HAL
open science

Rôles adaptatifs et contraintes de la sporulation chez les microorganismes associés aux plantes : cas de la sporulation in planta dans la symbiose actinorhizienne Frankia (Frankiaceae)–Alnus (Betulaceae)

Adrien C. Pozzi

To cite this version:

Adrien C. Pozzi. Rôles adaptatifs et contraintes de la sporulation chez les microorganismes associés aux plantes : cas de la sporulation in planta dans la symbiose actinorhizienne Frankia (Frankiaceae)–Alnus (Betulaceae). Evolution [q-bio.PE]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10359 . tel-01343317

HAL Id: tel-01343317

https://theses.hal.science/tel-01343317

Submitted on 12 Jul 2016

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

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

N° d'ordre : 359 – 2014

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
présentée devant
L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON 1

École Doctorale ED 341 – E2M2
(Évolution, Écosystèmes, Microbiologie et Modélisation)

Pour l'obtention du diplôme de doctorat
Spécialité : Ecologie évolutive microbienne
Discipline : Biologie

Soutenue publiquement le 18 décembre 2014, par :
M. ADRIEN C. POZZI

RÔLES ADAPTATIFS ET CONTRAINTES DE LA SPORULATION CHEZ LES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX PLANTES :

CAS DE LA SPORULATION *IN PLANTA* DANS LA SYMBIOSE ACTINORHIZIENNE *FRANKIA* (*FRANKIA*CEAE)–*ALNUS* (BETULACEAE).

Sous la co-direction des
Professeurs Mme MARIA P. FERNANDEZ et M. FRÉDÉRIC MENU

Devant le Jury composé de

Mme CÉLINE BROCHIER-ARMANET	Professeure des Universités, UCBL, Lyon	*Présidente*
M. PHILIPPE DE LAJUDIE	Directeur de Recherches, IRD, Montpellier	*Rapporteur*
M. CHRISTIAN STEINBERG	Directeur de Recherches, INRA, Dijon	*Rapporteur*
M. SÉBASTIEN GOURBIÈRE	Maître de Conférences, UPVD, Perpignan	*Examinateur*
M. FABIEN HALKETT	Chargé de Recherches, INRA, Nancy	*Examinateur*
Mme MARIA P. FERNANDEZ	Professeure des Universités, UCBL, Lyon	*Co-directrice*
M. FRÉDÉRIC MENU	Professeur des Universités, UCBL, Lyon	*Co-directeur*

One theory to rule them all,
One theory to find them,
One theory to bring them all,
And in the light of evolution bind them.

Une théorie pour les gouverner tous-tes,
Une théorie pour les trouver,
Une théorie pour les réunir tous-tes,
Et dans la lumière de l'évolution les lier.[1]

---

[1] Un divertissement du titre de l'essai *Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution* de Theodosius Dobzhansky (1973) et de la formule gravée dans l'Anneau Unique du roman *The Lord of the Rings* de J. R. R. Tolkien (1954), dans l'intention de rendre hommage à tous-tes les chercheurs-euses de vérité. – A. C. Pozzi.

CITATION DES TRAVAUX, CONTACT ET IDENTIFICATION DE L'AUTEUR

RÔLES ADAPTATIFS ET CONTRAINTES DE LA SPORULATION CHEZ LES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX PLANTES :

CAS DE LA SPORULATION *IN PLANTA*
DANS LA SYMBIOSE ACTINORHIZIENNE
FRANKIA (*FRANKIA*CEAE)-*ALNUS* (BETULACEAE).

M. ADRIEN C. POZZI

Pour citer ce document dans sa totalité :

Pozzi, A.C., Rôles adaptatifs et contraintes de la sporulation chez les microorganismes associés aux plantes : cas de la sporulation *in planta* dans la symbiose actinorhizienne *Frankia* (*Frankia*ceae)–*Alnus* (Betulaceae). 2014, Université Claude Bernard Lyon 1 : Lyon, France. p. 198.

Pour citer spécifiquement le CHAPITRE 4 et l'ANNEXE A (qui ont fait l'objet de publications dans des journaux à comité de lecture) :

- **CHAPITRE 4 :** Pozzi, A. C., H. H. Bautista-Guerrero, I. Nouioui, L. Cotin-Galvan, R. Pépin, P. Fournier, F. Menu, M. P. Fernandez and A. Herrera-Belaroussi (2015). *In-planta* sporulation phenotype: a major life history trait to understand the evolution of *Alnus*-infective *Frankia* strains. *Environmental Microbiology* **17**(9): 3125-3138. Doi: 10.1111/1462-2920.12644.

- **ANNEXE A :** Cotin-Galvan, L., A. C. Pozzi, G. Schwob, P. Fournier, F. M.P. and A. Herrera-Belaroussi (2016). *In-planta* sporulation capacity enhances infectivity and rhizospheric competitiveness of *Frankia* strains. *Microbes and Environments*. **31**(1): 11-18. Doi: 10.1264/jsme2.ME15090.

Contact et identification de l'auteur :

- **Courriel :** adrien.pozzi@univ-lyon1.fr ou adrien.c.pozzi@gmail.com.

- **Internet :** https://www.researchgate.net/profile/Adrien_Pozzi

- **ORCID :** orcid.org/0000-0001-6765-4293. **ResearcherID :** G-3078-2011.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en tout premier lieu mes co-directeurs de thèse Maria Fernandez et Frédéric Menu, qui m'ont témoigné leur confiance et leur bienveillance en tous instants et qui ont fait de mon expérience de la thèse une aventure scientifique passionnante et surtout une expérience humaine extrêmement enrichissante.

Je voudrais également particulièrement remercier MM. de Lajudie et Steinberg, rapporteurs du manuscrit de thèse et l'ensemble de membre du jury qui ont accepté d'évaluer mes travaux : Mme Brochier-Armanet, MM. S. Gourbière et F. Halkett.

De nombreuses personnes ont contribué à la réalisation de ces travaux, que cela soit en participant directement aux (intenses !) campagnes d'échantillonnage et aux (longues !) déterminations phénotypiques, ou bien indirectement en créant un environnement accueillant par des discussions (pas toujours !) scientifiques. Il serait trop long d'évoquer ici tous ces moments qui font pourtant aussi partie de la recherche. Que chacun se sente profondément remercié.

Enfin, je voudrais remercier mes parents, mon frère, ma compagne et mes amis, pour l'immense soutien que j'ai reçu de leur part sans discontinuer et le peu de rigueur qu'ils ont tenu de mon absence ou de mon éloignement.

TITRE, RESUME ET MOTS-CLES (FR)

Titre (FR)

Rôles adaptatifs et contraintes de la sporulation chez les microorganismes associés aux plantes : cas de la sporulation *in planta* dans la symbiose actinorhizienne *Frankia* (Frankiaceae)–*Alnus* (Betulaceae).

Résumé (FR)

Il a été montré que les variations environnementales ayant une influence sur le succès reproducteur des organismes exercent des pressions de sélection qui favorisent l'émergence et le maintien de stratégies de délais de développement. Ces stratégies comme la dormance, bien décrits chez les plantes et les insectes n'ont pas encore été étudiés dans une perspective évolutionniste chez les microorganismes. Nous avons donc proposé de comprendre à la lumière de l'évolution la variabilité intra- et inter-populationnelle d'une forme particulière de dormance : la sporulation asexuée des microorganismes. Nous avons choisi comme modèle biologique l'actinobactérie *Frankia* sp.– une bactérie gram-positive à haut-GC, fixatrice d'azote et capable de sporuler. Les nombreuses spores produites par ce microorganisme tellurique peuvent être assimilées à la production de descendants génétiquement identiques, dormants et de taille réduite, et permettraient respectivement l'accroissement du génotype parental, une meilleure survie aux conditions défavorables et une meilleure dispersion spatiale, comparé aux autres formes cellulaires de *Frankia*.

Frankia sp. est une actinobactérie tellurique capable d'établir une symbiose racinaire (nodosité) avec les plantes actinorhiziennes dont celles du genre *Alnus* sp. (aulnes). Cette symbiose est habituellement décrite comme facultative (les partenaires peuvent vivre séparément) et mutualiste (échanges trophiques bénéfiques et réciproques). La morphologie et le développement de *Frankia* sp. sont complexes : (i) croissance hyphale de cellules filamenteuses actives, (ii) fixation de l'azote atmosphérique (N_2) dans des cellules spécialisées (diazovésicules) et (iii) formation de sporanges multiloculaires contenant de très nombreux descendants dormants (spores). Seulement certaines souches de *Frankia* sont capables de sporuler *in planta*, ce qui est illustré par la présence (Sp+) ou l'absence (Sp–) de sporanges dans les cellules végétales de la nodosité. C'est à notre connaissance un cas unique de sporulation endophyte. Cependant la description de ce trait d'histoire de vie original était incomplète et l'interprétation écologique peu abordée, d'où la nécessité d'étudier ce trait à la lumière de l'évolution.

L'objectif général de cette thèse est donc d'initier une démarche pionnière à l'interface entre l'écologie microbienne et l'écologie évolutive. Guidés par le cadre théorique de l'évolution des traits d'histoire de vie en environnement variable, nous traitons généralement des délais de développement et de la dispersion spatiale des microorganismes, et en particulier des différentes formes de sporulation asexuée. Notre contribution à l'étude de la sporulation *in planta* (endophyte) des *Frankia* infectives de l'aulne intègre des approches théorique, descriptive et expérimentale, pour préciser (i) l'influence relative de la souche bactérienne, de l'espèce de la plante-hôte et des conditions pédoclimatiques sur le phénotype de sporulation *in planta* (Sp+ *versus* Sp–), (ii) le rôle de la variabilité environnementale sur la distribution, la diversité et la sélection des souches Sp+ et Sp–, ainsi que (iii) les coûts et bénéfices associés à la sporulation *in planta*, pour les deux partenaires de la symbiose.

Nous avons démontré pour la première fois, à partir d'un très large échantillonnage que le phénotype Sp+ est un trait d'histoire de vie (i) spécifique de certaines lignées de *Frankia*, (ii) majeur pour comprendre l'histoire évolutive des souches de *Frankia* et (iii) et que ce trait est significativement corrélé à des caractéristiques génétiques des souches. Nous avons également confirmé que l'occurrence du trait Sp+ varie selon l'environnement (espèce de la plante-hôte, climat). Nous avons enfin établi, sur la base d'un raisonnement discursif, un modèle de l'évolution du trait Sp+ abordant sa valeur adaptative (*fitness*). L'ensemble des réflexions menées et des résultats obtenus nous permet de discuter des traits Sp+ et Sp– dans le cadre d'un *continuum* de stratégies symbiotiques de *Frankia* (*continuum* définit par un gradient de coopération et un gradient de dépendance), et plus généralement de discuter de l'écologie évolutive des symbioses entre microorganismes et plantes.

Mots-clés (FR)

Frankia (*Frankia*ceae) ; Actinobacteria ; Actinomycètes ; Endophyte, Non-cultivé ; *Alnus* (Betulaceae) ; Aulne ; Symbiose, Actinorhizienne ; Mutualisme ; Coopération ; Dépendance ; Nodulation racinaire ; Nodules racinaires de plante ; Fixation d'azote, symbiotique ; Sporulation, *In planta* ; Trait d'Histoire de Vie ; Bactérie à Gram positif formant des spores ; Spores ; Sporanges ; Dormance ; Dissémination ; Réduction des risques, évitement et dispersion ; *Bet-hedging* ; Environnement, variations et stochasticité ; Phylogénie, Analyse de Séquences de Locus Multiples ; Génétique, diversité et spéciation ; Interactions microbiennes ; Spécificité d'hôte ; Biologie, adaptation et évolution ; Ecologie ; Microbiologie.

TITLE, ABSTRACT AND KEYWORDS (EN)

Title (EN)

Adaptive roles and constraints of the sporulation in plant-associated microorganisms: case of the *in-planta* sporulation in the actinorhizal symbiosis *Frankia* (Frankiaceae)–*Alnus* (Betulaceae).

Abstract (EN)

Environmental variations having an impact on an organism's reproductive outcome were shown to create selection pressures that favor the emergence and maintenance of developmental delay strategies. Such strategies like dormancy are well described in plants and insects but are not yet studied within an evolutionary framework in microbes. We propose to understand under the light of evolution the intra-populational and inter-populational variations of a specific kind of dormancy: the asexual sporulation of microorganisms. We choose the actinobacteria *Frankia* sp.– a high-CG gram-positive nitrogen-fixing and spore-forming bacteria– as a biological model. The numerous spores produced by this bacterium could be considered as a clonal progeny in a dormant state and of small size. Thus, spores would enable the increase of the parental genotype as well as a better survival to harsh conditions and a better spatial dissemination compared to the other *Frankia* cells.

Frankia sp. is a telluric actinobacteria able to establish a root symbiosis (plant nodule) with actinorhizal plant such as *Alnus* sp. (alders). This symbiosis is usually described as facultative (both symbionts can live separately) and mutualistic (beneficial and reciprocal trophic trade). *Frankia*'s morphology and development are complex: (i) hyphal growth of filamentous active cells, (ii) atmospheric nitrogen (N_2) fixation in specialized cells called diazovesicles and (iii) formation of multilocus sporangia containing spores. Only some *Frankia* strains are able to sporulate *in-planta*, as spores can be present in (Sp+) or absent from (Sp–) the vegetal cells of the root nodule. It is to our knowledge a unique case of endophytic sporulation. However, the description of this original trait was incomplete and the ecological interpretation was scarce, hence the need to study this trait under the light of evolution.

The main objective of this work is to initiate a pioneer approach at the frontiers of microbial ecology and evolutionary ecology. Within the theoretical framework of the evolution of life-history traits in varying environments, we deal generally with developmental delays and spatial

dissemination of microbes and especially with the different forms of asexual sporulation. Our contribution to the study of the *in-planta* (endophytic) sporulation of *Alnus*-infective *Frankia* sp. combines theoretical, descriptive and experimental approaches to precise (i) the relative effect of the bacterial strain, the host-plant species and the pedoclimatic conditions on the *in-planta* sporulation phenotype (Sp+ *versus* Sp–), (ii) the effect of the of the environmental variability on the distribution, diversity and selection of Sp+ and Sp– *Frankia* strains, and (iii) the costs and benefits associated with *in-planta* sporulation for the two symbiotic partners.

We demonstrated for the first time and from an extensive sampling that the Sp+ phenotype is a life-history trait (i) specific to some *Frankia* lineages, (ii) major to understand the evolutionary history of *Frankia* strains and (iii) significantly correlated to particular genetic features. We also shown that the occurrence of the Sp+ trait varies according to the environment (host-plant species and climate). On the basis of a discursive reasoning, we also proposed a model of the evolution of the Sp+ trait taking its *fitness* into account. We bring all the previous considerations and results to discuss the Sp+ and Sp– traits within a *continuum*– made on a gradient of cooperation and on a gradient of dependency– of symbiotic strategies and more generally to discuss the evolutionary ecology of plant-microbe symbioses.

Keywords (EN)

Frankia (*Frankia*ceae); Actinobacteria; Actinomycetes; Endophyte, Not-cultivated; *Alnus* (Betulaceae); Alder; Symbiosis, Actinorhizal; Mutualism; Cooperation; Dependency; Root nodulation; Plant root nodules; Nitrogen fixation, symbiotic; Sporulation, *In-planta*; Life-history trait; Spores; Sporangia; Dormancy; Dissemination; Risk reduction, avoidance and dispersal; *Bet-hedging*; Environment, variations and stochasticity; Phylogeny, Multi Locus Sequence Analysis; Genetic diversity and speciation; Microbial interactions; Host specificity; Biological adaptation and evolution; Ecology; Microbiology.

INTITULES ET ADRESSES DES UNITES OU LA THESE A ETE PREPAREE

UNIVERSITE DE LYON

Université Claude Bernard Lyon 1

43 Boulevard du 11 Novembre 1918

69 622 VILLEURBANNE CEDEX, FRANCE

ED 341-E2M2

École Doctorale Évolution, Écosystèmes, Microbiologie et Modélisation

43 Boulevard du 11 Novembre 1918

69 622 VILLEURBANNE CEDEX, FRANCE

UMR 5557 CNRS-LYON 1

Laboratoire d'Écologie Microbienne

43 Boulevard du 11 Novembre 1918

69 622 VILLEURBANNE CEDEX, FRANCE

UMR 5558 CNRS-LYON 1

Lab. de Biométrie et de Biologie Évolutive

43 Boulevard du 11 Novembre 1918

69 622 VILLEURBANNE CEDEX, FRANCE

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD – LYON 1

Président de l'Université	M. François-Noël GILLY
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTÉ

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directrice : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DÉPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directrice : Mme Caroline FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. Georges TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y. VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

TABLE DES MATIERES

CITATION DES TRAVAUX, CONTACT ET IDENTIFICATION DE L'AUTEUR 5

REMERCIEMENTS 7

TITRE, RESUME ET MOTS-CLES (FR) 9

TITLE, ABSTRACT AND KEYWORDS (EN) 11

INTITULES ET ADRESSES DES UNITES OU LA THESE A ETE PREPAREE 13

TABLE DES MATIERES 15

TABLE DES ILLUSTRATIONS 19

INTRODUCTION GENERALE 25

***SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE* : REPONSES ADAPTATIVES A LA VARIABILITE ENVIRONNEMENTALE & MODELE BIOLOGIQUE D'ETUDE 33**

1. CADRE THEORIQUE 35

1.1. GENERALITES 35

1.1.1. Sélection naturelle 35

1.1.2. Trait d'Histoire de Vie (THV) 35

1.1.3. Mesure de la performance évolutive 38

1.2. STRATEGIES BIODEMOGRAPHIQUES 43

1.2.1. Stratégies adaptatives et dispersion des risques 43

1.2.2. Plasticité phénotypique (PP) prédictive 44

1.2.3. Plasticité Phénotypique (PP) « pile-ou-face » 44

1.3. VERS UN *CONTINUUM* DE STRATEGIES DE *BET-HEDGING* PERMETTANT LA DISPERSION SPATIALE ET TEMPORELLE DES RISQUES 46

1.3.1. Type de variation : une question de grain de l'environnement 47

1.3.2. Coexistence des dispersions spatiale et temporelle 50

1.3.3. Vers un *continuum* de stratégies de *Bet-hedging* 52

2. STRATEGIES DE DISPERSION CHEZ LES MICROORGANISMES 53

2.1. VARIABILITE DE L'INFECTIVITE : PLASTICITE PHENOTYPIQUE « PILE-OU-FACE » PERMETTANT DU *BET-HEDGING* DIVERSIFIANT 53

2.1.1. Virulence sous-maximale des macroparasites 53

2.1.2. Latence dans le cycle de l'infection virale 54

2.2. CELLULES BACTERIENNES PERSISTANTES : PLASTICITE PHENOTYPIQUE PREDICTIVE ET *BET-HEDGING* DIVERSIFIANT 56

2.3. LES SPORULATIONS : QUELLE(S) TYPE(S) DE PLASTICITE PHENOTYPIQUE ADAPTATIVE ? 58

2.3.1. Définition 58

2.3.2. Différents types de sporulation asexuée 61

2.3.3. Quelle(s) stratégie(s) de dispersion ? 64

3. DES CONCEPTS AU MODELE BIOLOGIQUE D'ETUDE **69**
3.1. LA SYMBIOSE ACTINORHIZIENNE 71
3.1.1. Définitions de la symbiose et des partenaires symbiotiques 71
3.1.2. Intérêts écologiques 75
3.1.3. Histoire évolutive de *Frankia* 76
3.1.4. Ecologie et cycle de vie de *Frankia* 78
3.1.5. *Alnus* sp., un hôte modèle pour l'étude de la symbiose actinorhizienne et de la sporulation *in planta* 81
3.1.6. Histoire évolutive d'*Alnus* sp. 82
3.1.7. Ecologie et cycle de vie d'*Alnus* sp. 83
3.2. LA SPORULATION *IN PLANTA* DE *FRANKIA* 86
3.2.1. Définition de la sporulation *in planta* 86
3.2.2. Déterminisme et variabilité de la sporulation *in planta* 90
3.2.3. Occurrence des nodosités Sp+ en fonction de la présence de l'hôte 92
3.3. HYPOTHESES LIEES A LA SPORULATION *IN PLANTA* 96
3.3.1. Pour *Frankia* 96
3.3.2. Pour la plante-hôte 99

***MISE A L'EPREUVE*: EXPERIMENTATION & MODELISATION** **105**

4. *IN-PLANTA* SPORULATION PHENOTYPE, A MAJOR LIFE-HISTORY TRAIT TO UNDERSTAND THE EVOLUTION OF *ALNUS*-INFECTIVE *FRANKIA* STRAINS **107**
4.1. SUMMARY 109
4.2. INTRODUCTION 110
4.3. RESULTS 112
4.3.1. Occurrence of Sp+ nodule phenotype on sites according to host-plant species. 112
4.3.2. Phylogenetic analysis of Sp+ and Sp– *Alnus*-infective *Frankia* strains. 112
4.3.3. Genetic diversity of Sp+ and Sp– *Frankia* strains at the alder stand scale. 118
4.4. DISCUSSION 121
4.4.1. Phylogeny and taxonomic status of Sp+ strains. 121
4.4.2. Effect of host-plant *vs.* abiotic environmental factors. 122
4.4.3. Genetic homogeneity of Sp+ *Frankia*. 124
4.4.4. Towards a hypothetical scenario of Sp+ *Frankia* strain ecology. 125
4.4.5. Conclusion and perspectives 126
4.5. EXPERIMENTAL PROCEDURES 127
4.5.1. Nodule sampling. 127
4.5.2. Sporulation phenotype determination. 128
4.5.3. *Frankia* strains and culture conditions. 128
4.5.4. DNA extraction, PCR amplification and sequencing. 129
4.5.5. Phylogenetic analysis of Sp+ and Sp– *Alnus*-infective *Frankia* strains. 130
4.5.6. Genetic diversity of the *pgk* marker at the alder stand scale. 131
4.6. ACKNOWLEDGMENTS 131

5. APPROCHE DE MODELISATION **133**
5.1. POURQUOI SPORULER *IN PLANTA*, OU QUEL EST LE TRAIT QUI EVOLUE ET EN REPONSE A QUOI ? 134
5.1.1. Ce qui évolue et que l'on veut modéliser 134
5.1.2. Type de variabilité environnementale 137
5.1.3. Estimation des coûts et bénéfices pour les partenaires 138
5.2. CONSTRUCTION DU MODELE 138
5.2.1. Approches de modélisation et type de modèle choisi 138
5.2.2. Structure et paramétrisation du modèle 140
5.2.3. Validation et Prédictions du modèle 141

DISCUSSION GENERALE **145**

ANNEXES **154**

A. IN-PLANTA SPORULATION CAPACITY ENHANCES INFECTIVITY AND RHIZOSPHERIC COMPETITIVENESS OF *FRANKIA* STRAINS **154**

B. FACTEURS SELECTIFS DE LA SPORULATION *IN PLANTA* **173**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **181**

TABLE DES ILLUSTRATIONS

La numérotation des tables et figures suit celle des chapitres et des annexes.

Tables

Table	1.1	Traits d'Histoire de Vie (THV) microbiens.	36
——	1.2	Compromis évolutifs entre THV microbiens.	38
——	1.3	Variations environnementales, stratégies de dispersion et type de *Bet-hedging* attendus en fonction du grain de l'environnement.	50
——	2.1	Stratégies infectieuses des parasites.	53
——	3.1	Genres de plantes actinorhiziennes et présence de nodosités contenant des spores (Sp+).	72
——	3.2	Caractéristiques écologiques des espèces d'aulne étudiées.	85
——	3.3	Genres et espèces des plantes-hôtes pour lesquelles l'occurrence de nodosités Sp+ a été décrite.	93
——	3.4	Fréquence des nodosités Sp+ en fonction de facteurs environnementaux.	95
——	4.1	List of sampled alder stands.	113
——	4.2	Occurrence of Sp+ and Sp– phenotypes according to the host-plant species.	114
——	4.S1	List of *Frankia* reference strains.	117
——	4.3	Frequency of Spore-positive (Sp+) phenotype and genetic diversity of *pgk* at the site level.	119
——	4.S2	List of primers used for DNA amplification and sequencing.	129
——	5.1	Différentes stratégies de sporulation *in planta*.	135
——	5.2	Coûts et bénéfices des formes actives et dormantes pour *Frankia*.	138
——	5.3	Coûts et bénéfices des formes actives et dormantes pour l'hôte.	138
——	5.4	Hypothèses sur les paramètres du modèles.	141
——	A.1	Sp+ and Sp– field nodules used as inocula.	169

Table A.2 List of PCR primers used for *Frankia* strain genotyping. 169
—— A.3 Sp+ and Sp– strain infectivity on *A. glutinosa* and *A. incana* seedlings. 170
—— A.4 Competitivness of co-inoculated Sp+ and Sp– strains on *A. glutinosa* host-plant. 170
—— B.1 Type et catégories des variables étudiées. 174
—— B.2 Fréquence des nodosités Sp+ par espèce-hôte du genre *Alnus*. 176

Figures

Figure 1.1. Grains de l'environnement. 48
—— 1.2 Un schéma conceptuel pour comprendre la dispersion dans l'espace (*space*) et/ou le temps (*time*). 49
—— 1.3 Une matrice indiquant les covariations des stratégies de dispersion dans l'espace et dans le temps. 51
—— 2.1 Taux d'accroissement en fonction de la latence de l'infection virale. 55
—— 2.2 Description mathématique de deux types de cellules bactériennes persistantes à un stress antibiotique. 57
—— 2.3 Diversité morphologique des sporulations asexuées. 60
—— 3.1 Symbiose et *continuum* symbiotique. 70
—— 3.2 Nodosités actinorhiziennes et microsymbiote *Frankia*. 73
—— 3.3 Echanges trophiques dans la symbiose *Frankia–Alnus*. 74
—— 3.4 Sporanges et spores de *Frankia*. 77
—— 3.5 Phylogénies de référence du genre *Frankia*. 78
—— 3.6 Formes cellulaires et paramètres de la reproduction de *Frankia*. 79
—— 3.7 Phylogénies de référence du genre *Alnus*. 82
—— 3.8 Aires géographiques du genre *Alnus* et de ses sous-genres. 84
—— 3.9 Coupes de nodosités actinorhiziennes Sp+ et Sp–. 88

Figure	4.1	Microscopic structures of endophytic *Frankia* in *Alnus* root nodules.	114
——	4.2	Phylogeny of *Alnus*-infective *Frankia* based on concatenated sequences of *dnaA, ftsZ* and *pgk* genes and estimated by Bayesian Inference.	115
——	4.S1	Phylogeny of *Alnus*-infective *Frankia* based on concatenated sequences of *dnaA, ftsZ* and *pgk* genes and estimated by Maximum Likelyhood.	116
——	4.S2	Matrices of phylogenetic distances.	118
——	4.3	Genetic diversity of *pgk* at the site level.	119
——	4.S3	Relation between the frequency of Sp+ phenotype and the standardized number of OTUs, at the site level.	120
——	5.1	Cycle de vie de *Frankia* et hypothèses sur les stratégies Sp+et Sp–.	136
——	5.2	Modèle d'évolution des stratégies de sporulation *in planta* Sp+ et Sp–.	140
——	A.1	Effect o *Frankia* strain sporulation phenotype (Sp+ or Sp]) on infectivity, nodulation and plant growth rate.	171
——	A.2	Effect of Sp+/Sp– *Frankia* strain co-inoculations on plant development.	172
——	B.1	Phylogénie des *Frankia* infectives d'*Alnus* basée sur les séquences concaténées des 3 *loci dnaA, ftsZ* et *pgk* et estimée par Maximum de Vraisemblance.	177
——	B.2	Corrélation des variables étudiées et de la structure des communautés de *Frankia*.	179

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

A l'origine de toute production humaine, il y a souvent et peut-être même toujours des rencontres. Ce manuscrit n'y fait pas exception. La rencontre fondamentale qui en est à l'origine a été celle que j'ai faite entre l'écologie évolutive et l'écologie microbienne en cours de deuxième cycle universitaire. Cette rencontre, qui se déroule dans le plan de la pensée, prend elle-même son origine dans deux autres rencontres qui semblent se dérouler, au premier abord seulement, dans un plan plus matériel. La première rencontre est celle faite avec Frédéric Menu, qui a forgé ma conviction que rien n'a de sens en écologie microbienne en dehors de la lumière de l'évolution et qui m'a incité à construire un projet de recherche à l'interface entre l'écologie évolutive et l'écologie microbienne. La seconde rencontre est celle faite avec Maria Fernandez, qui a donné une forme véritable à ce projet en m'apprenant qu'une dormance bactérienne particulière, et unique dans les relations microorganismes-plantes, peut être observée dans certaines populations de *Frankia* sp. : la sporulation endophyte (*in planta*) de la bactérie dans les cellules de l'hôte végétal. Cela ouvrait une perspective prometteuse de faire coïncider mon attrait pour l'écologie évolutive et l'écologie microbienne dans une seule et même thématique de recherche, l'étude des dormances microbiennes à la lumière de l'évolution.

Cette perspective s'est d'abord concrétisée par des travaux de Master 2 Recherche puis par ces travaux de thèse, tous deux réalisés sous la co-direction de M. Fernandez et F. Menu et au sein de deux équipes de recherche de l'Université Claude Bernard Lyon 1. Dans la première équipe « Ecologie évolutive et Biologie des populations d'insectes » (UMR 5558 CNRS-Lyon 1, Laboratoire de Biométrie et de Biologie Evolutive), Frédéric Menu développe une thématique de recherche sur l'évolution des traits d'histoire de vie en environnement variable. Deux des modèles biologiques employés sont les diapauses (dormances) de charançons (*Curculio* sp.) et de punaises hématophages (*Triatoma* sp.). Les travaux combinent aspects théoriques et expérimentaux, sur le terrain et au laboratoire. Dans la seconde équipe « Symbiose actinorhizienne » (UMR 5557 CNRS-Lyon 1, Laboratoire d'Ecologie Microbienne), Maria Fernandez développe une thématique de recherche qui concerne l'écologie et l'évolution de la symbiose fixatrice d'azote. Le modèle employé est la symbiose actinorhizienne entre l'actinobactérie *Frankia* et un genre actinorhizien particulier, l'aulne (*Alnus*

sp.). Les travaux décrivent la biodiversité et la phylogénie de populations naturelles de *Frankia*. L'objectif général de cette thèse est de proposer une démarche pionnière à l'interface entre l'écologie microbienne et l'écologie évolutive. La complémentarité de ces deux équipes, en terme de thématiques et d'approches, a donc permis la réalisation de ces travaux.

Le cadre théorique qui a guidé notre démarche concerne l'évolution des traits d'histoire de vie en environnement variable. Dans ce contexte, il est prédit que les variations environnementales qui ont une influence sur le succès reproducteur des organismes créent des pressions de sélection qui favorisent l'émergence et le maintien de stratégies de réduction du risque d'échec de la reproduction. Lors de la sporulation asexuée d'un microorganisme, les nombreuses spores produites peuvent être assimilées à la production de descendants génétiquement identiques, dormants et de taille réduite, qui permettraient respectivement l'accroissement du génotype parental, ainsi qu'une dispersion temporelle (dormance) et spatiale (dissémination). Nous avons donc fait l'hypothèse que la sporulation des microorganismes, généralement très peu étudiée à lumière de l'évolution, pouvait constituer une stratégie de réduction des risques. Nous avons choisi d'étudier un type de sporulation particulier : la sporulation *in planta* de *Frankia*. C'est un modèle de sporulation bactérienne asexuée à notre connaissance unique dans les interactions plantes-microorganismes voire dans les interactions hôtes-microorganismes, qu'elles soient symbiotiques ou pathogènes, car ce phénomène se déroule à l'intérieur même des cellules de l'hôte, *i.e.* dans un contexte endosymbiotique. Nous avons fait l'hypothèse que la sporulation *in planta* de *Frankia* était une stratégie adaptative qui a émergé et s'est maintenue en réponse à l'hétérogénéité spatiale et temporelle dans le cycle de vie de *Frankia*. En effet, l'alternance entre une phase de vie symbiotique où *Frankia* est associée à une plante-hôte (conditions environnementales favorables) et une phase où la bactérie est libre dans le sol (conditions environnementales défavorables) introduit une importante hétérogénéité lors de l'association à l'hôte (où trouver et quand infecter une plante-hôte compatible ?) ou de la dissociation de l'hôte (quand se séparer de la plante-hôte et où disséminer ?). Sous cette hypothèse, les nombreuses spores produites lorsqu'une souche de *Frankia* sporule *in planta* peuvent lui permettre de se développer non seulement « ici et maintenant » par l'intermédiaire des cellules actives mais également « ailleurs et plus tard » par l'intermédiaire des spores. La sporulation *in planta* permettrait ainsi à une telle souche de survivre en l'absence de l'hôte et de se propager horizontalement d'un hôte à l'autre.

