed value of R_{ht}. The growth rate of the uninfected vc types ν_i were randomly determined for each simulation between two bounds (1 and 2) : thus, a vc type can be, at best, twice as fit as another one. Moreover, the initial ratio y_i/y'_i was always equal to one for all the vc types initially infected. Mean and standard errors of the final number of vc types and of DCE prevalence at equilibrium were calculated over 50 simulations performed for each combination of parameters. Simulations were performed with the software R ("Odesolve" package).

3.2.3 Results

For all simulations the vc types frequencies always reached an equilibrium (Figure 3.3). Without any DCE infecting the fungal population, no coexistence between vc types was observed. In this case, the population was dominated by the vc type with the highest growth (Figures 3.3a and 3.3b). When a DCE was introduced and depending on the parameters, a variable number of vc types was maintained in the population after a time of oscillations (Figures 3.3c, 3.3d, 3.3e and 3.3f). At equilibrium, all vc types were infected, even if only one vc type was initially infected. Moreover, no difference between the mean numbers of vc types at equilibrium were observed for the different initial conditions (DCE in all vc types or DCE in one vc type). The study of the dynamic of the model with $P = 0\%$, (i.e. when the permeability only depends on R_{ht}), showed that the virulence, the intra and inter vc types transmissions, the vertical transmission, and their interactions, had significant effects on the coexistence of vc types (Figure 3.4). The effect of vertical



(a) Without DCE

(b) Without DCE

(c) With DCE initially infected one vc type

(d) With DCE initially infected one vc type

(e) With DCE initially infected all vc types

(f) With DCE initially infected all vc types

FIGURE 3.3: Evolution of the frequencies of the vc types in function of time for different values of N and initial conditions. Each line represents the frequency of one vc type in the population.

transmission on vc type diversity was only observed for $c = 1$, vc type diversity was then lower than for other values of c. Only one vc type was observed at equilibrium when : i) $\beta_w = \beta_b$ ($R_{ht} = 1$) ; ii)$\alpha = 0$; iii) high levels of virulence were combined with a low intra vc type horizontal transmission efficiency (Figures 3.4g and 3.4j). In this latter case the extinction of the DCE in the host population was observed.

Figure 3.5 shows that coexistence between vc types is positively linked between their growth rates and their final infection percentage and between the frequency in the population of each vc type at equilibrium and the DCE prevalence within it. When $R_{ht} = 1$, no coexistence was observed. Only the vc types with the higher growth rates of each simulation had a frequency equal to 1, the frequency of all the others was equal to 0. For $R_{ht} < 1$, a varying number of coexisting vc types was observed (3,1 when the mean for $R_{ht} = 0.1$ and 5 when the mean for $R_{ht} = 0.01$). For these coexisting vc types, a positive correlation was observed between vc type growth rates and their final infection percentage on the one hand,and on the other, between the frequency at equilibrium of vc types in the population and the DCE prevalence within vc types.

For the other simulations, the vertical and horizontal transmission were fixed ($c = 0.95, \beta_w = 10$ and $R_{ht} = 0.01$). The study of the role of the interaction between the initial number of vc type and the DCE virulence (Figure 3.6a) showed that for all initial vc type diversities, the number of vc types at equilibrium increased with DCE virulence till a maximum value N_{eq}^{max} ($N_{eq}^{max} = 5$ for $N = 5$, $N_{eq}^{max} = 9.98$ for $N = 10$, $N_{eq}^{max} = 18.62$ for $N = 50$, $N_{eq}^{max} = 24.4$ for $N = 100$ and $N_{eq}^{max} = 40.2$ for $N = 500$).This value was reached with lower DCE virulence for populations initially rich in vc types than for populations with a poor initial vc type diversity, except for populations initially compounded by 5 vc types. This decrease in the final vc type diversity for high values of virulence was linked with a decrease in the final DCE prevalence (Figure 3.6b). Moreover, the less virulent (and the avirulent) DCE were those which always had the best frequency at equilibrium. High prevalences for virulent DCE were only found for populations initially constituted by few vc types.

The parameter P also directly determined the maximum vc types that can be maintained in the population (Figure 3.7). For $N = 5$, the maximal final vc type diversity was obtained for $P = 0\%$. But vc type diversity was also observed for intermediate and high values of P. Moreover, for $N = 50$, intermediate level of permeability ($P = 20\%$ and $P = 40\%$) maintained the highest vc type diversity at equilibrium for virulent DCE. As above, the decrease in the final vc type diversity for high values of virulence was linked with a decrease in the DCE prevalence.

3.2.4 Discussion

This study demonstrated that parasite mediated selection can maintain polymorphism at *vic* genes in fungi even if vegetative incompatibility system is permeable to parasite horizontal transmission. The general trend observed in our simulations is that of an increase in the number of coexisting vc types with a decrease of permeability (i.e. R_{ht} and P). Here, the mechanism which allows vc types diversity to be maintained does not consist in stopping the DCE transmission, but rather in slowing down the spread of DCE between vc types. Consequently, relatively independent epidemiologic dynamics of the same infectious agent can occur in each vc type : the most frequent vc types at equilibrium (i.e. the fittest) being the more infected. This negative frequency dependant selection occurred if, and only if, the permeability level was low enough to allow a relative independence between the infection dynamics in each vc type. Moreover, an analogy can be drawn between the ratio R_{ht} and the competition coefficient of the two species Lodka-Volterra model : coexistence occurred if the intra vc type rate of transmission was superior than the inter vc type of transmission, in other words, if the intra vc type competition was superior to the inter vc type competition. This analogy was also made by Holt and Pickering (1985), who studied the role of a horizontally transmitted parasite in the coexistence of two host species with a model similar to ours, but without vertical parasite transmission nor direct competition between species.

This Lodka-Volterra like mechanism operates when a DCE spreads, otherwise the fitter vc type competitively excludes the others. For certain conditions of DCE virulence, this is why, a decrease in the permeability in the host population for DCE transmission (i.e low

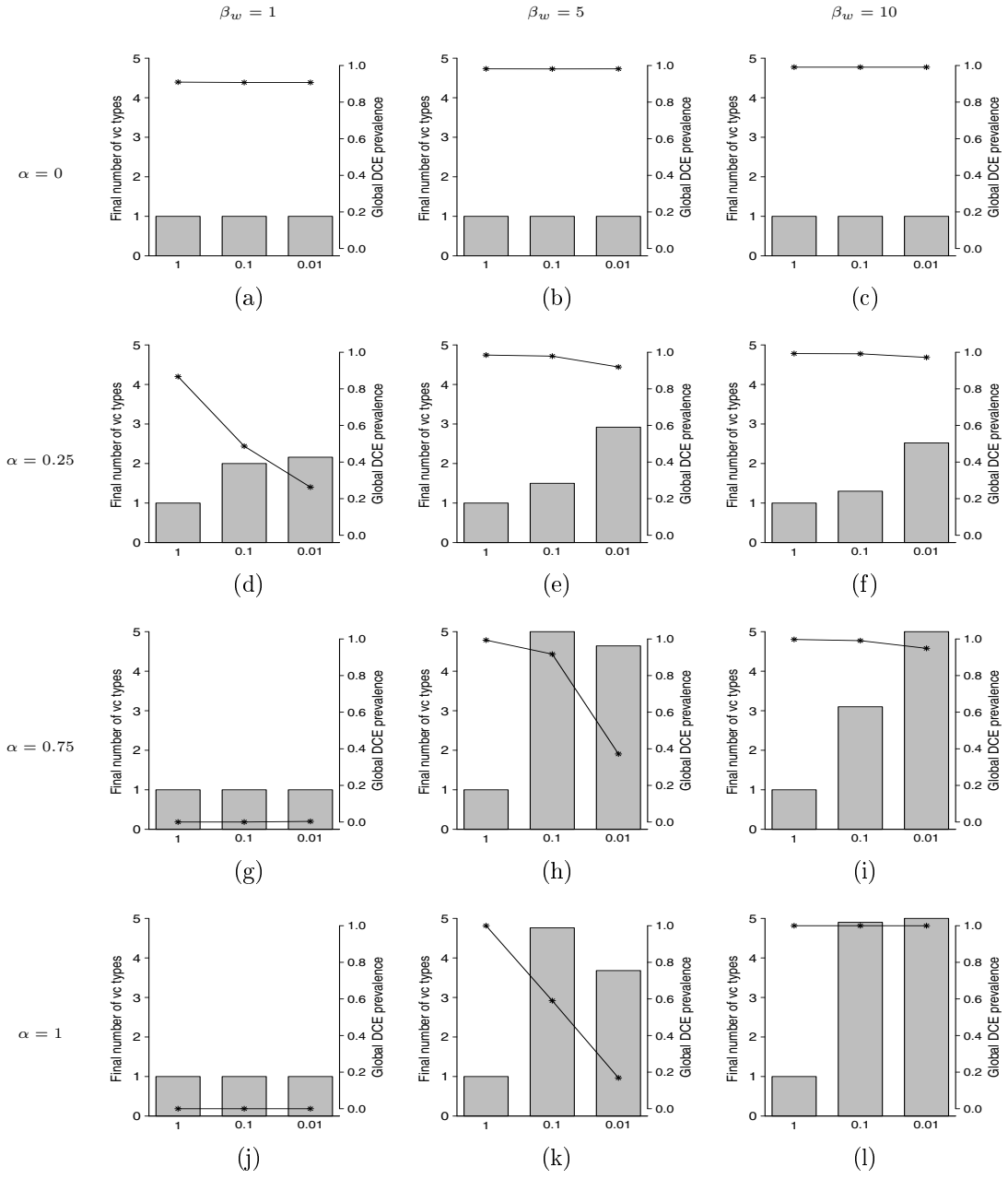


FIGURE 3.4: Effects of DCE virulence (α) and of intra vc type efficiency of transmission (β_w) on the final vc type diversity and on the final infection percentage in the population for different values of R_{ht} $(1, 0.1, 0.01)$. Grey bars (y axis on the left) and black lines (y axis on the right) respectively represent the mean vc type diversities and the mean infection rates of the population at equilibrium, calculated over 50 simulations with $N = 5$.

values of R_{ht} and P) reduced the final number of coexisting vc types. This inverse effect of the global trend between permeability level and vc type coexistence was caused by DCE extinction. For the parasite, low permeability means a decrease in its transmission rate, because then its transmission occurs almost only within vc types. Thus high virulence DCE could cause the extinction of a vc type before the DCE is transmitted to other vc types. In the same way, an increase in the host population vc type diversity would decrease the chance for the DCE to be transmitted before the death of its host. As a result, DCE can be functionally extinct of the host population and the competitive exclusion scenario between vc types occurred, like when no DCE was initially present. Thus unfavorable transmission conditions, such as low permeability and/or high initial vc type diversity, might represent an epidemiological dead end for virulent DCE. This suggests that the diversity of vc types is governed by a feedback mechanism exerted by virulent DCE : by giving a selective advantage to rare vc types, virulent DCE maintain vc type diversity in a host population, which can be detrimental for their transmission and may result in their own progressive extinction.

Interestingly enough, our results also highlight a paradox : how can DCE maintain a high level of vc type diversity if this same diversity induces DCE extinction ? The example of the native Asian populations of *C. parasitica* illustrate this paradox clearly : they have a high vc type diversity while most of the thalli are uninfected (Liu et al., 2007; Liu and Milgroom, 2007). Driving forces other than parasite mediated selection can explain the maintainance of such allelic diversity, such as competition between the cell lineages within the chimera (Buss, 1982), or the pleotropic hypothesis of *vic* genes (Muirhead et al., 2002). However, sexual reproduction, which is expected to create new combinations of vc types starting from low allelic diversity (Nauta and Hoekstra, 1996), might also be responsible of the vc diversity observed in Asiatic *C. parasitica* populations. Our model was built for an asexual population of fungi, thus higher levels of diversity would surely be obtained, if recombinations between *vic* alleles occurred. Indeed, when in vitro data of horizontal transmission of the CHV between vc types were used in our simulations (see Table 3.3 for more details) , our model was not able to explain the diversity observed in American po-

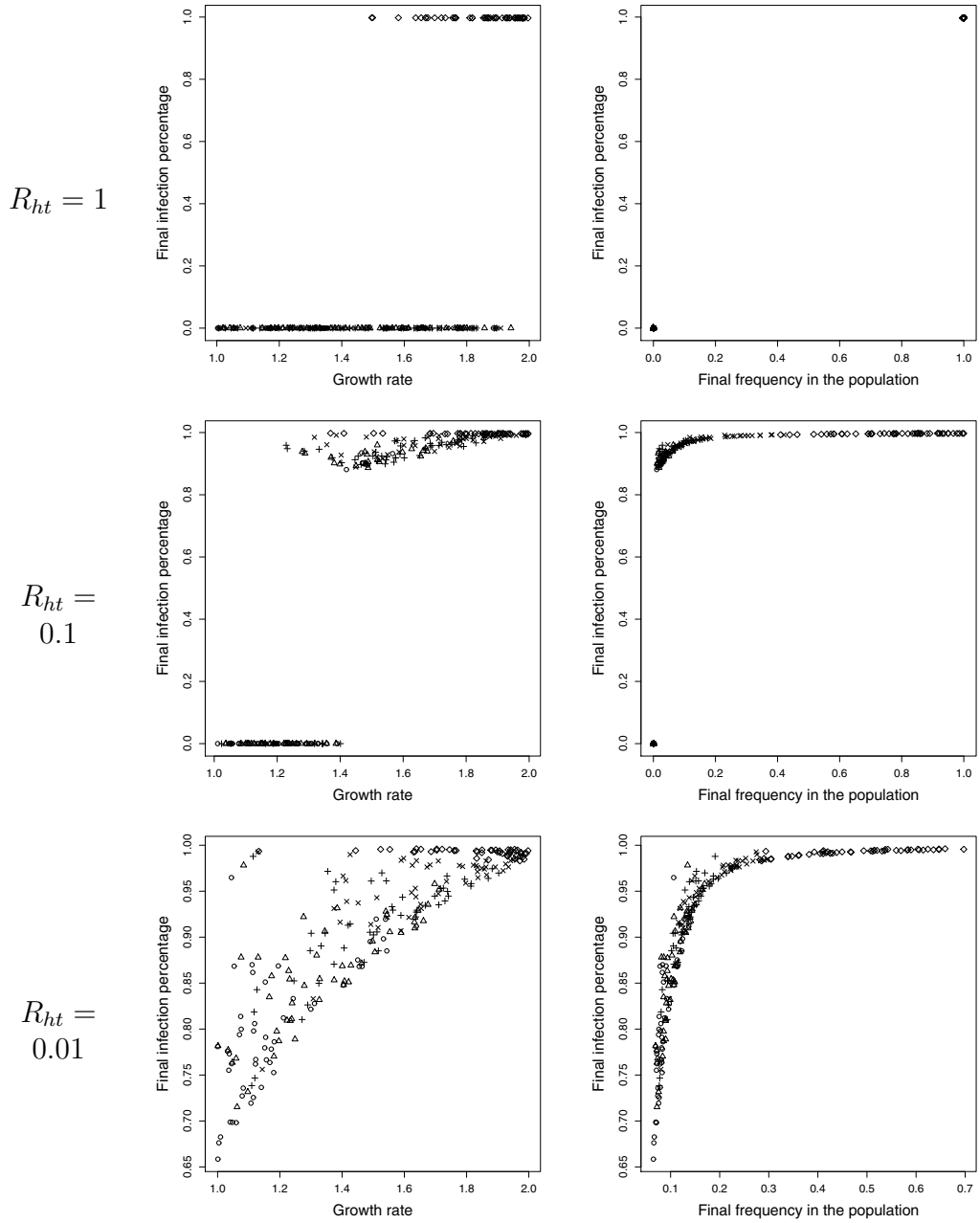
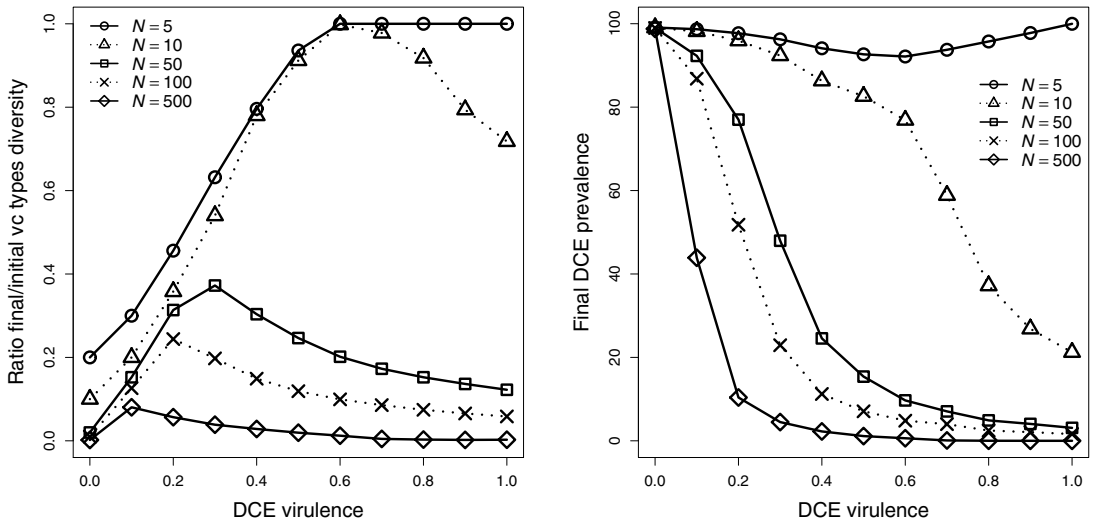


FIGURE 3.5: Correlations between (1) the vc types growth rate and their final infection percentage (on the left) and (2) between the frequency in the population of each vc type at equilibrium and the DCE prevalence within it (on the right) for different values of R_{ht} after 50 simulations. The combination of parameters are those of the Figure 3.4i (i.e $N = 5$, $\beta_{ii} = 10$, $\alpha = 0.75$). The symbols represent the growth rate rank of the vc type in one simulation. Thus in each simulation we had: growth rate of $\bigcirc$ <growth rate of $\triangle$< growth rate of $+$< growth rate of $\times$< growth rate of $\diamond$



(a) (b)

FIGURE 3.6: Evolution of the vc type diversity (a) and of DCE prevalence (b) in function of virulence for different initial numbers of vc types (5, 10, 50, 100, 500).

pulations of *C. parasitia*. In contrast to European populations, whereby the reproduction of this fungus is almost clonal, sexual reproduction is common for American populations of *C. parasitica* (Milgroom and Cortesi, 1999; Dutech et al., 2008). Recombinations by sexual events can explain the higher values of observed diversity than predicted by our model especially for American populations. In order to understand the Asian situation, where fungal and viral populations have to be at equilibrium, it would be interesting to consider in future studies to what extent sexual reproduction can magnify the vc type diversity of host population, even with low DCE virulence and/or low DCE prevalence in the host population.