Du point de vue théorique, les objectifs de nos travaux sont, d'une part, d'apporter des concepts et des hypothèses qui n'ont jamais été envisagés pour l'étude de la sporulation microbienne en général et de la sporulation *in planta* en particulier. Cela devrait contribuer à une meilleure compréhension de ce modèle biologique, et plus largement des stratégies de réduction des risques des microorganismes. D'autre part, nous espérons que l'application aux modèles microbiens des concepts, questions et interprétations élaborés pour des macroorganismes aura une forte valeur heuristique permettant de générer de nouvelles questions et de nouvelles hypothèses sur la sélection de ces stratégies. Les approches descriptives (terrain) et expérimentales (laboratoire) ont été choisies pour permettre d'établir les caractères transmissible et variable de la sporulation *in planta*. L'approche par modélisation a également été choisie pour permettre d'établir le caractère adaptatif de ce trait. Les simulations numériques devraient également permettre de tester la plausibilité de plusieurs *scénarii* évolutifs dans la symbiose *Frankia-Alnus*. Ces approches complémentaires ont pour but de préciser (i) l'influence relative de la souche bactérienne, de l'espèce de la plante-hôte et des conditions pédoclimatiques sur le phénotype de sporulation *in planta*, (ii) le rôle de la variabilité environnementale sur la distribution, la diversité et la sélection des souches Sp+ et Sp–, ainsi que (iii) les coûts et bénéfices associés à la sporulation *in planta*, en terme de valeur sélective (fitness) et pour les deux partenaires de la symbiose.

Le manuscrit est divisé en deux grandes parties. La première partie est une synthèse bibliographique sur les réponses adaptatives à la variabilité environnementale et sur le modèle biologique d'étude (CHAPITRES 1, 2 et 3). Comme nous avons déjà commencé de l'indiquer, l'approche interdisciplinaire et transversale que nous développons fait que notre synthèse dépasse l'exercice habituel. Nous tissons des liens entre concepts et observations théoriques et empiriques dans le but de réunir les différentes stratégies de dispersion microbiennes dans un même cadre, celui de l'évolution des traits d'histoire de vie en environnement variable. La seconde partie concerne la mise à l'épreuve expérimentale et l'approche de modélisation (CHAPITRES 4 et 5). Bien que cela puisse paraître déroutant de prime abord, la validation des hypothèses faites aux chapitres précédents sur la sporulation *in planta* de *Frankia* est donc effectuée soit par un travail expérimental soit par un travail conceptuel.

- Le CHAPITRE 1 définit le cadre théorique de l'écologie évolutive ainsi que les termes essentiels à la compréhension de l'évolution des traits d'histoire de vie en environnement variable et des stratégies de dispersion des risques, ces notions étant illustrées par des exemples microbiens.

- Le CHAPITRE 2 traite des stratégies de dispersion chez les microorganismes au sens large (bactéries, champignons, virus, protozoaires). Ces stratégies sont analysées et comparées dans le cadre théorique défini au chapitre précédent. Un accent particulier est porté sur les délais de développement dans les cycles de vie des organismes microbiens, comme les sporulations.

- Le CHAPITRE 3 présente un état de l'art du modèle biologique de la symbiose actinorhizienne entre *Frankia* et *Alnus* et décrit la sporulation *in planta* de *Frankia*. Les éléments de la littérature sont évalués et discutés pour faire émerger les hypothèses sur l'écologie des souches de *Frankia* sporulant *in planta*, et le rôle de cette sporulation.

- Le CHAPITRE 4 correspond à un article publié dans *Environmental Microbiology* (Pozzi *et al.*, 2015)[2]. Il présente une étude phylogénétique de souches de *Frankia* collectées dans des aulnaies naturelles dans le but de déterminer si les souches étudiées, provenant d'espèces-hôtes et de localisation différents et sporulant ou non *in planta*, ont des génotypes et un niveau de diversité différents ou pas.

- Le CHAPITRE 5 propose des pistes de modélisation de l'évolution du trait de sporulation *in planta*, à partir des réflexions théoriques sur le rôle écologique et évolutif des sporulations en environnement variable ainsi que des observations empiriques sur la sporulation *in planta*. L'approche par modélisation est une étape importante de la détermination du caractère adaptatif de la sporulation *in planta*.

Il a été fait le choix dans ce manuscrit de ne présenter qu'une partie des résultats expérimentaux obtenus (article publié en premier auteur) afin d'une part de maintenir un équilibre entre approche expérimentale et modélisation

---

[2] Pozzi *et al.*, *Environmental Microbiology* (2015) **17**(9), 3125–3138. Publisher's website. Download pdf.

mais aussi de garder une longueur raisonnable au document final. Nous avons donc réunis en ANNEXE A un article publié dans *Microbes and Environments* correspondant à un travail conjointement réalisé avec Laëtitia Cotin-Galvan durant sa thèse de doctorat (Cotin-Galvan, 2014) [3] qui réévalue expérimentalement la capacité des génotypes Sp+ et Sp– à s'associer (infectivité, compétitivité et spectre d'hôte) au partenaire végétal [4], et en ANNEXE B une partie des résultats expérimentaux portant sur l'histoire évolutive des *Frankia* Sp+/Sp– (distribution en zones refuges glaciaires/zones de recolonisation, effet des facteurs pédoclimatiques, de l'insularité, de l'endémisme) qui font l'objet de deux articles en préparation, en collaboration avec le Dr. Mélanie Roy (Université de Toulouse).

---

[3] Cotin-Galvan, L.C., Relation plante-hôte/*Frankia* dans les symbioses actinorhiziennes : cas particulier des souches non isolables capables de sporuler *in planta*. 2014, Université Claude Bernard Lyon 1 : Lyon, France. p. 147.

[4] Cotin-Galvan *et al.*, *Microbes and Environments* (2016) **31**(1):11-18. Publisher's website. Download pdf.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE :

REPONSES ADAPTATIVES À LA VARIABILITE ENVIRONNEMENTALE

&

MODELE BIOLOGIQUE D'ETUDE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE : REPONSES ADAPTATIVES A LA VARIABILITE ENVIRONNEMENTALE & MODELE BIOLOGIQUE D'ETUDE

Alors que les connaissances en physiologie, écologie fonctionnelle et phylogénie des microorganismes sont nombreuses, les mécanismes adaptatifs impliqués dans l'évolution de leurs traits d'histoire de vie demeurent peu étudiés. Ces mécanismes relèvent principalement de la sélection naturelle contribuant à l'optimisation des traits en matière de valeur sélective ainsi que des contraintes qui limitent cette optimisation (Roff, 1992 ; Stearns, 1992). En dépit de caractères spécifiques de la biologie microbienne (reproduction asexuée, parasexualité) et de l'échelle temporelle courte des mécanismes impliqués (développement rapide et temps de génération courts), les microorganismes présentent des caractéristiques similaires aux autres organismes, comme des structures spatiales fragmentées (habitats et populations), des niveaux d'activité variables (formes actives *versus* formes dormantes, résistantes ou persistantes) ainsi qu'une diversité (génétique, fonctionnelle et écologique) importante, qui ne justifient pas que leur étude se réalise sans une approche d'écologie théorique (Prosser, 2007) ni en dehors d'une approche de biologie évolutive[5].

Cette considération est d'autant plus pertinente que les microorganismes peuvent constituer des modèles de choix en écologie évolutive expérimentale, si l'on dispose des outils conceptuels et méthodologiques adéquats. En effet, les espèces microbiennes capables de reproduction asexuée produisent un grand nombre d'individus génétiquement identiques (clones), ce qui satisfait souvent aux conditions d'application des théories développées, et qu'il est le plus souvent possible d'obtenir ces clones au laboratoire, en peu de temps et avec des moyens réduits, ce qui est favorable à l'étude expérimentale. Les espèces microbiennes pouvant alterner reproduction sexuée et asexuée au cours de leur cycle de vie peuvent également être des modèles de choix pour l'étude de l'évolution de la sexualité. En retour, l'écologie évolutive a un fort pouvoir explicatif des adaptations microbiennes car « en biologie, les choses

[5] **Expliquer comment la diversité survient (traduit de Roff, 1992) :** « Il y a de nombreux types d'organismes différents dans le monde : ils diffèrent en taille, physiologie, apparence et histoire de vie. Le challenge pour les biologistes évolutifs est d'expliquer comment une telle diversité survient. »

n'ont de sens que si on les appréhende à la lumière de l'évolution » (Dobzhansky, 1973).

Notre approche se veut interdisciplinaire en présentant les concepts d'écologie évolutive[6] qui pourraient être appliqués à l'écologie microbienne[7], et transversale en traitant des stratégies de dispersion microbiennes sans nous limiter à un unique modèle biologique. Les objectifs principaux de cette synthèse bibliographique sont donc de vérifier que les données microbiologiques de la littérature peuvent s'inscrire dans le cadre théorique de l'écologie évolutive (non distorsion des concepts), et de confirmer ou d'infirmer les stratégies adaptatives sous-jacentes (validité de l'interprétation). Dans un premier temps, nous définissons le cadre théorique de l'écologie évolutive ainsi que les termes essentiels à la compréhension de l'évolution des traits d'histoire de vie en environnement variable (CHAPITRE 1). Le lecteur déjà familier avec ces notions les trouvera illustrées par des exemples biologiques issus de la microbiologie, permettant ainsi de connecter les deux disciplines. Dans un second temps, nous analysons et comparons différentes stratégies de dispersion microbiennes (CHAPITRE 2) afin de préciser comment des stratégies de délai de développement et de dissémination participent à l'adaptation des microorganismes en environnement imprévisible. Nous présentons alors le modèle biologique choisi pour notre étude, la symbiose actinorhizienne *Frankia-Alnus* (CHAPITRE 3). Un phénomène original de sporulation de la bactérie dans son hôte végétal a lieu dans ce contexte symbiotique et nous faisons l'hypothèse que la sporulation *in planta* contribue à l'adaptation de *Frankia* à l'hétérogénéité environnementale dans son cycle de vie.

---

[6] **Ouvrages de référence : en biologie évolutive**, Thomas, F., Lefèvre, T., and Raymond, M. (eds) (2010) *Biologie Evolutive*. Bruxelles, Belgique: Editions De Boek Université.) ; **en écologie évolutive,** Roff, D.A. (1992) *The Evolution of Life Histories, Theory and Analysis*. London, United Kingdom: Chapman & Hall, et Stearns, S.C. (1992) *The Evolution of Life Histories*. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.

[7] **Ouvrages de références : en écologie microbienne,** Bertrand, J.C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., and Normand, P. (eds) (2011) *Ecologie Microbienne, Microbiologie des Milieux Naturels et Anthropisés*. Pau, France: Presses de l'Université de Pau et des pays de l'Adour. ; **approche évolutive de l'écologie microbienne**, McArthur, J.V. (2006) *Microbial Ecology, an Evolutionary Approach*: Academic Press.

1. CADRE THEORIQUE

1.1. Généralités

1.1.1. Sélection naturelle

L'écologie évolutive recherche et étudie les rôles de la sélection naturelle (Darwin, 1859 ; Fisher, 1930) et des contraintes (allométriques, phylogénétiques, compromis évolutifs ou *trade-offs*) dans l'évolution des traits (Roff, 1992 ; Stearns, 1992). Pour que la sélection naturelle opère sur un trait, trois conditions doivent être remplies : (i) la transmission : le trait doit être transmissible, les individus doivent se reproduire et les caractères individuels êtres héritables, (ii) le potentiel de sélection : le trait transmis doit pouvoir varier d'un individu à l'autre, d'une population à l'autre, d'une génération à l'autre, et (iii) les pressions de sélection : les différences phénotypiques résultantes entre individus doivent être corrélées à des différences de valeur sélective (*fitness*) entre ces mêmes individus qui ne contribuent donc pas de manière égale à la génération suivante (Roff, 1992 ; Stearns, 1992). Parmi les traits évoluant sous sélection naturelle, il y a, entre autres, les traits d'histoire de vie considérés comme des traits dont l'étude permet de relier l'écologie à l'évolution (Roff, 1992). Ces traits et les contraintes sur leur évolution ainsi que la valeur sélective sont traitées dans les parties suivantes.

1.1.2. Trait d'Histoire de Vie (THV)

Définition et types de THV

Un THV est une composante du cycle de vie d'un organisme, dont la variation modifie fortement la valeur sélective de l'individu (Thomas *et al.*, 2010). L'ensemble des THV constitue une histoire de vie[8].

---

[8] **Les traits qui constituent l'histoire de vie (traduit de Stearns, 1992) : «** Considérons un zygote qui est sur le point de débuter sa vie et imaginons que toutes les opportunités lui sont ouvertes. A partir de quel âge et de quelle taille doit-il commencer à se reproduire ? Combien de fois dans sa vie doit-il tenter de se reproduire – une, plus d'une, continuellement, de façon saisonnière ? Quand il se reproduit, combien d'énergie et de temps doit-il allouer à sa reproduction et à l'opposé à sa croissance et à sa maintenance ? Avec une allocation donnée, comment doit-il diviser ses ressources parmi sa descendance ? Doit-elle être peu nombreuse mais de bonne qualité et de grande taille, ou doit-elle être de petite taille et très nombreuse mais moins à même de survivre ? Doit-il concentrer sa reproduction précocement dans sa vie et avoir une vie courte en conséquence, ou doit-il faire un effort reproductif moindre à chaque tentative donnée pour vivre plus longtemps ? »

Les THV peuvent être classés en trois grands types, selon qu'ils concernent la croissance, la maintenance ou la reproduction de l'organisme. Du point de vue de la biologie microbienne, l'ensemble des THV indiqués en note de bas de page précédente n'est pas forcément pertinent pour tous les microorganismes. Cependant, la classification en trois principaux types peut être conservée, avec les précisions suivantes. La croissance désigne l'augmentation irréversible des dimensions d'un organisme. Or, ce qui est classiquement appelé "croissance microbienne" n'est pas la croissance des dimensions des individus, mais l'augmentation des effectifs des populations par reproduction. Le taux d'accroissement (ou taux de division cellulaire) et la vitesse de croissance d'un hyphe pluricellulaire sont donc des THV de la reproduction. En revanche, la longueur cellulaire, que la cellule soit individuelle ou connectée à un hyphe pluricellulaire, est un THV de la croissance (Table 1.1).

Les six premiers THV donnés dans la Table 1.1 ont été décrits pour des microorganismes (une bactérie et un champignon filamenteux) à reproduction asexuée, mais il est raisonnable de penser qu'ils peuvent être généralisés à l'ensemble des microorganismes bactériens et fongiques et à leur descendance, qu'elle provienne de reproduction asexuée ou non. Les quatre derniers THV correspondent à un type de reproduction spécifique, la sporulation (*cf.* 2.3) et s'appliquent à la descendance issue de ce mode de reproduction (spores).

Table 1.1 : Traits d'Histoire de Vie (THV) microbiens.

Fonctions	Exemples de THV	Références
Croissance	Longueur cellulaire	(Pringle and Taylor, 2002)
Maintenance	Quantité de métabolites de réserve	(Ratcliff, 2010 ; Maharjan *et al.*, 2013)
Reproduction	Taux d'accroissement	(Pringle and Taylor, 2002)
	Vitesse de croissance hyphale	(Pringle and Taylor, 2002)
	Nombre de descendants produits	(Pringle and Taylor, 2002 ; Gilchrist, 2006)
	Taille des descendants produits	(Gilchrist, 2006)
dont sporulation	Taux de destruction	(Gilchrist, 2006)
	Taux de germination	(Gilchrist, 2006)
	Taux d'établissement	(Pringle and Taylor, 2002 ; Gilchrist, 2006)
	Durée de la latence	(Pringle and Taylor, 2002)

Stratégie d'allocation des ressources aux THV

Un organisme disposant d'un ensemble de ressources finies, tous les THV ne pourront donc être maximisés, ou optimisés, simultanément. Les organismes

ont donc développé différentes stratégies d'allocation des ressources entre les traits. Les stratégies d'allocation entre les THV concernant la croissance, la reproduction et la maintenance ont donc également été soumises à l'action de la sélection naturelle. En fonction du niveau des ressources disponibles, l'action de la sélection naturelle peut favoriser des stratégies d'allocation des ressources différentes. Par contre, il peut y avoir convergence évolutive d'organismes de taxonomie et d'écologie différentes quand ils sont soumis à des pressions environnementales similaires. C'est le cas, par exemple, pour les phénomènes de variation de dormance chez différents organismes qui répondent à des contextes environnementaux similaires, à savoir la stochasticité environnementale (*i.e.* variabilité imprévisible de l'environnement, comme nous le verront dans la partie 1.2).

Contraintes limitant l'optimisation d'un THV

Outre la quantité de ressources disponibles, d'autres contraintes limitent l'optimisation des traits (Thomas *et al.*, 2010). Ces contraintes sont de natures différentes. Les contraintes phylogénétiques limitent l'évolution phénotypique au sein d'une lignée donnée (*e.g.* la perte d'une voie métabolique chez l'ancêtre commun limite, au moins à court terme, l'évolution des fonctions associées chez les descendants). Les contraintes allométriques sont responsables de covariations entre traits (*e.g.* la surface et le volume d'une cellule microbienne) Enfin, des contraintes, appelées compromis évolutifs (*trade-offs*) engendrent des corrélations négatives entre traits. C'est à dire que le changement de la valeur d'un trait lié à une augmentation de *fitness* s'accompagnera d'un changement de la valeur d'un autre trait associé à une réduction de *fitness*, comme c'est le cas pour la longévité et la fécondité chez les animaux et les plantes (Roff, 1992). On dit qu'il y a compromis évolutif, ou *trade-off*, entre ces traits. Des compromis évolutifs ont également été mis en évidence chez les microorganismes (Table 1.2). Il résulte de ces contraintes que l'univers des possibles adaptatifs est limité.

L'examen des compromis évolutifs entre THV microbiens de la Table 1.2 montre que ces compromis peuvent se faire entre THV de la reproduction (taux d'accroissement, nombre de descendants) et de la maintenance (résistance et persistance, respectivement), entre THV de la reproduction (taux de sporulation) et de la croissance (vitesse de croissance hyphale) ainsi qu'entre THV de la reproduction seuls (nombre, taille et taux de germination des spores). Il n'est pas exclu que d'autres compromis existent chez les

microorganismes, à l'instar de ceux connus chez les animaux et les plantes, même s'ils ne sont pas reportés tels quels dans la littérature. L'allocation des ressources joue un rôle prépondérant dans ces compromis évolutifs : intuitivement, il est compréhensible qu'un organisme se reproduisant par sporulation ne puisse maximiser simultanément le nombre, la taille et le taux de germination des spores produites. Cette notion sera importante pour l'estimation de la valeur sélective (*fitness*) des organismes.

Table 1.2 : Compromis évolutifs entre traits d'histoire de vie (THV) microbiens.

THV 1	THV 2	Type	Références
Taux d'accroissement	Résistance	O	(Forde *et al.*, 2008)
Vitesse de croissance hyphale	Taux de sporulation	O	(Bever *et al.*, 1996)
Nombre de descendants	Persistance	P	(Caraco and Wang, 2008)
Taux d'infection	Persistance	P	(Caraco and Wang, 2008)
Nombre de spores	Taille des spores	P	(Gilchrist, 2006)
Nombre des spores	Virulence	O	(Thrall and Burdon, 2003 ; Moralejo *et al.*, 2006)
Nombre des spores	Longueur de l'hyphe	P *	(Gazey *et al.*, 1992)
Taille des spores	Taux de germination	P *	(Gilchrist, 2006)

Les THV 1 et 2 sont corrélés négativement : la maximisation du trait 1 entraîne la minimisation du trait 2 et réciproquement. Type de compromis évolutif : O, données observées par expérimentation et P, prédites par modélisation ; (*), corrélation négative ou positive selon les conditions.

1.1.3. Mesure de la performance évolutive

Unité de sélection

Selon Dawkins (1976), la sélection naturelle qui explique les adaptations, agit sur les individus mais l'entité sélectionnée sur le long terme est le gène, ou plus précisément l'information génétique (Gouyon *et al.*, 1997). Dans le couple gène-individu, l'unité de sélection est donc l'information génétique. Cette distinction a historiquement permis d'expliquer de manière satisfaisante l'observation de comportements sociaux coûteux au niveau individuel, *e.g.* l'altruisme, sans avoir recours à la sélection de groupe car ces comportements étaient bénéfiques pour le gène (Dawkins, 1976). L'hypothèse de sélection de groupe est rejetée aujourd'hui par la plupart des évolutionnistes même si une « nouvelle sélection de groupe » a été proposée récemment relançant le débat ; cette nouvelle conception de la sélection de groupe serait, en fait, une autre façon d'expliquer sémantiquement la même réalité biologique que celle expliquée par la sélection de parentèle (liée à la théorie du gène égoïste)

(Wilson and Wilson, 2007). Cependant, ces considérations sortent du cadre de ce manuscrit. Le concept d'unité de sélection gène-individu est également d'un grand intérêt pour l'écologue microbien confronté à la notion d'individu, le nombre exact d'individus dans une population microbienne étant difficile à estimer en raison de leurs petites dimensions et de leurs grands effectifs ainsi que de leur capacité à s'agréger (en biofilm pour les unicellulaires, en filaments/hyphes pour les pluricellulaires). Si le mode de reproduction du microorganisme étudié est asexué, alors tous les individus sont des clones qui portent la même information génétique.

Définition de la valeur sélective (fitness)

Pour comprendre l'évolution des THV, il faut d'abord pouvoir mesurer les différences dans la survie et le succès reproductif, *i.e.* l'espérance de la contribution à la génération suivante, entre deux individus ou entre deux génotypes. Il est donc nécessaire d'estimer la valeur sélective de l'individu ou du génotype, *i.e.* la *fitness*. Ce terme est généralement mal employé en écologie microbienne où la « *fitness* » désignerait l'aptitude d'une population inoculée à croître dans les conditions qui lui sont proposées expérimentalement (*e.g.* nutriments, températures, agents antimicrobiens) ou désignerait l'aptitude compétitive lors de confrontations de populations de souches différentes. De tels travaux concluent qu'une souche ayant une « bonne *fitness* » serait « bien adaptée » à son milieu ou serait une « bonne compétitrice ». Il est important de remarquer que la croissance des effectifs d'une population résulte de la reproduction des individus qui la composent et constitue donc une mesure de la fécondité, et que la compétitivité n'est qu'une fécondité relative entre les deux souches testées à un moment donné. Or la fécondité n'est qu'une composante de la valeur sélective et la maximisation d'une composante à des conditions et à un instant donnés ne garantit pas l'adaptation à long terme : par exemple, une fécondité faible est avantageuse en cas d'exposition à un traitement antibiotique (Balaban *et al.*, 2004). La mesure de la valeur sélective des microorganismes exige donc davantage de rigueur en tenant compte, notamment, des compromis évolutifs entre traits.

La valeur sélective, ou *fitness*, d'un gène (unité de sélection) représente son aptitude à se répliquer. Dans son manuscrit de thèse, Rajon (2008) a résumé le(les) concept(s) de *fitness*. J'invite les lecteurs intéressés à lire cette synthèse. Ici, nous retiendrons que les mesures de *fitness* d'un gène les plus usuelles sont basées sur les taux d'accroissement, sur la probabilité de persistance, sur la

capacité d'une population à ne pas être envahie ainsi que sur celle à s'établir dans une population existante (Rajon, 2008). La valeur sélective peut être estimée par des mesures globales et des mesures locales. Les mesures globales impliquent l'interaction de toutes les composantes de l'histoire de vie tandis que les mesures locales supposent que la maximisation d'une composante de la valeur sélective maximisera également la valeur sélective globale de l'organisme. Cela est vrai si et seulement si il n'existe pas de compromis évolutifs (*cf.* partie 1.1.2) entre les composantes de la valeur sélective (Roff, 1992). Quand une mesure locale a été choisie, il est indispensable de tenir compte de ces compromis pour définir la métrique de la valeur sélective. En effet, les mesures locales reposent sur le principe que la maximisation d'une composante de la valeur sélective maximisera également la valeur sélective globale de l'organisme. Or, s'il existe un compromis évolutif entre composantes, la maximisation de l'une entraînera la minimisation de l'autre. Dans ce cas, la mesure d'une seule composante de *fitness* ne sera pas représentative de la valeur sélective globale : par exemple, il est inexact d'estimer la *fitness* d'un microorganisme sporulant uniquement par le dénombrement des spores produites, sachant le compromis évolutif prédit entre quantité et qualité des spores (Gilchrist, 2006) ainsi qu'entre THV de la reproduction, de la croissance et de la maintenance (Table 1.2).

Estimations de la fitness

Le choix de la métrique de la valeur sélective doit se baser sur l'écologie de l'organisme considéré et dépendra entre autre de l'importance de la variabilité environnementale dans la question biologique posée. Les métriques classiques de valeur sélective qui seront présentées conviennent particulièrement quand les individus sont dénombrables. Pour mesurer des valeurs sélectives de microorganismes difficilement dénombrables, comme des unicellulaires agrégés ou des pluricellulaires filamenteux, on peut avoir recours à la notion de couple gène-individu (Dawkins, 1976 ; Gouyon *et al.*, 1997). L'effectif d'un gène unicopie, qui peut être quantifié par des techniques moléculaires fines telles que la PCR quantitative, donne par extension l'effectif des individus qui constituent la population.

La croissance d'une population clonale dans un environnement constant, homogène et non limité suit une fonction de croissance exponentielle telle que :

$$dN(t)/dt = r.N(t) \quad \text{équivaut à} \quad N(t) = N(0).e^{r.t} \qquad \text{(équation 1.1)}$$

où N(t) est l'effectif de la population à l'instant t et r le taux d'accroissement intrinsèque, *i.e.* la différence entre les taux instantanés de naissance et de mort. Dans les expériences de confrontation entre deux souches par exemple bactériennes, r (également appelé paramètre malthusien (Fisher, 1930) peut être une mesure appropriée de la valeur sélective globale[9]. Quand la population est à l'état stationnaire (croissance stable et r tendant vers 0) on peut écrire :

$$R_0 = \int l(x).m(x).dx = 1 \qquad \text{(équation 1.2)}$$

où R_0 est le taux reproductif net, l(x) la probabilité de survie à l'âge x et m(x) le nombre de descendants produits à l'âge x. L'emploi de R_0 comme métrique de valeur sélective facilite l'analyse et peut se justifier si r est proche de 0 ou si les traits considérés ne sont pas affectés par les facteurs qui maintiennent la population à un niveau relativement stable (Roff, 1992).

Selon les contextes écologiques considérés, d'autres métriques globales de valeur sélective en environnement constant peuvent être proposées, notamment quand des mécanismes dépendant de la densité sont présents (Roff, 1992 ; Gourbière and Mallet, 2005) ou quand un comportement altruiste est supposé au niveau individuel (Hamilton, 1964), mais cela sort du cadre de ce manuscrit et nous renvoyons le lecteur aux références citées pour leur description. Les conditions d'application précédentes (environnement constant, homogène et non limité) conviennent pour les études d'évolution expérimentale par dérive génétique (Lenski, 2003) où les confrontations de souches microbiennes sont réalisées en chémostats ou en chambres microfluidiques à flux continus. Elles peuvent être étendues aux environnements variant de manière prévisible, c'est à dire périodiquement. Cependant ces conditions peuvent paraître assez éloignées des conditions de vie naturelles des microorganismes, qui vivent dans des environnements au

---

[9] **Valeur sélective en environnement constant (traduit de Roff, 1992) :** « Supposons une population mixte de deux sous-populations clonales différentes vivant dans un environnement constant, respectivement d'effectifs $N_1(t)$ et $N_2(t)$ et de taux d'accroissement intrinsèque respectivement r_1 et r_2, tels que $N_1(0)$–$N_2(0)$ et $r_1 > r_2$. Le ratio des effectifs de ces populations après un temps t sera : $N_1(t)/N_2(t) = e^{(r_1-r_2).t}$ (équation 2.3). r_1 étant supérieur à r_2, ce ratio va augmenter au cours du temps, le clone 1 devenant numériquement de plus en plus dominant dans la population mixte. Ce résultat demeure identique en relaxant la condition d'effectifs égaux au temps initial. Des effectifs initiaux différents accélèrent ou retardent simplement le taux auquel la fréquence relative du clone 1 croît. Pour les deux clones décrits ci dessus, r est donc une mesure de valeur sélective appropriée car la fréquence du clone ayant la valeur de r la plus élevée augmentera jusqu'à 1. »

moins en partie variables et dont au moins une partie des variations peut être imprévisible.

En effet, quand l'environnement varie dans l'espace et dans le temps, les métriques de valeur sélective déterministes précédentes deviennent inappropriées car elles ne tiennent pas compte de la variance des taux d'accroissement [10]. Aussi, il a par exemple été proposé que dans un environnement qui varie dans le temps de manière stochastique (*i.e.* imprévisible) et sans densité-dépendance, la mesure correcte de valeur sélective stochastique est la moyenne géométrique des taux finis d'accroissement (Cohen, 1966). L'égalité précédemment écrite $N(t) = N(0).e^{r.t}$ équivaut à :

$$N(t) = N(0).(e^{r})^{t} \Leftrightarrow N(t) = N(0).(\lambda)^{t} \qquad \text{(équation 2.4)}$$

où λ est le taux fini d'accroissement (distinct du taux d'accroissement intrinsèque r).

L'effectif d'une population après un intervalle t est donné par :

$$N(t) = N(0).\lambda_1.\lambda_2.\lambda_3...\lambda_t = N(0).\Pi\lambda_i \quad \text{et} \quad G = (\Pi\lambda_i)^{(1/t)} \qquad \text{(équation 2.5)}$$

où G et $\Pi\lambda_i$ sont respectivement la moyenne géométrique et le produit des taux finis d'accroissement.

---

[10] **Valeur sélective en environnement stochastique (traduit de Roff, 1992) :** « Considérons deux génotypes A et B vivant dans un environnement variant entre deux types de conditions, l'une bonne et l'autre mauvaise, chacune se produisant à la même fréquence. En bonnes conditions, le génotype A a un taux fini d'accroissement (λ) de 2 et en mauvaises conditions un taux fini d'accroissement de 0,5 tandis que le génotype B a des taux finis d'accroissement valant respectivement 1,1 et 1. Les moyennes arithmétiques des taux d'accroissement de A et B valent respectivement 2,5 et 2,1 mais les moyennes géométriques sont 1 et 1,1. En conséquence, le génotype B a la plus haute valeur sélective à long-terme bien que sa moyenne arithmétique des taux d'accroissement soit la plus faible. Le génotype A s'accroît mieux que le génotype B en bonnes conditions, mais subit une réduction plus importante en mauvaises conditions. La valeur sélective relativement plus élevée du génotype B réside dans le fait que bien que sa moyenne arithmétique soit plus faible, la variance de ses taux finis d'accroissement (λ) est plus faible. Cela peut être expliqué par la relation : $G=\mu-(\sigma^2)/(2.\mu)$ (équation 2.6) où G, μ et σ^2 sont respectivement, la moyenne géométrique, la moyenne arithmétique et la variance des taux finis d'accroissement. En conséquence, la stochasticité environnementale crée une pression de sélection pour une réduction de la variance des taux finis d'accroissement. »

1.2. Stratégies biodémographiques

1.2.1. Stratégies adaptatives et dispersion des risques

Il a été montré théoriquement et expérimentalement que des variations environnementales ayant une influence sur le succès reproducteur des individus sélectionnent des stratégies adaptatives appelée stratégies biodémographiques (Thomas *et al.*, 2010) de délais de développement (Cohen, 1966; Evans and Dennehy, 2005) ou de dissémination spatiale. Le point commun à l'ensemble de ces stratégies est de permettre aux organismes ou à leur descendance de se développer « ailleurs et plus tard » plutôt « qu'ici et maintenant » (Solbreck, 1978) et donc de stabiliser leurs effectifs et de réduire les risques (*risk-dispersal*) liés aux variations de l'environnement (den Boer, 1968). Pour les besoins de cette thèse, nous allons clarifier la terminologie associée à la dispersion des risques. Dans la littérature, « *dispersal* » est tantôt employé pour désigner spécifiquement la dispersion spatiale et tantôt employé de manière générique. Dans ce dernier cas, il n'est pas fait de distinction entre la dispersion dans le temps (dispersion temporelle des risques par report de la reproduction, délai de développement, diapause, dormance des individus ou de leur descendance) et la dispersion dans l'espace (dispersion spatiale des risques, par dissémination des individus ou de leur descendance). Dans un premier temps et par souci de clarté, nous essaierons de maintenir cette distinction.

Selon (Rajon, 2008), la dispersion temporelle consiste à ce que différents individus d'une même génération se reproduisent sur plusieurs occasions de reproduction. C'est par exemple le cas de la diapause de certains insectes (Menu *et al.*, 2000 ; Gourbière and Menu, 2009 ; Rajon *et al.*, 2014). Pour une revue sur les délais de développement, voir Evans and Dennehy (2005). La production de graines par les plantes permet de la même manière une dispersion temporelle des descendants (pendant la durée du potentiel germinatif), mais également leur dispersion spatiale (Philippi, 1993). Selon Buoro et Carlson (2014), la dispersion spatiale peut être décomposée en étapes d'émigration depuis l'environnement d'origine, de transfert d'un environnement à l'autre et d'établissement dans le nouvel environnement. Chaque étape est associée à des coûts et des risques qui modifient la performance des individus dispersants. Pour une revue sur la dispersion spatiale, voir Matthysen (2012) et Duputié et Massol (2013). Ces stratégies de dispersion, qu'elles soient temporelles ou spatiales, permettent aux

descendants de rencontrer des conditions environnementales différentes et présentent donc un avantage lorsque la survie et/ou la reproduction varient stochastiquement dans le temps ou dans l'espace. Cependant, il existe aussi des réponses adaptatives aux variations prévisibles (*i.e.* périodique). L'ensemble de ces réponses fait appel à la plasticité phénotypique adaptative, qu'elle soit de type prédictive ou « pile-ou-face », comme nous allons le voir dans les sections suivantes.

1.2.2. Plasticité phénotypique (PP) prédictive

Considérant la dispersion temporelle, la stratégie de ne pas entrer dans un délai de développement sera avantageuse dans le cas où l'environnement demeure favorable ou retourne rapidement à de meilleures conditions, mais dans le cas contraire seules les formes dormantes pourront résister aux mauvaises conditions environnementales et se développer plus tard. Considérant la propagation spatiale, le même raisonnement peut être proposé. Les individus disséminant ont une certaine chance de rencontrer de meilleures conditions dans un milieu spatialement différent, mais aussi le risque d'en rencontrer de plus mauvaises que dans leur milieu d'origine. La décision de disperser temporellement (ou spatialement) comporte donc à la fois un bénéfice et un coût. Il y a donc une très forte pression de sélection pour des mécanismes capables d'intégrer des signaux corrélés à la variation de la qualité environnementale, et pour que ces mécanismes induisent l'entrée en délai de développement ou déclenchent la dissémination spatiale. Ces mécanismes relèvent de la plasticité phénotypique prédictive, l'expression d'un phénotype variable sur la base d'indices (signaux) qui prédisent les états futurs de l'environnement (Cooper and Kaplan, 1982 ; Kaplan and Cooper, 1984). Cependant, ce type de stratégies n'est pas adaptatif face à des variations environnementales non prévisibles du point de vue des organismes.

1.2.3. Plasticité Phénotypique (PP) « pile-ou-face »

Les milieux stochastiques présentent des paramètres biotiques ou abiotiques qui varient dans le temps et dans l'espace de manière aléatoire, *i.e.* imprévisible pour les organismes. De fait, la qualité environnementale peut, ne pas être corrélée ou être faiblement corrélée, aux signaux perçus par l'organisme. Entrer dans un délai de développement ou disséminer spatialement en l'absence d'information sur la qualité environnementale expose l'organisme à un risque d'échec de la reproduction à venir et crée une pression de sélection pour des mécanismes assurant la prévention de ce risque (Slatkin, 1974).

Cependant, en se plaçant du point de vue évolutif d'un gène, une plasticité « pile-ou-face » (ou *« coin-flipping » plasticity* en anglais) représente une stratégie adaptée à la stochasticité environnementale (Cooper and Kaplan, 1982 ; Kaplan and Cooper, 1984). Ce type de plasticité correspond à une expression aléatoire d'un gène produisant plusieurs phénotypes au même moment. La plasticité « pile-ou-face » peut expliquer les distributions bimodales de caractères phénotypiques parmi une population génétiquement identique (chaque mode correspondant à une face de la pièce). Les distributions multimodales et même continues peuvent être similairement expliquées (par choix parmi un nombre plus élevé de possibilités). La source de randomisation est un bruit de fond indifféremment génétique, physiologique, environnemental ou même d'étiologie inconnue (Cooper and Kaplan, 1982).

Bet-hedging

La plasticité « pile ou face » est un des mécanismes permettant de produire du *Bet-hedging :* Seger et Brockmann (1987) et Philippi et Seger (1989) ont montré que face à un environnement imprévisible, un organisme maximise sa *fitness* géométrique (sa valeur sélective) s'il parvient à réduire la variance de ses taux d'accroissement, même si cette réduction s'accompagne d'un coût sur la moyenne arithmétique de ces taux d'accroissement. Parmi les stratégies de *Bet-hedging*, on distingue classiquement deux type, le *Bet-hedging* conservateur[11] et le *Bet-hedging* diversifiant[12].

---

[11] ***Bet-hedging*** **conservateur (traduit d'après Seger and Brockmann, 1987 et Starrfelt and Kokko, 2012) :** Cette forme de *Bet-hedging* implique un mécanisme d'évitement des risques au niveau individuel sans diversification phénotypique. Les individus sacrifient une part de leur *fitness* arithmétique pour réduire l'incertitude, *i.e.* la variance, de leur fitness géométrique (*cf.* note précédente). Peut-être traduit par l'adage « un tiens vaut mieux que deux, tu l'auras ». Cette situation correspondrait à un individu qui paierait une prime pour s'assurer contre la réalisation d'un risque. Si le risque ne se réalise pas, alors il perd le montant de sa prime, mais si le risque se réalise, l'indemnité de l'assurance couvre largement le montant de la prime. Bien sûr, l'imprévisibilité de l'environnement est requise pour que cette stratégie ait un sens. S'il est absolument certain que le risque ne va pas se réaliser, il est inutile de perdre le montant de la prime d'assurance, *i.e.* de sacrifier une part de la *fitness* arithmétique moyenne.

[12] ***Bet-hedging*** **diversifiant (traduit d'après Seger and Brockmann, 1987 et Starrfelt and Kokko, 2012) :** Cette forme de *Bet-hedging* implique un mécanisme de dispersion des risques par diversification des phénotypes exprimés par un même génotype. La distribution des phénotypes alternatifs réduit la variance de la moyenne arithmétique à l'échelle de la population (composée d'individus portant le même génotype) en augmentant possiblement cette variance à l'échelle individuelle. Peut-être traduit par l'adage « il vaut mieux ne pas mettre tous ses œufs dans le même panier ». Cette situation correspondrait à un individu investissant dans un éventail de fonds de placements qui ne sont pas identiquement sensibles à la réalisation des risques. Là aussi, l'imprévisibilité de l'environnement est requise pour que cette stratégie ait un sens, sinon cet individu

Dans un environnement caractérisé par des changements rares mais réduisant fortement la *fitness* de l'organisme, une stratégie diversifiante, ou mixte, est bénéfique (Levins, 1968). Ce qu'avait déjà noté (Bernouilli, 1954) : « C'est la règle selon laquelle il est souhaitable de diviser des biens qui sont exposés à un danger en plusieurs parties plutôt que de les risquer tous ensemble ». Les phénotypes alternatifs coexistent à une fréquence qui est liée à celle des changements environnementaux (Levins, 1968). Notons, que les stratégies mixtes (diversification phénotypique exprimée par un même génotype) sont à distinguer du polymorphisme génétique[13] (diversification phénotypique issues de plusieurs génotypes) (Seger and Brockmann, 1987).

1.3. Vers un *continuum* de stratégies de *Bet-hedging* permettant la dispersion spatiale et temporelle des risques

Dans les environnements variant de manière imprévisible, les stratégies de *Bet-hedging* qui présentent une faible variance de leur taux d'accroissement intergénérationnel (maximisation de la moyenne géométrique de ces taux) peuvent théoriquement envahir des populations constituées d'individus dont la stratégie est associée à une moyenne arithmétique et à une variance des taux d'accroissement plus élevées. Ces stratégies de *Bet-hedging* prennent une « assurance multirisques » contre la variabilité de l'environnement. L'idée du *Bet-hedging* découle du fait que la mesure appropriée de la valeur sélective à long-terme est sensible à la variance des taux d'accroissement, ce qui conduit les stratégies présentant une variance réduite d'envahir c'est-à-dire d'augmenter en fréquence dans une population composée d'individus ayant « adopté » une autre stratégie. Dans cette section, nous rapprochons deux articles de synthèse récents qui abordent l'interdépendance entre les stratégies de dispersion spatiales et temporelles (Buoro and Carlson, 2014) et les variations de l'environnement dans l'espace ou le temps (Starrfelt and Kokko, 2012). Ces auteurs proposent un *continuum* dans les stratégies de *Bet-hedging*

---

a tout intérêt à réaliser son investissement uniquement dans le fond le plus performant, *i.e.* à ne pas produire de phénotypes alternatifs plus risqués.

[13] **A propos du polymorphisme génétique (traduit d'après Seger and Brockmann, 1987) :** Le polymorphisme génétique, quand il est maintenu par les variations de l'environnement ou par sélection fréquence-dépendante (la *fitness* individuelle d'un trait dépend de la fréquence de ce trait dans la population), est à tort considéré comme du *Bet-hedging*. Contrairement au postulat de la sélection de groupe, le polymorphisme génétique n'existe pas (et ne se maintien pas) parce qu'il augmente les « possibles » évolutifs et il ne réduit pas non plus la variance de la *fitness* individuelle.

(Starrfelt et Kokko, 2012) et de coupler les deux types de dispersion (Buoro et Carlson, 2014).

1.3.1. Type de variation : une question de grain de l'environnement

Les environnements peuvent être caractérisés par le grain, ou l'échelle, des variations. Les environnements à « gros grains » concernent des environnements qui ne varient que dans le temps : quand un changement environnemental intervient, il touche de la même façon tous les individus quel que soit l'espace occupé (il y a donc synchronisation des conditions environnementales dans l'espace c'est-à-dire entre populations locales). Les environnements à « grains fins » sont des environnements variant spatialement : les changements affectent les individus différemment selon l'espace occupé (il y a donc non synchronisation des conditions environnementales dans l'espace). En conséquence, des individus présentant une dispersion spatiale suffisante, peuvent subir spatialement les variations des conditions environnementales au même pas de temps (Levins, 1968; Seger & Brockmann, 1987) (Figure 1.1).

Les stratégies de *Bet-hedging* sont souvent classées en stratégies intra-générationnelles *versus* inter- générationnelles c'est-à-dire s'exprimant respectivement à l'intérieur d'une même génération (*Bet-hedging* spatial) ou entre générations (*Bet-hedging* temporel) (Hopper, 1999 ; Hopper *et al.*, 2003). En effet, dans le cas du *Bet-hedging* spatial, un même génotype exprime différents phénotypes individuels de dispersion spatiale (pas de dispersion versus dispersion ou faible dispersion vs forte dispersion) et ces différences s'expriment à l'intérieur d'une même génération. Au contraire dans le cas du *Bet-hedging* temporel, un même génotype exprime différentes longueurs individuelles de cycle de vie et donc une partie des individus se reproduiront à la génération t+1 et l'autre à la génération t+2 (dans le cas le plus simple). La répartition du risque a donc lieu dans ce cas entre plusieurs générations. Cette distinction entre *Bet-hedging* intra- et inter- générationnelle est souvent mise en relation avec le type de « grain » de l'environnement (Levins, 1968 ; Hopper, 1999) (*cf.* ci-dessus). Toutes choses étant égales par ailleurs, les environnements à « gros grains » sélectionneraient des stratégies de *Bet-hedging* intergénérationnel alors que ceux à « grains fins » du *Bet-hedging* intra-générationnel. Cependant, beaucoup d'environnements sont considérés comme étant à « grains moyens » et varient donc de manière combinée dans

le temps et l'espace (Starrfelt et Kokko, 2012). On peut ainsi supposer que dans ces derniers types d'environnements, les deux formes de *Bet-hedging* (inter- et intra-générationnel) pourraient évoluer.

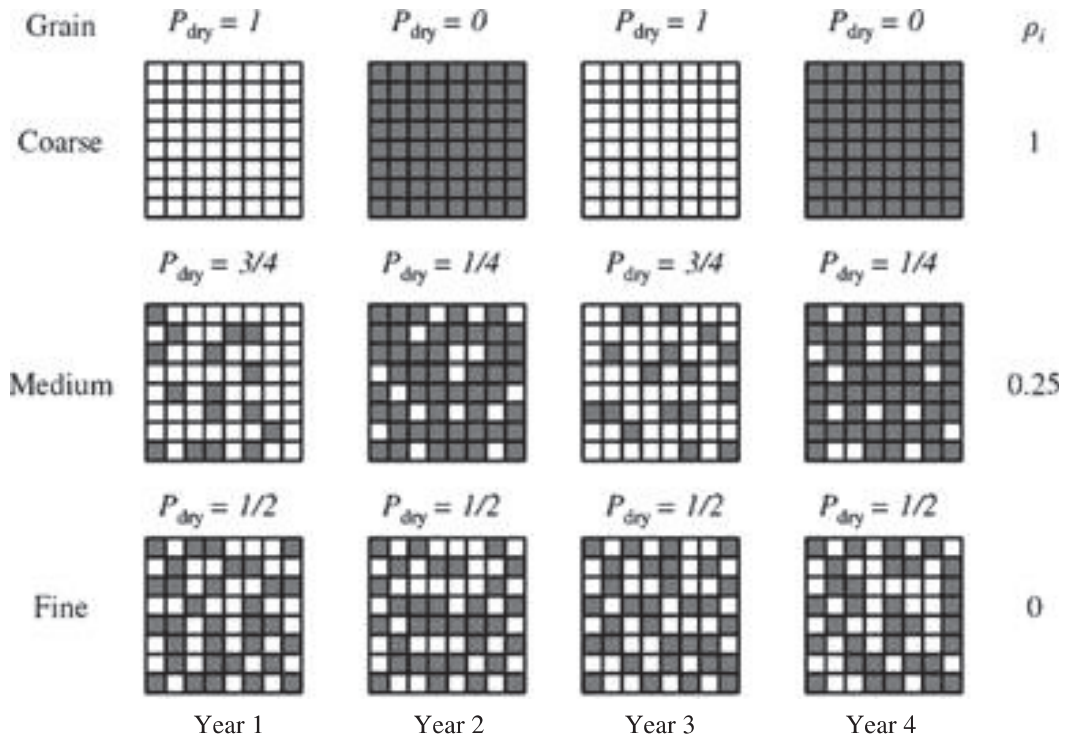


Figure 1.1 : « Grains » de l'environnement.

Un environnement à « gros grains » (*coarse*) ne varie que temporellement : à chaque pas de temps, les microenvironnements (petits carrés) sont soit tous mauvais (blanc), soit tous bons (gris). A l'inverse, un environnement à « grains fins » (*fine*) ne varie pas temporellement mais dans l'espace : en moyenne, les microenvironnements sont constants d'une année à l'autre (probabilité p, p=½) mais pour une année t l'environnement n'est pas le même d'un espace (carré) à l'autre. Entre ces deux extrêmes, un environnement à « grain moyen » (*medium*) varie à la fois spatialement et temporellement.

D'après Starrfelt et Kokko (2012).

Pour conclure, les variations temporelles des conditions environnementales sélectionneraient des stratégies de dispersion temporelle (s'exprimant à l'échelle individuelle par des individus de générations différentes), les variations spatiales des stratégies de dispersion spatiale (s'exprimant chez des individus de la même génération) et des variations à la fois temporelles et spatiales sélectionneraient une combinaison des deux types de stratégies (Figure 1.2).

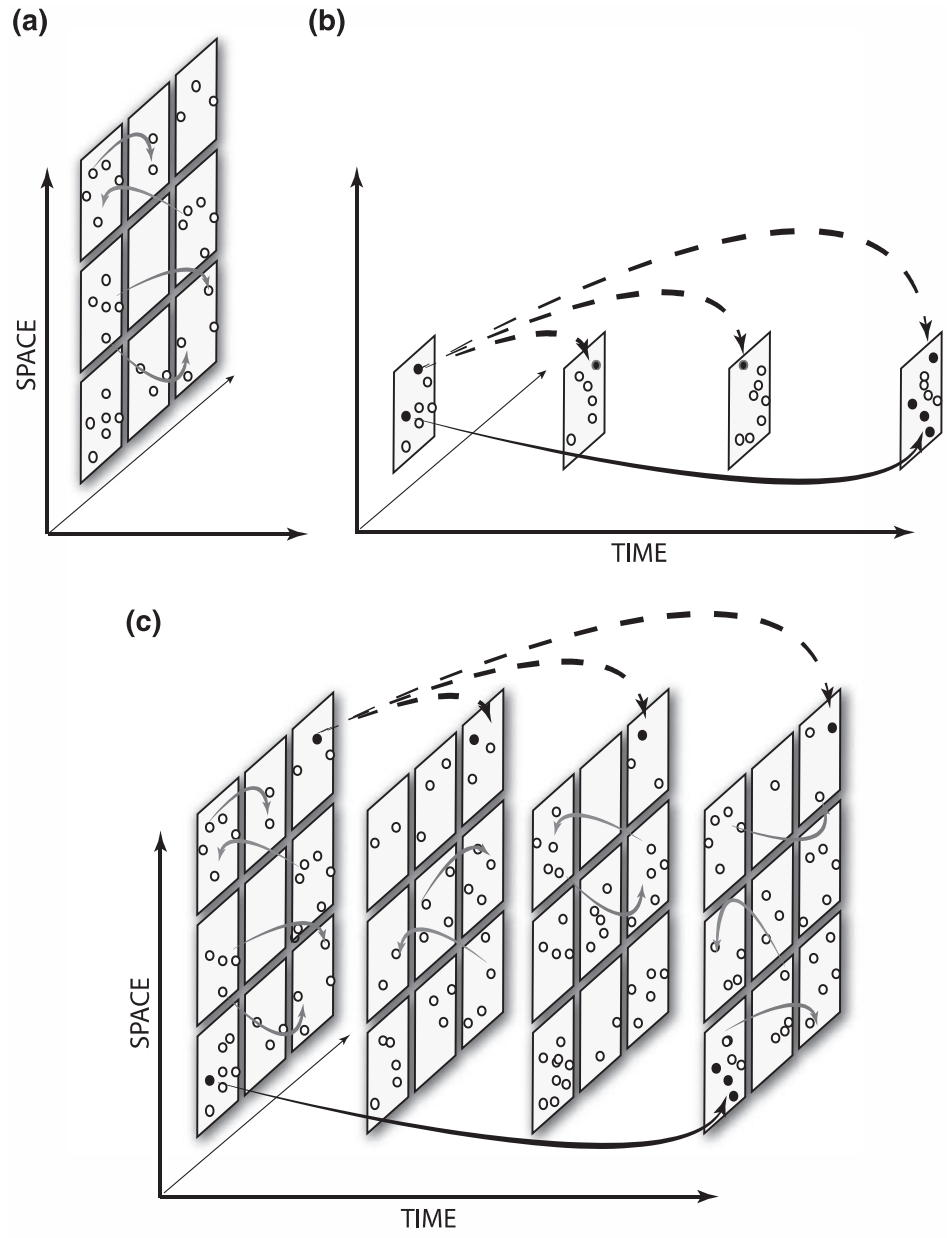


Figure 1.2 : Un schéma conceptuel pour comprendre la dispersion dans l'espace (*space*) et/ou le temps (*time*).

(a) Dispersion spatiale, intra-générationnelle (flèches). **(b)** Dispersion temporelle, inter-générationnelle. La dispersion temporelle peut être le résultat de structures en âge et/ou de l'itéroparité (plusieurs occasions de reproduction durant la vie d'un individu, flèches pointillées) ou de dormance (diapause des insectes ou dormance des graines, flèche pleine). **(c)** Combinaison de stratégies de dispersion spatiales et temporelles.

D'après (Buoro and Carlson, 2014).

1.3.2. Coexistence des dispersions spatiale et temporelle

La dispersion spatiale peut être décomposée en trois étapes (i) émigration depuis l'environnement d'origine, (ii) transfert d'un environnement à l'autre et (iii) établissement dans un nouvel environnement. En fait, une analogie directe peut être faite entre ces étapes du processus de dispersion et celles observées dans la dispersion temporelle: (i) entrée en dormance depuis un état actif, (ii) survie pendant la dormance et (iii) émergence de la dormance vers un état actif (Buoro and Carlson, 2014). L'idée que les dispersions spatiale et temporelle représentent des stratégies alternatives de minimisation des risques a été proposée assez tôt par Den Boer (1968). Cependant, la plupart des recherches se sont focalisées sur une dispersion des risques soit uniquement spatiale (*e.g.* Clobert *et al.* 2001, 2012 ; Kisdi 2002 ; Ronce 2007 en revue), soit seulement temporelle (*e.g.* Menu *et al.*, 2000 ; Gourbière and Menu, 2009) et rarement à une dispersion des risques impliquant une combinaison de ces deux stratégies (Rajon *et al.*, 2009 ; Pélisson *et al.*, 2013 ; Rajon *et al.*, 2014). Pourtant, il est nécessaire d'étudier la covariation entre ces stratégies pour comprendre leur évolution.

Le schéma conceptuel de Buoro et Carlson (2014) représenté dans la Figure 1.2 (a et b) rappelle respectivement, la notion d'environnement à « grain fins » *versus* à « gros grains », celle de variations temporelle *vs.* spatiale, et le *Bet-hedging* intra- *vs.* inter-générationnel de Starrfelt et Kokko (2012). Nous remarquons que la combinaison de dispersion spatiale et temporelle de Buoro et Carlson (2014) se déroule naturellement dans des environnements considérés à « grain moyens » par Starrfelt et Kokko (2012) (Table 1.3).

Table 1.3 : Variations environnementales, stratégies de dispersion et type de *Bet-hedging* attendus en fonction du grain de l'environnement.

	Grain de l'environnement		
	Gros	**Moyen**	**Fin**
Variations environnementales	Temporelle	Temporelle et spatiale	Spatiale
Stratégies de dispersion	Temporelle	Temporelle et spatiale	Spatiale
Type de *Bet-hedging*	Inter-générationnel	Les deux ?	Intra-générationnel

En pratique, une combinaison de dispersions spatiale et temporelle devrait pouvoir évoluer assez facilement sous certaines conditions environnementales (Buoro and Carlson, 2014). Cependant, du fait que ces

deux types de dispersion puissent réduire le risque d'échec de la reproduction suggère qu'ils puissent, dans certaines conditions, se substituer l'un à l'autre et constituer des stratégies alternatives (Figure 1.3).

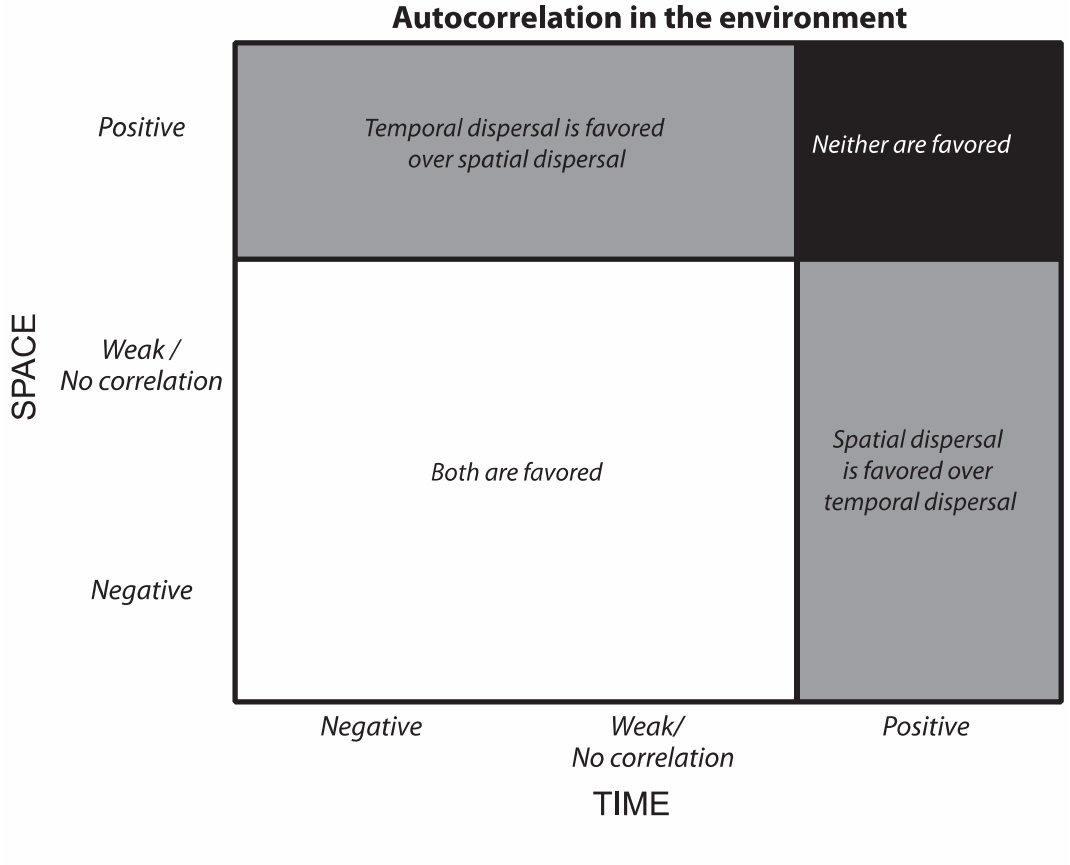


Figure 1.3 : Une matrice indiquant les covariations des stratégies de dispersion dans l'espace et dans le temps.

En abscisses, autocorrélation temporelle ; en ordonnées, autocorrélation spatiale. La combinaison de dispersions spatiale et temporelle est favorisée quand l'environnement est négativement corrélé dans l'espace et dans le temps (coin inférieur gauche, en blanc). La dispersion temporelle est favorisée par rapport à la dispersion spatiale quand l'environnement est positivement corrélé dans l'espace et faiblement ou négativement dans le temps (coin supérieur gauche, en gris). Inversement, la dispersion spatiale est favorisée par rapport à la dispersion temporelle quand l'environnement est positivement corrélé dans le temps et faiblement ou négativement dans l'espace (coin inférieur droit, en gris). Quand l'environnement est corrélé à la fois dans l'espace et dans le temps, aucune stratégie de dispersion n'est favorisée (coin supérieur droit, en noir).

D'après (Buoro and Carlson, 2014).

Plus généralement, cela implique que la dispersion spatiale peut contraindre l'évolution de la dispersion temporelle, et vice-versa, c'est-à-dire qu'il peut y avoir coévolution des deux stratégies. Les populations composées d'individus à faibles dispersions temporelle et spatiale seraient très vulnérables à

l'extinction dans des environnements stochastiques et donc peu fréquente (Buoro and Carlson, 2014). Des populations à individus présentant de fortes capacités de dispersion à la fois dans l'espace et dans le temps seraient également probablement assez rares, un organisme ne pouvant pas maximiser toutes les composantes de sa *fitness* simultanément, les « démons darwiniens[14] » n'existant pas (Law, 1979). Nous rajoutons à cela que disperser spatialement comporte nécessairement une dimension de dispersion temporelle, puisque qu'il faut bien qu'un individu survive pendant la durée de la dispersion spatiale.

1.3.3. Vers un *continuum* de stratégies de *Bet-hedging*

Quels que soient les critères utilisés pour classer les différents types de *Bet-hedging* (conservateur *versus* diversifiant, inter- *vs.* intra-générationnel, temporel *vs.* spatial), on peut supposer que ces types extrêmes appartiennent à un *continuum* (Starrfelt et Kokko 2012) et que le type de dispersion (temporelle, spatiale, combinée) dépendrait surtout du « grain » choisi pour décrire l'environnement. Cependant, une variance réduite des taux d'accroissement intergénérationnels exprimée par un même génotype est favorisée quelque soit le moyen de réduction de la variance (dispersion spatiale ou temporelle...). Le concept de grain de l'environnement est d'autant plus important pour l'écologie évolutive des microorganismes que les échelles spatiales et temporelles sont respectivement très petites et courtes. Les microorganismes vivent dans des habitats variés, au moins en partie stochastiques, mais il est difficile d'établir, *a priori*, les paramètres variant stochastiquement. Prosser *et al.* (2007) recommandent donc de définir préalablement les échelles spatiales et temporelles des variations des paramètres, ces échelles et ces paramètres devant tenir compte du cycle et du mode de vie de l'organisme et de la population considérée. Ces considérations nous ramènent donc au concept de grain de l'environnement et nous proposons que l'étude de l'évolution des adaptations des microorganismes se fasse à la lumière de ces considérations théoriques générales de l'écologie évolutive.

---

[14] Un « démon darwinien » est un organisme hypothétique qui peut maximiser tous les aspects de sa *fitness* simultanément et qui pourrait exister si l'évolution était entièrement non contrainte. De tels organismes se reproduiraient immédiatement après leur naissance, produiraient indéfiniment de nombreux descendants et vivraient indéfiniment. Bien que de tels organismes n'existent pas, les biologistes évolutifs utilisent la notion de « démon darwinien » pour tenter de comprendre les différentes stratégies d'histoires de vie des organismes, notamment face aux contraintes évolutive.

2. STRATEGIES DE DISPERSION CHEZ LES MICROORGANISMES

2.1. Variabilité de l'infectivité : plasticité phénotypique « pile-ou-face » permettant du *Bet-hedging* diversifiant

2.1.1. Virulence sous-maximale des macroparasites

Les stratégies de transmission des parasites présentent une grande diversité. Dans un modèle d'évolution numérique (chez un modèle biologique protozoaire) utilisant comme *fitness* la probabilité du stade parasitaire infectieux à survivre dans l'environnement et à infecter l'hôte, il a été montré que la stratégie optimale est très sensible au taux de disponibilité de l'hôte (Fenton and Hudson, 2002). Considérant la *fitness* du parasite, il est préférable d'avoir une infectivité sous-maximale, *i.e.* de ne pas allouer toute son énergie à l'infection pour maximiser sa survie dans l'environnement en période d'absence de l'hôte. Cela est compatible avec l'hypothèse d'un compromis évolutif (*trade-off*) dans l'allocation de l'énergie au maintien dans le milieu ou à l'infection de l'hôte. Le modèle prédit que lorsque les parasites subissent des conditions imprévisibles, la stratégie optimale est de produire une descendance qui diffère dans ses stratégies infectieuses (Table 2.1).

Table 2.1 : Stratégies infectieuses des parasites.

Déterminants	Type d'environnement		
	Déterministe		Stochastique
Disponibilité en hôte	Grande	Faible	Imprévisible
Type de stratégie favorisée	Pure	Pure	Mixte
Infectivité	Forte	Faible	Majoritairement faible et minoritairement forte

Dans l'exemple présenté par les auteurs, une stratégie pure serait d'allouer la totalité de son énergie à l'infection de l'hôte, au détriment de la survie. Une stratégie mixte serait d'allouer une part des ressources à l'infection, l'autre à la survie. Ce faisant, la stratégie mixte est moins infective, mais permet une meilleure survie dans l'environnement en l'absence de l'hôte. D'après Fenton et Hudson, 2002.

Ces travaux démontrent théoriquement qu'une réponse adaptative de type *Bet-hedging* peut être sélectionnée chez les macroparasites quand les fluctuations temporelles en hôtes sont imprévisibles. Des travaux expérimentaux cité par les auteurs sont cohérents avec les prédictions du modèle (Pasternak and Mikheev, 2000). Il est suggéré dans ces travaux qu'elles peuvent être appliquées aux microparasites (Fenton and Hudson, 2002) et nous sommes d'accord avec eux. Dans ce contexte, les fluctuations du taux de disponibilité

de l'hôte (*stricto sensu*, en individus) peuvent être élargies aux fluctuations du taux de disponibilité en sites d'infection, quand un seul individu est susceptible de subir des occurrences multiples d'infection (par exemple le système racinaire ou aérien d'un plante).

2.1.2. Latence dans le cycle de l'infection virale

Un modèle simple de *Bet-hedging* décrit exactement la situation observée lors des épidémies humaines du VZV (*Varicella Zoster Virus*) (Stumpf *et al.*, 2002). Le VZV se caractérise par une infection première (symptômes de la varicelle) et chez certaines personnes une infection secondaire (symptômes de zona) due à la réactivation du virus après une latence de 5 à 40 ans. Les auteurs montrent qu'une stratégie combinant une infection secondaire avec une longue latence peut avoir un avantage compétitif sur des stratégies sans latence. La latence de l'infectivité du VZV peut être sélectionnée par les fluctuations du nombre d'hôtes susceptibles (comme pour les macroparasites, *cf.* 2.1.1), indépendamment du mécanisme moléculaire de la réactivation virale. De telles fluctuations peuvent en fait mener à une persistance réduite du virus. Leurs résultats indiquent que la latence virale a évolué à cause d'un environnement fluctuant, car cela rend le virus meilleur compétiteur que des souches n'ayant aucune latence. Appliqué au VZV, cela signifie que les fluctuations en hôtes susceptibles pourraient avoir favorisé l'évolution et la maintenance de la latence virale, pas parce que le virus n'aurait pas persisté autrement, mais bien parce que cela lui permet de surpasser les autres compétiteurs sans latence (Figure 2.1).

L'utilisation d'une telle approche d'écologie évolutive montre qu'il n'est pas nécessaire d'imaginer des mécanismes de biologie moléculaire raffinés de la réactivation du virus pour expliquer l'évolution de la latence virale. Tant que le virus reste latent pour une certaine durée avant de se réactiver, il peut demeurer supérieur aux souches non latentes dans des environnement suffisamment risqués (Stumpf *et al.*, 2002). Par ailleurs, nous remarquons que les virus bactériophages (virus infectant les bactéries) peuvent réaliser des cycles infectieux lytiques (immédiats) et des cycles lysogéniques (avec une latence) et que le nombre de bactéries susceptibles (hôtes) peut fluctuer (Forde *et al.*, 2008). Il nous apparaît donc plausible que le *Bet-hedging* ait pu être sélectionné chez les bactériophages. Nous pensons également que ce type de raisonnement, et donc de stratégie, peut être généralisé à toutes les interactions biotiques basées sur des processus infectieux, bénéfiques

(infection symbiotique) ou non (infection pathogène) pour l'hôte. C'est en tout cas une stratégie à prendre en compte dans les théories épidémiologiques.