In our simulation, DCE extinctions were only observed for virulent DCE. In addition, only avirulent and low virulent DCE keep high prevalences in host populations with high vc type diversity or low values of R_{ht} or P. This raises the following question : did mycoviruses evolve to avirulence in response to horizontal transmission low efficiencies due to high vc type diversities of the fungal populations ? This hypothesis is in agreement with the low or null virulence reported for most of the known mycoviruses, with CHV or the D-factor appearing as exceptions (Ghabrial, 1998). Thus fungal host populations, through their vc type diversity, might exert a significant pressure on DCE virulence. This is

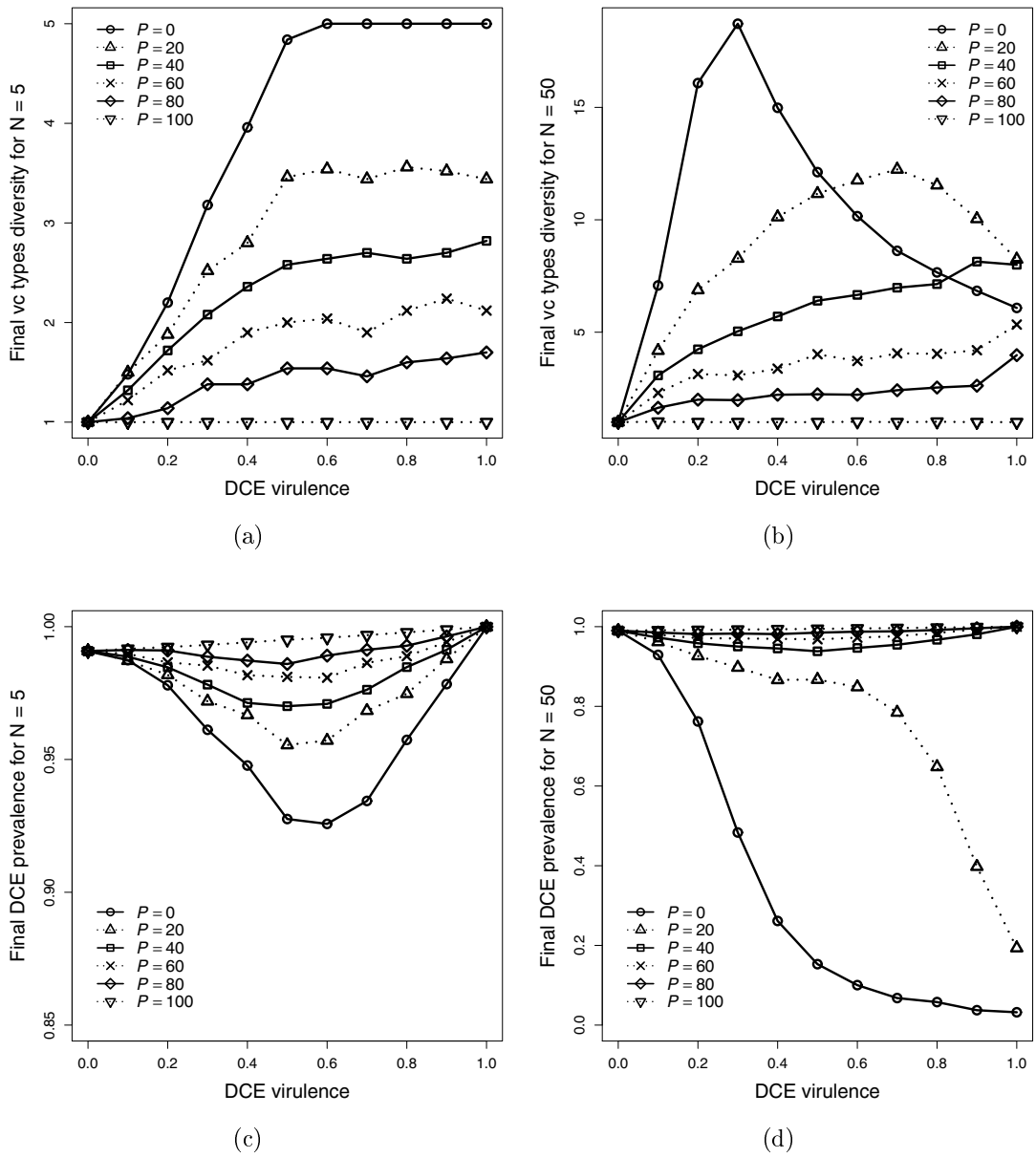


FIGURE 3.7: Evolution of vc type diversity (a and b) and of DCE prevalence ((c) and (d)) in function of the DCE virulence for $N = 5$ (a and c) and $N = 50$ (b and c) for different values of P.

supported by the known distribution of the different CHV in *C. parasitica* populations. In American populations, almost only viruses with low virulence (CHV-4) have been able to establish themselves and a harmful viral strain (CHV-1) infects *C. parasitica* European populations characterized by lower vc type diversity (Milgroom and Cortesi, 2004). In fungi,DCE other than viruses are also described, which can also explain the maintenance of a vegetative incompatibility system. It is notably the case of some cytoplasmic element that evolved from mutualism toward parasitism. In fungi, more than in other kingdoms, genetic conflicts (Hurst, 1992) between the nuclear and the cytoplasmic genomes could occurr, because the absence of cellular compartmentalization of mycelium, on the one hand, and the cytoplasmic exchanges during fusions, on the other, could create conditions for a cytoplasmic level of selection (Bertrand, 2000). This kind of intra host selection is often associated with short-sighted evolution (Levin and Bull, 1994) which may be responsible for the evolution of a high level of virulence. In this hypothesis, evolution of deleterious organelles within the host population had to be a constant risk for fungi which have to constantly protect themselves with a control of vegetative fusions. Moreover, these deleterious organelles, in maintaining vc type diversity, could be responsible for the evolution of mycoviruses toward avirulence. Nevertheless, the ecology of natural fungal populations still needs to be developed in order to acquire an accurate knowledge of DCE diversity and their real impact on the biology of natural fungal populations.

3.2.5 Conclusion

Our model highlights the mutual dependence between the evolution of fungal vegetative incompatibility systems and DCE populations. On the one hand, allelic diversity for the gene involved in the fungal self recognition is maintained due to parasic pressure and on the other hand, vegetative incompatibility might be a constraint for DCE virulence evolution. In other words, as a result of their effect on the maintenance of the vc type diversity, DCE can create the conditions favourable for their own extinction (and perhaps also for their own evolution). A better knowledge of the ecology and the biology of the natural fungal populations are needed to really understand the organization of the allelic diversity of *vic* loci and the selection pressures responsible for their evolution Nevertheless,

TABLE 3.3: Predicted versus observed vc type diversity for 18 populations of *C. parasitica* from 6 countries.

Country	Population	Number of dominant vc types present (Number of total vc types present)	Predicted vc type diversity		
			$\alpha = 0.25$	$\alpha = 0.75$	$\alpha = 0$
Croatia	Markusevac	4 (4)	2.18	3.44	2.52
	Hrvatska Kostajnica	5 (8)	2.54	3.18	2.22
	Pozega	3 (5)	2.12	3.32	2.64
	Istria-Buje	7 (8)	2.64	3.02	2.18
	Ozalj	2 (5)	1.68	3.2	2.66
France	Corsica	4 (6)	2.00	3.00	2.56
	Languedoc-Roussillon	3 (8)	3.1	3.34	2.3
Greece	Ioannina	2 (2)	1.6	2.00	2.00
	Aetoloakarnania	2 (3)	1.78	2.64	2.5
Italy	Bergamo	5 (16)	1.26	4.02	3.3
	Crevoladossola	4 (10)	2.96	3.22	2.42
	Cittanova	2 (4)	1.88	3.04	2.22
	Tenao	2 (3)	1.2	2.2	2.74
Switzerland	Lumino*	6 (11)	2.92	3.14	2.16
	Gnosca*	5 (11)	3.22	3.32	2.22
U.S.A.	Finzel*	23 (23)	5.18	3.14	1.92
	Bartow*	22 (22)	5.32	2.86	1.84
	Depot Hills*	20 (20)	4.48	3.34	1.86

Values of β_w and β_b were calculated using the logistic regression model of Cortesi and Milgroom (2001). With ν_i randomly determined between 1 and 2, and $c_i = 0.95$ according to data fromPeever et al. (2000). The predicted diversity in vc types was calculated, like the average diversity of the output of 50 simulations. Here, dominant vc types correspond to a vc type that presented a frequency superior to the tenth of the frequency of the most frequent vc type of the population. * : presence in the populations of vc types which was not studied by Cortesi and Milgroom (2001), these vc types were omitted from the analysis. References : Croatia : Krstin et al. (2008) ; France : Robin et al. (2000) and Robin, personal communication ; Greece : Perlerou and Diamandis (2006) ; Italia : Cortesi et al. (1996) ; Switzerland : Bissegger et al. (1977) ; U.S.A : Milgroom (1999).

the pressures directly or indirectly exerted by pathogens on the loci of vertebrate MHC (Apanius et al., 1997) is proof that parasitism is a strong enough driving force to maintain a higher level of polymorphism than observed in the fungal vegetative incompatibility system. Interestingly, several authors hypothesized that the somatic incompatibility of fungi and colonial marine invertebrates are ancestral forms of vertebrate MHC which evolved, along with a new way of life, from an intra species to an inter species recognition (Deboer,

1995; Edwards and Hedrick, 1998; Rinkevich and Shapira, 1999; Glass and Dementhon, 2006). If a similar driving force is at the origin of the evolution of the allelic diversity of these related mechanisms, we could be faced with a remarkable convergence of the eukaryotes evolutionary history.

Acknowledgements

This work was funded by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Région Aquitaine. We thank Sylvain Gandon for his helpful comments on the manuscript.

3.2.6 References

Alizon, S. and van Baalen, M. (2008). Multiple infections, immune dynamics, and the evolution of virulence. *The American Naturalist*, 172(4) :E150–168.

Allen, T. D. and Nuss, D. L. (2004). Linkage between mitochondrial hypovirulence and viral hypovirulence in the chestnut blight fungus revealed by cDNA microarray analysis. *Eukaryotic Cell*, 3(5) :1227–1232.

Anderson, R. M. and May, R. M. (1982). Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, 85 :411–426.

Antia, R., Levin, B. R., and May, R. M. (1994). Within-host population dynamics and the evolution and maintenance of microparasite virulence. *The American Naturalist*, 144 :457–472.

Apanius, V., Penn, D., Slev, P. R., Ruff, L. R., and Potts, W. K. (1997). The nature of selection on the major histocompatibility complex. *Critical Reviews in Immunology*, 17 :179–224.

Baidyaroy, D., Glynn, J. M., and Bertrand, H. (2000a). Dynamics of asexual transmission of a mitochondrial plasmid in *Cryphonectria parasitica*. *Current Genetics*, 37 :257–267.

Baidyaroy, D., Huber, D. H., Fulbright, D. W., and Bertrand, H. (2000b). Transmis-

sible mitochondrial hypovirulence in a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(1) :88–95.

Bertrand, H. (2000). Role of mitochondrial DNA in the senescence and hypovirulence of fungi and potential for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 38 :397–422.

Biella, S., Smith, M. L., Aist, J. R., Cortesi, P., and Milgroom, M. G. (2002). Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 269(1506) :2269–2276.

Bissegger, M., Rigling, D., and Heiniger, U. (1977). Population structure and disease development of *Cryphonectria parasitica* in European chestnut forests in the presence of natural hypovirulence. *Phytopathology*, 87 :50–59.

Bodmer, W. F. (1972). The evolutionary significance of the HLA system. *Nature*, 237(139-145).

Brasier, C. M. (1983). A cytoplasmically transmitted disease of *Ceratocystis ulmi*. *Nature*, 305 :220–223.

Brasier, C. M. (1984). Inter-mycelial recognition systems in *Ceratocystis ulmi* : their physiological properties and ecological importance. In Jennings, D. and Rayner, A. D. M., editors, *The ecology and physiology of the fungal mycelium*, pages p. 451–497. Cambridge University Press, Cambridge.

Buss, L. W. (1982). Somatic cell parasitism and the evolution of somatic tissue compatibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79 :5537–5541.

Carbone, I., Liu, Y. C., Hillman, B. I., and Milgroom, M. G. (2004). Recombination and migration of *Cryphonectria hypovirus* 1 as inferred from gene genealogies and the coalescent. *Genetics*, 166(4) :1611–1629.

Caten, C. E. (1972). Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. *Journal Of General Microbiology*, 72(2) :221–229.

Chen, B., Geletka, L. M., and Nuss, D. L. (2000). Using chimeric hypoviruses to fine-tune the interaction between a pathogenic fungus and its plant host. *Journal of Virology*, 74(16) :7562–7567.

Choi, G. H. and Nuss, D. L. (1992). A viral gene confers hypovirulence-associated traits to the chestnut blight fungus. *The EMBO Journal*, 11 :473–77.

Cortesi, P. and Milgroom, M. G. (2001). Outcrossing and diversity of vegetative compatibility types in populations of *Eutypa lata* from grapevines. *Journal of Plant Pathology*, 83(2) :79–86.

Cortesi, P., Milgroom, M. G., and Bisiach, M. (1996). Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. *Mycological Research*, 100 :1087–1093.

Day, P. R. (1968). The significance of genetic mechanisms in soil fungi. In Tousson, T. A., Bega, R. V., and Nelson, P. E., editors, *Root diseases and soil-borne pathogens.* University of California Press, Berkeley.

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., and Read, A. F. (2005). Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21) :7624–7628.

Debets, F., Yang, X., and Griffiths, A. J. F. (1994). Vegetative Incompatibility in *Neurospora* - Its Effect on Horizontal Transfer of Mitochondrial Plasmids and Senescence in Natural-Populations. *Current Genetics*, 26(2) :113–119.

Deboer, R. J. (1995). The Evolution of Polymorphic Compatibility Molecules. *Molecular Biology and Evolution*, 12(3) :494–502.

Dutech, C., J.-P., R., Fabreguettes, O., and Robin, C. (2008). Geostatistical genetic analysis for inferring the dispersal pattern of a partially clonal species : example of the chestnut blight fungus. *Molecular Ecology*, 17 :4597–4607.

Edwards, S. V. and Hedrick, P. W. (1998). Evolution and ecology of MHC molecules : from genomics to sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(8) :305–311.

Ewald, P. W. (1983). Host-parasite relations, vectors, and the evolution of disease severity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 14 :465–485.

Fenner, F. and Ratcliffe, F. (1965). *Myxomatosis*. Cambridge University Press.

Gaag, M. v. d., Debets, A. J. M., Osiewacz, H. D., and Hoekstra, R. F. (1998). The dynamics of pAL2-1 homologous linear plasmids in *Podospora anserina*. *Molecular and General Genetics*, 258(5) :521–529.

Ghabrial, S. A. (1998). Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*, 16(1) :119–131.

Glass, N. L. and Dementhon, K. (2006). Non-self recognition and programmed cell death in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6) :553–558.

Glass, N. L. and Fleissner, A. (2006). Re-writing the network : understanding the mechanism and function of anastomosis in filamentous ascomycete fungi. In Kües, U. and Fischer, R., editors, *The Mycota I : Growth, differentiation and sexuality*, pages pp. 123–139. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.

Glass, N. L., Rasmussen, C., Roca, M. G., and Read, N. D. (2004). Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends in Microbiology*, 12(3) :135–141.

Gobbin, D., Hoegger, P. J., Heiniger, U., and Rigling, D. (2003). Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1) in Europe. *Virus Research*, 97 :39–46.

Griffiths, A. J. F. (1992). Fungal Senescence. *Annual Review of Genetics*, 26 :351–372.

Griffiths, A. J. F. (1995). Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiological Reviews*, 59(4) :673–685.

Grosberg, R. K. (1988). The evolution of allorecognition specificity in clonal invertebrates. *Quarterly Review of Biology*, 63(4) :377–412.

Hartl, D. L., Dempster, E. R., and Brown, S. W. (1975). Adaptive significance of vegetative incompatibility in *Neurospora crassa*. *Genetics*, (Nov) :553–569.

Holt, R. and Pickering, J. (1985). Infectious disease and species coexistence : a model of Lodka-Volterra form. *American Naturalist*, 126(2) :196–211.

Hurst, L. D. (1992). Intragenomic Conflict as an Evolutionary Force. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 248(1322) :135–140.

Krstin, L., Novak-Agbaba, S., Rigling, D., Krajacic, M., and Curkovic Perica, M. (2008). Chestnut blight fungus in Croatia : diversity of vegetative compatibility types, mating types and genetic variability of associated *Cryphonectria hypovirus* 1. *Plant Pathology*, 57 :1086–1096.

Lenski, R. and May, R. (1994). The evolution of virulence in parasites and pathogens : reconciliation between two competing hypotheses. *Journal of Theoretical Biology.*, 169 :253–265.

Leslie, J. F. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annu Rev Phytopathol*, 31 :127–50.

Levin, B. and Bull, J. (1994). Short-sighted evolution and the virulence of pathogenic microorganisms. *Trends in Microbiology*, 2 :76–81.

Liu, Y. and Milgroom, M. G. (1996). Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (*vic*) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology*, 86(1) :79–86.

Liu, Y.-C., Dynek, J. N., Hillman, B. I., and Milgroom, M. G. (2007). Diversity of viruses in *Cryphonectria parasitica* and *C. nitschkei* in Japan and China, and partial characterization of a new chrysovirus species. *Mycological Research*, 111 :433–442.

Liu, Y. C. and Milgroom, M. G. (2007). High diversity of vegetative compatibility types in *Cryphonectria parasitica* in Japan and China. *Mycologia*, 99(2) :279–284.