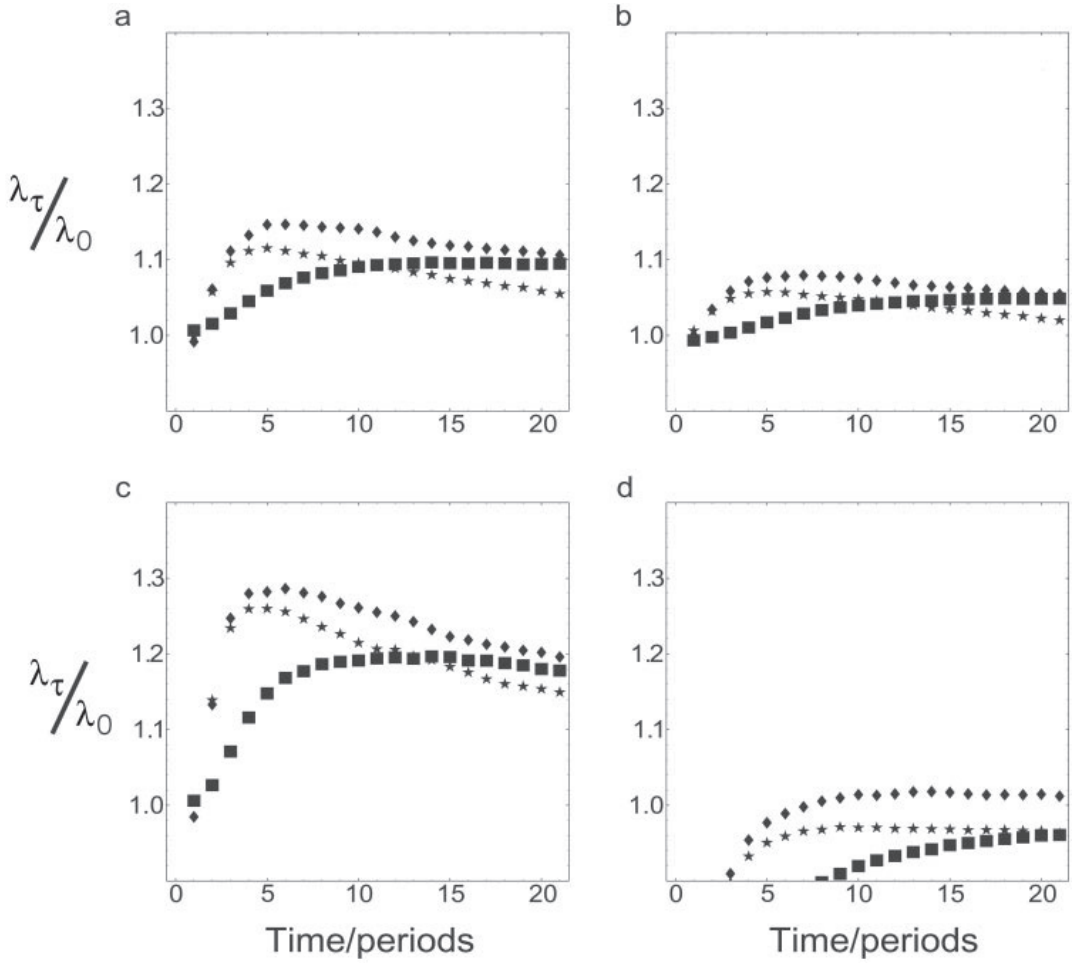


Figure 2.1 : Taux d'accroissement en fonction de la latence de l'infection virale.

λ_τ /λ_0 : *ratio* des moyenne géométrique des taux d'accroissement pour une stratégie virale avec latence (λ_τ) et une stratégie virale sans latence (λ_0). Chaque courbe (étoiles, carrés et losanges) représente la valeur moyenne du *ratio* λ_τ /λ_0 au cours de la période considérée, pour différentes valeurs des paramètres du modèle qui prennent en compte l'infectivité à la primo-infection, à la réactivation, la survie et la durée de la latence virale (voir (Stumpf *et al.*, 2002) pour les détails). Pour trois environnements fluctuants (graphes a, b et c), la valeur supérieure à 1 après la période de temps considérée indique que la stratégie avec latence testée a une meilleure *fitness* que la stratégie sans latence. Pour l'environnement fluctuant où les mauvaises conditions sont plus fréquentes que les environnements précédents (graphe d), la stratégie avec latence virale fait aussi bien que la stratégie sans latence.

D'après (Stumpf *et al.*, 2002).

2.2. Cellules bactériennes persistantes : plasticité phénotypique prédictive et *Bet-hedging* diversifiant

En 1944, Bigger (cité par Balaban *et al.,* 2004) émit l'hypothèse de l'existence d'une fraction de cellules non réplicantes, *i.e.* ne se divisant pas donc insensibles à la pénicilline, parmi une population de staphylocoques. L'étude individuelle a aujourd'hui montré que ces cellules génétiquement homogènes (isogéniques) préexistent dans les populations bactériennes et ne sont pas produites en réponse au traitement antibiotique (Balaban *et al.*, 2004). Il ne s'agit pas de résistance acquise par mutation car les descendants issus des cellules persistantes demeurent sensibles à l'antibiotique. Grâce à un dispositif expérimental permettant de suivre individuellement les cellules, les auteurs ont pu enregistrer les taux de croissance individuels avant et après traitement à l'antibiotique, détecter les rares survivants et en analyser l'historique. Toutes les cellules persistantes se distinguaient par un taux de croissance faible ou nul. Cependant, il a été montré que ces cellules peuvent retrouver leur capacité à se diviser et ainsi recoloniser le milieu.

Pour rendre compte de ces observations, (Balaban *et al.*, 2004) ont proposé un modèle à deux états décrivant le passage d'un comportement à croissance rapide (normale) à un comportement à croissance lente ou nulle (persistant), et réciproquement (Figure 2.2). D'après les résultats de modélisation, les auteurs proposent que les cellules persistantes ont pu être sélectionnées car elles accroissent les chances de survie des populations bactériennes en environnement fluctuant et ils évoquent un lien avec les stratégies de *Bet-hedging* des plantes et des insectes.

Nous remarquons qu'en reportant ou réduisant leur effort reproductif, les bactéries persistantes diminuent leur taux d'accroissement (et donc leur *fitness* basée sur la moyenne arithmétique de ces taux) et réalisent donc une forme de dormance qui réduit la variance de leur taux d'accroissement. Nous soutenons donc en partie l'hypothèse de *Bet-hedging* proposée par les auteurs. Toutefois, parce qu'ils peuvent intégrer un signal environnemental corrélé à la dégradation de l'environnement qui devient moins favorable à une croissance et à une reproduction actives (déplétion en nutriments du milieu de culture *in vitro* pendant la phase stationnaire de la croissance de la population bactérienne), nous proposons que les individus persistants de type I réalisent une forme de Plasticité Phénotypique prédictive (*cf.* 1.2.2) qui n'est donc pas du *Bet-hedging*. En revanche, parce que les phénotypes (n et p) qui

sont produits continuellement ne sont pas corrélés aux conditions futures de l'environnement, nous proposons que les individus persistants de type II réalisent une forme de Plasticité Phénotypique « pile-ou-face » qui est du *Bet-hedging* diversifiant (1.2.3). Parmi les individus de la population bactérienne étudiée, qui était clonale, il y avait donc trois sous-populations aux THV de reproduction différents : (i) les cellules qui se reproduisent activement quoiqu'il advienne (et qui meurent lors de variations de l'environnement trop intenses) et (ii) celles qui se reproduisent activement mais qui sont capables de diminuer leur effort reproductif (et sans doute d'allouer davantage à leur maintenance et à leur survie) (ii.a) en fonction d'un signal corrélé à la qualité environnementale future (persistants de type I), ou (ii.b) selon une expression aléatoire (persistants de type II).

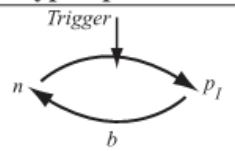
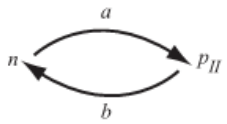
Type I persisters		Type II persisters	
			
$\begin{cases} \frac{dp_I}{dt} = -bp_I + \mu_p p_I \\ \frac{dn}{dt} = bp_I + \mu_n n \end{cases}$ Eq.(1)		$\begin{cases} \frac{dn}{dt} = -an + bp_{II} + \mu_n n \\ \frac{dp_{II}}{dt} = an - bp_{II} + \mu_p p_{II} \end{cases}$ Eq. (2)	
Estimated rates (units: hours^{-1})			
hipA7: $b=0.07\pm0.01$	*wt* Type I subpopulation: μ_p-b= -0.05±0.01*(23)*	*wt* Type II subpopulation: $a=1.2\pm0.2 \times 10^{-6}$ $b=0.1\pm0.05$	*hipQ* $a=1.0\pm0.2\times10^{-3}$ $10^{-7}<b<10^{-4}$
For a general solution of Eqs (1&2) see the Supplementary Online Material			

Figure 2.2 : Description mathématique de deux types de cellules bactériennes persistantes à un stress antibiotique.

Equations générales décrivant les dynamiques de deux sous-populations, ici notées comme normale (*n*) et persistante (*p*). Les individus persistants de type I sont générés par des évènements déclencheurs pendant la phase stationnaire de la croissance de la population bactérienne, alors que les individus persistants de type II sont générés continuellement pendant la croissance de la population bactérienne. Les paramètres pour les populations *hip* et pour le type sauvage (wt) sont déterminés dans le matériel supplémentaire en ligne (voir Balaban *et al.* 2004 pour les détails).

D'après (Balaban *et al.*, 2004).

2.3. Les sporulations : quelle(s) type(s) de plasticité phénotypique adaptative ?

2.3.1. Définition

La sporulation asexuée des microorganismes bactériens et fongiques est une différentiation morphologique produisant une ou plusieurs particules, appelées spores[15], par cellule. Les spores asexuées sont des propagules inactives et de petite dimension qui contiennent le matériel génétique sous forme hautement condensée. La sporulation correspond à une entrée en dormance. L'activité métabolique de la spore est ralentie : la respiration est par exemple dix fois moindre à l'état dormant qu'à l'état actif (Krumholz *et al.*, *2003*). Mais contrairement aux graines ou aux larves d'insectes, la spore contient relativement peu de réserves énergétiques ; on doit donc se focaliser non seulement sur l'estimation et la consommation des réserves énergétiques pendant le stade dormant (survie), mais aussi sur la constitution et l'utilisation de ressources pour sporuler (entrée en dormance), c'est à dire celles disponibles avant le stade dormant. La formation de spores nécessite des ressources en azote et en carbone pour synthétiser les molécules (peptidoglycane, glycoprotéines, acide dipicolinique) qui constituent les nombreuses couches protectrices. À ce jour on n'explique pas encore complètement comment ces couches s'organisent ni quel est le coût métabolique de la sporulation, mais des études suggèrent des différences d'expression dans le métabolisme carboné (Monz and Schwintzer, 1989) et azoté (VandenBosch and Torrey, 1984) entre souches d'une même espèce, l'une sporulant, l'autre pas. Si le cycle de sporulation cesse avant que la ou les spores soient mature(s), par exemple en raison d'un manque de ressources, la cellule sporogène meurt et aucune spore mature n'est produite. Il pourrait donc exister une forte pression de sélection pour des mécanismes permettant d'estimer la condition énergétique avant d'initier un cycle de sporulation bien

---

[15] Le terme « spore » dérive de « *spora* », qui signifie « graine ». En biologie, on appelle spore une unité issue de reproduction asexuée, qui peut avoir des fonctions de dissémination spatiale et/ou de survie, souvent pour des laps de temps étendus en conditions défavorables. Par contraste, les gamètes sont des unités issues de reproduction sexuée. Les spores comme les gamètes sont unicellulaires mais les spores peuvent germer, se développer et former de nouvelles cellules contrairement aux gamètes qui ont besoin de se combiner et fusionner pour former un zygote avant de développer davantage. Cependant, nous précisons que dans le cadre de cette synthèse bibliographique, nous nous intéressons à la sporulation et aux spores asexuées afin de les distinguer clairement des gamètes, parfois appelés improprement spores sexuées. La sporulation fait partie des cycles de vie de nombreux organismes dont des plantes, des algues, des protozoaires, des bactéries et des champignons. Nous nous focaliserons sur ces deux dernières catégories.

que dans la littérature ce point ne soit pas abordé à la lumière de l'évolution. Enfin, les spores ont la faculté de redonner une cellule active lors de leur germination, ou sortie de dormance. La sporulation peut ainsi permettre la résistance à des conditions qui ne sont pas favorables à la croissance active (Dworkin and Shah, 2010). Elle peut également permettre la propagation spatiale pour coloniser de nouveaux milieux éventuellement plus favorables (particulièrement étudié chez les champignons phytopathogènes (Sache, 1997). La sporulation peut également être un mode de reproduction à caractère facultatif ou obligatoire d'un organisme (Angert, 2005 ; Flint *et al.*, 2005) ou être à l'origine de la particule infectieuse (spore) d'un agent pathogène (Hugh-Jones and Blackburn, 2009 ; Velagapudi *et al.*, 2009).

Diversité interspécifique

Ici, nous nous intéressons à la signification écologique et évolutive davantage qu'à la régulation génétique et à aux mécanismes moléculaires de la sporulation, par ailleurs largement décrits (Abel-Santos, 2012). Nous traitons de la sporulation asexuée des microorganismes comme des adaptations à la variabilité environnementale développés pour d'autres organismes, bien que n'ayant pas trouvé d'article de synthèse sur ce sujet. Cela peut être dû à la forte diversité interspécifique de ce phénomène qui incite à parler davantage des sporulations asexuées que de la sporulation asexuée.

Des bactéries gram-positives unicellulaires comme le modèle classique *Bacillus subtilis* produisent une unique endospore (Veening *et al.*, 2008; Abel-Santos, 2012 ; Tan and Ramamurthi, 2014), d'autres peuvent en produire plusieurs comme *Anaerobacter polyendosporus* (Duda *et al.*, 1987) et jusqu'à une dizaine comme *Metabacterium polyspora* (Angert, 2005). Des microorganismes pluricellulaires, bactériens (van Dijk and Merkus, 1976 ; Locci, 2005) ou fongiques (Elliot *et al.*, 2002 ; Velagapudi *et al.*, 2009), peuvent produire plusieurs dizaines, centaines ou milliers de spores, libres ou regroupées dans des sporanges. Une terminologie spécifique existe pour désigner ces spores et les structures qui leur sont associées (Figure 2.3). La question de savoir si cette diversité relève de différentes stratégies adaptatives est donc capitale mais n'a pas été étudiée sous un angle évolutif.

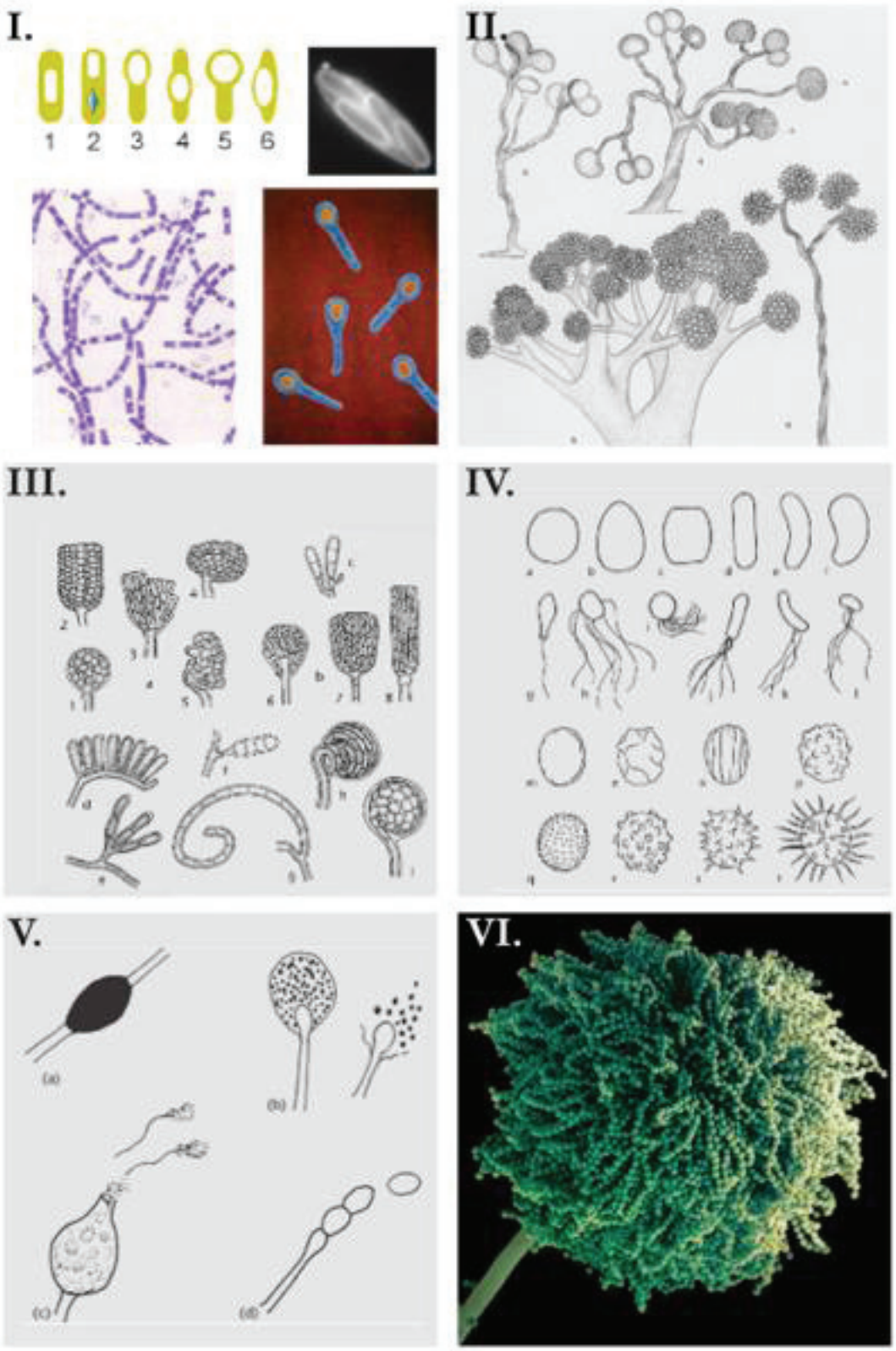


Figure 2.3 : Diversité morphologique des sporulations asexuées.

La sporulation asexuée est un trait répandu parmi les microorganismes, qu'ils appartiennent à des domaines différents comme Eubacteria (I-IV, procaryote) et Fungi (V-VI, eucaryote) et, au sein de

ces domaines, à des phylums différents (*e.g. Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria*). **I.** Des bactéries unicellulaires comme *Bacillus anthracis* (bas gauche), *Clostridium tetani* (bas droite) ou *Metabacterium polyspora* (haut droite) appartenant au phylum des Firmicutes (faible %GC, majoritairement gram-positif) peuvent produire une unique ou plusieurs spores à l'intérieur de la cellule bactérienne, d'où le nom d'endospore. La position de l'endospore peut varier d'un organisme à l'autre (haut gauche : 1 et 4, centrale ; 2, 3 et 5, terminale ; 6, latérale). **II.** Les myxobactéries comme *Chondromyces crocatus* appartiennent au phylum des Proteobacteria (très diversifié, gram-négatif) et peuvent s'agréger pour former des corps fructifères multicellulaires qui portent à leurs extrémités de nombreuses spores à paroi fine appelées myxospores. **III.-IV.** Des bactéries filamenteuses appartenant au phylum des Actinobacteria peuvent produire une à plusieurs centaines de spores, de formes variées, flagellées ou non, avec parfois des ornementations en surface. Ces spores peuvent être produites librement par le mycelium (filament) aérien ou non, parfois à l'intérieur de de structures appelées sporanges dont la forme est diversifiée et souvent une caractéristique du genre bactérien. **III.** Sporanges développé sur le mycélium non aérien (a) *Actinoplanes*, polysporulé (1) globulaire, (2) cylindrique, (3) lobulaire, (4) sous-globulaire, (5) irrégulier ; (b) *Pilimelia*, (6) ovoïde, (7) campanulée, (8) cylindrique ; (c) *Dactylosporangium*, oligosporulé, claviforme ; Sporanges développés sur le mycélium aérien (d) *Planomonospora*, monosporulé, claviforme (e) *Planobispora*, bisporulé, cylindrique, (f) *Planotetraspora*, tétrasporulé, cylindrique, (g) *Planopolyspora*, polysporulé, tubulaire, (h) *Spirillospora*, polysporulé, globulaire et (i) *Streptosporangium*, polysporulé, sphérique. **IV.** Morphologie des spores : forme (a) globulaire, (b) ovoïde, (c) doliforme, (d) en bâtonnet, (e) allantoïde, (f) réniforme ; flagelle (g) monotriche monopolaire, (h) péritriche, (i) polytriche, (j) lophotriche, (k) polytriche sous-polaire, (l) polytriche latéral ; ornementations de surface (m) lisse, (n) rugueux irrégulier, (o) rugueux parallèle, (p) verruqueux, (q) tuberculeux, (r) verruqueux plus prononcé, (s) piquant et (t) poilu. **V.-VI.** Les champignons filamenteux peuvent produire une à plusieurs milliers de spores, dont la nomenclature dépend des structures qui les portent. V. Spores fongiques (a) chlamydospore, (b) sporangiospore, (c) zoospore, (d) conidiospore. VI. Plusieurs milliers de spores sont portés par une seule fructification d'*Aspergillus* sp.

Crédits : I. *B. anthracis*, *C. tetani*, *M. polyspora*, position de l'endospore ; II. *C. crocatus* ; III-IV. Sporanges et spores actinobactériens ; V. Spores fongiques ; VI. Spores d'*Aspergillus* sp.

2.3.2. Différents types de sporulation asexuée

Une cellule unique produisant une spore unique

L'endospore bactérienne est une différentiation cellulaire des bactéries sporulantes dont la formation a pour l'instant été surtout envisagée comme une réponse à la perception de signaux de stress. Chez *Bacillus subtilis* en conditions nutritionnelles limitantes (*i.e.* non optimales), une fraction de la population sporule, une autre fraction meurt, se lyse et déverse son contenu dans le milieu et une dernière fraction continue de croître grâce aux métabolites ainsi relargués (Veening *et al.*, 2008). Les auteurs suggèrent que le choix entre ces comportements serait influencé par l'appartenance à des lignées de cellules-filles différentes (mais clonales car issues de la même

cellule-mère). Le choix serait donc sous déterminisme épigénétique plutôt que génétique, mais produirait quand même des phénotypes aléatoirement. En notant que les spores s'engagent dans un processus de développement à long terme, à l'inverse des autres cellules prêtes à croître rapidement dès le retour de conditions plus favorables, les auteurs assimilent ce choix à une stratégie de *Bet-hedging*. Cependant, l'absence de données expérimentales sur le taux de sporulation intrinsèque et sur la cinétique de sortie de la dormance (germination de la spore), ainsi que l'absence d'un modèle théorique pour étayer cette hypothèse nous incitent personnellement à davantage de prudence.

Considérons une population de bactéries unicellulaires pouvant produire chacune une unique endospore. Potentiellement, il peut donc être produit autant de spores que de cellules bactériennes, c'est à dire que l'effectif initial en génotype ou en individus est potentiellement équivalent à l'effectif final. Cependant on peut supposer que seule une fraction de cette population produira une spore mature viable au moment approprié, *i.e.* quand l'environnement se dégradera. Même si elles sont plus résistantes aux stress environnementaux, une fraction de ces spores pourra être perdue par destruction pendant la dormance. Seulement une fraction des spores dormantes germera et s'établira en réponse à des conditions favorables. Enfin, une dernière fraction des spores pourrait ne pas germer immédiatement. En conséquence, il est attendu une réduction drastique des effectifs en individus capables de fonder une nouvelle population. Ce coût de production d'une descendance résistante peut tout de même être relativisé car les séquences génomiques issues de cellules ou de spores détruites peuvent persister dans l'environnement et rester disponibles pour la transformation d'autres bactéries (Willerslev *et al.*, 2004). De plus, le passage par le stade de spore peut permettre à certains pathogènes de constituer des réservoirs, par exemple dans leurs hôtes (Chao and Rubin, 2010 ; Singh *et al.*, 2010). La sporulation asexuée remplie donc les conditions d'application du « germ-banking » (Evans and Dennehy, 2005), toute la descendance n'émergeant pas en dépit de conditions idéales pour l'émergence et le succès reproductif à venir.

Une cellule unique produisant plusieurs spores

Certaines espèces bactériennes unicellulaires peuvent produire plusieurs endospores par cellule. Ainsi, *Anaerobacter polyendosporus* en produit 0 à 7, généralement 1 à 2 (Duda *et al.*, 1987). *Metabacterium polyspora* peut produire

jusqu'à 9 endospores (Angert, 2005). Le bilan en termes d'effectifs d'individus ou de génotypes produits par évènement de sporulation est plus favorable que pour le cas précédent, puisque davantage de copies de gènes sont produites. Cependant, il serait intéressant de vérifier si la quantité et la qualité des spores produites (par exemple leur contenu en ADN ou leur taux de germination) dépendent de la quantité de ressources de la cellule mère. La variabilité en quantité et en qualité des spores aurait des conséquences en terme de valeur sélective car il a été proposé que la production d'un nombre élevé de spores favoriserait l'établissement de ces bactéries dans le tractus gastro-intestinal (Angert, 2005).

Parmi les modèles de sporulation asexuée décrits, quelques uns ont montré une variabilité entre individus d'une même souche. Par exemple, la spore peut contenir ou non le matériel génétique (Krumholz *et al.*, *2003*). Le nombre de spores par cellule peut varier de 0 à 7 chez l'unicellulaire *Anaerobacter polyendosporus* (Duda *et al.*, 1987). La taille des spores, leur type associé à une germination précoce ou tardive varient également (Elliot *et al.*, 2002). Curieusement, ces travaux restent descriptifs et ne posent pas les questions des causes et conséquences évolutives d'une telle variabilité. Dans la première partie de notre manuscrit, nous avons proposé que la stochasticité environnementale puisse être l'une des causes. Pour discuter des conséquences, nous devrons distinguer les cas où une unique spore est produite des cas où plusieurs spores sont produites.

Plusieurs cellules produisent plusieurs spores

La production d'un nombre élevé de spores a également été défini comme un facteur critique dans les processus de colonisation (Gilchrist, 2006) et de persistance dans le milieu (Friese and Allen, 1991) des microorganismes filamenteux, car les hyphes sont moins performants que les spores pour assurer ces fonctions. Nous proposons que l'ensemble de ces espèces puisse constituer des modèles de choix pour l'étude des aspects évolutifs de la sporulation. Il serait primordial dans l'avenir de distinguer les mécanismes évolutifs sous-jacents à la production de spores multiples et de spores uniques.

2.3.3. Quelle(s) stratégie(s) de dispersion ?

Dispersion temporelle uniquement : le modèle bactérien, retarder son développement sous forme de spore.

La spore asexuée bactérienne contient le matériel génétique sous forme hautement condensée et ses multiples couches protectrices assurent une très grande résistance aux stress thermique, hydrique et chimique (Abel-Santos, 2012). Cette résistance est due à l'inactivité métabolique de la spore (= dormance) ainsi qu'à son imperméabilité. Pendant longtemps, il a été considéré que l'application d'un stress thermique sur une population de cellules actives provoquait la sporulation de chaque individu (100 % d'entrée en dormance) et que le retour de conditions favorables déclenchait la germination (100% de sortie de dormance). Autrement dit, ces bactéries auraient été capables d'intégrer parfaitement les signaux actuels corrélés à la qualité environnementale future, bonne ou mauvaise pour leur vie active. Sous ces conditions, la sporulation serait une stratégie de réduction du risque dans le temps (= plasticité phénotypique prédictive), tous les individus retardant leur développement par dormance.

Cependant, en réalité il existe une variabilité intra-populationnelle de ces traits. Par exemple, lorsque l'on applique un stress nutritif à une population bactérienne isogène (= clonale), 3 sous-populations peuvent être distinguées. La première sporule (= entre en dormance), la seconde meurt et la dernière continue une vie active (Veening *et al.*, 2008). D'autres études ont mis en évidence une latence variable de la germination lors d'un retour à des conditions favorables à la vie active (Abel-Santos, 2012).

Dans une culture sporulante de *Bacillus subtilis*, seulement une sous-population de cellules produisent des spores matures résistantes à la chaleur (Chung *et al.*, 1994 ; Veening *et al.*, 2008). Ces spores s'engagent dans un processus de délai de développement, à l'inverse des autres cellules prêtes à croître rapidement dès le retour de conditions favorables, ce qui a suggéré que la sporulation corresponde à un comportement altruiste du point de vue individuel (Velagapudi *et al.*, 2009). C'est en fait un comportement égoïste du point de vue de l'information génétique impliquée dans l'acte altruiste, puisque à long-terme c'est cette information qui est favorisée (Dawkins, 1976; Gouyon *et al.*, 1997). Il y a donc des coûts et des bénéfices individuels selon que l'individu sporule ou non, mais il y a toujours un avantage pour l'information génétique.

Le cas extrême étant celui des spores « super-dormantes » qui demeurent dormantes plusieurs heures (= quelques générations) après que l'ensemble des autres spores a germé et repris une vie active (Abel-Santos, 2012). Certaines bactéries unicellulaires peuvent également produire des spores en nombre variable, de 0 à 7-9 par cellule (Duda *et al.*, 1987; Angert, 2005). Nous proposons que la signification écologique et évolutive de la variabilité de ces traits pourrait être la dispersion du risque dans le temps (= plasticité phénotypique pile-ou-face), bien que cette proposition n'ait pas encore été démontrée théoriquement et expérimentalement de manière rigoureuse.

Dispersion spatiale uniquement : le modèle fongique,
disséminer sous forme de spores.

Ce modèle de sporulation asexuée des champignons filamenteux peut aussi concerner les actinobactéries qui produisent des spores multiples. Lors de la sporulation asexuée fongique plusieurs dizaines à plusieurs centaines de spores sont produites par une même cellule spécialisée (sporangiophore, ou sporange, cellule portant les spores) d'un organisme pluricellulaire filamenteux. Ces spores sont des particules unicellulaires libres de petite taille et produites en grand nombre. Bien que soit faite une distinction entre spores de résistance et spore de dissémination chez les champignons, on leur reconnaît une résistance moindre que les spores bactériennes. Il est donc généralement admis que les spores fongiques participent à la colonisation et à la persistance dans le milieu (Gilchrist, 2006), les hyphes étant moins performants que les spores pour assurer ces fonctions. Il est souvent oublié que lorsque des cellules spécialisées produisent des spores, les autres cellules constituant l'organisme peuvent éventuellement continuer de se diviser activement. Les cellules actives d'un organisme pluricellulaire ont donc le choix de ne pas se diviser, de se diviser activement ou de sporuler. Nous proposons que la signification écologique et évolutive du choix cellulaire pourrait être la dispersion du risque dans l'espace (= plasticité phénotypique pile-ou- face), bien que cette proposition n'ait, non plus, pas encore été démontrée théoriquement et expérimentalement de manière rigoureuse.

Dispersion combinée temporelle et spatiale :
vers un modèle de sporulation où le temps et l'espace sont indissociables ?

D'après les deux paragraphes précédents, la sporulation permettrait donc soit la résistance à des conditions qui ne sont pas favorables à la croissance

(modèle bactérien), soit la propagation spatiale pour coloniser de nouveaux milieux éventuellement plus favorables (modèle fongique). Cependant, les spores bactériennes pourraient également contribuer efficacement à la propagation spatiale des bactéries unicellulaires (Abel-Santos, 2012), et inversement les spores fongiques ou actinorhiziennes, qui ont une activité métabolique plus réduite et une résistance plus importante que les cellules actives, pourraient être impliquées aussi dans la résistance et pas seulement la dissémination (Gilchrist, 2006). En fait, qu'elle permette un bénéfice évolutif par la dispersion temporelle d'un risque (production de particules dormantes) ou par la dispersion spatiale d'un risque (production de particules disséminantes), la sporulation engendre également des coûts. De même pour une dispersion combinée à la fois temporelle et spatiale, qui implique un *trade-off* (compromis) dans l'allocation d'énergie entre la qualité (meilleure dispersion temporelle) et la quantité (meilleure dispersion spatiale). Les stratégies où une partie de la descendance retarde son développement par dormance permettent une dispersion temporelle du risque. Celles où une partie de la descendance déplace ailleurs son développement par dissémination permettent une dispersion spatiale du risque. Ces stratégies permettent la constitution d'une réserve de gènes chez des individus qui se développeront « ailleurs et plus tard », ce qui réduit l'impact négatif de mauvaises conditions de survie et/ou de reproduction affectant les individus actifs « ici et maintenant » (Solbreck, 1978). Ne pas entrer en dormance ou ne pas disséminer sera avantageux seulement dans le cas où l'environnement local demeure favorable ou retourne rapidement à de meilleures conditions, mais dans tous les autres cas seules les formes dormantes ou disséminantes pourront se développer car elles subiront moins la dégradation de l'environnement.

La sporulation des microorganismes peut être considérée comme une stratégie efficace de survie temporelle (dispersion du risque dans le temps) et/ou de dissémination spatiale (dispersion du risque dans l'espace), selon le grain environnemental choisi (*cf.* 1.3.3). Les spores, formes de vie dormantes de taille réduite, permettraient aux microorganismes de se développer « ailleurs et plus tard » plutôt « qu'ici et maintenant » comme il a été proposé pour les dormances des macroorganismes (Solbreck, 1978). La production de plusieurs spores permettrait également l'accroissement du nombre de copies du génome. Il apparaît donc intéressant de déterminer si les traits associés à la sporulation (dispersion spatiale, dispersion temporelle, réplication du

génome) confèrent aux microorganismes une meilleure valeur sélective (*fitness*) dans des environnements variables et s'il existe différentes stratégies de sporulation adaptées à différents environnements.