Milgroom, M. G. (1999). Viruses in fungal populations. In Woral, J., editor, *Structure and Dynamics of Fungal Population*, pages 283–305. Dordrecht, The Netherlands : Kluwer.

Milgroom, M. G. and Cortesi, P. (1999). Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18) :10518–10523.

Milgroom, M. G. and Cortesi, P. (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence : a critical analysis. *Annu Rev Phytopathol*, 42 :311–38.

Muirhead, C. A., Glass, N. L., and Slatkin, M. (2002). Multilocus self-recognition systems in fungi as a cause of trans-species polymorphism. *Genetics*, 161(2) :633–641.

Nauta, M. J. and Hoekstra, R. F. (1994). Evolution of vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes .1. Deterministic models. *Evolution*, 48 :979–995.

Nauta, M. J. and Hoekstra, R. F. (1996). Vegetative incompatibility in ascomycetes : Highly polymorphic but selectively neutral ? *J. Theor. Biol.*, 183 :67–76.

Papazova-Anakieva, I., Sotirovski, K., Cortesi, P., and Milgroom, M. G. (2008). Horizontal transmission of hypoviruses between vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* in Macedonia. *European Journal of Plant Pathology*, 120(1) :35–42.

Pearson, M. N., Beever, R. E., Boine, B., and Arthur, K. (2008). Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 9.

Peever, T. L., Liu, Y. C., Cortesi, P., and Milgroom, M. G. (2000). Variation in tolerance and virulence in the chestnut blight fungus-hypovirus interaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11) :4863–4869.

Perlerou, C. and Diamandis, S. (2006). Identification and geographic distribution of vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* and occurrence of hypovirulence in Greece. *Forest Pathology*, 36(6) :413–421.

Richman, A. (2000). Evolution of balanced genetic polymorphism. *Molecular Ecology*, 9(12) :1953–1963.

Rinkevich, B. and Shapira, M. (1999). Multi-partner urochordate chimeras outperform two-partner chimerical entities. *Oikos*, 87(2) :315–320.

Robin, C., Anziani, C., and Cortesi, P. (2000). Relationship Between Biological Control, Incidence of Hypovirulence, and Diversity of Vegetative Compatibility Types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathologie*, 90(7) :730–737.

Robin, C., Capdevielle, X., Martin, M., Traver, C., and Colinas, C. (2009). *Cryphonectria parasitica* vegetative compatibility type analysis of populations in south-western france and northern spain. *Plant Pathology*, 58(3) :527–535.

Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 :406–425.

Smith, M. L., Gibbs, C. C., and Milgroom, M. G. (2006). Heterokaryon incompatibility function of barrage-associated vegetative incompatibility genes (*vic*) in *Cryphonechia parasitica*. *Mycologia*, 98(1) :43–50.

Takahata, N. and Nei, M. (1990). Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics*, 124 :967–978.

van Baalen, M. and Sabelis, M. W. (1995). The dynamics of multiple infection and the evolution of virulence. *The American Naturalist*, 146(6) :881.

Wright, S. (1939). The distribution of self-sterility alleles in populations. *Genetics*, 24 :538–552.

Wu, J., Saupe, S. J., and Glass, N. L. (1998). Evidence for balancing selection operating at the *het-c* heterokaryon incompatibility locus in a group of filamentous fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 :12398–12403.

3.2.7 Annex

In a first time, the dynamic of the vertical transmission of the DCE was written with the numbers of thalli. We introduced m_i and m'_i as respectively the number of the uninfected and infected thalli with $m = m_i + m'_i$, $x_i = m_i/m$ and $x'_i = m'_i/m$.

In this manner, the vertical transmission of the DCE was written as:

$$\begin{cases} \frac{dm_i}{dt} = \nu_i m_i + (1-c)\nu'_i m'_i \\ \frac{dm'_i}{dt} = c\nu'_i y'_i \end{cases} \tag{3.2}$$

with

$$\frac{dm_i}{dt} + \frac{dm'_i}{dt} = \nu_i m_i + \nu'_i m'_i \tag{3.3}$$

This model can also be written on the fractions, because:

$$\begin{aligned} \frac{dm_i}{dt} &= \frac{d}{dt}(ny_i) \\ &= n\frac{dy_i}{dt} + \frac{dn}{dt}y_i \end{aligned} \tag{3.4}$$

and similarly

$$\frac{dm'_i}{dt} = n\frac{dy'_i}{dt} + \frac{dn}{dt}y'_i \tag{3.5}$$

Moreover

$$\begin{aligned} \frac{dn}{dt} &= \sum_i \frac{dm_i}{dt} + \frac{dm'_i}{dt} \\ &= \sum_i \nu_i m_i + \nu'_i m'_i \\ &= \sum_i \nu_i n y_i + \nu'_i n y'_i \\ &= n\sum_i \nu_i y_i + \nu'_i y'_i \\ &= n\bar{\nu} \end{aligned} \tag{3.6}$$

From which

$$\begin{aligned} \frac{dm_i}{dt} &= n\frac{dy_i}{dt} + \frac{dn}{dt}y_i \\ &= n\frac{dy_i}{dt} + n\bar{\nu}y_i \end{aligned} \tag{3.7}$$

But $\frac{dm_i}{dt} = \nu_i m_i + (1-c)\nu'_i m'_i$. Consequently, we had

$$\frac{dy_i}{dt} = (\nu_i - \bar{\nu})y_i + (1-c)\nu'_i y'_i \tag{3.8}$$

and similarly

$$\frac{dy'_i}{dt} = (c\nu'_i - \bar{\nu})y'_i \tag{3.9}$$

Finally the vertical transmission model on the fraction was written as:

$$\begin{cases} \frac{dy_i}{dt} = (\nu_i - \bar{\nu})y_i + (1-c)\nu'_i y'_i \\ \frac{dy'_i}{dt} = (c\nu'_i - \bar{\nu})y'_i \end{cases} \tag{3.10}$$

The horizontal transmission model can directly be wrote on the fractions, using a SIS model without recovery.

$$\begin{cases} \frac{dy_i}{dt} = -y_i(\sum_j \beta_{ij} y'_i) \\ \frac{dy'_i}{dt} = y_i(\sum_j \beta_{ij} y'_i) \end{cases} \tag{3.11}$$

The global model was obtain by the addition of the demographic effects on the fractions of the vertical and horizontal models:

$$\begin{cases} \frac{dy_i}{dt} = (\nu_i - \bar{\nu})y_i + (1-c)\nu'_i y'_i - (\sum_j \beta_{ij} y'_i)y_i \\ \frac{dy'_i}{dt} = (c\nu'_i - \bar{\nu})y'_i + (\sum_j \beta_{ij} y'_i)y_i \end{cases} \tag{3.12}$$

which is the same system of equations than 3.1

Chapter 4

Évolution de la virulence des populations de CHV-1

La différence de virulence entre la souche [Ep713] et les virus de sous-type I (Cf Introduction) amène à se poser la question des pressions de selection responsables de l'évolution de la virulence dans chaque sous-type de CHV-1. Cette différence de virulence pourrait être le résultat d'une évolution de la virulence du CHV-1 suivant le modèle du trade-off décrit par Anderson and May (1982), chaque sous-type ayant évolué vers sa virulence intermédiaire optimale. En effet, étant donné la faible diversité génétique des populations européennes de *C. parasitica*, la diversité en GCV de la population d'hôte n'a pas dû être une contrainte forte pour l'évolution de la virulence du CHV-1. C'est pourquoi dans ce chapitre nous proposons de tester l'hypothèse de l'existence d'une relation entre infectivité et virulence dans les populations européennes de CHV-1. Ceci dans le but de tester si le modèle du trade-off est bien à l'origine de la différence de virulence observée entre les deux sous-types viraux de CHV-1 présents en France.

Ce travail a fait l'objet de l' article suivant, encore au stade de préparation.

Trade-off hypothesis measurement in a cross-inoculation experiment: does the same mechanism drive virulence evolution in two viral subtypes?

4.1 Introduction

Understanding the driving forces acting on the adaptation of parasites is a crucial step for the disease management of agrosystems or of human populations. For 30 years numerous theoretical studies have outlined the main pressures which shape the evolution of host-parasite systems (Levin and Pimental, 1981; Anderson and May, 1982; Ewald, 1983; Ebert, 1994; Frank, 1996b; Gandon, 2004). From these studies the idea that virulence (i.e. the reduction in host fitness due to infection by a parasite) may be managed has emerged (Williams and Nesse, 1991; Ewald, 1994; Dieckmann et al., 2002). In other words, it could be possible to manipulate the evolution of infectious diseases toward harmless ends. This idea is the direct consequence of the interpretation of the trade-off hypothesis (Anderson and May, 1982; Ewald, 1983). The concept of the trade-off hypothesis defines the mechanisms that are suspected to shape the evolution of virulence for horizontally transmitted parasites (i.e. parasites which are transmitted independently of the host reproduction). The trade-off hypothesis is actually based on two assumptions: " (1) parasite-induced host mortality is costly for the parasite; and (2) transmission and virulence are inextricably coupled" (Ebert and Bull, 2003). Theses two assumptions are supposed to have divergent effects on the sign of the correlation between virulence and parasite fitness. The first assumption is based on the fact that the increase of the duration of infection is suspected to enhance the chances of parasite transmission. Consequently, too many virulent parasites that kill their host before being transmited will be counter selected. Moreover, because benevolence confer the possibility to infect a broader number of hosts, parasite will evolve towards avirulence (i.e. low or null virulence). However, the second assumption of the trade-off hypothesis infers that virulence of the parasite could

be the unavoidable consequence of its intra-host replication. Because transmission success increases with the number of transmission stages produced, a parasite has to harm its host in order to be transmitted. As a result of this trade-off, no pathogen should be able to increase both infection duration and production of transmission stages. Moreover, each parasite has to evolve towards an optimal intermediate virulence (i.e the optimal balance between infection duration and virulence) that maximizes its fitness. One of the most famous examples of the trade-off hypothesis is the case of the Myxomatosis virus which was used for the biological control of Australian populations of rabbits in the 60's. It has been suggested that the decrease in virulence of the highly harmful strains used for this biological control was driven by a selection for an increase in the duration of the host infection (Fenner and Ratcliffe, 1965). Although this trade-off hypothesis is accepted by the evolutionary community as a major mechanism of host-parasite system evolution, little empirical evidenceof this trade-off exists. A recent review Alizon et al. (2008), listed only eleven host-parasite systems for which evidence of the occurrence of the trade-off was found. This scarcity of data supporting the trade-off hypothesis challenges its existence or at least its universality (Ebert and Bull, 2003; Alizon et al., 2008).

One major limit of the trade-off hypothesis is that it considers that traits as infectivity or virulence are only under the control of parasite genotype (Ebert and Bull, 2003; Lambrechts et al., 2006), despite an impact of host genotype on parasite fitness traits has been reported in numerous studies (Thompson and Burdon, 1992; Peever et al., 2000; Carius et al., 2001; Lambrechts et al., 2005; Grech, 2006; Salvaudon et al., 2007). For example, the decrease of host fitness may be due to the host immune system itself rather than to the intrinsic parasite effect (Graham et al., 2005), as it seems to be the case for some human diseases (Weiss, 2002). However, parasite virulence can also be beneficial for hosts (Michalakis et al., 1992; Fellous and Salvaudon, 2009). This is notably the case when virulence drawbacks act at a higher level of selection than host-parasite systems themselves. In parasite-mediated competition, parasites infecting a population may represent biological weapons giving advantage to one competitive species (Hatcher et al., 2006; Holt and Dobson, 2006; Kuo et al., 2008). Therefore, even if the parasite is harmful, a fitness

benefit may exist for the host on another level of selection than on the pairwise interaction alone, which can move the interaction toward mutualism (Fellous and Salvaudon, 2009). As a result, the evolution of parasite virulence appears to be the result of a more complex mechanism than a parasite-centred model of evolution as hypothesized by the trade-off model of Anderson and May (1982), such as genotype-genotype interaction between host and parasite, or involvement of a higher level of selection. More investigations focussed on these different processes are needed to have a better understanding of mechanisms driving virulence evolution.

Here we proposed the study of the interaction between a mycovirus Cryphonectria Hypovirus 1 (CHV-1) and its fungal host, the chestnut blight agent *Cryphonectria parasitica*. Some authors have hypothesized that the high level of virulence observed for CHV-1 has been selected to reduce tree mortality and increase the fitness of the fungi (Michalakis et al., 1992; Taylor et al., 1998). This biological model would be useful to study to what extent higher level of selection may perturb the evolution of virulence as predicted by the trade-off hypothesis. Moreover, in Europe different level of CHV virulence evolution had been reported with different geographic patterns of distribution, evolved respectively toward mild and severe level of virulence (Allemann et al., 1999; Allen and Nuss, 2004).

We propose to study the life history traits of two CHV-1 subtypes (F and I) in the interactions with their fungal host to investigate wether different evolutionary forces drove the evolution of this host-parasite interaction. We carried out a cross-inoculation experiment, which is a classical tool in host-parasite system studies (Kaltz et al., 1999; Lively and Dybdahl, 2000; Salvaudon et al., 2007; Sicard et al., 2007), with six viral strains of CHV-1 (three of each subtype), and six fungal strains of *C. parasitica* belonging to a single clonal lineage. Our results confirmed the difference in virulence between the two viral subtypes, and the host and parasite effects on asexual sporulation of the fungus. Moreover, a positive relationship between virulence, assessed by the decrease of sporulation caused by the parasite, and horizontal transmission was observed for the more virulent subtype only. This result suggests that the trade-off model is acting in this subtype and that effectively different mechanisms drive the evolution of the virulence of each subtype.

The consequence of these results for the evolution of the interaction between *C. parasitica* and its hypovirus is discussed

4.2 Material and Method

Biological system

Our biological model is the chestnut blight system, which is the result of a three trophic level interaction between chestnut (*Castanea sp.*) the plant host, *C. parasitica* the fungal parasite, and Cryphonectria Hypovirus the hyperparasite. *C. parasitica* is an Ascomycete (*Cryphonectriaceae* family) which causes cortical cankers in chestnuts, and which girdles the trunks and branches causing apical mortality. As is typical for Ascomycetes, *C. parasitica* reproduces asexually (with conidia) and, eventually, sexually (production of ascospores). Both types of spores are in the transmission of the disease. In Europe,the severity of the disease has been attenuated by a mycovirus, the Cryphonectria Hypovirus-1 (a dsRNA virus from the Hypoviridae family). Indeed the CHV-1 alters the virulence of its host and other phenotypic traits involved in the fungal fitness as asexual sporulation and fecondity. Infection by a CHV-1 of an individual can be assessed in vitro by its phenotype: virus-infected mycelia are white and might have a debilitated growth, whereas virus-free mycelia are pigmented and have a regular growth. The virus is horizontally transmitted between individuals after hyphal anastomosis when their cytoplasms mixed. However this transmission is reduced by vegetative incompatibility: transmission rates are high among individuals belonging to the same vegetative compatibility (vc) types, but much lower between individuals of different vc types. Vc types are determined at least by six loci (Cortesi et al., 2001). The virus cannot be vertically transmitted to the host's sexual progeny , but it is transmitted with variable rates to the conidia.

Cross-inoculation experiment

This experiment consisted in infecting single-conidial *C. parasitica* strains (recipient strains) with the hypovirus and infecting their respective parental isolates. We chose as

parental isolates, six donor isolates of *C. parasitica* belonged to the same vc type, EU-2 (Table 4.1).

Table 4.1: Geographical origin and virus sub-type of the six isolates of *C. parasitica* used in this study

C. parasitica isolates	Geographical origin	CHV-1 sub type	references
D12.1A	Doissat, SW France	I	this study
D1.1C	Doissat, SW France	I	this study
G20.3	Ganges, SE France	I	this study
D21.B	Doissat, SW France	F	this study
2-37A	Xxxxx, SE France	F	Robin et al. (2000)
D88.1D	Doissat, SW France	F	this study

Four isolates came from a *C. parasitica* population (Doissat, Dordogne, France: Breuillin et al., 2006). The six isolates had the same allele composition for ten microsatellite markers developed for *C. parasitica* (Dutech et al., 2008), and then they were considered to belong to the same clonal lineage (defined by the ten molecular markers and at least the six vic loci). The virus, from the isolate 2.37A, has been identified as belonging to subtype F in a previous study using RFLP method (Robin et al. submitted). The identity of five other hypoviruses was determined by extracting dsRNA from the parental isolates and sequencing a region of 436 nucleotides of the ORF-B (primers : OrfB_12F: 5 - ATCGGGTCTCCCTTCAAGTT - 3 et OrfB_12R: 5 - CACGACGAGTTCGTTGAGRA - 3). All sequences were different and aligned with sequences of a reference viral strain from each sub-type (Subtype I : [Euro7] and Subtype F : [Ep713]).

To obtain the six single-conidial recipient strains, 0.2 ml of a suspension of conidia (concentration: 500 000 spore/ml in sterile water) obtained from each donor isolate was spread on 15ml of potato dextrose agar (PDA, Difco Laboratories, Detroit) in 9 cm Petri plates. After a two-day incubation at 25°C in the dark, 30 germinating spores were transferred on new Petri plates and incubated for two days at 25°C in the dark and then two days at bench temperature and under natural light. One orange single-conidial isolate was selected for each parental isolate. We infected each of the recipient strains with the six hypoviruses through hyphal anastomosis using a previously described method (Liu

and Milgroom, 1996). Horizontal transmission of the hypovirus from the donor isolate to the recipient strain was assessed by the phenotype of the strains. Their infectious statues was confirmed by test of CHV-1 transmisson into virus free isolates of the same GCV. We obtained 36 infected fungal strains corresponding to the inoculation of six hypoviruses to the six recipient strains.

Vertical and horizontal transmission of the viruses

The vertical transmission rate of the virus in the conidia was measured for the 36 infected fungal strains. Spore suspensions were collected, as described above from three cultures in 4.5 cm PDA Petri plates for each fungal strain. From each suspension, we isolated 30 germinating spores and transferred them onto three 9 cm Petri plates with PDA. After one week of incubation at room and light temperature, the presence of virus in each single-spore strain was determined by assessing their phenotype (orange or white). We calculated the vertical transmission rate as the ratio of the number of white single spore strains by the total number of single-spore strains.