3. DES CONCEPTS AU MODELE BIOLOGIQUE D'ETUDE

Nous avons montré dans les chapitres précédents que la sporulation asexuée peut être considérée comme la production de descendants résistants et disséminants, réalisant une dispersion temporelle et spatiale de la reproduction qui permet à l'organisme de se développer « plus tard » et « ailleurs » plutôt « qu'ici et maintenant » (Solbreck, 1978). L'objectif de cette thèse est d'étudier la sporulation *in planta* de l'actinobactérie *Frankia*, symbiote de l'aulne (*Alnus* sp.). Nous avons choisi comme modèle biologique l'actinobactérie *Frankia* car les nombreuses spores produites par ce microorganisme tellurique peuvent être assimilées à la production de très grands effectifs de descendants génétiquement identiques, dormants et de dimensions très petites. Nous faisons donc l'hypothèse que la sporulation *in planta* permettrait un accroissement du génotype parental et contribuerait à une meilleure survie aux conditions défavorables et une meilleure dispersion spatiale de *Frankia* en environnement variable. Par analogie avec la dormance des graines des plantes et la diapause des insectes, nous proposons que la variabilité environnementale ait pu sélectionner des stratégies de *Bet-hedging* chez *Frankia*.

Frankia est une actinobactérie tellurique capable d'établir une symbiose[16] avec les plantes actinorhiziennes[17] dont celles du genre *Alnus*. Cette interaction biotique durable est matérialisée par la formation de nodosités racinaires, organe symbiotique formé par la plante et hébergeant les cellules bactériennes.

---

[16] **Définition de la symbiose et du *continuum* symbiotique.** Le terme symbiose (*sum-*, "ensemble" et *biōsis*, "vivre") a initialement été proposé avec un sens restrictif pour définir les interactions obligatoires et à bénéfices mutuels, symbiose s.s. étant donc synonyme de « mutualisme obligatoire» (Beneden, 1873). A.B Frank a également proposé le terme "*symbiotismus*" (Franck, 1877). Anton de Bary a ensuite proposé un sens moins restrictif pour décrire toute association vivante d'espèces différentes (De Bary, 1879), symbiose perdant ainsi le caractère de mutualisme obligatoire. Toutefois, deux notions restent présentes dans le terme symbiose : la coopération (mutualisme) et la dépendance (obligatoire ou non) entre partenaires symbiotiques. Enfin, à partir de travaux sur la symbiose Rhizobiales-légumineuses a été proposé le concept de *continuum* symbiotique selon un degré de nodulation (Bryan et al., 1996), c'est à dire en fait selon un degré de dépendance entre la plante et la bactérie. L'élargissement du terme symbiose aux interactions non mutualistes (neutres ou négatives) n'est pas encore communément partagé, bien que l'on puisse aussi aussi imaginer un degré dans la coopération.

[17] **Le terme actinorhizien** (*aktis*, rai et *riza*, racine) (Torrey and Tjepkema, 1979) s'applique à la fois (i) au type de symbiose fixatrice d'azote entre l'actinobactérie *Frankia* (microsymbiote) et un ensemble de plantes (hôtes) auxquelles la bactérie peut s'associer, la symbiose actinorhizienne, (ii) aux dites plantes- hôtes appelées collectivement plantes actinorhiziennes, et (iii) aux organes symbiotiques qui sont des racines modifiées, produits par la plante-hôte et qui hébergent *Frankia*, les nodosités actinorhiziennes.

Cette symbiose est habituellement décrite comme facultative (les partenaires peuvent aussi vivre séparément) et mutualiste (échanges trophiques bénéfiques et réciproques) (Figure 3.1). La morphologie et le développement de *Frankia* sont complexes : c'est une bactérie pluricellulaire filamenteuse capable de différenciations cellulaires. Seulement certaines souches sont capables de sporuler *in planta*, ce qui est illustré par la présence (Sp+) ou l'absence (Sp–) de sporanges (contenant les spores, dormantes) dans les cellules végétales de la nodosité. Cependant la description de ce trait est incomplète et l'interprétation écologique encore incomprise[18], d'où la nécessité d'étudier ce trait à la lumière de l'écologie évolutive.

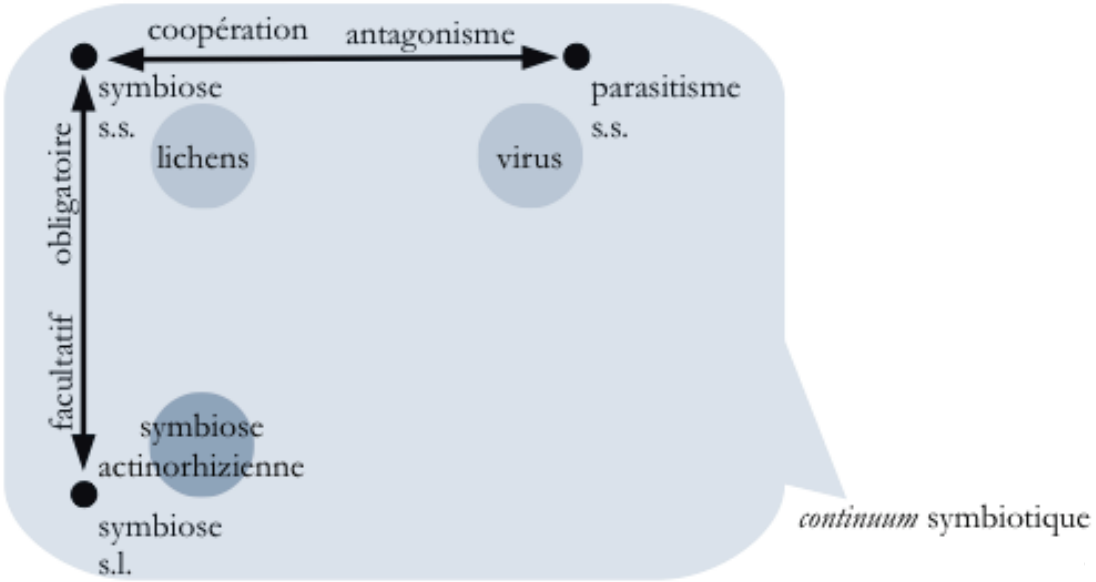


Figure 3.1 : Symbiose et *continuum* symbiotique.

Ici, nous utiliserons l'acceptation la plus large du terme symbiose : toute interaction biotique durable d'espèces différentes (consortiale ou monospécifique), à transmission horizontale (via l'environnement) ou verticale (via la lignée germinale) et quels que soient les degrés de dépendance (de facultatif à obligatoire) et de coopération (de parasitique à mutualiste) entre les partenaires. Sous cette acceptation, les symbioses peuvent être envisagées comme le résultat d'une dynamique pouvant produire, dans le *continuum*, des trajectoires symbiotiques différentes : les degrés de dépendance, de coopération, les modes de transmission, etc., ne sont pas fixes *a priori* et invariants mais sont susceptibles d'évolution.

A. C. Pozzi.

[18] **Ouvrages de référence :** Schwintzer, C.R., and Tjepkema, J.D. (eds) (1990) *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. San Diego, California, United States: Academic Press, Inc, ibid., et Pawlowski, K., and Newton, W.E. (eds) (2008) *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, ibid.

Nous faisons d'abord un état de l'art de la biologie, de l'écologie et de l'histoire évolutive des partenaires du modèle biologique choisi pour l'étude, la symbiose actinorhizienne entre *Frankia* et *Alnus* (partie 3.1). Puis nous décrivons la sporulation *in planta* de *Frankia* pour proposer une réflexion sur le rôle écologique et évolutif de ce trait d'histoire de vie ainsi que pour formuler nos hypothèses de travail (partie 3.2).

3.1. La symbiose actinorhizienne

3.1.1. Définitions de la symbiose et des partenaires symbiotiques

Frankia et les nodosités actinorhiziennes

La première observation reportée d'une nodosité actinorhizienne a été réalisée au XIXème siècle (Meyen, 1829). Pendant longtemps, l'étiologie des nodosités est restée incertaine, et a été longtemps attribuée à un champignon filamenteux (Woronin, 1866). Il faudra attendre des travaux ultérieurs (Schaede, 1932, 1938 ; Pommer, 1959 ; Callaham *et al.*, 1978) pour finalement établir que le microsymbiote présent dans ces nodosités est un microorganisme procaryote, différent de celui des nodosités racinaires des plantes légumineuses (dues à l'action de bactéries Rhizobiales) et qu'il s'agit d'une actinobactérie (Callaham *et al.*, 1978), nommée *Frankia* (Becking, 1970) en l'honneur du mycologue A.B. Franck.

Plantes actinorhiziennes

Les plantes actinorhiziennes regroupent environ 280 espèces d'angiospermes appartenant à 25 (23-29 selon la classification) genres paraphylétiques (Wheeler *et al.*, 2008) et à 8 familles botaniques (Table 3.1). Ce sont des plantes ligneuses et pérennes à l'exception de *Datisca* spp. regroupant des herbacées pérennes. Ce sont des espèces de précoce à moyenne-succession dans le développement des communautés végétales, notamment par fructification abondante ou reproduction végétative importante et par intolérance à l'ombre (Dawson, 2008). L'interaction entre la bactérie et la plante-hôte est un processus infectieux qui conduit à la genèse de la nodosité. Les nodosités peuvent être racinaires (majoritairement) ou bien aériennes (plus rarement) mais sont toujours des

Table 3.1 : Genres de plantes actinorhiziennes et présence de nodosités Sp+.

Sous-classe[a] Famille	Genres	Nb. d'espèces	Nodulation connue	Sp+[e]	Distribution native
Hamamelidae					
Betulaceae	***Alnus***	**47**	**47**	**oui**	Europe, Asie, Amérique N et S. (Andes), Afrique N.
Casuarinaceae	*Allocasuarina*	59	54	nc	Australie
	Casuarina	**18**	**18**	**oui**	Australie, Asie tropicale, Pacifique S-O
	Ceuthostoma	2	2	nc	Océanie
	Gymnostoma	18	18	nc	Australie, Nouvelle-Calédonie, Sumatra
Myricaceae	***Comptonia***	**1**	**1**	**oui**	Amérique N
	Myrica	**60**	**28**	**oui**	Tous continents excepté l'Australie
Rosidae					
Elaeagnaceae	***Elaeagnus***	**45**	**35**	**oui**	Europe, Asie, Amérique N
	Hippophae	**3**	**2**	**oui**	Europe, Asie
	Shepherdia	3	2	nc	Amérique N
Rhamnaceae	*Adolphia*[b]	1	1	nc	Amérique N
	Ceanothus	**55**	**31**	**oui**	Amérique N
	Colletia	17	4	nc	Amérique S
	Discaria	10	5	nc	Amérique S, Australie, Nouvelle-Zélande
	Kentrothamnus	2	2	nc	Amérique S
	Retanilla	2	nc	nc	nc
	Trevoa[c]	6	2	nc	Amérique S
Rosaceae	*Cercocarpus*	20	4	nc	Mexique, Etats-Unis d'Amérique S-O
	Chamaebatia	2	1	nc	Sierra Nevada (montagnes)
	Dryas	**3**	**1**	**oui**	Arctique
	Purshia[d]	**29**	**3**	**oui**	Amérique N-O, S-0, Mexique
Magnoliidae					
Coriariaceae	*Coriaria*	16	16	nc	Méditerranée, Asie, Nouvelle-Zélande, Amérique N
Dilleniidae					
Datiscaceae	*Datisca*	2	2	nc	Asie, Amérique N, Europe

Modifié d'après (Bond, 1983 ; Dawson *et al.*, 1986 ; Baker and Schwintzer, 1990 ; Moiroud, 1996 ; Swensen, 1996 ; Huguet, 2003 ; Benson *et al.*, 2004 ; Dawson, 2008 ; Swensen and Benson, 2008). a, classification selon (Cronquist, 1981, 1988). b, Adolphia peut être actinorhizien, mais cela n'a pas été confirmé (Cruz-Cisneros and Valdes) ; A. infesta (Kunth) Meisn. et Colubrina infesta (Kunth) Schltdl. sont synonymes avec le basionyme Ceanothus infestus (Kunth). c, Talguena doit être combiné à et classé sous Trevoa (Tortosa, 1992). d, Cowania doit être combinée à et classée sous Purshia (Henrickson). e, Sp+ : modifié d'après (Torrey, 1987 ; Schwintzer, 1990), voir détails et références dans la Table 3.3. nc, non communiqué.

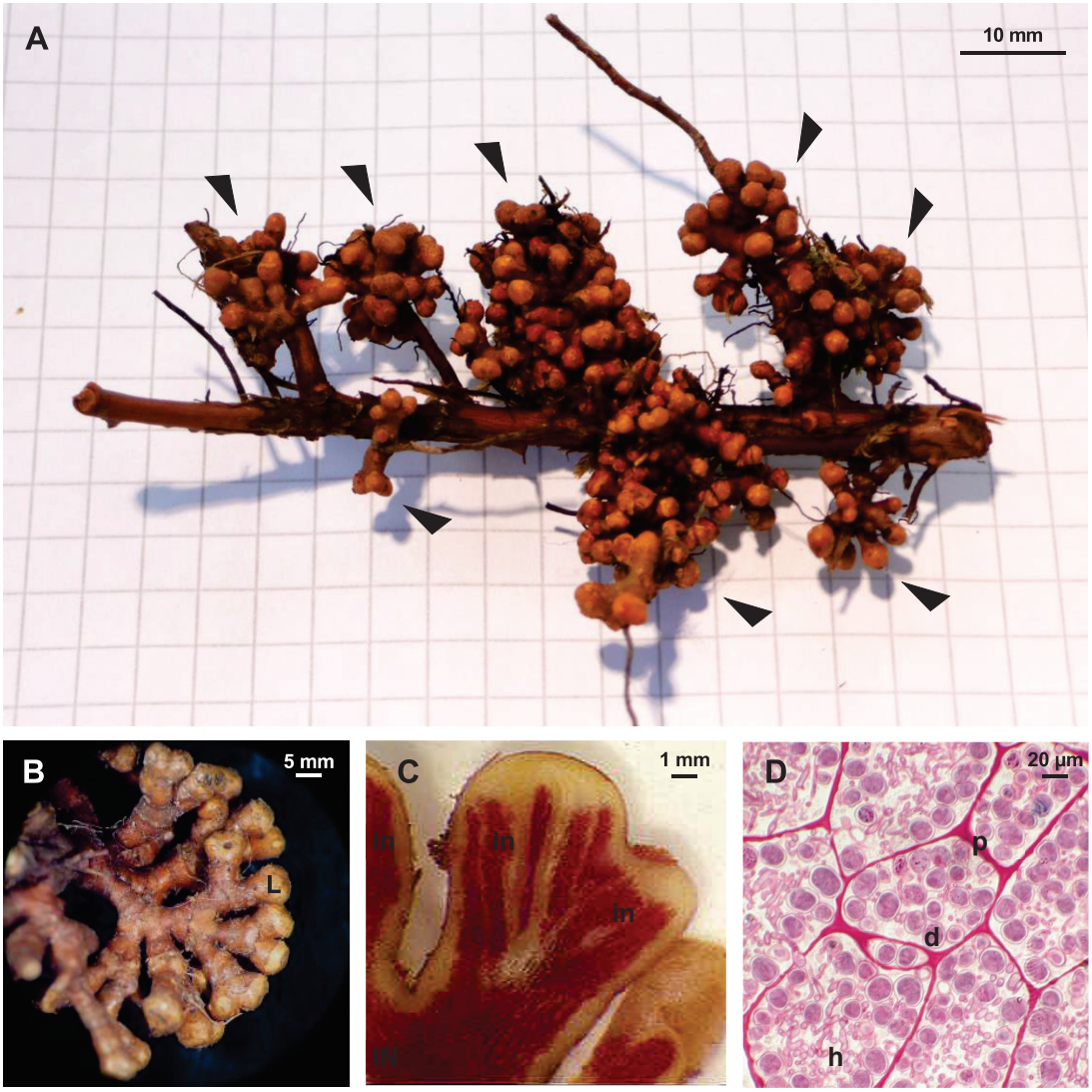


Figure 3.2 : Nodosités actinorhiziennes et microsymbiote *Frankia*.

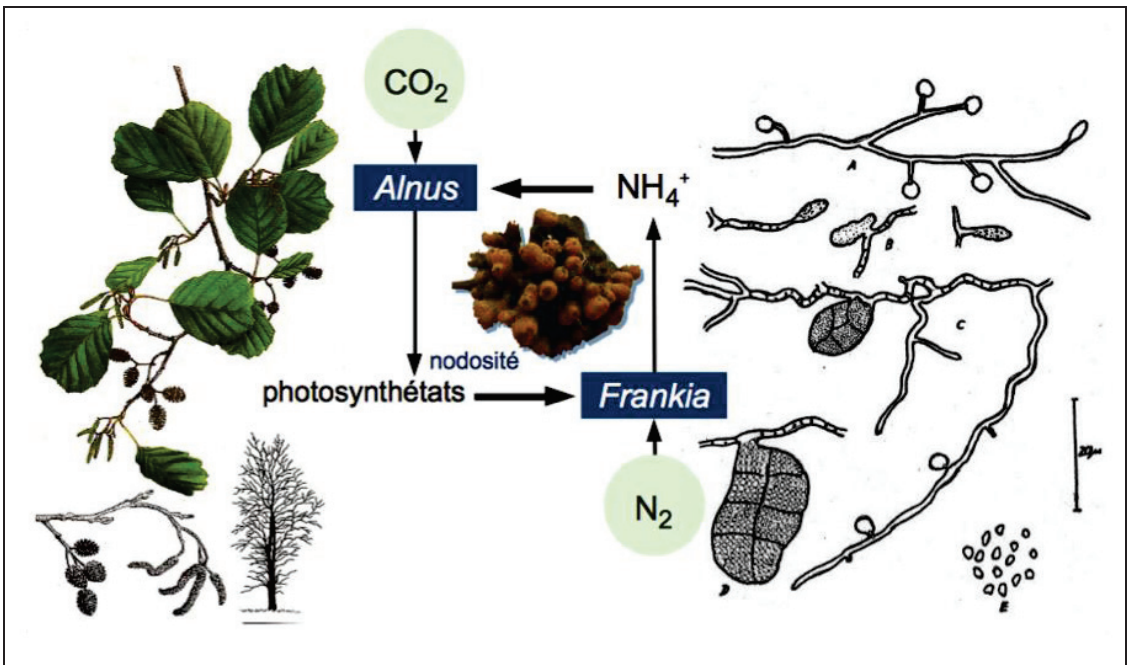
(A). Racine d'*Alnus glutinosa* et nodosités. La racine porte de nombreuses nodosités (flèches noires) dont la formation commence au point d'infection de *Frankia* (poil racinaire pour l'espèce-hôte *Alnus* sp.). La forme et la couleur des nodosités peuvent varier selon l'espèce-hôte, la souche de *Frankia* et le type de sol. **(B). Détail de la structure d'une nodosité d'*Alnus glutinosa*.** Observation à la loupe binoculaire qui met en évidence les branchements coralloïdes et les lobes (L) à l'apex. **(C). Coupe longitudinale à mainlevée d'une nodosité de *Casuarina* sp.** La coloration au phloroglucinol met en évidence les zones lignifiées infectées. La zone infectée à la base de la nodosité (IN) est à l'origine de l'infection des zones à l'apex (in). **(D). Coupe transversale semie-fine d'une nodosité d'*Alnus glutinosa*.** La coloration de Schiff-Vert-de-Malachite met en évidence les hyphes (h) et les diazovésicules (d), tous deux en rouge et qui sont visibles à l'intérieur des cellules végétales (p, paroi cellulaire) colonisées par *Frankia*.

(A-B). A. C. Pozzi. (C). R. H. Berg . (D). A. Herrera-Belaroussi et R. Pépin.

racines modifiées. Elles sont constituées de tissus végétaux indifférenciés dont certaines cellules végétales abritent de très nombreuses cellules bactériennes endosymbiotiques (Figure 3.2).

Nature de la symbiose actinorhizienne

Cette symbiose est décrite comme mutualiste car les échanges trophiques entre partenaires sont bénéfiques et réciproques (Figure 3.3).



<u>Figure 3.3 : Echanges trophiques dans la symbiose actinorhizienne *Frankia-Alnus.*</u>

Dans la nodosité racinaire, *Frankia* réduit le diazote atmosphérique (N minéral, N_2), pourvoyant la plante-hôte (par exemple *Alnus* sp.) d'une source non limitante d'azote assimilable (N organique, par exemple sous forme NH_4^+ ou acide aminé), et en échange, la bactérie utilise les photosynthétats (carbone organique) de la plante-hôte pour sa propre croissance et pour alimenter le processus de fixation d'azote très gourmand en énergie.

Dessin botanique *A. glutinosa*, inconnu ; nodosité racinaire d'*Alnus rubra*, D.R. Benson ; schéma *Frankia*, (Pommer, 1959) ; figure générale, A.C. Pozzi.

L'azote étant le premier facteur limitant de la croissance végétale après l'eau, l'association avec *Frankia* confère aux plantes actinorhiziennes la capacité de coloniser des milieux dépourvus ou pauvres en azote. Les plantes actinorhiziennes sont donc des végétaux pionniers, l'apport de matière organique par leur litière permettant de constituer un sol qui sera colonisé ultérieurement par d'autres espèces végétales plus compétitives qui tendront à les remplacer à long terme. Les composés carbonés étant le facteur limitant

la fixation d'azote et donc la croissance de *Frankia*, l'association avec une plante-hôte confère à *Frankia* la capacité d'atteindre des grands effectifs et des dimensions cellulaires importantes dans la nodosité qui sont rarement rencontrées chez les *Frankia* vivant à l'état libre (observation personnelle à partir de données issues de cultures *in vitro* et extrapolées au sol, comparées aux observations faites dans les nodosités).

Cette association est également décrite comme facultative car les partenaires peuvent croître l'un sans l'autre comme le montre la culture axénique de plantes actinorhizienne et l'isolement et la croissance en culture pure de nombreuses souches de *Frankia* réalisées en routine au laboratoire. Ainsi, les partenaires peuvent être associés ou non dans la nature, et chacun peut être cultivé *in vitro* indépendamment de l'autre.

3.1.2. Intérêts écologiques

La symbiose actinorhizienne contribueraient jusqu'à 25% du total de la fixation globale d'azote terrestre et a donc un rôle important dans son cycle biogéochimique (Dixon and Wheeler, 1986). Les plantes actinorhiziennes ont un rôle d'espèces pionnières et facilitatrices de l'entrée d'azote organique (assimilable) dans les habitats pauvres en azote et ont donc un impact sur l'économie de cet élément dans la végétation naturelle. Les plantes actinorhiziennes sont de ce fait utilisées en agroforesterie (« *nursing trees* » dans les plantations d'espèces d'arbres ayant une plus grande valeur) et bioremédiation de sols perturbés (réhabilitation de sols érodés par reconstitution du sol, stabilisation de berges de cours d'eau, de dunes, de pentes pour limiter l'érosion). Revue des usages dans (Tjepkema and Schwintzer, 1990).

En tant que modèle d'étude, *Frankia* est une bactérie qui présente des traits d'histoire de vie (THV) facilement identifiables, et gère l'allocation de ressources entre formes actives (hyphes, diazovésicules) et formes dormantes (spores) de manière variable *in vitro* et *in planta*. La dormance peut se produire dans un contexte symbiotique, ce qui implique une problématique à la fois spatiale et temporelle due à l'écologie pionnière de l'hôte. Cela fait de la symbiose actinorhizienne un modèle biologique pertinent pour l'étude de l'évolution des THV en environnement variable.

3.1.3. Histoire évolutive de *Frankia*

Systématique

La systématique de *Frankia* sp. est la suivante : Regio, *Bacteria* ; Regnum, *Bacteria* ; Phylum, *Actinobacteria* ; Classis, *Actinobacteria* ; Subclassis, *Actinobacteridae* ; Ordo, *Actinomycetales* ; Subordo, *Frankineae* ; Familia, *Frankiaceae* ; Genus, *Frankia* (Whitman, 2012). Le genre *Frankia* est le seul représentant de la famille des *Frankia*ceae (Wheeler *et al.*, 2008). Les genres actinobactériens qui en sont les plus proches sont *Acidothermus cellulolyticus*, *Actinoplanes* spp et *Geodermatophilus* spp. (Normand *et al.*, 1996). *Frankia* a été mise en évidence dans des sols âgés de 100 M années (Normand and Bousquet, 1989).

Taxonomie

La description des espèces de *Frankia* est basée sur un ensemble de critères moléculaires, morphologiques, physiologiques, biochimiques et sérologiques ainsi que sur les spectres d'hôtes (revue et limites des différentes approches dans Lechevalier and Lechevalier, 1990 et Swensen and Benson, 2008). Ici nous nous concentrerons sur les critères qui seront utilisés dans notre approche : les critères moléculaires (ADN) et morphologiques (sporanges multiloculaires). *Frankia* est un organisme dont l'ADN est très riche en bases G et C (environ 65-75%). Les séquences de l'ADNr 16S présentent une faible variabilité qui ne permet pas de distinguer les souches en dessous du genre, d'où la nécessité d'employer un ou plusieurs marqueurs plus variables tout en restant conservés d'une souche à l'autre. Neuf (Fernandez *et al.*, 1989) puis douze (Normand and Fernandez, 2009) espèces génomiques ont été définies sur la base de l'homologie ADN-ADN de souches de *Frankia* isolées et cultivées *in vitro*. Des caractères morphologiques uniques parmi les actinobactéries, permettent d'identifier les membres du genre *Frankia* en particulier la production, en culture *in vitro*, de sporanges multiloculaires *i.e.* arrangés dans plusieurs plans de l'espace (Figure 3.4). Les sporanges peuvent aussi être formés dans les nodosités (van Dijk, 1978 ; Normand and Lalonde, 1982 ; Lechevalier, 1983 ; Holman and Schwintzer, 1987 ; Lechevalier and Lechevalier, 1990), à l'intérieur même des cellules végétales.

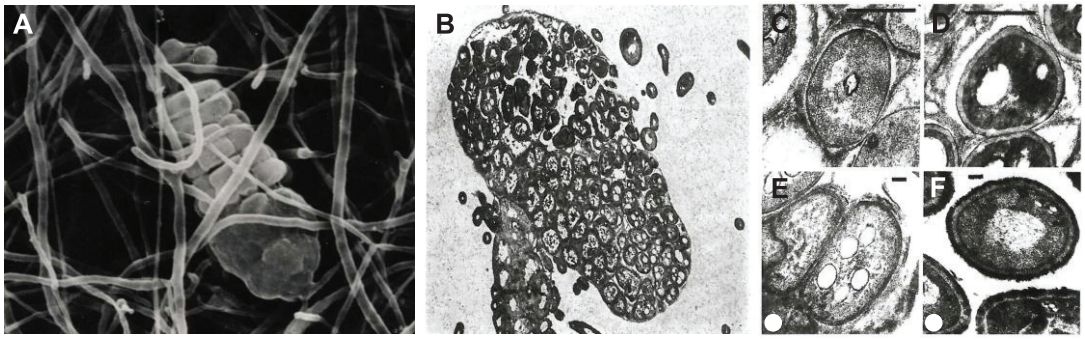


Figure 3.4 : Sporanges et spores de *Frankia*.

(A). Jeune sporange et hyphes de *Frankia* observés en microscopie électronique à balayage. Les sporanges sont ronds, cylindriques ou irréguliers et remplis de spores, matures et jeunes qui coexistent souvent dans le même sporange. **(B). Sporange en état de maturation observé en microscopie électronique à transmission.** Les spores en développement ont des régions nucléoïdes transparentes aux électrons avec des fibrilles dispersées et de nombreuses gouttelettes lipidiques. Un résidu d'enveloppe laminée est visible sur les parois extérieures. **(C-F). Etapes de la maturation des spores observée en microscopie électronique à transmission.** (C). Spores avec une paroi fine à simple couche. (D). Spores avec une paroi fine à double couche. (E et F). Spores matures avec un système membranaire extérieur et une paroi fine, correspondant respectivement à C et D. Echelle : C-D, 1 µm ; E-F, 0,1 µm.

(A). Y. Prin. (B-C). (Horrière *et al.*, 1983).

Phylogénie

Dans les phylogénies de référence basées sur les séquences de l'ADNr 16S, le genre *Frankia* apparaît comme un groupe monophylétique constitué de 4 clusters correspondant aux groupes d'infection: les souches du cluster 1 sont infectives des Myricaceae, Casuarinaceae et *Alnus* (Betulaceae), celles du cluster 2 sont les symbiotes non-cultivés *in vitro* de *Dryas* (Rosaceae), *Coriaria* (Coriariaceae), *Datisca* (Datiscaceae) et *Ceanothus* (Rhamnaceae), celles du cluster 3 sont infectives des Elaeagnaceae et Rhamnaceae, et les souches du cluster 4 sont atypiques et dites « inefficientes » (ne fixent pas l'azote) ou « non-infectives » (ne nodulent pas) (Normand *et al.*, 1996 ; Benson and Dawson, 2007) (Figure 3.5). Ces clusters sont conservés dans les travaux plus récents et quelle que soit l'approche moléculaire (Bautista-Guerrero *et al.*, 2011 ; Nouioui *et al.*, 2011 ; Gtari *et al.*, 2012 ; Pozzi *et al.*, 2015 ; Bautista-Guerrero *et al.*, non publié). Les souches du cluster 1 (incluant donc les *Frankia* infectives d'*Alnus*) sont les plus spécialisées car elles n'infectent que trois familles d'un seul clade majeur, les Hamamelidae (Figure 3.5).

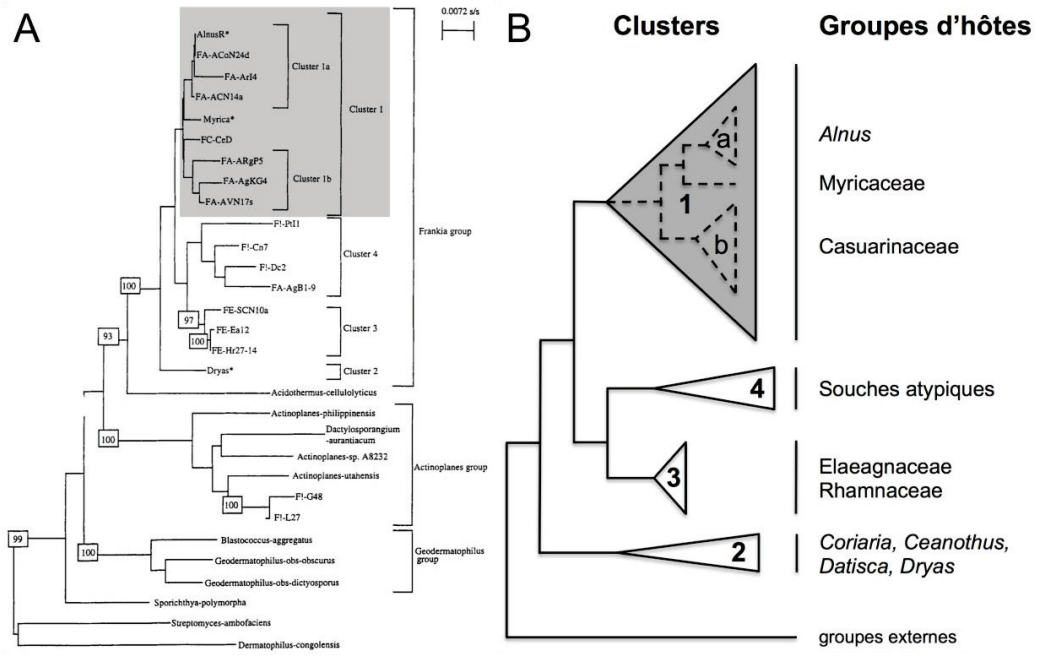


Figure 3.5 : Phylogénies de référence du genre *Frankia*.

(A). Phylogénie du genre *Frankia* et des genres apparentés. L'arbre phylogénétique a été obtenu par Neighbor-Joining sur 1 389 sites de l'ADNr 16S. Seules les valeurs de bootstraps >90% sont indiquées (nombres encadrés). Echelle : 0,0072 substitutions par site (s/s). En gris, les souches du cluster 1. **(B). Représentation schématique simplifiée de la phylogénie du genre *Frankia*.** Les souches du cluster 1 incluant les *Frankia* infectives d'*Alnus* sp., des Myricaceae et des Casuarinaceae sont mises en évidence par les encadrés gris. Au sein de ce cluster, les *Frankia* sont regroupées par l'espèce (*Alnus*, 1a) ou la famille (Myricaceae ; Casuarinaceae, 1b) de l'hôte.

(A). (Normand *et al.*, 1996) . (B). A. C. Pozzi, modifié d'après (Normand *et al.*, 1996).

3.1.4. Ecologie et cycle de vie de *Frankia*

Reproduction

La reproduction de *Frankia* est asexuée (*i.e.* clonale) et peut prendre deux formes différentes : elle se déroule soit par division/scissiparité des cellules (articles) qui résulte en l'allongement des hyphes (filaments) déjà existants (taux de doublement > 15 heures, *in vitro*), soit par différentiation cellulaire de sporanges contenant de nombreuses spores (sporogénèse 1-2 semaines). Les articles interconnectés forment des hyphes pluricellulaires plus ou moins ramifiés. Chaque article (cellule active, 0,3-2 µm de long) est capable individuellement d'exploiter les ressources trophiques du milieu environnant pour sa propre croissance, maintenance et reproduction mais contribue également à la croissance, la maintenance et la reproduction de l'ensemble de la population d'article auquel il est connecté (organisme pluricellulaire). Les

spores (cellules dormantes, 1-2 µm de diamètre) sont capables de donner ultérieurement et individuellement un nouvel article libre lorsqu'elles germent. Les articles ont également la capacité de s'engager dans une autre différentiation cellulaire qui produit des diazovésicules (cellules spécialisées dans la fixation d'azote, 5-20 µm de diamètre) (Figure 3.6).

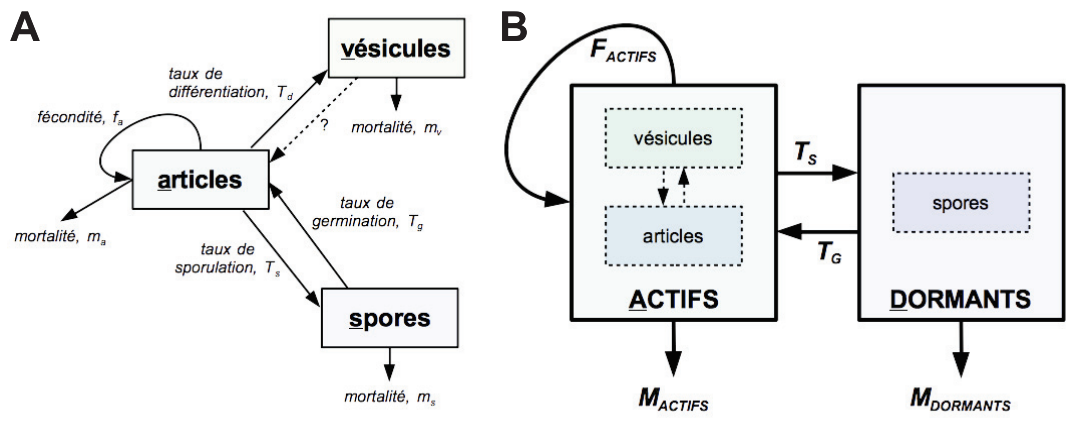


Figure 3.6 : Formes cellulaires et paramètres de la reproduction de *Frankia*.

(A). Schéma complet. L'article est la forme-clé qui peut se reproduire pour donner des descendants actifs (nouveaux articles) avec une fécondité (f_a) ou des descendants dormants (spores) avec un taux de sporulation (t_s), ainsi que se différencier en vésicules avec un taux (t_d). Chaque forme cellulaire différenciée résulte de l'allocation de ressources faite par *Frankia* et est associé à des mortalités différentes ($m_a \neq m_s \neq m_v$). Les spores peuvent retourner à une vie active avec un taux de germination (t_g). Il n'est pas formellement établi dans la littérature que les vésicules puissent se dédifférencier en articles (*?*). **(B). Schéma simplifié.** Les articles et les vésicules sont regroupés comme individus actifs pour la reproduction avec une fécondité (F_{ACTIFS}) et un taux de sporulation (T_s) donnant des descendants dormants. Les individus dormants peuvent produire à leur tour des actifs à un taux de germination (T_g). Formes actives et dormantes ont une mortalité telle que $M_{ACTIFS} < M_{DORMANTS}$ (au moins en conditions environnementales défavorables à la vie active).

A.C. Pozzi.

Cycle de vie

Frankia a la capacité de s'associer aux plantes actinorhiziennes par un processus infectieux qui aboutit au développement de la nodosité. La transmission de *Frankia* est horizontale et peut donc se faire entre individus-hôtes apparentés ou non. Plusieurs génotypes du symbiote peuvent être hébergés chez un même individu de plante-hôte dans des nodosités différentes. La transmission horizontale de *Frankia* implique que son cycle de vie se réalise dans deux compartiments, ou niches, très différents : la plante-

hôte (nodosité) pour la phase associée du cycle de vie et le sol pour la phase libre (ou saprophyte) du cycle de vie. Ces deux compartiments n'ont a priori pas la même qualité. La nodosité est un compartiment de bonne qualité pour la vie active de *Frankia* (milieu nutritif riche, protection physique contre le dessèchement, contre la prédation...) où le temps de résidence de *Frankia* peut être long, les nodosités étant des structures pérennes (jusqu'à l'extinction de la nodosité)[19]. Le sol est par contre un compartiment de moins bonne qualité pour la vie active (oligotrophe, dessèchement, prédation...) et dans lequel *Frankia* peut également résider longtemps (le temps de rencontrer un site d'infection disponible sur une plante hôte compatible)[20]. Ces deux compartiments sont soumis à des variations environnementales journalières et saisonnières (alternances jour/nuit et photosynthèse/respiration, variations de température, d'humidité, de pH, variations de l'allocation des ressources de la plante dues à la phénologie...). Ces variations plutôt régulières pourraient être en partie prévisibles par une bactérie dans la nodosité ou dans le sol (*via* des indicateurs environnementaux corrélés). Par contre, le passage d'un compartiment à l'autre (du sol à la nodosité, et inversement) sont des étapes du cycle de vie qui pourraient être, au moins en partie, imprévisibles, et introduire une forte hétérogénéité dans le cycle de vie de *Frankia*.

Présence dans les sols et migration

Frankia est généralement présente dans les sols sous la plante hôte mais aussi dans des sols dépourvus de l'hôte et même sur des sites où l'hôte n'a pas poussé depuis longtemps (Valdes, 2008). Elle est présente dans de très nombreux écosystèmes depuis les sols circumpolaires (Huss-Danell *et al.*, 1999) aux sols caillouteux volcaniques (Burleigh and Dawson, 1994) et même des sédiments lacustres (Huss-Danell, 1997). *Frankia* est également présente dans des sols nouvellement formés comme les sols de retraits glaciaires et les dunes côtières (Valdes, 2008). Il existe cependant certains sols où la présence

---

[19] En l'absence de données bibliographiques sur la durée d'existence moyenne d'une nodosité et la variabilité de cette durée moyenne, il est difficile d'estimer une durée de résidence de *Frankia* dans une nodosité. Au minimum, ce pourrait être la durée de formation de la nodosité (environ 2 semaines, soit l'équivalent de plus d'une vingtaine de générations de *Frankia* avec un taux de doublement de 15h) et au maximum la durée de vie de l'hôte (plusieurs dizaines ou centaines d'années, soit l'équivalent de 5840 générations par dizaine d'année avec un taux de doublement identique et constant).

[20] Similairement, il est difficile d'estimer la durée moyenne de résidence de *Frankia* dans le sol. La durée pourraient en être encore plus grand que dans la nodosité. Au minimum, cela pourrait être quelques heures (1 génération de *Frankia* tout au plus) à une ou plusieurs centaines d'années (plusieurs dizaines de milliers de générations de *Frankia*).

de *Frankia* n'est pas reportée (Arveby and Huss-Danell, 1988 ; Huss-Danell, 1997). La présence de *Frankia* varie spatialement (Paschke and Dawson, 1994 ; Simonet *et al.*, 1999) et temporellement (Wollum *et al.*, 1968) donnant différentes dynamiques de population. La population de *Frankia* capable de noduler (bactéries physiologiquement actives) est de 0,2-2940 unités nodulantes par gramme de sol, mais cette quantité ne représente qu'une petite fraction de la population totale de *Frankia*, estimée à 2-92 milliers d'unités génomiques par gramme de sol (Myrold and Huss-Danell, 1994). La présence et la viabilité de *Frankia* sur les sols même dépourvus d'hôte peuvent être expliquées par le fait que cet organisme peut croître saprophytiquement, qu'il peut avoir une descendance dormante (spores) et qu'il peut disséminer spatialement. Des préparations d'hyphes et de spores séchées peuvent survivre et rester infectieuses (Rodriguez-Barrueco, 1968 ; Burleigh and Torrey, 1990 ; Tortosa and Cusato, 1991) leurs fonctions de photoréactivation (Sayed, 2011) permettant à ces dernières le maintien de l'intégrité du message génétique. La dissémination spatiale de *Frankia* est hydrochore et zoochore (revue des vecteurs dans Chaia *et al.*, 2010) et probablement anémochore (dispersion de particules de sol, Dawson, 2008)), ce qui fait qu'elle peut migrer sur de grandes échelles spatiales, relativement à ses propres dimensions.

3.1.5. *Alnus* sp., un hôte modèle pour l'étude de la symbiose actinorhizienne et de la sporulation *in planta*

Le genre *Alnus* est, avec *Myrica* sp., le genre actinorhizien où se déroule le plus fréquemment la sporulation *in planta* (Schwintzer and Tjepkema, 1990). *Alnus* sp. nodule facilement dans et en dehors de son aire géographique qui est très large, on lui reconnaît donc une nodulation ubiquiste. Ces trois caractéristiques en font un hôte végétal modèle pour l'étude de la symbiose actinorhizienne, de la diversité de *Frankia* et de la sporulation *in planta*. Cela peut être dû au fait qu'il s'associe à un mélange hétérogène de souches, ou alternativement au fait que certains génotypes de *Frankia* présentent une distribution géographique plus large que celle de leurs hôtes, parce que les microsymbiotes auraient (i) de meilleurs capacités de dispersion, (ii) de meilleurs aptitudes saprophytiques et/ou compétitives, ou (iii) seraient maintenus dans les rhizosphères de plusieurs plantes non-actinorhiziennes. Les données palynologiques sur *Alnus* sp. sont abondantes ce qui permet de tracer les dynamiques de peuplement à l'échelle des temps géologiques,

comme la survie aux dernières périodes de glaciations dans les zones refuges et la recolonisation postglaciaire depuis ces zones (*cf.* ANNEXE B).

3.1.6. Histoire évolutive d'*Alnus* sp.

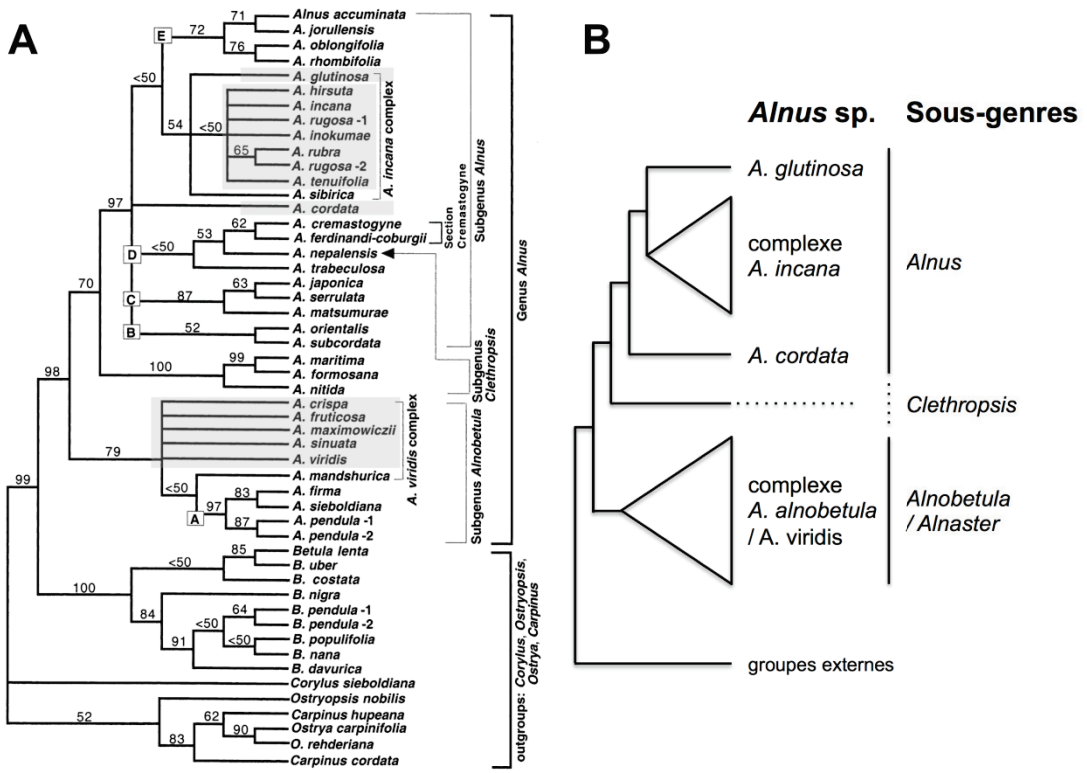


Figure 3.7 : Phylogénies de référence d'*Alnus* sp.

(A). Phylogénie du genre *Alnus* et des genres apparentés. L'arbre phylogénétique a été obtenu par Parcimonie sur 618 sites de l'ADNnr ITS (espaces internes traduits de l'ADN ribosomal nucléaire). Consensus strict des 18 arbres les plus parcimonieux sur 335 étapes (index de consistance : 0,76 et index de rétention : 0,92). Valeurs de bootstraps calculées sur 10 000 réplicats. La classification traditionnelle du genre *Alnus* est indiquée à droite. **(B). Représentation schématique simplifiée de la phylogénie du genre *Alnus*.** Seules les relations entre les principales espèces étudiées dans nos travaux sont représentées. *A. glutinosa* et *A. incana* (et ses sous-espèces formant un complexe d'espèce) sont des espèces-sœurs et apparentées à *A. cordata*, ces trois espèces appartenant au sous-genre *Alnus*. *A. viridis* (et ses sous-espèces formant un complexe d'espèce) appartient au sous-genre *Alnobetula/Alnaster* qui est et basal dans la phylogénie.

(A). (Chen and Li, 2004) . (B). A. C. Pozzi, modifié d'après (Chen and Li, 2004).

Systématique

La systématique du genre *Alnus* est la suivante : Regnum, *Plantae* ; Cladus, *Angiosperms* ; Cladus, *Eudicots* ; Cladus, *Core eudicots* ; Cladus, *Rosids* ; Cladus, *Eurosids I* ; Ordo, *Fagales* ; Familia, *Betulaceae* ; Subfamiliae, *Betuloideae* ; Genus,

Alnus (Cronquist, 1981). Trois sous-genres sont distingués selon les structures des bourgeons, des chatons et des fleurs, la veinure des feuilles, et la phénologie : *Alnus*, *Alnaster* ou *Alnobetula* et *Clethropsis*. Le registre fossile des angiospermes indique une origine continentale asiatique, à partir du Crétacé supérieur 70-100 Ma (Furlow, 1979). Des pollens de Betulaceae similaires à ceux d'*Alnus* sont trouvés au Crétacé supérieur 87,5-66 Ma et des fossiles de structures reproductives d'aulne au Paléocène (Crane, 1989).

Phylogénie

L'Asie du nord est un centre d'origine probable du genre *Alnus* car cette région a le plus grand nombre d'espèces d'aulne et aussi le plus haut niveau d'endémisme de l'aulne (Murai, 1964 ; Navarro *et al.*, 2003). Le sous-genre *Alnaster* (ou *Alnobetula*), représenté par *A. viridis* (ou *A. alnobetula*) et ses sous-espèces très répandues en climats froids et marges glaciaires, présente une position phylogénétique basale, une vitesse évolutive lente et des caractères morphologiques primitifs, ce qui en fait le genre le plus proche de la forme ancestrale des aulne (Navarro *et al.*, 2003 ; Chen and Li, 2004 ; Ren *et al.*, 2010) (Figure 3.7).

3.1.7. Ecologie et cycle de vie d'*Alnus* sp.

L'aire géographique d'*Alnus* sp. s'étend sur tout l'hémisphère nord et une partie limitée de l'Amérique du Sud. C'est un genre pionnier colonisateur plus fréquemment rencontré sur sols humides mais également dans des habitats secs. Le sous-genre *Alnobetula* (*Alnus viridis* et ses sous-espèces dans notre étude) est typiquement adapté aux régions boréales et montagneuses ; le sous-genre *Alnus* (*Alnus glutinosa*, *Alnus incana* et *Alnus cordata* ainsi que leurs sous-espèces respectives dans notre étude) est retrouvé dans les milieux tempérés ; le sous-genre *Clethropsis* (non étudié ici) est plutôt de type relique (peu d'espèces, peu d'habitats) (Figure 3.8).

Les espèces du genre *Alnus* ont une reproduction sexuée (monoïque) ainsi qu'une reproduction asexuée (clonale). La maturité sexuelle est précoce (3-6 ans) en conditions naturelles. La pollinisation est anémogame et l'effort

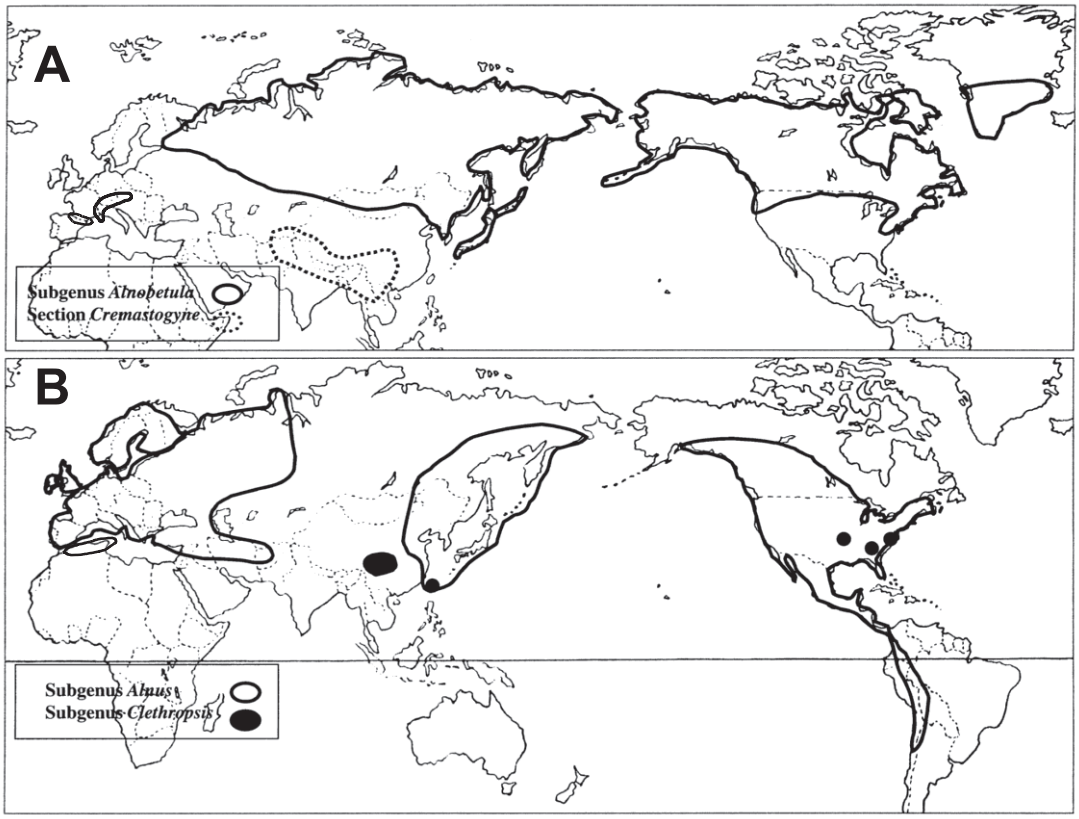


Figure 3.8 : Aires géographiques du genre *Alnus* et de ses sous-genres.

(A). Sous-genre *Alnaster/Alnobetula*. Les espèces de ce sous-genre sont reportées uniquement dans l'hémisphère Nord, et en très grande majorité autour et au delà du cinquantième parallèle, excepté pour la section *Cremastogyne* (Figure 4.7) présente sur le plateau himalayen et pour les populations *d'A. viridis/A. Alnobetula* des Alpes, des Pyrénées et de la Corse que nous avons ajouté à cette carte. **(B). Sous-genres *Alnus* et *Clethropsis*.** Le sous-genre *Alnus* peuple trois ensembles géographiques déconnectés, l'Europe côtière et continentale, l'Asie orientale et l'Amérique du Nord (principalement) avec des incursions en Amérique du Sud (le long de la chaîne des Andes). Nous avons également ajouté les populations d'*A. glutinosa* des refuges glaciaires d'Afrique du Nord. Le sous-genre *Clethropsis* a une répartition beaucoup plus ponctuelle.

Modifié d'après (Chen and Li, 2004).

reproductif est très important (propagules sexuées : plusieurs millions de grains de pollens par chaton, plusieurs centaines à milliers de chatons par individu annuellement, plusieurs milliers de graines par individus annuellement) (Bousquet and Lalonde, 1990). Le fruit est de type akène et les graines ont une dissémination anémochore et hydrochore (McVean, 1953 ; Furlow, 1979). La germination des graines est épigée et le succès de la

germination variable d'une année à l'autre. La stratification[21] peut être nécessaire pour obtenir la germination, ce qui indiquerait qu'une part que la production de graines constitue une banque pour une germination avec délai (Bousquet and Lalonde, 1990) et peut expliquer l'absence de recrutement sur une période d'au moins 3 ans (Huenneke, 1987). La propagation clonale d'*Alnus* sp. est très fréquente, avec comme conséquences une homogénéité génétique des plantes d'une même aulnaie (futaie d'aulnes), une survie supérieure à ce que peuvent mesurer les analyses dendrométriques, ainsi qu'une colonisation persistante de sites périodiquement inondés ou recouverts de neige (Bousquet and Lalonde, 1990). Le tableau 3.2 présente les caractéristiques écologiques et phénologiques des quatre espèces d'aulne principales étudiées dans nos travaux.

Table 3.2 : Caractéristiques écologiques et phénologiques des espèces d'aulne étudiées.

Caractère	*Alnus* sp.			
	A. glutinosa	***A. incana***	***A. cordata***	***A. viridis***
Type biologique taille indicative	méso-phanérophyte < 16 m	méso-phanérophyte < 16 m	phanérophyte > 32 m	micro-phanérophyte < 8 m
Hydrophilie	très forte	forte	forte	moyenne
Etage	plaine, collinéen	collinéen, montagnard	collinéen, montagnard	montagnard, subalpin
Floraison	fév.-avr.	fév.-mar.	fev.-mar.	mai-juil.
Fructification	sep.-oct.	sep.-oct.	sep.	

D'après Baseflor : Julve, Ph., 2014 ff. - Baseflor. Index botanique, e cologique et chorologique de la flore de France. Version : 25 avril 2014. http://perso.wanadoo.fr/philippe.julve/c atminat.htm (McVean, 1953 ; Lhote, 1986).
Les étapes de la phénologie végétale peuvent être considérées comme des indicateurs de l'allocation des ressources carbonées et azotée que le végétal investit, dans les parties aériennes comme les parties racinaires (dont les nodosités), entre traits d'histoire de vie de la croissance, de la maintenance et de la reproduction. La variabilité dans les périodes données dépend des conditions climatiques annuelles et de l'état physiologique individuel du végétal.

[21] Dans la nature, la dormance des graines est généralement levée suite au passage de la graine dans le sol pendant une période hivernale où son tégument dur est ramolli par le gel et l'action des intempéries. Cette période humide et froide déclenche le développement de l'embryon de la graine, sa croissance et son expansion subséquente jusqu'à percer le tégument ramolli dans sa recherche de lumière et de nutriments. Ce faisant, la graine subit une forme naturelle de stratification, qui peut être reproduite de manière artificielle au laboratoire.

3.2. La sporulation *in planta* de *Frankia*

3.2.1. Définition de la sporulation *in planta*

Premières descriptions des nodosités « Spore-positives » (Sp+)

La présence de structures dites « bactéroïdes », plus tard identifiées comme sporanges et spores, et différentes des hyphes et des vésicules actinobactériens a été remarquée assez tôt dans les nodosités actinorhiziennes (Peklo, 1910 ; MacLuckie, 1923 ; Arcularius, 1928). Ces auteurs ont distingué les nodosités avec ou sans bactéroïdes, ainsi que leur localisation dans les cellules végétales ou dans les espaces intercellulaires quand ces bactéroïdes étaient présents. Il faudra attendre les travaux de microscopie électronique sur des nodosités actinorhiziennes (van Dijk and Merkus, 1976) et d'isolement et culture *in vitro* de *Frankia* (Callaham *et al.*, 1978) pour établir définitivement que les sporanges sont produits aussi bien dans les nodosités (*in planta*) qu'en culture pure (*in vitro*). La sporulation *in planta* est décrite dans les nodosités de 9 des 25 genres de plantes-hôtes actinorhiziennes (*cf.* Tables 3.1 et 3.3). Ce type de nodosité est appelée « Spore-positive » ou « Sp+ » ou parfois « P type » (*positive for sporangia*) (van Dijk, 1978). L'autre type, plus courant, est appelée « Spore-négatif » ou « Sp– » ou parfois « N type » (*negative for sporangia*) (Lechevalier and Lechevalier, 1990).

Développement et localisation des spores dans la nodosité

D'après certains auteurs, l'apparition des sporanges débuterait tardivement dans le développement du lobe nodulaire et coïnciderait avec la sénescence des diazovésicules de *Frankia* dans les cellules infectées (Torrey, 1987 ; Schwintzer, 1990 ; VandenBosch and Torrey, 1985). Cependant, leurs travaux ne permettent pas de distinguer si la formation de sporanges induit la mort de la cellule hôte et donc la dégénérescence des diazovésicules de *Frankia* ou si, inversement, certains événements dans la cellule hôte conduisent à l'apparition de sporanges (VandenBosch and Torrey, 1985). En fait, les sporanges commencent à se former relativement précocement dans les nodosités des plantules. Chez *Comptonia peregrina*, les diazovésicules se différencient en 3 semaines après inoculation, les jeunes sporanges sont discernables dès 4 semaines et les sporanges matures sont présents à 6 semaines (VandenBosch and Torrey, 1985). Chez *Myrica gale* (Monz and Schwintzer, 1989) et *Alnus glutinosa*, *A. incana* ssp. *incana* et *A. cordata* (van Dijk,

1978) les sporanges sont détectés entre 6-10 semaines et dès 6 semaines après inoculation, respectivement. Des spores et des sporanges sont également détectés chez *A. glutinosa, A. incana* ssp. *incana* et *A. viridis* ssp. *viridis* dès 4-6 semaines après l'inoculation (*i.e.* dès la formation du premier ou des deux premiers lobes de la nodosité), que les plantules soient cultivées en hydroponie ou sur sol en environnement contrôlé (observations personnelles). La sporulation *in planta* débuterait donc plutôt précocement dans l'histoire de vie mais pourrait également se poursuivre en fin de saison de végétation de l'hôte.

La position dans la nodosité (apex ou base de la nodosité) où sont réalisées les coupes influence la détermination du phénotype Sp+ (Torrey, 1987 ; Schwintzer, 1990). Dans chaque lobe de nodosité, il y a en effet un gradient d'âge : *Frankia* et les cellules végétales sont plus jeunes à l'apex qu'à la base du lobe. Les sporanges commencent à se développer près de l'apex, dans une région où les diazovésicules sont tout juste matures (van Dijk, 1976). La cellule hôte commence un processus de sénescence au démarrage de la différentiation du sporange puis meurt lorsque le sporange est mature. Les sporanges matures se trouvent dans la région où les cellules hôtes contiennent les diazovésicules (van Dijk and Merkus, 1976 ; VandenBosch and Torrey, 1985) ainsi que dans les régions basales du lobe où les vésicules, les hyphes et les cellules végétales infectées semblent dégénérées (van Dijk and Merkus, 1976 ; VandenBosch and Torrey, 1985). Il est donc recommandé de réaliser les observations à la base du lobe nodulaire, dans la région contenant les cellules infectées les plus âgées et, dans le cas de nodosités pluriannuelles collectées au début de la saison de végétation de l'hôte, l'observation doit être réalisée à partir des tissus de l'année précédente (Schwintzer, 1990).

Dans la plupart des cas, une nodosité Sp+ se caractérise par des cellules végétales remplies d'abondants sporanges et par un grand nombre de spores dispersées lors de la coupe (Figure 3.9) permettant un diagnostic rapide et observable sur de nombreuses coupes issues d'une même nodosité. Lorsque les sporanges sont moins nombreux ou absents, un nombre important de coupes doit être examiné.

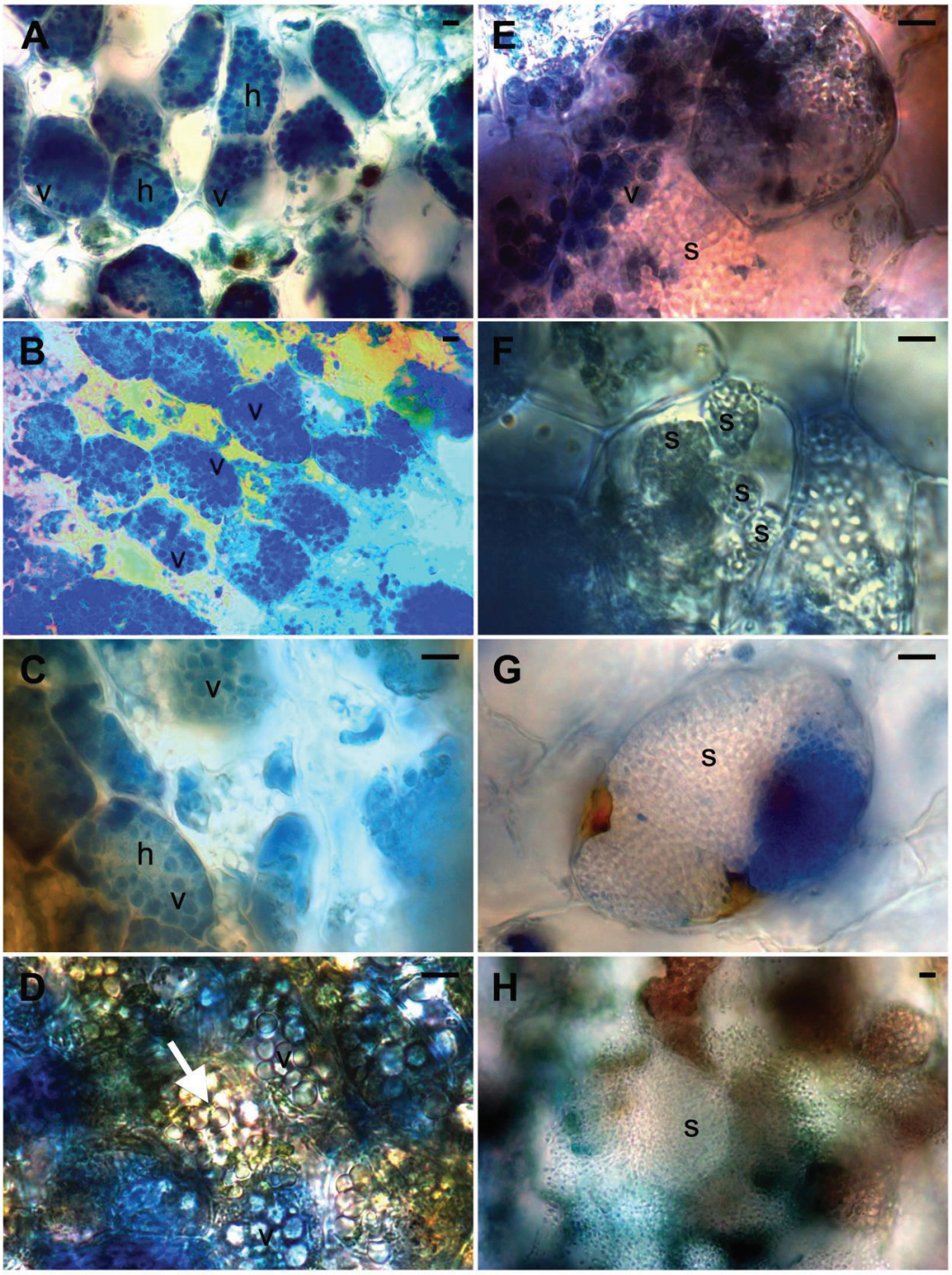
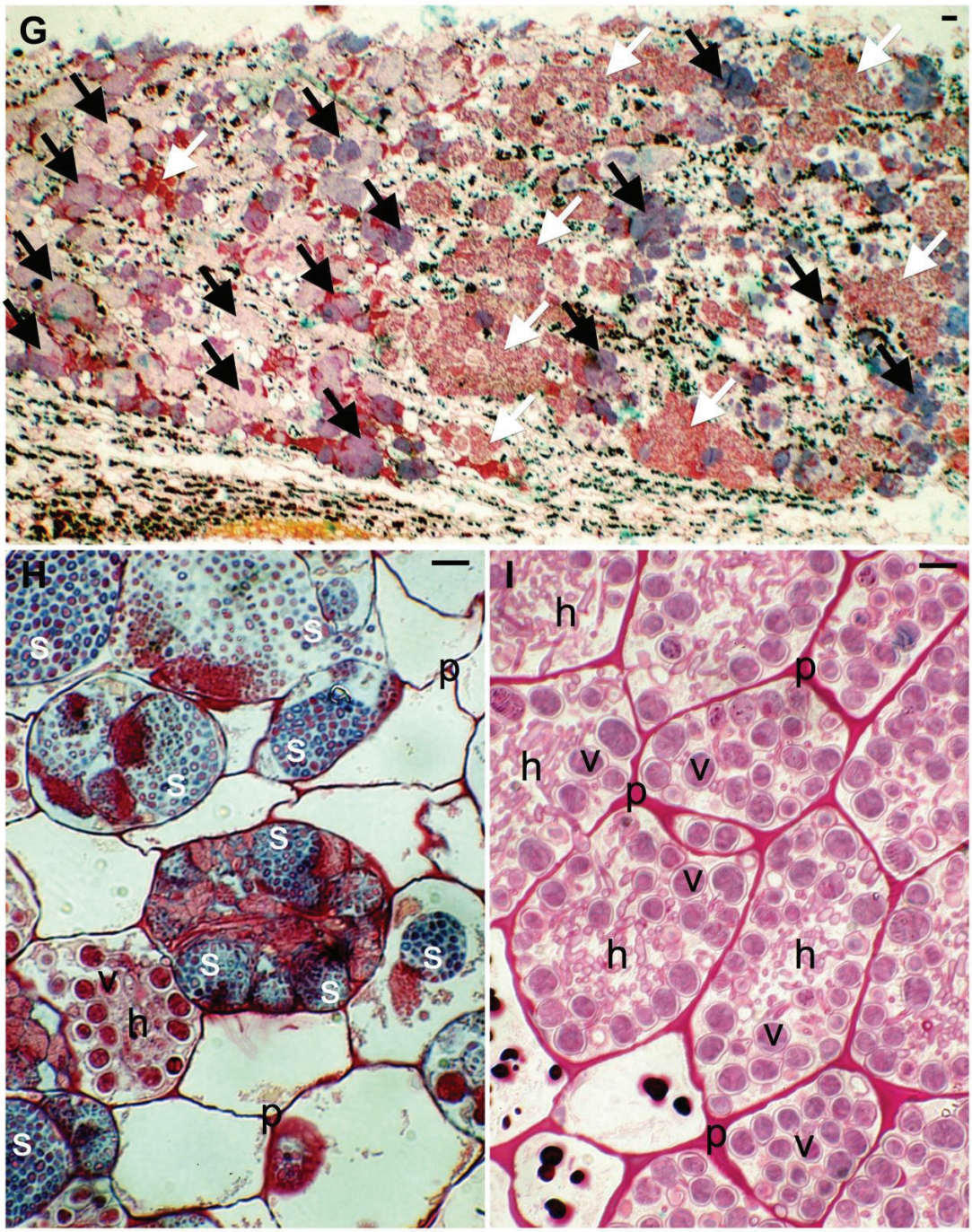


Figure 3.9 : Coupes de nodosités actinorhiziennes Sp+ et Sp–.