The horizontal transmission of the viruses to a recipient virus-free isolate (vc type EU-8) was assessed for the 36 infected strains by pairing each strain with this recipient isolate, following the previously described method (Liu and Milgroom, 1996). Between 16 and 32 pairings were performed for each strain. After a two-week incubation at room temperature, the recipient isolates which exhibited the same phenotype as the infected strain (no pigmentation and irregular growth) were paired with the original virus-free isolate to confirm their infection. For each infected strain, we assessed the horizontal transmission rate as the ratio of the number of successful transmission events to the total number of pairings.

Sporulation assessment

Four cultures of the 36 infected strains and the 6 recipient virus-free strains were initiated on PDA agar with a plug of 3 day-old cultures of each of the strains and isolates. After a three-week incubation period (at 22°C, with a 18h/6h photo-period), asexual

spores produced by each strain were removed from the fungal colony by adding 25ml of sterile water on the mycelium surface in each Petri plate. The concentration of each spore suspension was measured with the particle sizing and counting analyzer Multisizer™ 3 COULTER COUNTER® (30 µm Aperture Tube; Isoton II), which provided the concentration in spores/ml and the mean size of spores for each spore suspension. The viral inhibition of sporulation, which is the virulence component of interest in our study, was calculated as the substraction between the measured trait of an infected strain and the mean value of the uninfected isogenic strain.

Data analysis

We performed one-way or two-way ANOVA to study the effects of the host (recipient isolates or association groups), the parasite (hypoviruses or CHV-1 subtype) and their interaction on the sporulation rate and on the vertical and horizontal transmission of the hypovirus. For this latter trait, the interaction effect could not be tested. Sporulation distribution differed to normal distribution. Analyses of variance of this trait were performed with a General Linear Model using a Poisson distribution which is recommended for counting data. Mean comparisons were performed two-by-two with a t-test for transmission traits measured and with a Wilcoxon test (using ranks sums). The non-parametric test of Spearman was used to study correlations between virulence and transmission traits. The statistical software R (R Development Core Team, 2009) was used for all analyses.

4.3 Results

Host and parasite effects on parasite transmission

Our results can only demonstrate a parasite effect on vertical transmission of CHV-1 (Table 4.2; Figure 4.1).

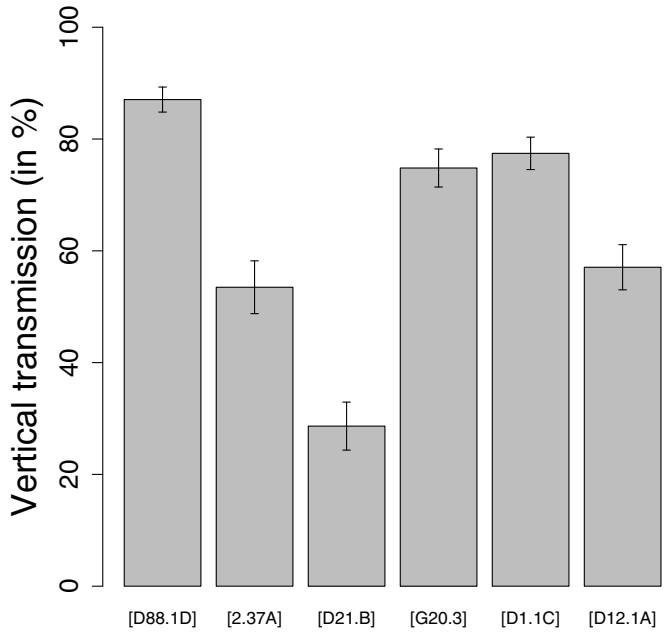


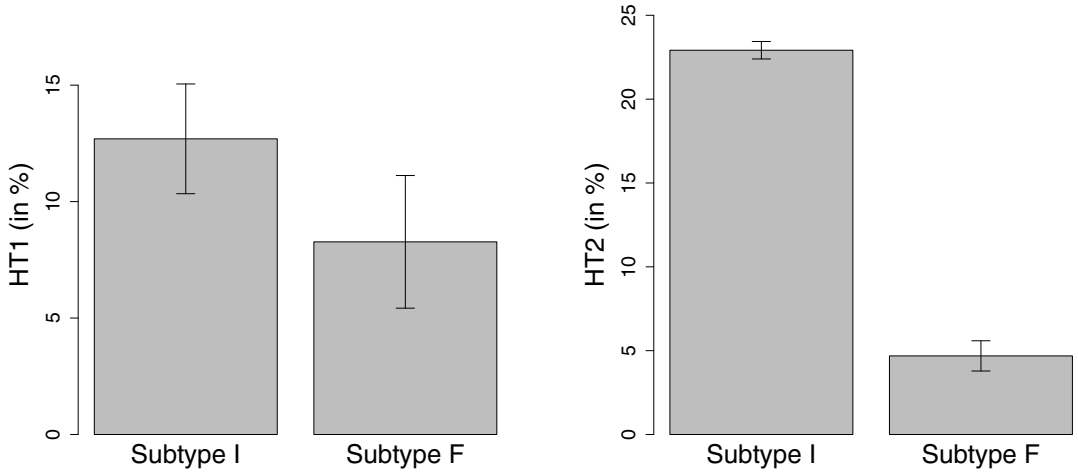
Figure 4.1: Average vertical transmission of the six viral strains of CHV-1

Table 4.2: Analyses of variance testing the effects of the fungal isolates, the viral strains and their interactions on the sporulation, the vertical and horizontal virus transmission

Source		Sporulation†	Vertical transmisson††	Horizontal transmisson††
	df	F-ratio	F-ratio	F-ratio
Fungal isolate (F)	5	4.0***	0.9 n.s.	1.3 n.s.
Viral strain (V)	5	47.9***	6.0***	2.1 n.s
F ×V	25	7.6***	0.7 n.s.	-

The virus free isolates were excuded from analyses. † generalize linear model with poisson distribution

Two viruses from subtypes F were vertically transmitted in conidia with lower rates than the other viruses (Figure 4.1). Although it seemed there were variations in rates of horizontal transmission between viruses, the virus effect did not appear significant (Table 4.2, Figure 4.2)



(a) (b)

Figure 4.2: Average horizontal transmission rate of each subtype of CHV-1. (a) : first experiment: horizontal transmission rates obtained from 24 pairings between all the 36 isolates and vc type EU-8; (b) : second experiment: horizontal transmission rates obtained from 64 pairings between 6 isolates and vc type EU-8.

and the sub-type effect (F=1.3,n.s.) did not appear as significant. To test whether this variation could be due to a low statistical power of our experiment or could result from a real virus effect, we performed a second experiment, in which a higher number of pairings (64) between the vc type EU-8, used as recipient isolate, and six strains (the six viral strains infecting the isolate D88.1D) were performed. These experimental conditions enabled to demonstrate a significant difference between the two viral subtypes (F=141.4***). The three viruses of the subtype I were transmitted more effectively in another vc type than subtype F, with respectively 22% and 5% of average horizontal transmission (Figure 4.2b).

Host and parasite effects on sporulation

No significant variation was observed in sporulation among the six virus-free recipient strains (F-ratio= 1.4 n.s.). However, when infected by a CHV-1 , the sporulation of a fungal strain varied with the fungal isolate, the infecting virus and the interaction of isolate x virus. Indeed, there was significant effect of the two factors and of their interaction on this trait (Table 4.2, Figure 4.3) . There was a highly significant effect of the viral strain

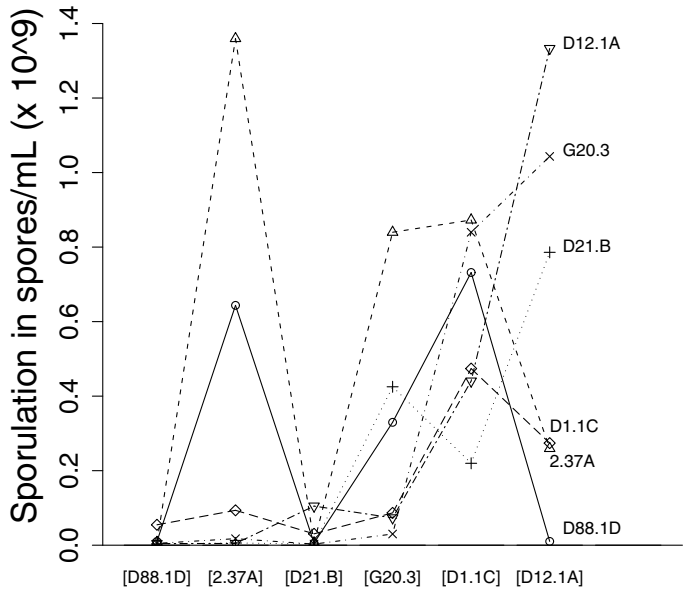


Figure 4.3: Average sporulation rate by viral subtype (in square bracket) in function of the fungal isolate

on sporulation, but the interaction between the viral strain and the fungal isolates was highly significant, preventing a direct comparison of viral strains.

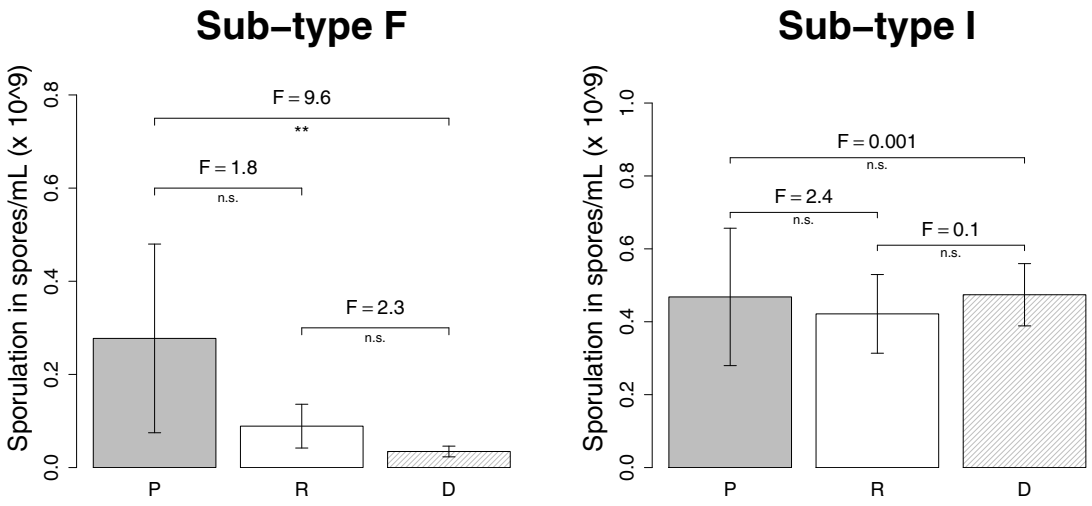
To better understand these interaction between the host and the parasite, we classed the fungus-virus associations into three different groups according to the virus which they infect the fungal strains, and the viral strains into the two subtypes. Fungal strains could be infected the virus that was infecting their parental isolate (group P, 6 strains), by a virus closely related to the virus of their parental isolate (i.e. belonging to the same CHV-1 subtype, group R, 12 strains) or by a virus belonging to a different subtype than the parental one (group D, 18 strains). This"association type" effect was not significant on sporulation of the infected strains whereas the subtype had a significant effect which was dependent to the association type. Infection by viruses of subtype F and I subtype reduced in mean of 90% (F = 24.2,***) and of 40% (F = 4.1, *) the sporulation rate of fungal isolates. (Table 4.3).

Table 4.3: Analyses of variance testing the effects of the viral sub type and the type of association on the sporulation.

Source	Sporulation†		
	df	F	Pr(>F)
Association type (At)	2	1.5	n.s.
Viral sub type (Vt)	1	32.0	***
Vt×At	2	3.3	*

The virus free isolates were excluded from analysis. †: generalize linear model with Poisson distribution; *** : p-value<0.001, ** : p-value<0.01,* : p-value<0.05, m.s. : p-value<0.1, n.s. : p-value>0.1.

Moreover, a virus F caused a larger reduction of sporulation in strains D and R than in strains P (Figure 4.4).



(a) (b)

Figure 4.4: Mean and standard error of the sporulation rate and of isolates infected by the viral sub type I (I), the viral sub type F (F) ; *** : p-value<0.001, ** : p-value<0.01,* : p-value<0.05, m.s. : p-value<0.1, n.s. : p-value>0.1.

This effect was not observed for viruses of subtype I. Moreover, for P strains, there was no difference between infection by F or I subtypes, whereas for strains R and D, the infection by viruses of subtype F significantly decreased the sporulation compared to infection by subtype I.

Virulence and transmission traits correlation

A significant correlation was observed between HT and the inhibition of sporulation for the subtype F (Rho = 0.42, ***) and no for I subtype (Rho = 0.083, ns) (Figure 4.5).

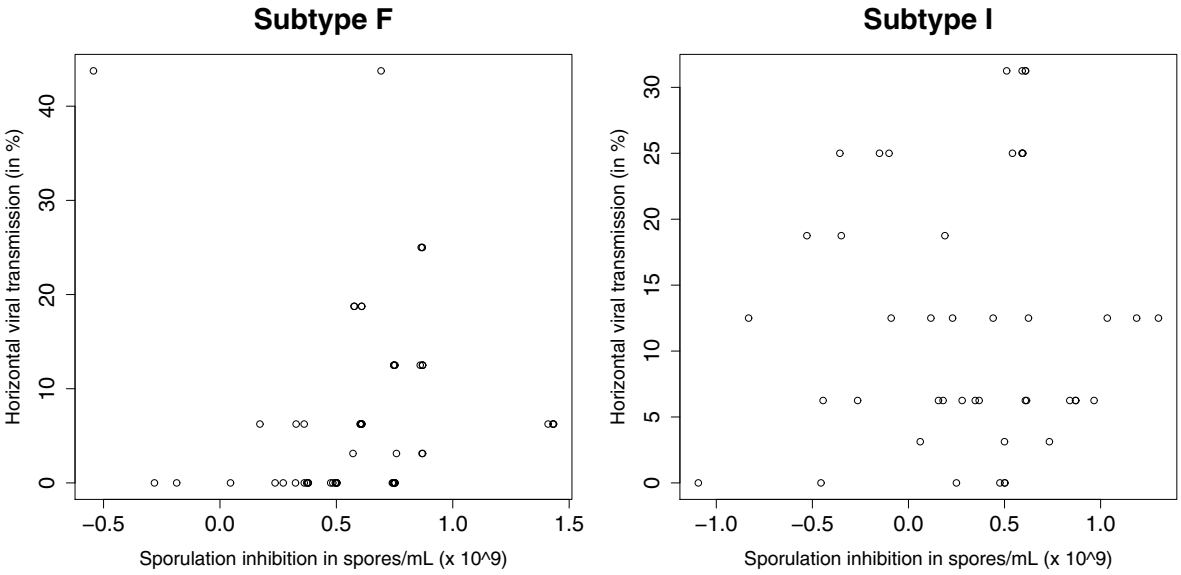


Figure 4.5: Distribution of the viral inhibition of the sporulation of viral strains in of functionof their horizontal transmission rates

No correlation between vertical and horizontal rates of transmission of the viruses was obtain neither correlation between vertical transmission rate and inhibition of sporulation.

4.4 Discussion

Our results confirmed the phenotypic variation within CHV-1 (Peever et al., 2000; Allen and Nuss, 2004). This variation was observed, with a balanced viral sample (three subtypes F, three subtypes I), with strains which have been recently isolated and for traits related to transmission and virulence. We showed CHV-1 strains were differently transmitted, not only vertically but also horizontally: viruses of subtype I are more efficiently horizontally transmitted into a different vc type than viruses F. Thus, although horizontal transmission of CHV-1 is commonly considered as being only under of hosts genotype dependence (Liu and Milgroom, 1996; Cortesi et al., 2001), this suggests that

CHV-1 might be selected to increase its success of transmission between incompatible vc types, as it has previously been suggested (Biella et al., 2002).

However, the novelty of our study is that the two different viral subtypes exhibit different levels of specificity with their fungal host: the reduction of sporulation of fungal strains infected by viruses of subtype F appeared less severe when the fungal strains were the offspring of an isolate infected by the same viruses F (strains in association type P). By contrast, for associations involving the subtype I, the asexual sporulation did not vary with the association type. In other words, when a virus of subtype F was infecting a anive fungal strain, it was more virulent than in a strain which has had the opportunity to co-evolve with it. These results could be accounted for via two hypotheses and different evolutionary pressures acting on fungal sporulation.

Firstly, the more virulent CHV-1 subtype, the subtype F, could have also evolved toward the higher level of specificity. This is in good agreement with the prediction that highly virulent parasites exerting a strong selective force on their hosts would favour local adaptation and specialization between protagonists of the association (Lively, 1999; Gandon and Michalakis, 2002; Greischar and Koskella, 2007).

Secondly, the coevolution process might have selected host-parasite associations that maximize the production of the asexual spores. Indeed, the fitness of vertically transmitted parasites is by definition intrinsically linked to the fitness of their hosts (Ewald, 1987). Many theoretical (Levin and Pimental, 1981; Anderson and May, 1982; Ewald, 1983; Lipsitch et al., 1995, 1996; Frank, 1996b; Gandon, 2004) and experimental (Bull et al., 1991; Ebert, 1994; Messenger et al., 1999; Stewart et al., 2005; Lambrechts and Scott, 2009) works have outlined that, in consequence, vertically transmitted parasites are likely to evolve toward avirulence. Thus, the generalist pattern of the viruses of subtype I could be the result of an ancient co-evolutionary history with the clonal lineage EU-2, whereas the specialist pattern observed for the subtype F may be the consequence of a more recent association with a naïve host. The geographic distributions of the clonal lineage EU-2 and of the CHV-1 subtype I (in Italy, Switzerland, south-eastern France (Allemann et al., 1999; Gobbin et al., 2003; Carbone et al., 2004, Robin et al., unpublished) and

that of subtypes F (in south-western France and in Spain, where the clonal lineage EU-2 proved to be rare (Breuillin et al., 2006; Montenegro et al., 2008, Robin et al., in prep, Dutech et al., in prep) suggest that the lineage EU-2 of *C. parasitica* and the subtype I of CHV-1 have been introduced during the same event. Further studies on the level of specificity of the two subtypes, and especially the subtype F, within their presumed native fungal population, will help us to confirm this hypothesis of co-evolution.