(A-H). Coupes transversales de nodosités d'*Alnus* sp. Observation en microscopie optique à transmission après coloration au Bleu de Lactophénol. Echelle : 20 µm. **(A-C). Cellules végétales infectées ou non par *Frankia*.** Les cellules infectées (en bleu) forment des ensembles entourés de cellules non infectées (incolores ou brunâtres). **(D). Diazovésicules en formation.** Les structures rondes et incolores sont des diazovésicules en formation car il y a absence de réfringence et présence d'hyphes branchés (flèche) **(E-H). Sporanges et spores.** Les sporanges contenant de nombreuses spores (incolores et réfringentes) peuvent colocaliser (E) ou non dans une même cellule avec les hyphes et les diazovésicules. (H) Sporange éclaté lors de la coupe.



(I-K). Coupes semi-fines de nodosités d'*Alnus glutinosa.* Observation en microscopie optique à transmission après double coloration au Schiff-Vert-de-Malachite. Echelle : 20 µm. **(I). Coupe longitudinale.** Les cellules végétales ont un très haut niveau d'infection par *Frankia* (flèches blanches, hyphes et diazovésicules ; flèches noires, sporanges). La différence d'intensité dans la coloration verte des sporanges est probablement due au degré de maturation des spores. **(J-K). Coupes transversales.** Détermination de nodosités « Spore-positive » (Sp+) et « Spore-négative » (Sp–) **(J). Nodosité Sp+.** Les cellules végétales sont colonisées par une souche de *Frankia* qui en plus des hyphes (h) et des diazovésicules (d) forme des spores (vertes) regroupées dans des sporanges (s) à l'intérieur des cellules végétales. **(K). Nodosité Sp–.** Les cellules végétales sont colonisées par une souche de *Frankia* qui ne sporule pas *in planta*. Seules les hyphes et les diazovésicules (en rouge) sont visibles. p, paroi des cellules végétale. (A-H). A. C. Pozzi. (I-K). A. Herrera-Belaroussi et R. Pépin.

Une nodosité est définie comme étant Sp+, si plus d'un sporange est observé pour 50 cellules infectées (Schwintzer, 1990). Dans le cas contraire, le nodule est considéré comme Sp–. Un phénotype intermédiaire pour les nodosités où les sporanges sont présents à une fréquence inférieure à 1 pour 50 cellules infectées a été proposé (Smolander and Sundman, 1987). Ce phénotype intermédiaire peut être assimilé au phénotype Sp– au sens large (Schwintzer, 1990) mais nous notons quand même qu'il est curieux d'observer des sporanges *in planta* et d'attribuer un phénotype Spore-négatif à la nodosité. Nous préférons réserver le phénotype Sp– pour l'absence de sporanges *in planta* et distinguer les phénotypes Sp+ où les sporanges sont peu abondant (<1 pour 50 cellules infectées) ou plus abondants (>1 pour 50 cellules infectées).

3.2.2. Déterminisme et variabilité de la sporulation *in planta*

Génotype de Frankia

Van Dijk a initialement suggéré que la capacité de sporuler *in planta* était sous le contrôle du symbiote *Frankia* et qu'il existait deux types de souches (« *two types of strains concept* », van Dijk, 1978). Ces hypothèses étaient supportées par des inoculations expérimentales utilisant des broyats de nodosités Sp+ et Sp– comme inocula, où seuls les inocula Sp+ donnaient des nodosités Sp+ sur les plantes, indépendamment de l'espèce-hôte d'origine et de l'espèce-hôte inoculée (*Alnus* sp., van Dijk, 1978 ; *Comptonia* sp. et *Myrica* sp., VandenBosch and Torrey, 1985 ; *Myrica gale*, Monz and Schwintzer, 1989). Cela suggère que le phénotype Sp+ est transmissible et sous contrôle de la souche de *Frankia* endophyte et non pas de la plante-hôte. Des études moléculaires ont indiqué l'existence d'une différence génétique entre souches de *Frankia* présentes dans des nodosités Sp+ et Sp– (Nazaret *et al.*, 1991 ; Simonet *et al.*, 1994 ; Normand *et al.*, 1996 ; Bautista-Guerrero *et al.*, 2011). Ces résultats sont conformes au concept de « deux types de souches » et renforcent l'idée que la sporulation *in planta* puisse être déterminée par le génotype de *Frankia*. Néanmoins, ces études basées sur un nombre très restreint de nodosités Sp+ (1 ou 2 individus maximum) ne permettent pas une telle généralisation. Les données disponibles dans la littérature restent donc fragmentaires (peu de plantes-hôtes testées, peu de sites étudiés, identification des souches par des méthodes peu discriminantes) et depuis, aucune étude récente n'a été réalisée qui permette de prouver clairement que les phénotypes Sp+ et Sp– des nodosités

actinorhiziennes soient en fait des phénotypes bactériens déterminés par des génotypes respectivement Sp+ et Sp– de *Frankia*.

Facteurs environnementaux

Quelques travaux ont étudié l'effet de la plante hôte sur la formation de sporanges par le symbiote. A partir d'observations de terrain des nodosités Sp+ de *A. glutinosa* van Dijk constate que les nodosités Sp+ et Sp– peuvent s'observer sur le même arbre ce qui exclut, selon lui, que le génotype de la plante ou son état phénologique soient des facteurs déterminant la production de sporanges *in planta* (van Dijk, 1978). Des expériences d'inoculations croisées au laboratoire confirment que la plante n'influence pas le phénotype des nodosités (*cf.* paragraphe précédent). Des études sur *C. peregrina* et *M. gale* confirment également les conclusions de Van Dijk mais suggèrent toutefois que si la présence de sporanges dépend de *Frankia*, la quantité et la saisonnalité de la sporogénèse *in planta* pourrait dépendre de la plante-hôte et de son état phénologique (VandenBosch and Torrey, 1985). Par exemple, chez *C. peregrina* et *M. gale*, les premiers stades de développement des sporanges ont été observés, dans les lobes produit durant la saison de croissance en cours, dès le mois de juin avec une abondance maximale en septembre et octobre (VandenBosch and Torrey, 1985). La formation des premiers sporanges coïnciderait ainsi avec le pic d'activité photosynthétique du végétal et serait maximale au moment où l'hôte commence à reconstituer des réserves. La formation des sporanges et leur maturation pourraient aussi être corrélées avec la cessation de l'activité nitrogénase dans le nodule (Torrey, 1987), bien qu'aucune étude n'ait permis à ce jour de vérifier cette hypothèse.

Le nombre de sporanges formés dans les nodules Sp+ pourrait également être affecté par l'environnement dans lequel l'hôte se développe. Par exemple, sur des plantules d'*A. glutinosa* en culture hydroponique, les sporanges sont plus nombreux à pH modéré qu'à pH élevé (van Dijk, 1978). Il demeure donc incertain si des facteurs environnementaux (phénologie de la plante ou autres) jouent également un rôle dans la production de sporanges *in planta* (Lechevalier and Lechevalier, 1990).

3.2.3. Occurrence des nodosités Sp+ en fonction de la présence de l'hôte

La distribution du phénotype Sp+ dans des nodosités collectées sur le terrain peut être très variable (van Dijk, 1978 ; Normand and Lalonde, 1982 ; Torrey, 1987). Une même plante peut contenir les deux types de nodosité et une même nodosité peut parfois présenter un lobe Sp+ et un lobe Sp– (Torrey, 1987). Les nodosités Sp+ sont observées moins fréquemment que les nodosités Sp– : en effet les sites composés uniquement de nodosités Sp– sont courants, comme les sites mixtes avec les deux types de nodosités. Des nodosités Sp+ ont été décrites chez seulement 9 genres actinorhiziens sur les 25 connus (Table 3.3). Cependant, chez tous ces genres, ce sont les nodosités Sp– qui prédominent généralement (Schwintzer, 1990). Les plus fortes occurrences de nodosités Sp+ sont observées chez les genres *Alnus* et *Myrica* (Torrey, 1987; Schwintzer, 1990) mais même dans ces taxa, ce sont les nodosités Sp– qui prédominent sauf chez *A. incana* ssp *incana* (Table 3.3). Voir également nos observations personnelles (ANNEXE B) pour d'autres *Alnus* spp. (Table B.2).

Il est très probable que certaines souches de *Frankia* peuvent croître (se maintenir et se reproduire) en tant que saprophytes dans les sols, c'est à dire à l'état libre, parce qu'au moins certaines souches, en l'occurrence provenant de nodosités Sp–, peuvent être cultivées in vitro dans des milieux relativement simples où elles présentent une croissance (reproduction) substantielle, où elles fixent le diazote et où elles sporulent (Holman and Schwintzer, 1987). De plus, des particules infectieuses de *Frankia* ont été mises en évidence dans des sols qui ont toujours, ou depuis de nombreuses années, été dépourvus de plantes-hôtes (Baker and Schwintzer, 1990). Cependant, ces souches pourraient aussi persister sans croissance saprophytique, soit par survie des articles et/ou survie des spores produites dans le sol. Ces souches seraient donc probablement déjà présentes dans les sols de nombreux sites qui sont nouvellement colonisés par les plantes actinorhiziennes et donneraient majoritairement des nodosités Sp– sur ces sites (Valdes, 2008).

Table 3.3 : Genres et espèces des plantes-hôtes pour lesquelles l'occurrence de nodosités Sp+ a été décrite.

Famille ***Genre et espèce***	**Références**
Betulaceae	
Alnus cordata	(van Dijk, 1978)
Alnus cremastogyne	A. Herrera-Belaroussi, R. Xu et A. Pozzi (données non publiées)
Alnus glutinosa	(Shibata and Tahara, 1917 ; Schaede, 1932, 1962 ; Becking *et al.*, 1964 ; Akkermans and van Dijk, 1976 ; Gardner, 1976 ; van Dijk and Merkus, 1976 ; Becking, 1977 ; van Dijk, 1978 ; Hall *et al.*, 1979 ; Suetin *et al.*, 1979 ; van Dijk, 1979 ; Maynard, 1980 ; Burggraaf *et al.*, 1981 ; Houwers and Akkermans, 1981 ; Wheeler *et al.*, 1981 ; Weber, 1986 ; Pozzi *et al.*, 2015 ; Cotin-Galvan *et al.*, 2016)
Alnus incana ssp. *incana*	(van Dijk, 1978 ; Huss-Danell *et al.*, 1982 ; Danière *et al.*, 1986 ; Sellstedt *et al.*, 1986 ; Weber, 1986 ; Pozzi *et al.*, 2015 ; Cotin-Galvan *et al.*, 2016)
Alnus incana ssp. *rugosa*	(Normand and Lalonde, 1982 ; Lechevalier *et al.*, 1983 ; Baker and Selig, 1984 ; Holman and Schwintzer, 1987 ; Markham, 2008) ;
Alnus incana ssp. *tenuifolia*	(Pozzi *et al.*, 2015)
Alnus rubra	(Hall *et al.*, 1979 ; Wheeler *et al.*, 1981 ; Markham, 2008)
Alnus viridis [a] ssp. *crispa*	(Normand and Lalonde, 1982 ; Holman and Schwintzer, 1987 ; Pozzi *et al.*, 2015)
Alnus viridis [a] ssp. *fruticosa*	Pozzi *et al.* (2015)
Alnus viridis [a] ssp. *viridis*	(Nazaret *et al.*, 1991 ; Simonet *et al.*, 1994 ; Normand *et al.*, 1996 ; Pozzi *et al.*, 2015 ; Cotin-Galvan *et al.*, 2016)
Casuarinaceae	
Casuarina cunninghamiana	(Gardner, 1976 ; Becking, 1977) ; M. Chandler, P. Dart et P.A. Rosbrook (communication personnelle).
Casuarina equisetifolia	R.H. Berg (communication personnelle)
Casuarina glauca	P.A. Rosbrook (communication personnelle)
Casuarina obesa	P.A. Rosbrook (communication personnelle)
Elaeagnaceae	
Elaeagnus umbellata	(Becking, 1977 ; Baker *et al.*, 1980)
Hippophae rhamnoides	(Gardner, 1976)
Myricaceae	
Comptonia peregrina	(VandenBosch and Torrey, 1983 ; VandenBosch and Torrey, 1984, 1985)
Myrica cerifera	(Gardner, 1976)
Myrica gale	(Schaede, 1932, 1962 ; Fletcher and Gardner, 1974 ; Gardner, 1976 ; Becking, 1977 ; Schwintzer *et al.*, 1982 ; VandenBosch and Torrey, 1983 ; VandenBosch and Torrey, 1984, 1985 ; Kashanski and Schwintzer, 1987)
Rhamnaceae	
Ceanothus velutinus	(Gardner, 1976)
Rosaceae	
Dryas drummondii	(Lawrence *et al.*, 1967 ; Becking, 1977)
Purshia tridentata	(Bond, 1976)

a. *A. viridis* et ses sous-espèces sont également désignés *A. alnobetula*.

Au contraire, les *Frankia* de nodosités Sp+ se maintiendraient sur un site principalement par croissance (maintenance et reproduction) dans les nodosités des plantes, où elles produisent de nombreuses spores (Houwers and Akkermans, 1981 ; van Dijk, 1984 ; van Dijk *et al.*, 1988). Les spores relâchées dans le sol lorsque la nodosité se désagrège seraient dispersées et pourraient germer et infecter les racines poussant au voisinage (van Dijk, 1979 ; Houwers and Akkermans, 1981 ; Schwintzer, 1990). Comme il n'existe pas d'indice montrant que les Sp+ présentent une croissance (maintenance et reproduction) significative dans le sol (ces souches ne sont pas cultivées/cultivables *in vitro*, Torrey, 1987), leur persistance sur un site dépendrait donc de la présence continuelle d'hôtes susceptibles d'être infectés (Weber, 1986). En conditions naturelles, ces souches seraient donc plutôt attendues sur des sites où l'hôte compatible est présent depuis de longues périodes et donneraient principalement des nodosités Sp+ sur ces sites (Weber, 1986).

3.2.4. Occurrence en fonction d'autres facteurs

Au sein d'un même genre, les différentes espèces présentent des exigences écologiques variées et donc peuplent des habitats différents. L'influence de l'espèce-hôte ne peut donc pas être considérée comme indépendante des autres facteurs environnementaux comme les facteurs abiotiques. Aucune corrélation n'a été détectée entre la présence de nodosités Sp+ et les facteurs pédologiques étudiés, excepté un faible effet du pH : les nodosité Sp+ sont un peu plus fréquentes quand l'hôte (*A. incana* ssp. *rugosa*, *Myrica galé*) colonise des sols acides (Table 3.4). La croissance (reproduction) *in vitro* réduite des Sp– à bas pH d'une part, et la meilleure survie de *Frankia* introduites dans des sols à pH > 6.0 par rapport à des sols à pH < 4 d'autre part (Smolander *et al.*, 1988) suggèrent qu'aux bas pH, la croissance saprophytique des Sp– est réduite par rapport aux Sp+ qui, sous forme de spores, pourraient tolérer des conditions plus extrêmes.

Il est surprenant que parmi les principaux facteurs environnementaux, seuls des facteurs pédologiques aient été étudiés à l'exception d'une étude (Kashanski and Schwintzer, 1987) qui a pris en compte deux variables bioclimatiques (nombre moyen de jours de gel par an, durée de la saison de végétation) et une variable géographique (élévation du site).

Table 3.4 : Fréquence des nodosités Sp+ en fonction de facteurs environnementaux.

Facteurs	Hôte[a]	Sp+	Sp–	Références
% matière organique	Mg	Corr >0 [c]		(Kashanski and Schwintzer, 1987)
Absence plante-hôte	na	rare	fréquent	(van Dijk, 1984; Smolander and Sundman, 1987)
Age aulnaie	Ag	ancien	récent	(van Dijk, 1984)
	Air	ancien	récent	(Holman and Schwintzer, 1987)
	Ar	ancien	récent	(Markham and Chanway, 1998)
Amendement	Aii	oui	non	(Weber, 1986)
Azote				
total	Ar	Corr >0 [c]		
$[NH_4^+]$[b]	Ag	faible		(van Dijk, 1978)
	Ai	ns	ns	(Huss-Danell *et al.*, 1982b)
$[KNO_3]$[b]	Ag	ns	ns	(van Dijk, 1978)
		faible		(Käppel and Wartenberg, 1958)
Durée saison croissance	Mg	longue	courte	(Kashanski and Schwintzer, 1987)
Elévation	Mg	basse	haute	(Kashanski and Schwintzer, 1987)
Localisation	Cp	littoral	intérieur	(Schwintzer, 1989)
Nb. moy. de j. sans gels /an	Mg	Corr >0 [c]		(Kashanski and Schwintzer, 1987)
pH	Ag	pas de corrélation, pH 5-8		(van Dijk, 1984)
	Air	pH < 4	pH > 4	(Holman and Schwintzer, 1987)
	Ar	Corr <0 [c]		(Markham and Chanway, 1998)
	Cp	ns	ns	(Schwintzer, 1989)
	Mg	Corr <0 [c]		(Kashanski and Schwintzer, 1987)
	Mg	bas	haut	(Kashanski and Schwintzer, 1987)
Phosphore (échangeable)	Ar	Corr >0 [c]		(Markham and Chanway, 1998)
Type colonisation	Aii	forestière	spontanée	(Weber, 1986)
Végétation dominante				
Rubus spectabilis	Ar	Corr >0 [c]		(Markham and Chanway, 1998)

a, espèce-hôte : Ag, *Alnus glutinosa* ; Aii, *Alnus incana* ssp. *incana* ; Air, *Alnus incana* ssp. *rugosa* ; Ar, *A. rubra* ; Cp, *Comptonia peregrina* ; Mg, *Myrica gale*. b, cultures expérimentales. c, corrélation positive (> 0) ou négative (< 0). na, non applicable. ns, non significatif. Les paramètres physico-chimiques du sol (azote total, pH, phosphore échangeable) se révèlent de faibles prédicteurs (faibles coefficients de détermination dans le modèle linéaire) de la proportion de Sp+ dans une aulnaie (Markham and Chanway, 1998).

On peut pourtant faire l'hypothèse, selon le même raisonnement que précédemment pour le pH, que les spores (dormantes) des Sp+ pourraient permettre une meilleure survie à des amplitudes thermiques importantes, des cycles de gels/dégels ou d'inondations/exondations des sols, etc., perturbations climatiques amplifiées aux latitudes et altitudes élevées ou sur des sites ayant une pente importante. Si de tels facteurs bioclimatiques ou géographiques impactent directement ou indirectement le végétal hôte (durée de vie de la nodosité ou le nombre de sites d'infection) ou bien si l'impact a lieu sur la survie et la dissémination de *Frankia* en dehors de l'hôte, il est raisonnable de faire l'hypothèse que l'écologie de *Frankia* peut en être affectée. On pourrait alors s'attendre à ce que ces facteurs soient liés à la présence ou à l'absence de nodosités Sp+, ce qui rend leur étude très intéressante (*cf.* ANNEXE B).

3.3. Hypothèses liées à la sporulation *in planta*

Les souches de nodosités Sp– sporulent librement sur la plupart des milieux quand elles sont cultivées *in vitro* (Burggraaf *et al.*, 1981 ; Baker, 1982 ; Normand and Lalonde, 1982). Les souches des nodosités Sp+ comme celles des nodosités Sp– ont donc la capacité génétique de sporuler, mais seules certaines réalisent cette capacité *in planta*. Cette différence d'expression de la sporulation *in planta* entre *Frankia* endophytes de nodosités Sp+ et Sp– s'accompagne de caractéristiques différentes en ce qui concerne (i) l'isolement et la cultivabilité *in vitro*, (ii) l'infectivité, c'est à dire la capacité de nodulation d'une plante, (iii) l'efficience symbiotique, c'est à dire la capacité fixatrice d'azote dans les nodosités, et (iv) les spectres d'hôtes. Ces différences soulèvent des questions sur la biologie et l'écologie des *Frankia* des nodosités Sp+ et sur les conséquences pour *Frankia* et pour la plante-hôte.

3.3.1. Pour *Frankia*

Vers une symbiose obligatoire plutôt que facultative ?

Dans les études comparant souches Sp+ et Sp–, les inocula Sp+ ne peuvent être obtenues qu'avec des broyats de nodosités Sp+ car aucune culture pure (*in vitro*) de *Frankia* Sp+ n'est disponible à ce jour, alors que de nombreux isolats de souches Sp– sont disponibles. En effet, les essais d'isolement à partir de nodosités Sp+ ont toujours échoué et les isolats éventuellement obtenus (Normand and Lalonde, 1982 ; Torrey, 1987) ne remplissaient pas les

postulats de Koch : ces isolats n'étaient pas infectieux (ne formaient pas de nodosités) ou ne sporulaient pas *in planta* une fois ré-inoculés (Torrey, 1987). Cela indique que les isolats obtenus n'étaient sans doute pas ceux des souches sporulant *in planta*. Cette absence d'isolement et de culture *in vitro* des *Frankia* des nodosités Sp+ suggère que les *Frankia* Sp+ pourraient dépendre davantage de leur hôte et pourraient avoir évolué vers une symbiose obligatoire (Schwintzer and Tjepkema, 1990). Cela remettrait donc en question le caractère facultatif de la symbiose actinorhizienne.

D'autres souches de *Frankia* n'ont pas pu être cultivées *in vitro* séparément de l'hôte végétal. Ce sont les *Frankia* du cluster phylogénétique 2 (Normand *et al.*, 1996), symbiotes des genres végétaux *Datisca*, *Coriaria*, *Dryas*, *Purshia* et certains *Ceanothus*. Ces souches, comme celles des nodosités Sp+, ne seraient pas des symbiotes facultatifs mais plutôt des symbiotes obligatoires. D'autre part, il existe d'autres souches de *Frankia* qui ne forment pas de nodosités suite à l'infection initiale lorsqu'elles sont inoculées à une plante. On leur attribue donc un phénotype non-nodulant (Nod-). N'ayant pas d'association pérenne avec la plante, ces souches sont considérées comme non-symbiotiques. Puisque des souches de *Frankia* différentes semblent avoir des degrés différents de dépendance à leur hôte, nous proposons que la symbiose actinorhizienne soit replacée dans un *continuum* symbiotique plus large que le mutualisme *facultatif* seul.

Une meilleure infectivité : quantité et/ou qualité des propagules ?

Il existe différentes méthodes d'étude de l'infectivité de souches de *Frankia* : (i) inoculation de plantes avec une suspension issue d'un broyat de nodosité, dans lesquelles sont présents les hyphes et les vésicules, ainsi que les spores du symbiote si la nodosité est Sp+, (ii) inoculation de plantes avec du sol prélevé à proximité d'une plante hôte nodulée ou (iii) inoculation de plantes avec une suspension de culture pure de *Frankia*, qui inclut généralement spores, vésicules et fragments d'hyphes (Torrey, 1987). Etant donné l'impossibilité d'isoler des souches à partir de nodosité Sp+, la plupart des études visant à montrer les différences d'infectivité entre les nodosités Sp+ et Sp– se basent sur la première méthode (broyats de nodosités). Quand des biomasses identiques de broyats de nodosités Sp+ et Sp– sont inoculés à des plantes, généralement du genre *Alnus*, les études montrent qu'un broyat Sp+ forme 100 à 2000 fois plus de nodosités qu'un broyat Sp– et les auteurs concluent que les *Frankia* des nodosités Sp+ sont 100 à 2000 fois plus

infectives que les *Frankia* de nodosités Sp– (van Dijk, 1979 ; Houwers and Akkermans, 1981 ; Torrey, 1987 ; Quispel, 1990). Cependant, ces résultats doivent être considérés avec précaution. En effet, si la biomasse de nodosité est identique, il n'en est certainement pas de même pour le nombre de propagules infectieuses, les nodosités Sp+ contenant un très grand nombre de spores, qui par définition sont absents des nodosités Sp–. De plus, les spores peuvent provoquer par contact la déformation du poil racinaire chez *Alnus*, première étape de l'association symbiotique (Mansour *et al.*, 1990) et un composé racinaire de la plante-hôte peut stimuler la germination de spores de *Frankia* (Krumholz *et al.*, 2003).

Nous proposons donc le raisonnement suivant : de telles différences d'infectivité entre *Frankia* des nodosités Sp+ et Sp– peuvent être dues, à infectivité égale des propagules, au fait qu'il y a 100-2000 fois plus de propagules dans les nodosités Sp+ que dans les nodosités Sp–, ou à nombre égal de propagules, que celles des nodosités Sp+ sont 100-2000 fois plus infectives que celles des Sp–. C'est à dire que, toutes choses étant égales par ailleurs, la différence d'infectivité entre *Frankia* des nodosités Sp+ et Sp– serait due, à un extrême, à une différence de quantité de propagules, et à l'autre extrême, à une différence de qualité des propagules. Nous faisons l'hypothèse que la réalité, comme souvent, se situe entre ces deux extrêmes. L'hypothèse d'une charge importante de spores libérées lors de la préparation d'un broyat de nodosité Sp+ n'est probablement pas la seule plausible pour expliquer une telle différence d'infectivité entre nodosités Sp+ et Sp– (Quispel and Tak, 1978), et malgré le manque de données expérimentales, on peut envisager qu'une forte infectivité soit une caractéristique propre aux souches des nodosités Sp+. On attendrait cela sous l'hypothèse de symbiose obligatoire des *Frankia* des nodosités Sp+ (*cf.* paragraphe précédent) : si la vie en dehors de l'hôte leur est impossible, il est probable que des stratégies très efficaces pour se réassocier à l'hôte aient émergé, aient été sélectionnées et se soient maintenues. Une étude montre d'ailleurs que des broyats Sp+ introduits dans un sol seraient plus compétitifs que les broyats Sp– (Kurdali *et al.*, 1990, *cf.* également Cotin-Galvan *et al.*, 2016 en ANNEXE A).

3.3.2. Pour la plante-hôte

Un rendement symbiotique moindre ?

Les *Frankia* des nodosités Sp+ sembleraient également moins efficientes (moindre fixation d'azote) que les *Frankia* des nodosités Sp– (Quispel, 1990). À ce jour, la plupart des études comparant la physiologie des nodosités Sp+ et Sp– tendent à montrer que (i) les nodosités Sp– ont une activité ARA (activité réductrice de l'acétylène, indicateur du fonctionnement potentiel de la nitrogénase et donc de la fixation potentielle d'azote) supérieure à celle des nodosités Sp+ (Normand and Lalonde, 1982 ; VandenBosch and Torrey, 1984 ; Monz and Schwintzer, 1989) et (ii) le coût énergétique de la fixation d'azote (taux de respiration par unité d'activité nitrogénase) est inférieure pour les nodosités Sp– que pour les nodosités Sp+ (VandenBosch and Torrey, 1984 ; Monz and Schwintzer, 1989 ; Schwintzer, 1990). Les plantes ayant des nodosités Sp+ investissent donc plus de biomasse carbonée dans les nodosités (Monz and Schwintzer, 1989), et les nodosités Sp+ seraient moins efficientes en terme de croissance de la plante hôte en milieu dépourvu d'azote (VandenBosch and Torrey, 1984 ; Monz and Schwintzer, 1989 ; Schwintzer, 1990). A partir de ces résultats et sous conditions limitantes en azote, une moins bonne croissance (production de biomasse) de la plante est attendue quand celle-ci possède des nodosités Sp+ en raison d'un moins bon rendement symbiotique (quantité de carbone photosynthétique investit par la plante par rapport à l'azote retourné par *Frankia*). Plusieurs expérimentations au laboratoire vont dans ce sens (Hall *et al.*, 1979 ; VandenBosch and Torrey, 1984 ; Sellstedt *et al.*, 1986 ; Monz and Schwintzer, 1989). Des différences précoces sont observées (par exemple 45% de biomasse supplémentaire à 6 semaines pour une plante nodulée Sp–) mais qui s'estompent au cours du temps (plus que 19% de biomasse supplémentaire à 10 semaines pour une plante nodulée Sp–). Cependant, la biomasse d'une plantule pourrait ne pas être totalement corrélée, ou même pas du tout corrélée, à la biomasse adulte, et nous faisons l'hypothèse que ces différences de biomasse entre plantes nodulées Sp+ et Sp– s'estompent davantage au cours du temps. De plus, des facteurs liés au sol ou au substrat de culture expérimental pourraient affecter la fixation d'azote (activité nitrogénase) dans les nodosités (Kurdali *et al.*, 1990). Malgré ces deux réserves, il a été proposé que les *Frankia* des nodosités Sp+ soient des symbiotes tricheurs (Markham, 2008), qui détournent de la fixation symbiotique de l'azote (production et fonctionnement des

diazovésicules) une partie de l'investissement des ressources carbonées de la plante vers la sporulation *in planta* (production de sporanges). Cela remettrait en question le caractère purement mutualiste de la symbiose actinorhizienne.

Ce caractère mutualiste de la symbiose actinorhizienne est d'ailleurs uniquement basé sur les bénéfices des échanges trophiques réalisés dans la partie du cycle de vie où les partenaires sont associés. D'une part, cela ne tient pas compte de la partie du cycle de vie des deux partenaires où ils ne sont pas associés, partie tout aussi importante que la première pour comprendre cette symbiose. D'autre part, si l'investissement des partenaires dans la symbiose peut être estimé en termes de ressources trophiques, cela n'est que partiellement représentatif des investissements en terme de *fitness*, seule métrique valable pour prendre en compte les coûts et bénéfices évolutifs. Cependant, il reste significatif que l'allocation des ressources de *Frankia* aux hyphes, diazovésicules (et éventuellement sporanges *in planta*) ainsi que l'investissement du végétal-hôte est différent entre nodosités Sp+ et Sp–. D'autres souches de *Frankia* sont incapables de fixer l'azote atmosphérique (phénotype non-fixateur Fix–) et ne peuvent pas retourner de l'azote en échange du carbone investi par la plante. Ces souches ne seraient pas symbiotes mutualistes mais plutôt symbiotes non-mutualistes (neutres, voire tricheurs ou même parasites). Puisque des souches de *Frankia* différentes semblent avoir des degrés de coopération avec l'hôte différents, nous proposons également que la symbiose actinorhizienne soit replacée dans un *continuum* symbiotique plus large que le *mutualisme* facultatif seul.

Des spectres d'hôtes différents ?