The consequence of the trade-off hypothesis is the evolution of parasites toward an intermediate optimal virulence. Thus, antagonistic forces have to be exerted on the evolution of parasite virulence . In the host-parasite system studied here, the enhancement of parasite virulence, which results in stronger inhibition of fungal sporulation, is effectively costly for the parasite since fungal sporulation is the only way for the CHV-1 to be vertically transmitted. As a result, CHV-1 strains that limit their effect on this trait could present strong selective advantages. Interestingly, we observed a significant positive relationship between virulence (reduction of sporulation rate) and horizontal transmission for viruses of F subtype only. Therefore, the evolution of the subtype F seems to be in accordance with the trade-off hypothesis. In contrast, with the viral strains of subtype I used in this cross infection experiment, we were not able to detect a relationship between these two traits. In addition, the difference in virulence observed between these two subtypes could effectively be the consequence of different evolutionary mechanism, the trade-off hypothesis acting in subtype F only.

Our results raised different questions. The viruses of subtype I having a better horizontal and vertical transmission than viruses of the subtype F, it is likely that the viruses of subtypes F are competitively excluded by subtype I if they share a same fungal population. This has already been observed in France in biological control experiments using strains of subtypes F in an area where viruses of subtypes I have been established (Robin et al., submitted). However, in some areas, for example in Doissat, Dordogne from where four strains of our study were originated, both subtypes appeared to coexist and to co-infect some fungal host (Brusini, unpublished results; Hogan and Griffin, 2002). Numerous theoretical works (Levin and Bull, 1994; van Baalen and Sabelis, 1995; Alizon and van

Baalen, 2008) supported by some empirical evidence (de Roode et al., 2005) have shown that virulent parasites would have an advantage during intra-host competition resulting from coinfection. It would be interested to study if this mecanism would explain why viruses of subtype F are not competitively excluded by viruses of subtype I in Dordogne.

One can also wonder why subtype I did not evolve toward a complete avirulence. In this three trophic level interaction, an upper level of selection could drive the evolution of virus virulence(Michalakis et al., 1992). The virulence of viruses of subtype I may be positively correlated (until a critical threshold is reached) with the fitness of the host-parasite system. The extending phenotypic concept (Dawkins, 1982), which may be used for each parasite interaction (Restif and Koella, 2003; Lambrechts et al., 2006), is especially useful to understand the selective pressures acting at a higher level of selection of the host-parasite system, as its the case here. Each *C. parasitica*/CHV-1 associations can be considered as a "superorganism" resulting from the interaction of the two genotypes. The evolution of the virulence of subtypes I more likely to be the consequence of the evolution between the superorganism and the chestnut tree than of the evolution within the superorganims. By reducing the virulence of its fungal host, the CHV-1 is expected to provide the fungus-virus association with the possibility of reaching its evolutionarily stable strategy (Taylor et al., 1998; Michalakis et al., 1992; Morozov et al., 2007). Viruses of subtype I may therefore be nearer to this stage than viruses of subtype F. Interestingly, fungal-viral associations involving subtype I kept the same level of asexual sporulation whatever the fungal coevolutionary history. This result may be an argument for a level of selection acting on the superorganism and not the parasite only. Higher level of selection acting on the evolution of host-parasite systems are suspected to be common in nature. Several studies have shown that parasite mediated selection may be determinant for competition outcome between species (Hatcher et al., 2006; Holt and Dobson, 2006; Kuo et al., 2008). For example, Tompkins et al. (2000) showed that a nematode parasite which has a much larger impact on host fitness in the native UK grey partridge than on the introduced ring-necked pheasant, may underpin exclusion of the first by the second. Similar results were obtain with a temperate phage which could facilitate the invasion of

its bacterial host in new environments occupied by other bacteria (Brown et al., 2006). Selection acting at the level of the superorganism, that each host-system represent, is in contradiction with the trade-off hypothesis which states that traits as virulence or transmission are under parasite control only. This would perhaps explain the difficulties to found empirical evidences of the trade-off hypothesis.

Our results also showed that intra clonal variation can be detected when a clonal host is infected by a parasite. This is additional evidence of the crucial role of parasites in the evolution of host diversity (Hamilton, 1982; Poulin et al., 2000; Blanchet et al., 2009). Moreover, the phenotypic diversity within the clonal lineage EU-2 showed the adaptive potential of clonal organisms which would be underestimated and would be crucial under stressful conditions (Lushai et al., 2003). Thus, in contrast to the common view(Jaenike, 1978; Hamilton, 1990), hosts do not necessarily need sex to coevolve. This may be especially true in fungi for which parasexuality following somatic fusion (Pontecorvo et al., 1953) may represent a powerful source of recombination, as the description of numerous cases of intra and inter specific horizontal genes transfers in fungi suggests (McGuire et al., 2005).

This study highlights that, when the host and parasite share some interests, this may alter the detection of trade-off between virulence and transmission. It also reinforces Ebert and Bull (2003)'s message : no general law can be drawn for virulence evolution, each host-parasite system has its own particularities, and direct action on virulence will need a specific target of intervention in the host-parasite system.

Acknowledgements

This work was funded by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Région Aquitaine. We thank Tatiana Giraud and Cyril Dutech for their helpful comments on the manuscript.

4.5 References

Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N., and Baalen, M. V. (2008). Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology*, 22:245 – 259.

Alizon, S. and van Baalen, M. (2008). Multiple infections, immune dynamics, and the evolution of virulence. *The American Naturalist*, 172(4):E150–168.

Allemann, C., Hoegger, P., Heiniger, U., and Rigling, D. (1999). Genetic variation of cryphonectria hypoviruses (CHV1) in europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology*, 8(5):843–854.

Allen, T. D. and Nuss, D. L. (2004). Linkage between mitochondrial hypovirulence and viral hypovirulence in the chestnut blight fungus revealed by cDNA microarray analysis. *Eukaryotic Cell*, 3(5):1227–1232.

Anderson, R. M. and May, R. M. (1982). Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, 85:411–426.

Biella, S., Smith, M. L., Aist, J. R., Cortesi, P., and Milgroom, M. G. (2002). Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 269(1506):2269–2276.

Blanchet, S., Rey, O., Berthier, P., Lek, S., and Loot, G. (2009). Evidence of parasite-mediated disruptive selection on genetic diversity in a wild fish population. *Molecular Ecology*, 18:1112–1123.

Breuillin, F., Dutech, C., and Robin, C. (2006). Genetic diversity of the Chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French populations assessed by microsatellite markers. *Mycological Research*, 110:288–296.

Brown, S. P., Chat, L. L., De Paepe, M., and Taddei, F. (2006). Ecology of microbial invasions: Amplification allows virus carriers to invade more rapidly when rare. *Current Biology*, 16(20):2048–2052.

Bull, J. J., Molineux, I. J., and R., R. W. (1991). Selection of benevolence in a host-parasite system. *Evolution*, 45:875–882.

Carbone, I., Liu, Y. C., Hillman, B. I., and Milgroom, M. G. (2004). Recombination and migration of *Cryphonectria hypovirus* 1 as inferred from gene genealogies and the coalescent. *Genetics*, 166(4):1611–1629.

Carius, H. J., Little, T. J., and Ebert, D. (2001). Genetic variation in a host-parasite association: Potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution*, 55(6):1136–1145.

Cortesi, P., McCulloch, C. E., Song, H. Y., Lin, H. Q., and Milgroom, M. G. (2001). Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics*, 159(1):107–118.

Dawkins, R. (1982). *The Extended Phenotype*. Oxford University Press.

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., and Read, A. F. (2005). Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21):7624–7628.

Dieckmann, U., Metz, J. A. J., Sabelis, M. W., and Sigmund, K. (2002). *Adaptive Dynamics of Infectious Diseases: In Pursuit of Virulence Management*. Cambridge University Press, 1st edition.

Dutech, C., J.-P., R., Fabreguettes, O., and Robin, C. (2008). Geostatistical genetic analysis for inferring the dispersal pattern of a partially clonal species: example of the chestnut blight fungus. *Molecular Ecology*, 17:4597–4607.

Ebert, D. (1994). Virulence and local adaptation of a horizontally transmitted parasite. *Science*, 265(5175):1084–1086.

Ebert, D. and Bull, J. J. (2003). Challenging the trade-off model for the evolution of virulence: is virulence management feasible? *Trends in Microbiology*, 11(1):15–20.

Ewald, P. W. (1983). Host-parasite relations, vectors, and the evolution of disease severity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 14:465–485.

Ewald, P. W. (1987). Transmission modes and the evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 503:295–306.

Ewald, P. W. (1994). *Evolution of Infectious Disease*. Oxford University Press, USA.

Fellous, S. and Salvaudon, L. (2009). How can your parasites become your allies? *Trends in Parasitology*, 25:2.

Fenner, F. and Ratcliffe, F. (1965). *Myxomatosis*. Cambridge University Press.

Frank, S. A. (1996b). Problems inferring the specificity of plant-pathogen genetics - Reply. *Evolutionary Ecology*, 10(3):323–325.

Gandon, S. (2004). Evolution of multihost parasites. *Evolution*, 58:455–469.

Gandon, S. and Michalakis, Y. (2002). Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(3):451–462.

Gobbin, D., Hoegger, P. J., Heiniger, U., and Rigling, D. (2003). Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1) in Europe. *Virus Research*, 97(1):39–46.

Graham, A., Allen, J., and Read, A. (2005). Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36:373–397.

Grech, K. Watt, K. R. A. F. (2006). Host-parasite interactions for virulence and resistance in a malaria model system. *Journal of Evolutionary Biology*, 19:1620–1630.

Greischar, M. A. and Koskella, B. (2007). A synthesis of experimental work on parasite local adaptation. *Ecology Letters*, 10(5):418–434.

Hamilton, W. D. (1982). Pathogens as causes of genetic diversity in their host populations. In Anderson, R. M. and May, R. M., editors, *Population biology of infectious diseases*, pages 269–296. Springer.

Hamilton, W. D. (1990). Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (A Review). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:3566–3573.

Hatcher, M. J., Dick, J. T., and Dunn, A. M. (2006). How parasites affect interactions between competitors and predators. *Ecology Letters*, 9:1253–1271.

Hogan, E. P. and Griffin, G. J. (2002). Spread of Cryphonectria hypovirus1 into 45 vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* on grafted American chestnut trees. *Forest Pathology*, 32(2):73–85.

Holt, R. D. and Dobson, A. P. (2006). Extending the principles of community ecology to address the epidemiology of host-pathogen communities. In Collinge, S. K. and Ray, C., editors, *Disease ecology: community structure and pathogen dynamics*, pages 6–27. Oxford University Press.

Jaenike, J. (1978). An hypothesis to account for the maintenance of sex within populations. *Evolutionary Theory*, (3):191–194.

Kaltz, O., Gandon, S., Michalakis, Y., and Shykoff, J. A. (1999). Local maladaptation in the anther-smut fungus *Microbotryum violaceum* to its host plant *Silene latifolia*: Evidence from a cross-inoculation experiment. *Evolution*, 53(2):395–407.

Kuo, C., Corby-Harris, V., and Promislow, D. E. (2008). The unavoidable costs and unexpected benefits of parasitism: Population and metapopulation models of parasite-mediated competition. *Journal of Theoretical Biology*, 250(2):244–256.

Lambrechts, L., Fellous, S., and Koella, J. C. (2006). Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends in Parasitology*, 22:12–16.

Lambrechts, L., Halbert, J., Durand, P., Gouagna, L. C., and Koella, J. C. (2005). Host

genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 4:3.

Lambrechts, L. and Scott, T. W. (2009). Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 276(1660):1369–1378.

Levin, B. and Bull, J. (1994). Short-sighted evolution and the virulence of pathogenic microorganisms. *Trends in Microbiology*, 2:76–81.

Levin, S. A. and Pimental, D. (1981). Selection of intermediate rates of increase in parasite-host systems. *The American Naturalist*, 117:308–315.

Lipsitch, M., Nowak, M. A., Ebert, D., and May, R. M. (1995). The population-dynamics of vertically and horizontally transmitted parasites. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 260(1359):321–327.

Lipsitch, M., Siller, S., and Nowak, M. A. (1996). The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission. *Evolution*, 50(5):1729–1741.

Liu, Y. and Milgroom, M. G. (1996). Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (*vic*) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology*, 86(1):79–86.

Lively, C. M. (1999). Migration, virulence, and the geographic mosaic of adaptation by parasites. *The American Naturalist*, 153:S34–S47.

Lively, C. M. and Dybdahl, M. F. (2000). Parasite adaptation to locally common host genotypes. *Nature*, 405(6787):679–681.

Lushai, G., Loxdale, H. D., and Allen, J. A. (2003). The dynamic clonal genome and its adaptative potential. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79:193–208.

McGuire, I. C., Davis, J. E., Double, M. L., MacDonald, W. L., Rauscher, J. T., McCawley, S., and Milgroom, M. G. (2005). Heterokaryon formation and parasexual recombination

between vegetatively incompatible lineages in a population of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Mol Ecol*, 14(12):3657–69.

Messenger, S. L., Molineux, I. J., and Bull, J. J. (1999). Virulence evolution in a virus obeys a trade-off. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 266(1417):397–404.

Michalakis, Y., Olivieri, I., Renaud, F., and Raymond, M. (1992). Pleiotropic action of parasites - how to be good for the host. *Trends in Ecology and Evolution*, 7:59–62.

Montenegro, D., Aguin, O., Sainz, M., Hermida, M., and Mansilla, J. (2008). Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW spain. *Forest Ecology and Management*, 256(5):973–980.

Morozov, A. Y., Robin, C., and Franc, A. (2007). A simple model for the dynamics of a host-parasite-hyperparasite interaction. *Journal of Theoretical Biology*, 249:246–253.

Peever, T. L., Liu, Y. C., Cortesi, P., and Milgroom, M. G. (2000). Variation in tolerance and virulence in the chestnut blight fungus-hypovirus interaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11):4863–4869.

Pontecorvo, G., Roper, J. A., and Forbes, E. (1953). Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *Journal Of General Microbiology*, 8:198–210.

Poulin, R., Marshall, L. J., and Spencer, H. G. (2000). Metazoan parasite species richness and genetic variation among freshwater fish species: cause or consequence? *International Journal for Parasitology*, 30:697–703.

R Development Core Team (2009). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Restif, O. and Koella, J. C. (2003). Shared control of epidemiological traits in a coevolutionary model of host-parasite interactions. *The American Naturalist*, 161:827–836.

Robin, C., Anziani, C., and Cortesi, P. (2000). Relationship Between Biological Control, Incidence of Hypovirulence, and Diversity of Vegetative Compatibility Types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathologie*, 90(7):730–737.

Salvaudon, L., Heraudet, V., and Shykoff, J. A. (2007). Genotype-specific interactions and the trade-off between host and parasite fitness. *BMC Evol Biol*, 7:189.

Sicard, D., Pennings, P. S., Grandclement, C., Acosta, J., Kaltz, O., and Shykoff, J. A. (2007). Specialization and local adaptation of a fungal parasite on two host plant species as revealed by two fitness traits. *Evolution*, 61(1):27–41.

Stewart, A. D., Logsdon, J. M., and Kelley, S. E. (2005). An empirical study of the evolution of virulence under both horizontal and vertical transmission. *Evolution*, 59(4):730–739.

Taylor, D. R., Jarosz, A. M., Lenski, R. E., and Fulbright, D. W. (1998). The acquisition of hypovirulence in host-pathogen systems with three trophic levels. *The American Naturalist*, 151(4):343–355.

Thompson, J. N. and Burdon, J. J. (1992). Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature*, 360:121–125.

Tompkins, D., Greenman, J., Robertson, P., and Hudson, P. (2000). The role of shared parasites in the exclusion of wildlife hosts: *Heterakis gallinarum* in the ring-necked pheasant and the grey partridge. *Journal of Animal Ecology*, 69:829–841.

van Baalen, M. and Sabelis, M. W. (1995). The dynamics of multiple infection and the evolution of virulence. *The American Naturalist*, 146(6):881.

Weiss, R. (2002). Virulence and pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 10:314–318.

Williams, G. C. and Nesse, R. M. (1991). The dawn of darwinian medicine. *The Quarterly Review of Biology*, 66(1):1–22.

Chapitre 5

Discussion générale

Dans cette discussion générale seront présentés les principaux mécanismes reliant diversité en GCV et transmission des DCE que nos résultats, principalement obtenus à partie de l'étude du cas particulier *C. parasitica*/CHV, ont permis de mettre en évidence. Ceci dans l'optique de mieux comprendre en quoi la relation qui semble exister entre pression parasitaire et diversité des gènes impliqués dans l'incompatibilité végétative des champignons influe sur l'écologie et l'évolution de la relation hôte-parasite des systèmes champignon/DCE.

5.1 Interaction champignon/DCE et diversité génétique de la population d'hôte.

Plusieurs études (Hamilton, 1982; Poulin *et al.*, 2000; Blanchet *et al.*, 2009) ont suggéré que la pression exercée par les parasites sur leur population d'hôte était source de diversité génétique pour ces dernières. Les résultats obtenus à partir du modèle mathématique du chapitre 3 et de l'expérience d'infection croisée entrent dans ce cadre en montrant que les DCE peuvent agir sur la diversité génétique de leur population d'hôte à plusieurs niveaux.

5.1.1 Rôle des DCE sur la diversité en GCV

5.1.1.1 sur un hôte asexué : une boucle de rétroaction

Le modèle mathématique développé dans le chapitre 3 montre que, malgré la perméabilité de la barrière d'incompatibilité végétative, la pression parasitaire exercée par les DCE est une force suffisante pour permettre le maintien de la diversité en GCV des populations de champignon. De façon similaire à ce qu'ont trouvé Holt et Pickering (1985) avec un modèle proche du nôtre testant le rôle du parasitisme dans la coexistence de deux espèces d'hôte, la coexistence entre GCV est possible uniquement lorsque le taux transmission intra GCV du DCE est supérieur au taux de transmission inter GCV. Ainsi le frein que représente la barrière d'incompatibilité à la transmission du DCE serait suffisant pour permettre le maintien d'une diversité en GCV en réponse à la pression parasitaire exercée par le DCE. Il est également apparu que cette perméabilité pouvait s'avérer nécessaire au maintien du DCE dans la population d'hôte. En effet, il semble exister une boucle de rétroaction entre pression exercée par les DCE et diversité en GCV : en maintenant une forte diversité en GCV, les DCE créent les conditions de leur propre extinction. La perméabilité entre GCV serait donc une garantie du maintien de cette pression de sélection que représentent les DCE dans la population de champignon.

L'existence de cette perméabilité entre GCV a été confirmée par l'étude du cas particulier de *C. parasitica* et du CHV-1 (Cf. Chapitre 3 A). Comme suggéré par Carbone *et al.* (2004), notre étude de transmission du CHV-1 sur tiges excisées a montré que la transmission du CHV-1 entre GCV *in vitro* sous-estime la capacité de transmission du virus en conditions naturelles. Il reste à étudier plus précisément chez *C.parasitica* comment le substrat de culture et sa richesse pourrait jouer sur la perméabilité de la barrière d'incompatibilité végétative.

Les forts taux de transmission entre GCV obtenus sur tiges excisées peuvent sembler contradictoire avec l'observation de la coexistence de ces GCV dans une même parcelle. Cependant, en paramétrant le modèle mathématique avec les résultats de transmission obtenus sur tiges excisées entre EU-2, EU-5 et EU-72, la coexistence à l'équilibre de ces trois GCV est apparue comme possible. En effet, dans 30% des 50 simulations réalisées,

ces trois GCV coexistaient à l'équilibre, avec un nombre moyen de GCV à l'équilibre de 2.3, pour un virus présentant une virulence $\alpha = 0.75$ (proche de ce qui est observé pour les virus de sous-type F, Cf Chapitre 4).

5.1.1.2 et sur un hôte sexué ?

Alors que les prédictions du modèle mathématique (obtenues en utilisant des paramètres de transmission inspirés des résultats de Cortesi *et al.* (2001)) s'avèrent correspondre avec la diversité en GCV des populations de *C. parasitica* observées en Europe, ce modèle s'est révélé ne pas pouvoir expliquer toute la diversité en GCV observée dans les populations américaines de *C. parasitica*. Ceci suggère que la grande diversité en GCV des populations de *C. parasitica* n'est pas seulement dûe à la pression exercée par le CHV-1, mais qu'il existerait d'autres mécanismes agissant sur le polymorphisme des gènes *vic* dans ces populations (Milgroom et Cortesi, 1999). Deux hypothèses, non-exclusives, peuvent expliquer le décalage entre diversité en GCV observée et théorique des populations américaines :

- d'autres pressions de sélection interviennent dans le maintien de la diversité en GCV. En effet, d'autres hypothèses que la possibilité de transmissions horizontales de DCE via la fusion mycélienne existent pour expliquer l'évolution du polymorphisme des gènes vic (voir Chapitre 2)
- la grande diversité en GCV des populations de *C. parasitica* observée aux États-Unis (et en Asie) est la conséquence de la reproduction sexuée.

Or une hypothèse importante faite lors de la conception de notre modèle mathématique est que la population d'hôte est asexuée. Les populations européennes de *C. parasitica* satisfont à cette hypothèse contrairement aux populations américaines et asiatiques (Liu *et al.*, 2007; Milgroom *et al.*, 2008; Dutech *et al.*, 2008). La reproduction sexuée, via la création de nouvelles combinaisons entre allèles des différents gènes *vic*, est une source importante de diversité en GCV (Nauta et Hoekstra, 1996). Le décalage obtenu entre la diversité en GCV théorique de notre modèle et la diversité observée dans les populations américaines pourrait donc être la conséquence de la reproduction sexuée du champignon.

Sans pression de sélection, la reproduction sexuée seule ne peut pas expliquer l'évolution du polymorphisme allélique des gènes *vic*. Il serait donc intéressant de complexifier notre modèle en prenant en compte à la fois la reproduction sexuée et de l'effet d'un DCE, il serait ainsi possible de tester si la reproduction sexuée peut amplifier la diversité de GCV maintenue par un virus, même peu virulent. La prise en compte de la reproduction sexuée est particulièrement intéressante car ceci permettrait d'étudier si comme proposé par (Milgroom, 1999), la stérilité femelle que provoque l'infection par le CHV-1 peut favoriser le virus en limitant la diversité génétique de son hôte. De plus, un tel modèle pourrait également illustrer en quoi la reproduction sexuée, via l'augmentation de la diversité génétique, peut avantager les populations d'hôte.

5.1.1.3 Rôle des DCE sur la diversité au sein du GCV

L'expérience d'infections croisées présentée dans le Chapitre 4 montre que le CHV-1 peut être également source de diversité pour son hôte au sein de lignées issues de reproduction clonale représente un GCV. L'effet significatif de l'interaction des génotypes d'hôte et de parasite sur la sporulation asexuée montre qu'il existe de la variabilité génétique entre ces six souches provenant pourtant d'une même lignée clonale (même combinaison d'allèles pour 10 marqueurs microsatellites et pour les gènes *vic*). Ainsi, comme suggéré par (Lushai *et al.*, 2003) il semblerait que le potentiel adaptatif des populations clonales, notamment en situation de stress, soit sous-estimé. Dans le cas de *C. parasitica*, la situation de stress serait causée par l'infection par le CHV-1. Cette évolution au sein d'une lignée clonale pourrait résulter de mutations, d'effets épigénétiques, d'amplification de transposons, de "gènes mutateurs" (Lushai *et al.*, 2003) ou du phénomène de parasexualité, qui a été plusieurs fois suggéré chez les champignons et qui pourrait permettre le transfert horizontal de gènes (Taylor *et al.*, 1999; McGuire *et al.*, 2005; Paoletti *et al.*, 2006).

5.1.2 Diversité de la population hôte et évolution des DCE

5.1.2.1 Rôle de la diversité en GCV sur l'évolution des DCE

Une des particularités des systèmes champignon/DCE mise en évidence par les simulations produites avec le modèle mathématique (cf. deuxième partie du Chapitre 3) est que la transmission du parasite est fortement contrôlée par le génotype du champignon et par la diversité génétique de la population d'hôte. En effet, les possibilités de transmission horizontale d'un DCE infectant un mycélium de GCV rare dans une population présentant une forte diversité en GCV sont beaucoup plus faibles que celles du même DCE infectant un individu d'une population constituée d'un unique GCV. Ainsi la capacité de transmission d'un DCE semble avant tout dépendante de la diversité en GCV de sa population hôte, ceci quelque soit son taux de reproduction intra-hôte. Ces systèmes champignons/DCE sont donc un bon exemple de systèmes hôte-parasite pour lequel le modèle du trade-off est inadapté. Cette difficulté de transmission lorsque la population d'hôte est diversifié en GCV semble particulièrement nuire au DCE virulent pour lequel nous observons une baisse importante de leur prévalence avec l'augmentation de la diversité génétique de la population d'hôte. Cette baisse de prévalence peut même aller jusqu'à l'extinction du DCE qui n'arrive plus à se propager dans la population d'hôte si celle-ci est trop diversifiée. Ceci montre que dans une population riche en GCV il y aurait un double coût à l'augmentation de la virulence d' un DCE s'exprimant (Figure 5.1) :

- au niveau de la transmission verticale du DCE, car fitness de l'hôte et celle du parasite sont directement corrélées (Cf Introduction, Section 1.2.1)
- au niveau de la transmission horizontale du DCE, car la baisse de fitness liée à la diminution de la durée de l'infection n'est pas compensée par une augmentation de la transmission du parasite.

Les descriptions des effets des différentes espèces de CHV semble confirmer cette hypothèse : les cas moins sévères d'hypovirulence liée au CHV sont décrits dans les populations de *C. parasitica* les plus diversifiées en GCV (Milgroom et Cortesi, 1999; Milgroom, 1999). De façon intéressante, il semble également exister un lien entre prévalence et diversité en GCV de son champignon hôte (*Ophiostoma novo-ulmi*) pour le D-factor (Brasier, 1988),

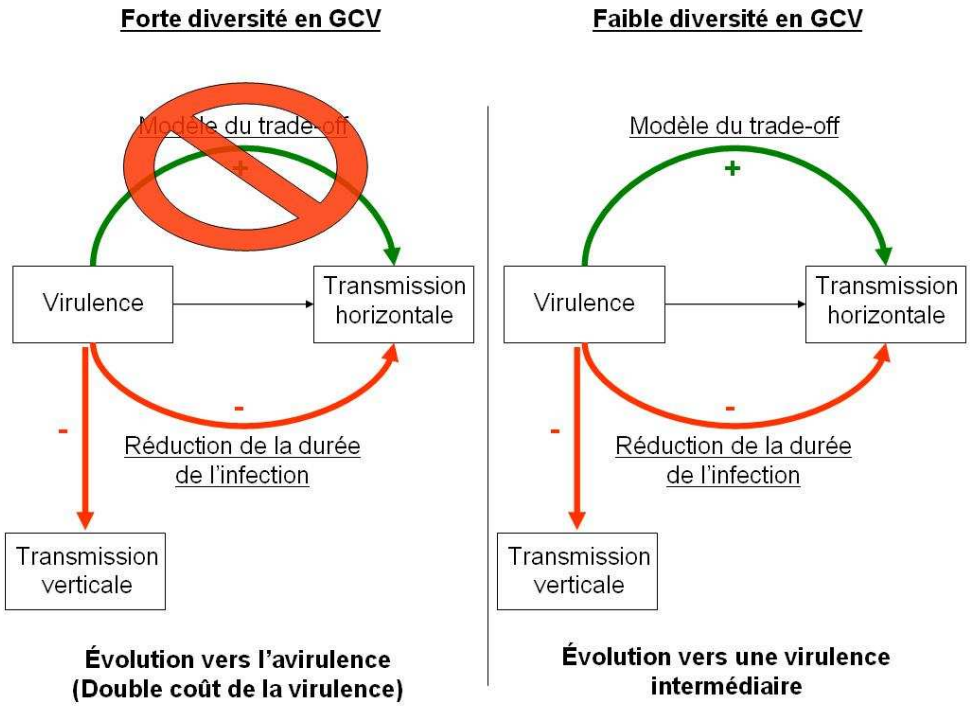


FIGURE 5.1: Schéma hypothétique des pressions de sélection agissant sur l'évolution de la virulence des DCE suivant la diversité en GCV de leur population d'hôte.

qui comme le CHV est un des rares cas connus de mycovirus virulent. Comme nos résultats obtenus dans le Chapitre 4 le suggèrent, ce niveau de virulence intermédiaire que présentent les DCE dans des populations d'hôte peu diversifiées pourrait être la conséquence d'une évolution de la virulence suivant le modèle du trade-off (Figure 5.1 ; Cf Section 5.2.2).

5.1.2.2 le cas particulier des éléments cytoplasmiques délétères

Il est ici important de faire une distinction chez les DCE entre les mycovirus et les autres éléments cytoplasmiques devenus délétères. Même si l'effet sur le maintien de la diversité en GCV est le même quelque soit la nature des DCE, les mécanismes à l'origine de leur évolution sont complètement différents car le caractère délétère de ces organelles (mitochondries, plasmides) est souvent le fait d'une évolution à court terme (en anglais : short-sighted evolution) (Levin et Bull, 1994). En fait, la nature coenocitique des champignons est favorable à la mise en place de compétition entre organelles au sein du cytoplasme, surtout si les fusions somatiques permettent l'introduction de nouveaux géno-

types (hétéroplasmie). Il existerait donc chez les champignons un fort risque d'évolution intra-hôte. Ceci expliquerait pourquoi ces éléments symbiotiques peuvent, chez les champignons plus que chez les autres Eucaryotes multicellulaires (Plantes, Animaux), évoluer vers le parasitisme. Contrairement aux organelles délétères, la virulence des mycovirus est le résultat de sa coévolution avec la population d'hôte, son niveau de virulence étant principalement contrôlé par la diversité en GCV de cette dernière. L'émergence de ces organelles n'obéissant plus aux règles du mutualisme se produirait en revanche quelque soit le niveau de diversité génétique de la population de champignon. Le maintien de la diversité en GCV pourrait donc être majoritairement le fait de la pression de sélection exercée par ces DCE particuliers, qui sont d'autant plus virulents que leur bon fonctionnement est vital pour l'organisme. Ainsi, le système d'incompatibilité végétative pourrait non seulement limiter la propagation des ces organelles délétères mais aussi limiter leur évolution. C'est pourquoi, l'incompatibilité végétative des champignons pourrait avoir évoluer en réponse à la pression représenté par ces organelles délétères enempêchant l'hétéroplasmie et en réduisant ainsi les possibilités d'évolution de ces derniers (Cf Chapitre 2).

5.2 L'évolution de la virulence des populations de CHV-1

5.2.1 Le modèle du trade-off hypothesis

Selon Ebert et Bull (2003) le modèle du trade-off décrit dans l'Introduction (Section 1.2.2) , repose sur deux principes :

(1) la virulence (réduction de la fitness de l'hôte due à l'infection par le parasite) est coûteuse pour le parasite

(2) transmission et virulence sont intrinsèquement liées, dans le sens où une forte virulence favorise le succès de transmission horizontale du parasite (Cf Introduction Section 1.2.2 pour la description du lien entre virulence et transmission horizontale)

En conséquence, pour que le modèle du trade-off soit vérifié, autrement dit, pour que l'évolution vers une virulence optimale soit observée dans un système hôte-parasite, il faut, outre une corrélation positive entre virulence et transmission, que l'augmentation de la virulence soit négativement corrélée avec un autre trait intervenant dans la fitness du parasite. Par exemple, Anderson et May (1982) ont proposé que la virulence des parasites devrait être négativement corrélée avec la durée d'infection. Cette corrélation sous-entend que l'infection par le parasite peut être mortelle pour l'hôte. Or, dans de nombreux systèmes hôte parasite, la virulence du parasite consiste juste en la baisse de la fitness du l'hôte. Afin de vérifier que dans de tels systèmes hôte-parasite la virulence soit bien soumise à des pressions évolutives antagonistes, il est nécessaire d'identifier en quoi cette baisse de la fitness de l'hôte peut également avoir une répercussion négative sur la fitness du parasite.

5.2.2 Les virus CHV-1 du sous-type F : un exemple de parasites qui obéissent au trade-off ?

Jusqu'à présent, l'effet de l'infection par CHV-1 sur la mortalité de *C. parasitica* n'a jamais été étudié. Il est donc difficile de savoir si effectivement une augmentation de la virulence du CHV-1 peut avoir une répercussion sur la durée de l'infection virale. Cependant, l'effet du CHV-1 sur la sporulation asexuée de son hôte (cf Chapitre 4) est un bon exemple de l'existence dans ce modèle biologique d'une corrélation négative entre virulence et fitness du parasite. En effet, le CHV est transmis verticalement via les spores issues de la reproduction asexuée. Le taux de sporulation asexuée est donc un paramètre intervenant à la fois dans la fitness de l'hôte et du parasite car la production de spores asexuées est une composante majeure de la fitness des ascomycètes (Taylor *et al.*, 1999). Du fait de ce mode de transmission, le premier principe du modèle du trade-off selon Ebert et Bull (2003) semble être vérifié dans le système *C. parasitica*/CHV. Il est même intéressant de constater que, pour un des sous-types viraux étudiés dans notre expérience d'infection croisée (le sous-type F), le taux de sporulation asexuée était le plus important lorsque la souche virale était associée à son isolat fongique naturel. Ce résultat suggère

donc que le processus de coévolution a sélectionné, au sein de ce sous-type viral, un niveau de virulence maximisant la sporulation des mycéliums infectés. C'est d'ailleurs pour ce même sous-type viral qu'il a été trouvé une relation entre transmission horizontale et virulence. Ainsi, à partir des souches virales testées dans cette étude, il semblerait que l'évolution de la virulence des virus de sous-type F obéisse au modèle du trade-off. De plus, selon le modèle du trade-off, c'est la forte reproduction intra-hôte des parasites les plus virulents qui serait la cause de leur forte transmission. Il serait en conséquence intéressant de pouvoir relier virulence et taux de transmission à la charge virale des virus de sous-type F en quantifiant cette charge par PCR-quantitative dans les différentes associations *C. parasitica*/CHV testées. De cette manière, il serait possible de clairement vérifier que le modèle du trade-off est le processus à l'origine de l'évolution de la virulence pour les virus de sous-type F.

Cette corrélation positive entre inhibition de la sporulation et transmission horizontale a été observée alors que la sporulation des mycéliums infectés était sous la dépendance des deux génotypes ainsi que de leur interaction. Or, une des critiques souvent faites à l'encontre du modèle du modèle du trade-off est justement qu'il n'intègre pas la possibilité de l'interaction entre le génome de hôte et celui du parasite dans la définition de la virulence (Ebert et Bull, 2003; Alizon *et al.*, 2008). Les nombreuses études ayant montré que des traits traditionnellement considérés comme étant contrôlés par le parasite pouvaient également être sous la dépendance du génotype de l'hôte (Thompson et Burdon, 1992; Carroll, 2001; Peever *et al.*, 2000; Lambrechts *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2005; Grech, 2006; Sakamoto *et al.*, 2007) sont souvent citées en exemple pour expliquer l'absence de corrélation entre virulence et transmission dans les systèmes hôte parasite. Paradoxalement dans notre modèle biologique, il apparaît que des interactions fortes entre les génotypes du parasite et de l'hôte ne sont pas incompatibles avec la détection du modèle du trade-off. Les interactions génotype-génotype ne représenteraient donc pas toujours un obstacle majeur à l'évolution de la virulence du parasite suivant le modèle du trade-off tel qu'il est défini par (Ebert et Bull, 2003).

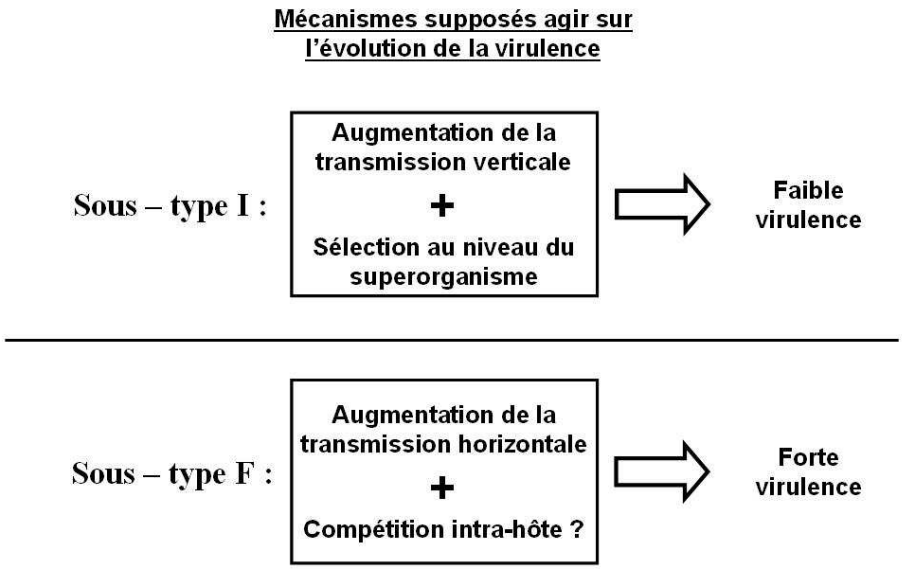


FIGURE 5.2: Schéma représentant les pressions de sélection suposées agir sur l'évolution de la virulence des deux sous-types de CHV-1 présents en France. (Cf texte).

5.2.3 Les virus CHV-1 de sous-type I : virulence ou phénotype étendu ?

En revanche, pour les trois souches de virus de sous-types I testées dans cette expérience d'infection croisée, il n'a pas été possible de mettre en évidence l'existence d'une corrélation entre virulence et transmission horizontale. Ce résultat suggérerait donc que la différence de virulence, qui a été rigoureusement démontrée dans le chapitre 4 entre les deux sous-types, serait le résultat de processus évolutifs différents (Figure 5.2). Les differents niveaux de virulences observés entre les deux sous-types seraient donc bien le résultat d' évolutions indépendantes de ces derniers. La divergence entre sous-type F et sous-type I suposée être antérieure à leur introduction en Europe (Gobbin *et al.*, 2003) ne serait donc pas la seule cause des différences phénotypiques observées entre ces deux sous-types

L'absence de relation entre inhibition de la sporulation et transmission horizontale chez les virus de sous-types I étudiés dans le Chapitre 4 pose la question du maintien de la virulence des virus de sous-type I. En effet, à la vue de nos résultats, aucun avantage évolutif ne semble pouvoir contre-balancer l'effet négatif de la virulence du CHV sur sa

propre fitness bien que la virulence du sous-type I puisse s'exprimer au niveau de traits non mesurés ici, . La virulence optimale d'un tel parasite devrait donc être une virulence nulle. Or, l'expérience d'infection croisée nous a permis d'observer une baisse significative de la sporulation asexuée des isolats fongiques lorsqu'ils étaient infectés par des virus de sous-type I. En fait, il a été proposé (Michalakis *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1998) que l'évolution de l'interaction *C. parasitica*/CHV dépende également de processus évolutifs mettant en cause le châtaignier. Autrement dit, l'évolution de l'interaction *C. parasitica*/CHV ne peut être comprise et analysée sans prendre en considération de l'interaction arbre-champignon. Selon (Taylor *et al.*, 1998), la forte virulence du CHV, comparée à celle des autres mycovirus, permettrait aux champignons infectés d'atteindre une virulence optimale en augmentant sa durée d'infection sur le châtaignier.

D'après Ebert et Bull (2003), le manque de preuves empiriques du trade-off est souvent la conséquence d'une dimension supplémentaire à l'interaction hôte parasite qui vient complexifier l'obtention de la virulence optimal. Cette dimension peut être :

- temporelle comme pour la virulence du virus HIV évoluant après une phase asymptomatique (Levin, 1996 mais regarder Fraser *et al.*, 2007)
- ontogénétique comme la virulence de certaines maladies humaines qui sont fonction de l'âge du malade
- la conséquence d'un processus écologique agissant à un niveau supérieur comme cela peut être le cas dans l'interaction *C. parasitica*/CHV

Ce dernier point est bien illustré par les cas de compétitions dirigées par les parasites (en anglais : parasite-mediated competition, Hatcher *et al.*, 2006; Holt et Dobson, 2006; Kuo *et al.*, 2008) où la virulence du parasite peut s'avérer bénéfique pour la fitness de l'hôte à un autre niveau de sélection. Par exemple, l'étude de Tompkins *et al.* (2000) suggère que l'exclusion compétitive de l'espèce de perdrix native du Royaume Uni par une espèce de faisan introduite était en partie due à l'infection commune de ces deux espèces par un nématode parasite. L'absence de corrélation entre virulence et transmission pour les virus de sous-type I pourrait donc être la conséquence d'une adaptation, non pas au niveau de l'interaction *C. parasitica*/CHV considérée comme un système clos, mais au niveau

des trois niveaux trophiques virus-champignon-arbre, ce qui perturberait la détection du trade-off entre le virus et le champignon. Il existerait donc bien pour ce sous-type un avantage à être virulent ce qui pourrait expliquer l'observation d'une virulence non nulle. Il serait intéressant de vérifier que l'absence d'effet « type d'association » pour le sous-type I (Chap4. Figure 4.4) soit bien une conséquence de l'interaction avec le châtaignier. En effet, si la virulence du sous-type I a évolué en réponse à la pression exercée par la population de châtaignier, il apparaît logique de ne pas observer d'effet « type d'association » sur milieu gélosé. Il faudrait donc mesurer le taux de sporulation asexuée d' associations *C. parasitica*/CHV infectant des génotypes différents de châtaignier afin de tester l'existance d' un effet châtaignier sur l'expression de ce trait pour les virus de sous-type I en comparaison à des virus de sous-type F.

5.2.4 Existence et rôle de coinfections multiples et compétition entre sous-types

Au vu des résultats obtenus dans la manipulation d'infection croisée (cf. chapitre 4), il est tentant de faire l'hypothèse que, dans les zones comme en Dordogne où les deux-sous types coexistent, le sous-type F sera peu à peu remplacé par des virus de sous-type I. En effet, les virus de sous-type I ont présenté des taux de transmission horizontaux et verticaux (en terme de pourcentage de spores infectées, mais aussi en terme de nombre de spores infectées produites par chaque mycélium) supérieurs aux virus de sous-type F. Cependant, l'analyse de la population de virus de St-Cernin (cf. Chapitre 3) montre que les deux sous-types sont retrouvés dans des proportions similaires. De plus, les cas de transmission inter-GCV ne semblent pas donner avantage à l'un ou l'autre des sous-types. Le fait que des virus de sous-type F soient retrouvés associés à de nouveaux GCV montre que la fitness de ce sous-type est suffisante pour qu'il puisse se transmettre dans la population d'hôte malgré la compétition avec le sous-type I. Une explication possible à ce maintien du sous-type F est un avantage des virus de sous-type F lors des compétitions intra-hôte entre sous-types viraux. La possibilité d'infections d'isolats de *C. parasitica* par des souches de CHV-1 différentes a déjà été suggérée (Hogan et Griffin, 2002). Il n'y a

cependant que peu ou pas de cas décrits d'infections multiples, mais cette rareté peut provenir du fait qu'il existe peu de populations de *C. parasitica* infectées par des virus de types ou sous-types différents. Ces infections multiples sont en effet difficiles à mettre en évidence lorsque les différences entre souches virales sont minimes. Dans notre étude d'une population de *C. parasitica*, les séquences (ORF-A et B) de six souches virales sur un total de 49 (soit 12%) suggèrent des événements de recombinaison entre les deux sous-types viraux. Ces recombinaisons nécessitent obligatoirement qu'il y ait eu des coinfections de *C. parasitica* par des sous-types viraux F et I. Or les parasites les plus virulents sont supposés être favorisés dans ce genre de compétition intra-hôte (Levin et Bull, 1994; van Baalen et Sabelis, 1995; de Roode *et al.*, 2005; Alizon et van Baalen, 2008). Par exemple, (de Roode *et al.*, 2005) ont trouvé que la virulence de plusieurs souches de *Plasmodium chabaudi*infectant des souris de laboratoire était fortement liée à leur valeur compétitive, les souches les plus virulentes étant avantagées grâce à un taux de réplication intra-hôte plus important. D'une façon similaire à l'étude de de Roode *et al.*, 2005, il serait donc interessant de quantifier la charge virale par PCR-quantitative des isolats utilisés dans l'expérience d'infection croisée pour de tester :

- si la forte virulence des virus de sous-type F est bien liée à leur capacité à se reproduire au sein de l'hôte, ce qui permettrait de confirmer que le modèle du trade-off est bien responsable de l'évolution de la virulence de sous type F.
- la charge virale des virus de sous-type F est bien supérieure à celle des virus de sous-type I, ce qui serait un argument suplémentaire de la meilleure compétitivité des virus sous-type F lors de coinfection avec des virus de sous-type I.

Ainsi il serait possible d'expliquer pourquoi les virus de sous-type F et de sous-type I semblent coexister en Dordogne malgrè la meilleure transmission de ce dernier. De plus, cet avantage qu'auraient les virus virulents lors de coinfection pourait constituer une forte pression de selection en faveur de l'augmentation de la virulence dans ce système hôte-parasite.

Il sera donc nécessaire de suivre dans le temps la parcelle de Saint-Cernin étudiée dans le chapitre 3 afin d'étudier l'évolution des prévalences respectives des deux sous-

types. De plus, ces cas de recombinaisons entre sous-type pouvant aboutir à l'évolution des nouvelles souches virales ce suivi permettrait de surveiller l'émergence de souches recombinées qui pourraient se disséminer dans les populations de *C. parasitica* et modifier non seulement l'équilibre entre le champignon et le virus mais aussi celui entre l'association *C. parasitica*/CHV et le châtaignier.

5.3 Conclusion

Comment expliquer la virulence observée des parasites ? Cette question peut être généralisée à l'ensemble les systèmes hôte-parasite. Une partie de cette thèse a justement constitué en l'étude de cette question concernant les systèmes champignons/DCE et plus particulier *C. parasitica* et de son hypovirus. Un des points de ce travail est la mise en évidence du rôle de la perméabilité inter GCV dans l'étude de l'évolution des systèmes champignon/DCE. Cette prise en compte a permis d'avoir une approche nouvelle de l'interaction entre la pression exercée par les DCE sur la diversité des gènes *vic*. Ceci a permis de souligner une particularité des systèmes champignons/DCE qui est que l'évolution de la virulence n'est pas uniquement fonction du nombre de propagules infectieuses produites par le parasite durant l'infection et de la probabilité de rencontre avec un hôte sain comme dans la plupart des système hôtes-parasite. En fait, ce serait la composition en GCV de la population d'hôte et notamment son niveau de diversité qui dirigerait la dispersion des DCE ainsi que leur évolution. Dans ces conditions, le modèle du trade-off d'évolution de la virulence semble ne pas être applicable à des populations riches en GCV car la transmission horizontale d'un DCE dans une population riche en GCV ne peut pas être sous le contrôle du génotype du parasite. L'évolution des DCE vers des niveaux de virulence élevé ne pourrait donc être seulement possible dans des populations présentant une diversité faible comme cela semble être le cas pour le CHV-1 dans les populations européennes de *C. parasitica*.

Chapitre 6

Bibliographie

Aimi, T., Yotsutani, Y. et Morinaga, T. (2002a). Cytological analysis of anastomoses and vegetative incompatibility reactions in *Helicobasidium monpa*. *Current Microbiology*, 44:148–152.

Aimi, T., Yotsutani, Y. et Morinaga, T. (2002b). Vegetative incompatibility in the ascomycete *Rosellinia necatrix* studied by fluorescence microscopy. *Journal of Basic Microbiology*, 42:147–155.

Ainsworth, A. M. et Rayner, A. D. M. (1986). Responses of living hyphae associated with self and non-self fusions in the basidiomycete *Phanerochaete velutina*. *Journal of General Microbiology*, 132:191–201.

Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N. et Baalen, M. V. (2008). Virulence evolution and the trade-off hypothesis : history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology*, 22:245 – 259.

Alizon, S. et van Baalen, M. (2008). Multiple infections, immune dynamics, and the evolution of virulence. *The American Naturalist*, 172(4):E150–168.

Allemann, C., Hoegger, P., Heiniger, U. et Rigling, D. (1999). Genetic variation of cryphonectria hypoviruses (CHV1) in europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology*, 8(5):843–854.

Allen, T. D. et Nuss, D. L. (2004). Linkage between mitochondrial hypovirulence and viral hypovirulence in the chestnut blight fungus revealed by cDNA microarray analysis. *Eukaryotic Cell*, 3(5):1227–1232.

Anagnostakis, S. L. (1987). Chestnut blight : the classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia*, 79:23–37.

Anderson, R. M. et May, R. M. (1982). Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology*, 85:411–426.

Baidyaroy, D., Glynn, J. M. et Bertrand, H. (2000a). Dynamics of asexual transmission of a mitochondrial plasmid in *Cryphonectria parasitica*. *Current Genetics*, 37(4):257–267.

Begueret, J., Turcq, B. et Corinne Clavé (1994). Vegetative incompatibility in filamentous fungi : *het* genes begin to talk. *Trends in Genetics*, 10:441–446.

Beisson-Schecroun, J. (1962b). Incompatibilite cellulaire et interactions nucléo-cytoplasmiques dans les phenomènes de barrage chez *Podospora anserina*. *Annales de génétique*, 4:1–50.

Bernet, J. . (1965). Mode d'action des genes de barrage et relation entre l'incompatibilite cellulaire et l'incompatibilite sexuelle chez le *Podospora anserina*. *Annales des Sciences Naturelles ; Botanique*, 6:611–768.

Bertrand, H. (2000). Role of mitochondrial DNA in the senescence and hypovirulence of fungi and potential for plant disease control. *Annual Review of Phytopathology*, 38:397–422.

Biella, S., Smith, M. L., Aist, J. R., Cortesi, P. et Milgroom, M. G. (2002). Programmed cell death correlates with virus transmission in a filamentous fungus. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 269(1506):2269–2276.

Blanchet, S., Rey, O., Berthier, P., Lek, S. et Loot, G. (2009). Evidence of parasite-mediated disruptive selection on genetic diversity in a wild fish population. *Molecular Ecology*, 18:1112–1123.

Bodmer, W. F. (1972). The evolutionary significance of the HLA system. *Nature*, 237(139-145).

Brasier, C. M. (1984). Inter-mycelial recognition systems in *Ceratocystis ulmi* : their physiological properties and ecological importance. *Dans* The ecology and physiology of the fungal mycelium, pages p. 451–497. Cambridge University Press, Cambridge.

Brasier, C. M. (1988). Rapid changes in genetic structure of epidemic populations of *Ophiostoma ulmi*. *Nature*, 332(6164):538–541.

Breuillin, F., Dutech, C. et Robin, C. (2006). Genetic diversity of the Chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* in four French populations assessed by microsatellite markers. *Mycological Research*, 110:288–296.

Bull, J. J., Molineux, I. J. et R., R. W. (1991). Selection of benevolence in a host-parasite system. *Evolution*, 45:875–882.

Buss, L. W. (1982). Somatic cell parasitism and the evolution of somatic tissue compatibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79:5537–5541.

Buss, L. W. (1987). *The evolution of individuality*. Princeton University, Princeton.

Carbone, I., Liu, Y. C., Hillman, B. I. et Milgroom, M. G. (2004). Recombination and migration of *Cryphonectria hypovirus* 1 as inferred from gene genealogies and the coalescent. *Genetics*, 166(4):1611–1629.

Carroll, S. B. (2001). Chance and necessity : the evolution of morphological complexity and diversity. *Nature*, 409(6823):1102–1109.

Caten, C. E. (1972). Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. *Journal Of General Microbiology*, 72(2):221–229.

Chen, B., Geletka, L. M. et Nuss, D. L. (2000). Using chimeric hypoviruses to fine-tune the interaction between a pathogenic fungus and its plant host. *Journal of Virology*, 74(16):7562–7567.

Chen, B. et Nuss, D. L. (1999). Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1-Euro7 : a comparative virology approach to investigate virus-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Journal of Virology*, 73:985–992.

Chevanne, D., Bastiaans, E., Debets, A., Saupe, S. J., Clave, C. et Paoletti, M. (2009). Identification of the *het-r* vegetative incompatibility gene of *Podospora anserina* as a member of the fast evolving HNWD gene family. *Current Genetics*, 55(1):93–102.

Choi, G. H. et Nuss, D. L. (1992). A viral gene confers hypovirulence-associated traits to the chestnut blight fungus. *The EMBO Journal*, 11:473–77.

Cortesi, P., McCulloch, C. E., Song, H. Y., Lin, H. Q. et Milgroom, M. G. (2001). Genetic control of horizontal virus transmission in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Genetics*, 159(1):107–118.

Cortesi, P. et Milgroom, M. G. (1998). Genetics of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8):2988–2994.

Dawe, A. L. et Nuss, D. L. (2003). Hypoviruses and chestnut blight : exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis.

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. et Read, A. F. (2005). Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21):7624–7628.

Debets, F., Yang, X. et Griffiths, A. J. F. (1994). Vegetative Incompatibility in *Neurospora* - Its Effect on Horizontal Transfer of Mitochondrial Plasmids and Senescence in Natural-Populations. *Current Genetics*, 26(2):113–119.

DEBOER, R. J. (1995). The Evolution of Polymorphic Compatibility Molecules. *Molecular Biology and Evolution*, 12(3):494–502.

DUTECH, C., J.-P., R., FABREGUETTES, O. et ROBIN, C. (2008). Geostatistical genetic analysis for inferring the dispersal pattern of a partially clonal species : example of the chestnut blight fungus. *Molecular Ecology*, 17:4597–4607.

EBERT, D. (1994). Virulence and local adaptation of a horizontally transmitted parasite. *Science*, 265(5175):1084–1086.

EBERT, D. et BULL, J. J. (2003). Challenging the trade-off model for the evolution of virulence : is virulence management feasible ? *Trends in Microbiology*, 11(1):15–20.

ESSER, K. et BLAICH, R. (1994). Heterogenic incompatibility in fungi. *Dans* The Mycota I : Growth, Differentiation and Sexuality. Springer-Verlag, Berlin.

EWALD, P. W. (1983). Host-parasite relations, vectors, and the evolution of disease severity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 14:465–485.

EWALD, P. W. (1987). Transmission modes and the evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 503:295–306.

FRANK, S. A. (1992). Models of plant pathogen coevolution. *Trends in Genetics*, 8(6):213–219.

FRANK, S. A. (1996a). Models of parasite virulence. *Quarterly Review of Biology*, 71(1): 37–78.

FRASER, C., HOLLINGSWORTH, T. D., CHAPMAN, R., de WOLF, F. et HANAGE, W. P. (2007). Variation in HIV-1 set-point viral load : epidemiological analysis and an evolutionary hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104:17441–17446.

GAAG, M. v. d., DEBETS, A. J. M., OSIEWACZ, H. D. et HOEKSTRA, R. F. (1998). The dynamics of pAL2-1 homologous linear plasmids in *Podospora anserina*. *Molecular and General Genetics*, 258(5):521–529.

GANDON, S. (2004). Evolution of multihost parasites. *Evolution*, 58:455–469.

GHABRIAL, S. A. (1998). Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*, 16(1):119–131.

GLASS, N. L. et KANEKO, I. (2003). Fatal attraction : Nonself recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell*, 2(1):1–8.

GOBBI, E., FIRRAO, G., CARPANELLI, A., LOCCI, R. et VAN ALFEN, N. K. (2003). Mapping and characterization of polymorphism in mtDNA of *Cryphonectria parasitica* : evidence of the presence of an optional intron. *Fungal Genetics and Biology*, 40(3):215–224.

GOBBIN, D., HOEGGER, P. J., HEINIGER, U. et RIGLING, D. (2003). Sequence variation and evolution of *Cryphonectria hypovirus* 1 (CHV-1) in Europe. *Virus Research*, 97(1): 39–46.

GRECH, K. Watt, K. R. A. F. (2006). Host-parasite interactions for virulence and resistance in a malaria model system. *Journal of Evolutionary Biology*, 19:1620–1630.

GRIFFITHS, A. J. F. (1995). Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiological Reviews*, 59(4):673–685.

GROSBERG, R. K. (1988). The evolution of allorecognition specificity in clonal invertebrates. *Quarterly Review of Biology*, 63(4):377–412.

HAMILTON, W. D. (1982). Pathogens as causes of genetic diversity in their host populations. *Dans* Population biology of infectious diseases, pages 269–296. Springer.

HARTL, D. L., DEMPSTER, E. R. et BROWN, S. W. (1975). Adaptive significance of vegetative incompatibility in *Neurospora crassa*. *Genetics*, (Nov):553–569.

HATCHER, M. J., DICK, J. T. et DUNN, A. M. (2006). How parasites affect interactions between competitors and predators. *Ecology Letters*, 9:1253–1271.

HEDRICK, P. W. (1972). Maintenance of genetic variation with a frequency-dependent selection model as compared to the overdominant model. *Genetics*, 72(4):771–775.

HEINIGER, U. (1997). Le chancre de l'écorce du châtaignier (*Cryphonectria parasitia*). Rapport technique, Eidgenössische Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft.

HERRE, E. A. (1993). Population structure and the evolution of virulence in nematode parasites of fig wasps. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5100):1442–1445.

HOEGGER, P. J., HEINIGER, U., HOLDENRIEDER, O. et RIGLING, D. (2003). Differential transfer and dissemination of hypovirus and nuclear and mitochondrial genomes of a hypovirus-infected *Cryphonectria parasitica* strain after introduction into a natural population. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7):3767–3771.

HOGAN, E. P. et GRIFFIN, G. J. (2002). Spread of Cryphonectria hypovirus1 into 45 vegetative compatibility types of *Cryphonectria parasitica* on grafted American chestnut trees. *Forest Pathology*, 32(2):73–85.

HOLT, R. et PICKERING, J. (1985). Infectious disease and species coexistence : a model of Lodka-Volterra form. *American Naturalist*, 126(2):196–211.

HOLT, R. D. et DOBSON, A. P. (2006). Extending the principles of community ecology to address the epidemiology of host-pathogen communities. *Dans* Disease ecology : community structure and pathogen dynamics, pages 6–27. Oxford University Press.

KRONSTAD, J. W. et STABEN, C. (1997). Mating type in filamentous fungi. *Annual Review of Genetics*, 31:245–276.

KUO, C., CORBY-HARRIS, V. et PROMISLOW, D. E. (2008). The unavoidable costs and unexpected benefits of parasitism : Population and metapopulation models of parasite-mediated competition. *Journal of Theoretical Biology*, 250(2):244–256.

LAMBRECHTS, L., HALBERT, J., DURAND, P., GOUAGNA, L. C. et KOELLA, J. C. (2005). Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 4:3.

LAMBRECHTS, L. et SCOTT, T. W. (2009). Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 276(1660):1369–1378.

LESLIE, J. F. (1993). Fungal vegetative compatibility. *Annu Rev Phytopathol*, 31:127–50.

LEVIN, B. (1996). The evolution and maintenance of virulence in microparasites. *Emerging Infectious Diseases*, 2:93–102.

LEVIN, B. et BULL, J. (1994). Short-sighted evolution and the virulence of pathogenic microorganisms. *Trends in Microbiology*, 2:76–81.

LEVIN, S. A. et PIMENTAL, D. (1981). Selection of intermediate rates of increase in parasite-host systems. *The American Naturalist*, 117:308–315.

LIPSITCH, M., NOWAK, M. A., EBERT, D. et MAY, R. M. (1995). The population-dynamics of vertically and horizontally transmitted parasites. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 260(1359):321–327.

LIPSITCH, M., SILLER, S. et NOWAK, M. A. (1996). The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission. *Evolution*, 50(5):1729–1741.

LIU, Y. et MILGROOM, M. G. (1996). Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (*vic*) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology*, 86(1):79–86.

LIU, Y.-C., DYNEK, J. N., HILLMAN, B. I. et MILGROOM, M. G. (2007). Diversity of viruses in *Cryphonectria parasitica* and *C. nitschkei* in Japan and China, and partial characterization of a new chrysovirus species. *Mycological Research*, 111:433–442.

LUSHAI, G., LOXDALE, H. D. et ALLEN, J. A. (2003). The dynamic clonal genome and its adaptative potential. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79:193–208.

MAIZELS, N. (2005). Immunoglobulin gene diversification. *Annual Review of Genetics*, 39:23–46.

Malik, M. et Vilgalys, R. (1999). Somatic Incompatibility in Fungi. *Dans* Structure and Dynamics of Fungal Populations, pages 123–138. Chapman and Hall, London.

McGuire, I. C., Davis, J. E., Double, M. L., MacDonald, W. L., Rauscher, J. T., McCawley, S. et Milgroom, M. G. (2005). Heterokaryon formation and parasexual recombination between vegetatively incompatible lineages in a population of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Mol Ecol*, 14(12):3657–69.

Messenger, S. L., Molineux, I. J. et Bull, J. J. (1999). Virulence evolution in a virus obeys a trade-off. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 266(1417):397–404.

Michalakis, Y., Olivieri, I., Renaud, F. et Raymond, M. (1992). Pleiotropic action of parasites - how to be good for the host. *Trends in Ecology and Evolution*, 7:59–62.

Milgroom, M. G. (1999). Viruses in fungal populations. *Dans* Structure and Dynamics of Fungal Population, pages 283–305. Dordrecht, The Netherlands : Kluwer.

Milgroom, M. G. et Cortesi, P. (1999). Analysis of population structure of the chestnut blight fungus based on vegetative incompatibility genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18):10518–10523.

Milgroom, M. G. et Cortesi, P. (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence : a critical analysis. *Annu Rev Phytopathol*, 42:311–38.

Milgroom, M. G., Sotirovski, K., Spica, D., Davis, J. E., Brewer, M. T., Milev, M. et Cortesi, P. (2008). Clonal population structure of the chestnut blight fungus in expanding ranges in southeastern europe. *Molecular Ecology*, 17(20):4446–4458.

Mitchell, S., Rogers, E. S., Little, T. J. et Read, A. F. (2005). Host-parasite and genotype-by-environment interactions : temperature modifies potential for selection by a sterilizing pathogen. *Evolution*, 59:70–80.

Montenegro, D., Aguin, O., Sainz, M., Hermida, M. et Mansilla, J. (2008). Diversity of vegetative compatibility types, distribution of mating types and occurrence

of hypovirulence of *Cryphonectria parasitica* in chestnut stands in NW spain. *Forest Ecology and Management*, 256(5):973–980.

Nasrallah, J. B. (2005). Recognition and rejection of self in plant self-incompatibility : comparisons to animal histocompatibility. *Trends in Immunology*, 26(8):412–418.

Nauta, M. J. et Hoekstra, R. F. (1994). Evolution of vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes .1. Deterministic models. *Evolution*, 48(4):979–995.

Nauta, M. J. et Hoekstra, R. F. (1996). Vegetative incompatibility in ascomycetes : Highly polymorphic but selectively neutral ? *Journal of Theoretical Biology*, 183(1):67–76.

Nelson, M. A. (1996). Mating systems in ascomycetes : a romp in the sac. *Trends in Genetics*, 12:69–74.

Nuss, D. L. (1992). Biological control of chestnut blight : an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiol Rev*, 56(4):561–76.

Paoletti, M., Buck, K. W. et Brasier, C. M. (2006). Selective acquisition of novel mating type and vegetative incompatibility genes via interspecies gene transfer in the globally invading eukaryote *Ophiostoma novo-ulmi*. *Molecular Ecology*, 15(1):249–262.

Paoletti, M., Saupe, S. J. et Corinne Clavé (2007). Genesis of a fungal Non-Self recognition repertoire. *PLoS ONE*, 2(3):e283.

Peever, T. L., Liu, Y. C., Cortesi, P. et Milgroom, M. G. (2000). Variation in tolerance and virulence in the chestnut blight fungus-hypovirus interaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11):4863–4869.

Peever, T. L., Liu, Y. C. et Milgroom, M. G. (1997). Diversity of hypoviruses and other Double-Stranded RNAs in *Cryphonectria parasitica* in north america. *Phytopathology*, 87(10):1026–1033.

Pinan-Lucarré, B., Paoletti, M. et Corinne Clavé (2007). Cell death by incompatibility in the fungus podospora. *Seminars in Cancer Biology*, 17(2):101–111.

Poulin, R., Marshall, L. J. et Spencer, H. G. (2000). Metazoan parasite species richness and genetic variation among freshwater fish species : cause or consequence ? *International Journal for Parasitology*, 30:697–703.

Read, A. F. (1994). The evolution of virulence. *Trends in Microbiology*, 2(3):73–76.

Richman, A. (2000). Evolution of balanced genetic polymorphism. *Molecular Ecology*, 9(12):1953–1963.

Robin, C., Anziani, C. et Cortesi, P. (2000). Relationship Between Biological Control, Incidence of Hypovirulence, and Diversity of Vegetative Compatibility Types of *Cryphonectria parasitica* in France. *Phytopathologie*, 90(7):730–737.

Robin, C. et Heiniger, U. (2001). Chestnut blight in Europe : diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest Snow and Landscape Research*, 76(3): 361–367.

Sakamoto, M., Chang, K. H. et Hanazato, T. (2007). Plastic phenotypes of antennule shape in *Bosmina longirostris* controlled by physical stimuli from predators. *Limnology and Oceanography*, 52(5):2072–2078.

Saupe, S. J., Clavé, C., Sabourin, M. et Béguéret, J. (2000). Characterization of *hch*, the *Podospora anserina* homolog of the *het-c* heterokaryon incompatibility gene of *Neurospora crassa*. *Current Genetics*, 38:39–47.

Schafleitner, R., Robin, C., Capdevielle, X., Schafleitner, S., Colinas, C. et Gomez, M. (October 2004a). New vc types of *Cryphonectria parasitica* and subtypes of CHV1 in south-Western France and Northern Spain. *Dans* III International Chestnut Congress, Chaves, Portugal.

Schwessinger, B. et Zipfe, C. (2008). News from the frontline : recent insights into pamp-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 11:389–395.

Shapira, R., Choi, G. H. et Nuss, D. L. (1991). Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. *The EMBO Journal*, 10(4):731–739.

Smith, M. L., Gibbs, C. C. et Milgroom, M. G. (2006). Heterokaryon incompatibility function of barrage-associated vegetative incompatibility genes (*vic*) in *Cryphonechia parasitica*. *Mycologia*, 98(1):43–50.

Smith, M. L., Micali, O. C., Hubbard, S. P., Mir-Rashed, N., Jacobson, D. J. et Glass, N. L. (2000). Vegetative incompatibility in the het-6 region of neurospora crassa is mediated by two linked genes. *Genetics*, 155(3):1095–1104.

Stewart, A. D., Logsdon, J. M. et Kelley, S. E. (2005). An empirical study of the evolution of virulence under both horizontal and vertical transmission. *Evolution*, 59(4):730–739.

Taylor, D. R., Jarosz, A. M., Lenski, R. E. et Fulbright, D. W. (1998). The acquisition of hypovirulence in host-pathogen systems with three trophic levels. *The American Naturalist*, 151(4):343–355.

Taylor, J. W., Jacobson, D. J. et Fisher, M. C. (1999). The evolution of asexual fungi : Reproduction, speciation and classification. *Annual Review of Phytopathology*, 37:197–246.

Thompson, J. N. et Burdon, J. J. (1992). Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature*, 360:121–125.

Tock, M. R. et Dryden, D. T. (2005). The biology of restriction and antirestriction. *Current Opinion in Microbiology*, 8:466–472.

Todd, N. K. et Rayner, A. D. M. (1980). Fungal individualism. *Science Progress*, 66:331–354.

Tompkins, D., Greenman, J., Robertson, P. et Hudson, P. (2000). The role of

shared parasites in the exclusion of wildlife hosts : *Heterakis gallinarum* in the ring-necked pheasant and the grey partridge. *Journal of Animal Ecology*, 69:829–841.

van Baalen, M. et Sabelis, M. W. (1995). The dynamics of multiple infection and the evolution of virulence. *The American Naturalist*, 146(6):881.

Wright, S. (1939). The distribution of self-sterility alleles in populations. *Genetics*, 24:538–552.

Wu, J., Saupe, S. J. et Glass, N. L. (1998). Evidence for balancing selection operating at the *het-c* heterokaryon incompatibility locus in a group of filamentous fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21):12398–12403.

Yamamura, N. (1996). Evolution of mutualistic symbiosis : A differential equation model. *Population Ecology*, 38(2):211–218.

Zhang, L., Baasiri, R. A. et Van Alfen, N. K. (1998). Viral repression of fungal pheromone precursor gene expression. *Molecular and cellular biology*, 18:953–959.

Résumé : Le système d'incompatibilité végétative a été décrit chez tous des champignons (Eumycètes) comme intervenant dans la limitation des fusions somatiques entre conspécifiques. Chez les champignons la fusion somatique est uniquement possible entre individus de même GCV (Groupe de Compatibilité Végétative). Comme tous les systèmes de reconnaissance du soi, le fonctionnement du système d'incompatibilité végétative des champignons est basé sur une grande diversité allélique. Cette thèse propose d'étudier la relation qui semble exister entre cette diversité des gènes impliqués dans l'incompatibilité végétative des champignons et la pression parasitaire exercée par des éléments cytoplasmiques délétères (ou DCE) transmis lors des fusions somatiques. Trois problématiques ont été abordées, avec trois approches différentes : (1) une approche conceptuelle générale portant sur l'évolution des systèmes de reconnaissance du soi, (2) une approche de modélisation sur le maintien de la diversité en GCV de la population de champignon par un DCE et (3) une approche expérimentale, pour étudier d'une part la perméabilité de la barrière d'incompatibilité végétative et d'autre part l'interaction *C. parasitica*/CHV et les liens existant entre transmission et virulence du CHV. Ces études ont permis de montrer l'importance de la perméabilité de la barrière d'incompatibilité végétative à la fois au niveau du maintien de la diversité génétique de la population d'hôte et au niveau de la prévalence des DCE. Il semblerait donc que les DCE évoluent vers des niveaux de virulence faible du fait de la limitation de leur transmission par le système d'incompatibilité végétative de leur hôte. Nos résultats expérimentaux suggèrent que lorsque la diversité en GCV de la population d'hôte est faible, la virulence des DCE pourrait évoluer suivant le modèle du trade-off impliquant une évolution vers un niveau de virulence intermédiaire optimal. Ces travaux permettent donc de mieux comprendre les mécanismes agissant sur l'écologie et l'évolution des interactions champignon/DCE qui, au vu de cette étude, apparaissent comme de bon modèles pour l'étude des systèmes hôtes/parasites.

Mots-clés : champignons, Cryphonectria hypovirus, *Cryphonectria parasitica*, évolution de la virulence, modèle du trade-off, système d'incompatibilité végétative, transmission horizontale, virus.

Abstract: Vegetative incompatibility systems have been described in Fungi as controlling somatic fusion between conspecifics. For fungi, only fungi of the same vc type can fuse together. As other self recognition systems, this system involved high allelic diversity at specific genes. The issue of this work is to study the cause and effect relationship between the evolution of vegetative incompatibility systems and the selective pressure drove by cytoplasmic deleterious elements, transmitted during somatic fusion. Three problematics with three different approach were done : (1) a conceptual general framework on the evolution of self recognition systems (2) a theoretical work on the maintenance of vc type diversity by DCE and (3) an experimental work on the study of relationship between transmission and virulence in the *C. parasitica*/CHV host-parasite system. Ours results showed the key role of the permeability of the vegetative incompatibility barrier both for vc type diversity maintenance and on DCE prevalence. DCE would evolve toward avirulence in response to the transmission limitation by host incompatibility systems. Experimental work suggested a positive link between virulence and transmission in some population of CHV when host present a low vc type diversity, which could allow the evolution of the DCE toward an intermediate optimal virulence. This study would shed some light on mechanisms acting on the ecology and the evolution of fungi/DCE interaction which, according to our results, would be good study models for works on host-parasite systems.

Keyword: Cryphonectria hypovirus, *Cryphonectria parasitica*, fungi, trade-off hypothesis, vegetative incompatibility systems, horizontal transmission, virulence evolution, virus