Certaines souches de *Frankia* Sp+ présentent un spectre d'hôtes limité : par exemple des broyats de nodosités Sp+ d'*A. incana* forment des nodosités efficientes (fixatrices d'azote) sur *A. incana* et non-efficientes (non-fixatrices) sur *A. glutinosa*, et aucune nodosité sur *A. nitida* (alors même que *A. nitida* peut être nodulé par un broyat Sp+ d'*A. glutinosa* et n'est donc pas incompatible par nature avec un broyat Sp+, van Dijk *et al.*, 1988). De même un broyat Sp+ d'*A. incana* induit des nodosités efficientes chez *A. incana* mais pas chez *A. glutinosa* (Domenach *et al.*, 1988) et un broyat Sp+ de *Myrica gale* forme des nodosités efficientes sur *M. gale* mais pas sur *Comptonia peregrina* (VandenBosch and Torrey, 1983). Pour expliquer les différences d'infectivité (spectre d'hôte) et d'efficience (fixation d'azote) observés entre souches de *Frankia* (VandenBosch and Torrey, 1983 ; Baker, 1987 ; Weber *et al.*, 1987 ; van Dijk

et al., 1988) il a été proposé que l'hôte puisse sélectionner les *Frankia* avec lesquels il s'associe (Weber, 1986). Des hôtes comme *A. glutinosa* pourraient être incompatibles avec les *Frankia* Sp+ et seraient en conséquence nodulés majoritairement par des *Frankia* Sp–. Au contraire, d'autres hôtes comme *A. incana* ssp. *incana* seraient incompatibles avec les souches des nodosités Sp– et seraient nodulés majoritairement par des *Frankia* de nodosités Sp+ ? (références ci-dessus). Cependant toutes ces expérimentations ont concerné relativement peu de souches, non caractérisées génétiquement ni positionnées phylogénétiquement : il est donc difficile de conclure si des espèces-hôtes s'associent plus fréquemment à des *Frankia* de nodosités Sp+, et si oui à des génotypes particuliers de *Frankia* (*cf.* ANNEXE A). Sous l'hypothèse du symbiote tricheur (degré de coopération moindre) il a même été proposé que l'hôte puisse (i) filtrer les souches de *Frankia* en fonction de leur rendement symbiotique (Markham, 2008), *i.e.* en fonction de leur degré de coopération et (ii) éventuellement sanctionner les moins bons coopérateurs (Denison, 2000 ; Ratcliff, 2010 ; Laguerre *et al.*, 2012, ces trois références dans le modèle de fixation symbiotique de l'azote Rhizobia-légumineuses). Cependant, aucune de ces études n'a démontré que le végétal puisse reconnaitre et choisir ses partenaires, ni soit capable d'estimer leur degré de coopération.

MISE A L'EPREUVE :

EXPERIMENTATION

&

MODELISATION

MISE A L'EPREUVE : EXPERIMENTATION & MODELISATION

Il a déjà été établi théoriquement et expérimentalement chez des organismes variés (plantes, insectes, crustacés) que l'évolution des dormances (dispersion temporelle) et des disséminations (dispersion spatiale) sont des réponses adaptatives aux variations environnementales ayant des répercussions sur le succès reproductif des individus et qui conduisent à une répartition des risques contre une future variabilité environnementale stochastique, *i.e.* imprévisible (*Bet-hedging*) (CHAPITRE 1). De telles adaptations ont également été sélectionnées chez les microorganismes en réponse au même type de variabilité environnementale. La sporulation microbienne, qui est un trait héritable et variable, pourrait être une adaptation permettant l'évitement et/ou la dispersion des risques, à la fois dans le temps et dans l'espace (CHAPITRE 2). En considérant l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la réassociation à son hôte végétal par transmission horizontale, la sporulation *in planta* de *Frankia* constitue un modèle biologique intéressant pour étudier ces stratégies de dispersion temporelle et spatiale. En effet, *Frankia* alterne son cycle de vie entre deux états (symbiotique et libre, ou saprohyte) correspondant à deux compartiments (la nodosité et le sol). Ces compartiments sont de qualités différentes pour la vie active (croissance, maintenance, reproduction), le temps de résidence y est généralement long (relativement à l'échelle temporelle de *Frankia*). (CHAPITRE 3). Les passages d'un compartiment à l'autre sont des événements majeurs du cycle de vie de *Frankia* : passage de la nodosité vers le sol suite à la destruction de la nodosité et passage du sol vers la nodosité lors de la réussite de la réassociation à l'hôte (infection et nodulation). Notre revue de la littérature a fait apparaître que la sporulation *in planta* pourrait être un trait (i) transmissible, et lié une composante génétique de certaines souches de *Frankia*, (ii) variable en occurrence et en expression d'une souche à l'autre, d'une espèce-hôte à l'autre, d'un environnement à un autre, et (iii) lié à des caractéristiques écologiques qui pourraient remettre en question les caractères mutualistes et facultatifs de la symbiose actinorhizienne telle qu'elle est habituellement présentée (CHAPITRE 3).

Les implications de l'ensemble des observations précédentes sur la sporulation *in planta* de *Frankia* n'ont jamais été questionnées systématiquement, ni envisagées dans le cadre théorique de l'évolution des

réponses adaptatives à la variabilité environnementale. La sporulation *in planta* est-elle un trait d'histoire de vie susceptible d'évoluer sous sélection naturelle et de constituer une réponse de *Frankia* à l'hétérogénéité environnementale dans son cycle de vie ? Y-a-t-il des différences génotypiques entre souches de *Frankia* qui expliquent la différence phénotypique entre nodosités Sp+ et Sp– ? Y-a-t-il un ou des facteur(s) écologique(s) qui déclenche(nt) la sporulation *in planta* ? Si oui, les nodosités Sp+ doivent-elles y être exposées et pas les Sp– ? Ou au contraire, y-a-t-il un ou des facteur(s) qui inhibe(nt) la sporulation *in planta* ? Si oui, les nodosités Sp– doivent-elles y être exposées et pas les Sp+ ? Ce(s) facteur(s) serai(en)t-il(s) uniquement lié(s) à la plante-hôte (environnement interne à la nodosité) ou à l'environnement externe (conditions pédoclimatiques) ou à une interaction entre les deux ? Quelle(s) variation(s) de ces facteurs a(ont) véritablement un impact sur la croissance, la maintenance et la reproduction de *Frankia* et/ou la plante-hôte ? La sporulation *in planta* est-elle coûteuse ou bénéfique à l'un, à l'autre ou aux deux partenaires symbiotiques ; et en quels termes exprimer le rapport coût/bénéfice ? Autrement dit, les *Frankia* dans les nodosités Sp+ gagnent-elles à sporuler *in planta* ? Ou bien les *Frankia* dans les nodosités Sp– gagnent-elles à *ne pas* sporuler *in planta* ? Et que gagne la plante à être associée avec lun ou l'autre type de symbiote ?

Nous proposons de répondre à certaines de ces questions dans cette partie. L'objectif est de continuer notre démarche pionnière à l'interface entre Ecologie microbienne et Ecologie évolutive pour étudier le trait d'histoire de vie qu'est la sporulation *in planta*. Nous associons analyse descriptive et expérimentation pour d'étudier le caractère transmissible et le potentiel de sélection de ce trait (CHAPITRE 4). Puis nous allions réflexion conceptuelle et approche de modélisation, pour aborder le caractère adaptatif de la sporulation *in planta* (CHAPITRE 5). Des expérimentations supplémentaires ont été guidées par le cadre théorique et nos observations de terrain. Les résultats préliminaires de ces expérimentations sont brièvement présentés dans les ANNEXES A et B.

4. *IN-PLANTA* SPORULATION PHENOTYPE, A MAJOR LIFE-HISTORY TRAIT TO UNDERSTAND THE EVOLUTION OF *ALNUS*-INFECTIVE *FRANKIA* STRAINS

Ce chapitre correspond à un article accepté pour publication dans *Environmental Microbiology* (Pozzi *et al.*, 2015) [22]. Il présente une étude phylogénétique de souches de *Frankia* collectées dans des aulnaies naturelles dans le but de déterminer si les souches étudiées, provenant d'espèces-hôtes et de localisation différents et sporulant ou non *in planta*, ont des génotypes et un niveau de diversité différents ou pas. Des études précédentes, basées sur des inoculations croisées, ont suggéré que la sporulation *in planta* dépendrait des souches de *Frankia* utilisée comme inoculum. D'autres études ont suggéré des différences génétiques entre ces souches. Cependant, ces études étaient basées sur 1-2 nodosités ou 1-2 sites échantillonnés et ne permettaient pas de conclure que les différences phénotypiques entre nodosités Sp+ et Sp– étaient dues à des différences génotypiques entre souches différentes de *Frankia*. L'objectif principal de ce papier, publié dans *Environmental Microbiology*, est de réaliser une étude phylogénétique de *Frankia* dans des nodosités Sp+ et Sp– d'*Alnus* afin de déterminer si des nodosités Sp+ et Sp–hébergent des *Frankia* de lignées phylogénétiques divergentes, c'est à dire de déterminer s'il existe bien des génotypes Sp+ et Sp– de *Frankia*, première condition pour que le trait d'histoire de vie qu'est la sporulation *in planta* puisse évoluer sous sélection naturelle.

Titre (FR) : Le phénotype de sporulation *in planta* : un trait d'histoire de vie majeur pour comprendre l'évolution des souches de *Frankia* infectant le genre *Alnus*.

Résumé (FR) : Deux types majeurs de *Frankia* sont reconnus, basés sur la capacité à sporuler *in planta* : Spore-positif (Sp+) et Spore-négatif (Sp–). Nous avons conduit une étude sur des souches de *Frankia* Sp+ et Sp– collectées dans des nodosités d'*Alnus glutinosa*, d'*A. incana* et *A. viridis*. Les nodosités ont été phénotypées à l'aide de méthodes histologiques poussées et le génotype des souches endophytiques de *Frankia* a été déterminé par une approche d'analyse de séquences multi-locus (MLSA). Un échantillonnage additionnel a été réalisé pour déterminer la relation entre la fréquence du phénotype Sp+

---

[22] Pozzi *et al.*, *Environmental Microbiology* (2015) **17**(9), 3125–3138. Publisher's website. Download pdf.

et la diversité génétique de *Frankia* à l'échelle de l'aulnaie. Nos résultats révèlent que (i) les *Frankia* Sp+ et Sp– infectives de l'aulne sont génétiquement différentes même quand elles sont prélevées sur une même aulnaie et une même espèce-hôte, (ii) il y a au moins deux lignées phylogénétiques distinctes de *Frankia* Sp+ dont les souches se regroupent selon l'espèce-hôte et non pas selon la distance géographique et (iii) la diversité génétique des souches Sp+ est très basse à l'échelle de l'aulnaie comparé aux souches Sp–. La différence dans l'histoire évolutive et la diversité génétique entre *Frankia* Sp+ et Sp– nous permet de discuter le rôle écologique possible de la sporulation *in planta*.

NOTICE: this is the author's version of a work that has been accepted for publication in Environmental Microbiology and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/1462-2920.12644 or as Pozzi, A. C., H. H. Bautista-Guerrero, I. Nouioui, L. Cotin-Galvan, R. Pépin, P. Fournier, F. Menu, M. P. Fernandez and A. Herrera-Belaroussi (2015). *In-planta* sporulation phenotype: a major life history trait to understand the evolution of *Alnus*-infective *Frankia* strains. *Environmental Microbiology* 17(9): 3125-3138. This article is protected by copyright. All rights reserved.

In-planta **sporulation phenotype: a major life-history trait to understand the evolution of** ***Alnus*****-infective** ***Frankia*** **strains**

POZZI Adrien C.[1,2,3], BAUTISTA-GUERRERO Hector H.[1,2], NOUIOUI Imen[1,2,4], COTIN-GALVAN Laetitia[1,2], PEPIN Régis[1,2], FOURNIER Pascale[1,2], MENU Frédéric[1,3], FERNANDEZ Maria P.[1,2], HERRERA-BELAROUSSI Aude[1,2*]

[1] PRES Université de Lyon, F-69361, Lyon, France and Université Lyon 1, F-69622, Villeurbanne, France.

[2] CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, F-69622, France.

[3] CNRS, UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et de Biologie Evolutive, Villeurbanne, F-69622, France.

[4] Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives, Université de Tunis El Manar (FST), 2092, Tunis, Tunisia.

*** Corresponding author**

Aude HERRERA-BELAROUSSI – UMR 5557 Ecologie Microbienne, 43, Boulevard du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France. Tel: (33) 472 448 200 - Fax: (33) 426 234 468. E-mail: aude.herrera-belaroussi@univ-lyon1.fr.

Running Head: *In-planta* sporulation of *Alnus*-infective *Frankia*

Key-words: *Frankia*; Actinobacteria; Actinomycetales; Endophyte; Uncultured; *Alnus*; Alder; Betulaceae; Symbiosis, Actinorhizal; Nitrogen Fixation; Sporulation, *In-planta*; Life History Trait; Spores, Bacterial; Dormancy; Dispersal; Risk-spreading; *Bet-hedging*; Molecular sequence; Phylogeny, Multi *Locus* Sequence Analysis; Genetic Diversity; Evolution.

4.1. Summary

Two major types of *Frankia* strains are usually recognized, based on the ability to sporulate *in-planta*: Spore-positive (Sp+) and Spore-negative (Sp–). We carried out a study of Sp+ and Sp– *Frankia* strains based on nodules collected on *Alnus glutinosa*, *A. incana* and *A. viridis*. The nodules were phenotyped using improved histology methods and endophytic *Frankia* strain genotype was determined using a *multilocus* sequence analysis (MLSA) approach. An additional sampling was done to assess the relation between Sp+ phenotype frequency and genetic diversity of *Frankia* strains at the alder stand scale. Our results revealed that (i) Sp+ and Sp– *Alnus*-infective *Frankia* strains are genetically different even when sampled from the same alder stand and the same host-plant species, (ii) there are at least two distinct phylogenetic lineages of Sp+ *Frankia* that cluster according to the host-plant species and without regard of geographic distance and (iii) genetic diversity of Sp+ strains is very low at the alder stand scale compared with Sp– strains. Difference in evolutionary history and genetic diversity between Sp+ and Sp– *Frankia* allows us to discuss the possible ecological role of *in-planta* sporulation.

4.2. Introduction

Frankia is a soil actinobacterium able to establish root nodule symbiosis with actinorhizal plants. This symbiosis is described as facultative (both partners can live separately) and mutualistic (partners are involved in reciprocal trophic trade). *Frankia* morphology and development are complex with: (i) hyphal growth of active cells, (ii) atmospheric nitrogen fixation in specialized cells (diazovesicles) and (iii) formation of multilocular sporangia containing numerous dormant offspring (spores). *In-vitro*, all cultured strains can sporulate while only some strains are able to sporulate *in-planta,* as shown by the presence of numerous sporangia within plant cells allowing two phenotypes to be distinguished: Spore-positive phenotype (Sp+) when sporangia are present in the nodule and Spore-negative phenotype (Sp–) when sporangia are absent (van Dijk, 1978). The endophytic sporulation of *Frankia* inside host-plant cells is a unique feature of actinorhizal symbiosis compared with other plant-bacteria interactions and as far as we know plant-microorganism interactions in general. Yet, its role remains unknown and its consequences on the ecology and evolution of both partners is not understood.

Van Dijk (1978) initially suggested that the ability to sporulate *in-planta* was under the genetic control of the *Frankia* symbiont. This was supported by inoculation experiments using Sp+ or Sp– crushed nodules as inocula, where only Sp+ inocula resulted in Sp+ nodules on inoculated plants (van Dijk, 1978). Several field studies questioned the role of the host-plant species *vs.* the abiotic environmental factors on the distribution of Sp+ nodules. Sp+ nodules have been less frequently reported than Sp– nodules and were found on only nine among 25 actinorhizal plant genera, with the highest occurrences observed for *Alnus* and *Myrica* genera (Torrey, 1987; Schwintzer, 1990). No general correlations were found between Sp+ occurrence and soil factors, except a slight pH effect (Holman and Schwintzer, 1987; Markham and Chanway, 1998).

Contrary to Sp– nodules, isolation attempts from Sp+ nodules repeatedly failed or the isolates obtained, if any, did not fulfill Koch's postulates since they were non-infective or did not sporulate once re-inoculated (Torrey, 1987). The lack of *bona fide* Sp+ cultures strongly limited conventional comparisons with Sp– strains. Moreover, among the 11 genomes of *Frankia* sequenced to date (including an uncultured endophyte from *Datisca*) no Sp+

strain was included (Tisa *et al.*, 2013). Thus, scarce data are available on Sp+ *Frankia* biodiversity. Only one study, based on a single *Alnus* species and a single alder stand, focused on molecular characterization of Sp+ and Sp– *Frankia* (Simonet *et al.*, 1994). The results were consistent with the "two types of strains" concept (van Dijk, 1978) and strengthened that *in-planta* sporulation was determined by the symbiont genotype.

Data about Sp+ are interspersed in *Frankia* phylogeny and diversity studies. In 16S rRNA based phylogeny, the *Frankia* genus appeared as a monophyletic group made of four main clusters mostly corresponding to host infection groups: cluster 1 strains are infective on Myricaceae, Casuarinaceae and *Alnus* (Betulaceae); cluster 2 strains are uncultured symbionts of *Dryas* (Rosaceae), *Coriaria* (Coriariaceae), *Datisca* (Datiscaceae) and *Ceanothus* (Rhamnaceae); cluster 3 strains are infective on Elaeagnaceae and Rhamnaceae and, cluster 4 combines ineffective (non-nitrogen fixing) or non-infective strains (Normand *et al.*, 1996). At the species level at least 12 genomospecies were delineated based on DNA homology (Normand and Fernandez, 2009). Phylogenetic studies on *Frankia* seldom included Sp+ endophytes. Only *Alnus viridis* Sp+ endophytes were characterized and positioned close to cluster 1 but the very few number of specimens analyzed did not allow generalization about Sp+ phylogeny and diversity. (Nazaret *et al.*, 1991; Normand *et al.*, 1996; Bautista-Guerrero *et al.*, 2011).

This work focused on *Alnus*, the actinorhizal genus with the highest occurrence of Sp+ nodules, and aimed to study (i) the occurrence of Sp+ phenotype among different *Alnus* species and ecological habitats, (ii) the phylogenetic relationships between *Alnus* Sp+ and Sp– endophytic and reference strains, and (iii) the genetic diversity of Sp+ strains at large as well as local (alder stand) scales. To that purposes, a large set of Sp+ and Sp– root nodules were sampled mainly from the three *Alnus* species endemic to French sites (*A. glutinosa*, *A. incana* and *A. viridis*) and their respective American relatives. The nodules were phenotyped using improved histology methods and endophytic *Frankia* strain genotype was determined using a *multilocus* sequence analysis (MLSA) approach.

4.3. Results

4.3.1. Occurrence of Sp+ nodule phenotype on sites according to host-plant species.

A total of 336 root nodules were sampled from 67 distinct sites (Tables 4.1 and 4.2). The lactophenol blue stain discriminated spores (refringent and non-stained) from hyphae and diazovesicles (stained deep blue) (Figure 4.1.A). The Schiff's-malachite green stain allowed spores (stained green, Figure 4.1.B) to be discerned from other *Frankia* structures as well as plant compounds (both stained red, Figure 4.1.B-C).

A total of 173 nodules (51%) were phenotyped Sp+. They were observed in 42 (64%) of the sampled sites with the occurrence depending on the host-plant species (Table 4.2). In total, 14 *A. glutinosa* stands (39%), 14 *A. incana* stands (93%) and 15 *A. viridis* stands (94%) had Sp+ nodules. Co-occurrence of Sp+ and Sp– nodules in the same site was found in 56% of *A. viridis* stands, and only in 13% of *A. incana* stands and in 22% of *A. glutinosa* stands. Only one *A. incana* site (7%) and one *A. viridis* site (6%) had exclusively Sp– nodules while this feature was dominant (61%) for *A. glutinosa* sites.

4.3.2. Phylogenetic analysis of Sp+ and Sp– *Alnus*-infective *Frankia* strains.

Frankia sequences of *dnaA*, *ftsZ* and *pgk* obtained from a subset of 61 nodules– 23 nodules sampled from nine *A. glutinosa* sites, 15 from six *A. incana* sites and 23 from eight *A. viridis* sites– and 18 reference strains were used for the phylogenetic analysis. The individual phylogenies of these three markers were overall consistent (data not shown). The corresponding multiple alignments were thus combined into a single alignment representing 2040 nucleotide positions that was used to infer the phylogeny of Sp+ and Sp– *Frankia* strains. The topologies of the resulting Bayesian (BI) and Maximum Likelihood (ML) trees were similar. (Figure 4.2 and Figure 4.S1, respectively).

Previously described *Frankia* clusters (1 to 4) and genomospecies (G1 to G4) corresponded to monophyletic groups. Clades proposed in this study were defined on the basis of strain origin (host-plant) and *in-planta* sporulation phenotype. All clusters, genomospecies and clades were highly

Table 4.1. List of sampled alder stands.

Site No.	Site localisation (county)	Country**	*Alnus* species	Sample designation	Phenotype***
1	Mimizan (40)	FR	*A. glutinosa*	AgMim	-
2	Riom (63)	FR		AgRIO	-
3	Thury, pop. I, II, III, IV, V (21)*	FR		AgTyI, II, III, IV, V	+/-
4	Nièvre (58)	FR		AgNi	-
5	Epinac (71)	FR		AgEpc	-
6	Epertully (71)	FR		AgEpy	-
7	Amélie-les-Bains (66)	FR		AgALB	+
8	Sébrazac (12)	FR		AgSeb	-
9	Portet-sur-Garonne (31)	FR		AgPor	-
10	La-Croix-Falgarde (31)	FR		AgLXF	-
11	Arcachon (32)	FR		AgArc	-
12	Wallers (59)	FR		AgWal	-
13	Vallon de Bassera (06)	FR		AgVB	-
14	Château-Gaillard (01)	FR		AgCg	-
15	Clavel, Savigneux (01)	FR		AgCl	-
16	Dombes (01)	FR		AgDRE	-
17	Miribel (01)	FR		AgMi	+/-
18	Silhac (07)	FR		AgARD	-
19	Romans-sur-Isère (26)	FR		AgROM	+
20	Saou (26)	FR		AgSaII	-
21	Arandon (38)	FR		AgARA	-
22	Le Grand-Lemps (38)	FR		AgGL	-
23	Saint-Laurent-du-Pont (38)	FR		AgSLP	+
24	Apinac (42)	FR		AgFo	+
25	Caluire-et-Cuire (69)	FR		AgBdr	+
26	Gelon, Bourget-en-Huile (73)	FR		AgGBh	-
27	Le Blanchet, Bourget-en-Huile (73)	FR		AgLB	+/-
28	Le Tremblay, Le-Bourget-du-Lac (73)	FR		AgTrS, AgTrH	+/-
29	Algérie, El Kala national park	DZ		AgAEK	-
30	Copenhagen, Byparken	DK		AgCop	-
31	Croatia, pop. I, II*	HR		AgCroI, II	+/-
32	La Herreteria, las Médulas, Spain	ES		AgESP	+
33	Lac Léman, Genève	CH		AgGen	-
34	Blackford Pond, Edinburgh	GB		AgBp	+/-
35	Royal Holloway University, Egham	GB		AgRHU	+/-
36	Virginia Water Lake, Surrey	GB		AgVWL	+/-
37	Agnielle (05)	FR	*A. incana* ssp. *incana*	AiAGN	+
38	Allemont (38)	FR		AiAll	+
39	Vallée-d'Aulps, pop. I and II (74)*	FR		AiAupI, II	+
40	Les Bossons (74)	FR		AiBOS	+
41	La Bérarde, pop. V (38)*	FR		AiBV	+
42	Fond-de-France (38)	FR		AiFF	-
43	Gévoudaz (73)	FR		AiG	+
44	Chamonix-Mont-Blanc (74)	FR		AiMB	+
45	Ornon (38)	FR		AiOR	+
46	Paute (38)	FR		AiP	+
47	La Pallud (38)	FR		AiPAL	+
48	Saint-Sorlin-d'Arves (73)	FR		AiSSA	+
49	Saint-Romain-de-Jalionas (38)	FR		AiSTR	+
50	Vallée des Villards, pop. I and II (73)*	FR		AiVVI, II	+/-
51	Alaska, Bonanza experimental forest	US	*A. incana* ssp. *tenuifolia*	AitALBP	+/-
52	Embrun (05)	FR	*A. viridis* ssp. *viridis*	AvEmb	+/-
53	Vallée des Merveilles, pop. I, II (06)*	FR		AvVMI, II	+/-
54	Lac d'Anterne (74)	FR		AvAnt	+
55	Mont d'Arménaz (73)	FR		AvAr	+/-
56	La Bérarde, pop. I, II, III, IV (38)*	FR		AvBI, II, III, IV	+
57	Bionnassay, pop. 200 and 201 (74)*	FR		AvBi200, 201	+
58	Col de la Croix-de-Fer (73)	FR		AvCf	+/-
59	Corbier, pop. I, II, III, IV (73)*	FR		AvCoI, II, III, IV	+/-
60	Fond-de-France (38)	FR		AvFF	+/-
61	Lac Fourchu (38)	FR		AvLF	-
62	Ornon (38)	FR		AvOr	+
63	La Toussuire, pop. I, II, III (73)*	FR		AvToI, II, III	+
64	Vallée des Villards (73)	FR		AvVVIII	+/-
65	Abitibi-Témiscamingue	CA	*A. viridis* ssp. *crispa*	AvcATI	+/-
66	Tadoussac, pop. I, II*	CA		AvcTadI, II	+/-
67	Alaska, Bonanza experimental forest	US	*A. viridis* ssp. *fruticosa*	AvfAL4B	+

(*) pop: different populations–less than one km distant– sampled on the same site. (**) CA: Canada, CH: Switzerland, DK: Denmark, DZ: Algeria, ES: Spain, FR: France, GB: Great Britain, HR: Croatia, US: United States. (***) Occurrence of nodule phenotype: +: Spore-positive (Sp+), -: Spore-negative (Sp–), +/-: both Sp+ and Sp– occurred on the site (see experimental procedures for phenotype determination).

Table 4.2. Occurrence of Sp+ and Sp– phenotypes according to the host-plant species.

Alnus species*	Number of analysed nodules	Number of sampled sites	Sp+ occurrence (% of sites)				Sp- occurrence only (% of sites)
			In total	Sp+ occurrence only	Sp+ and Sp- co-occurrence		
Ag	173	36	39	17	22		61
Ai	65	15	93	80	13		7
Av	98	16	94	38	56		6

(*) Ag: *Alnus glutinosa*, Ai: *A. incana* ssp. *incana* and ssp. *tenuifolia*, Av: *A. viridis* ssp. *viridis* and ssp. *crispa* and ssp. *fruticosa*.

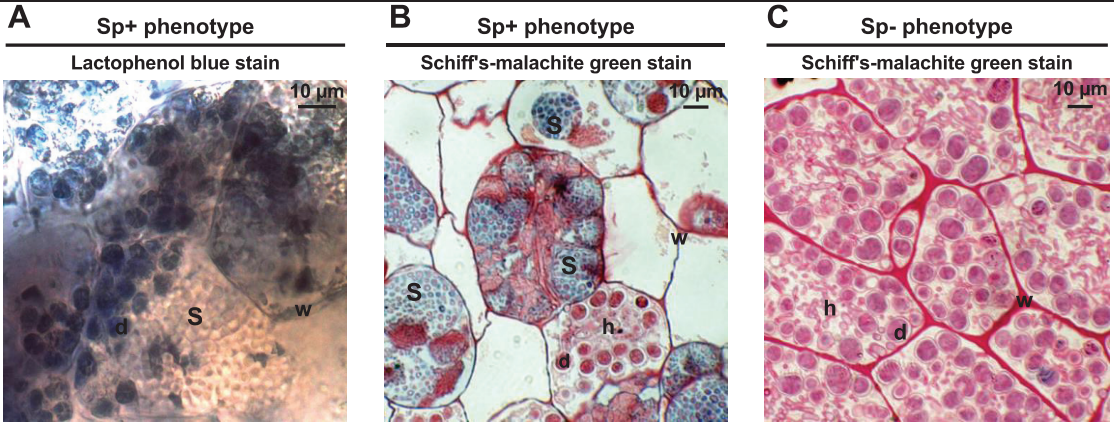


Figure 4.1. Microscopic structures of endophytic *Frankia* in *Alnus* root nodules

A: Lactophenol blue stain on nodule hand section. Nodule cells colonized by a Sp+ *Frankia* (able *of in-planta* sporulation). Spores (S) appeared as refringent and non-stained structures while diazovesicles (d) are stained deep blue. B-C: Schiff's-green malachite stain on nodule semi-thin sections. B: Nodule cells colonized by a Sp+ *Frankia*. Besides hyphae (h) and diazovesicules (both red), spores (green) are gathered in sporangia within the host-plant cells. C: Nodule cells colonized by a Sp– *Frankia* (unable of in-planta sporulation). Only hyphae and diazovesicules (red) are visible within the host-plant cells. w: cell wall.

Pozzi *et al.*, 2015.

supported by Posterior Probabilities (PP) and Bootstrap Values (BV) (noted as **PP**|*BV*). Relative positions between them were highly supported except between ArgP5-AG strain (G3) and clades 1-3 (**0.87**|*64*) and between clade 3 and clades 1-2 (**0.64**|*32*). All reference strains but two (Av59-7 and ARgP5-AG) grouped together into clades 2 (G1) and 4 (G2). All nodular endophytes genotyped in this study belonged to cluster 1 (*Alnus*-infective *Frankia*) and grouped into three divergent clades (1, 3 and 5), with the exception of three strains grouping into clade 2 and another three grouping into clade 4. Strains representative of four *Frankia* genomospecies defined by DNA-DNA hybridization (Fernandez *et al.*, 1989) were included in this

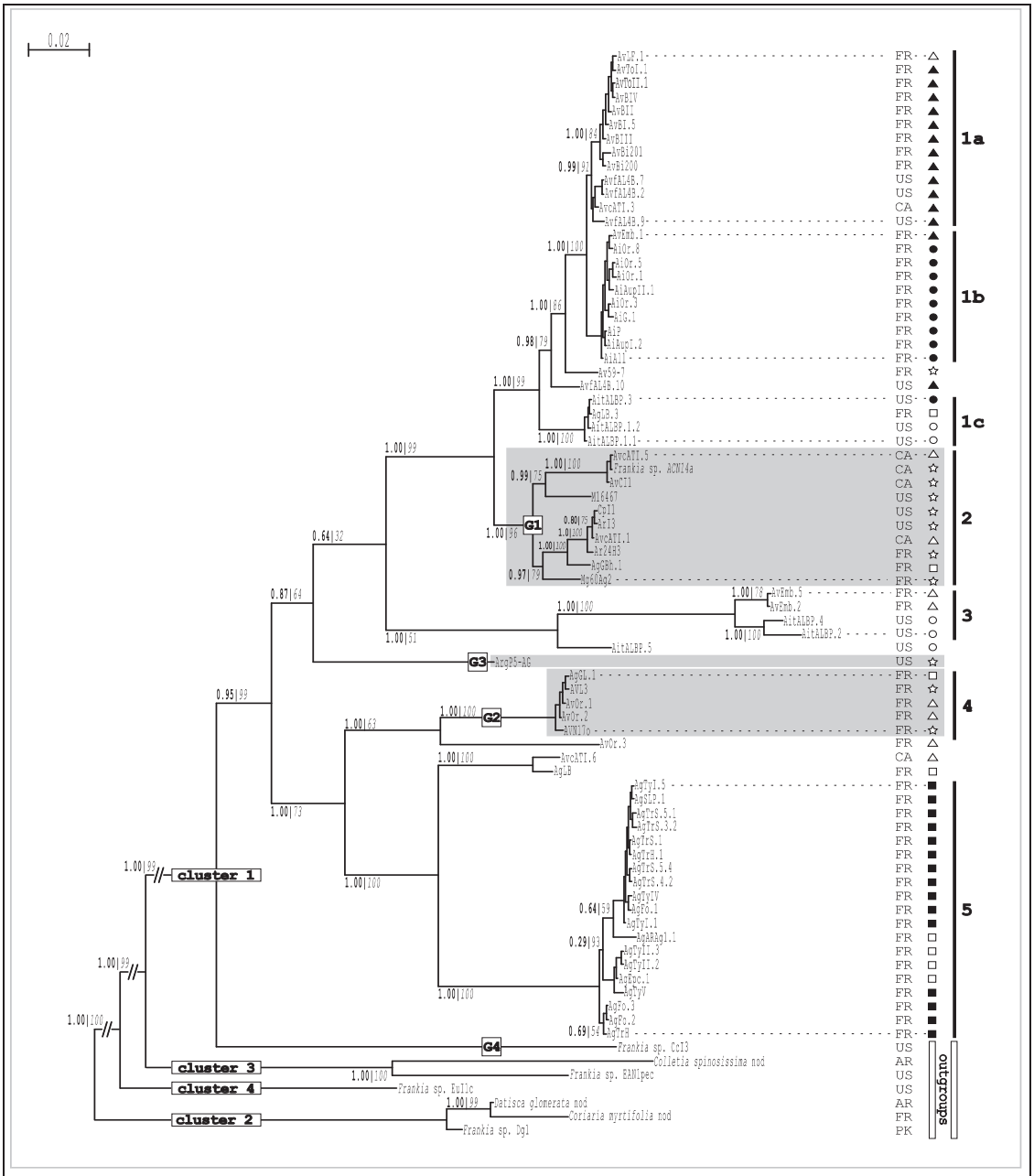


Figure 4.2. Phylogeny of *Alnus*-infective *Frankia* based on concatenated sequences of *dnaA*, *ftsZ* and *pgk* genes and estimated by Bayesian Inference.

Strain origin (host-plant): *Alnus glutinosa* nodules (squares), *A. incana* nodules (circles), *A. viridis* nodules (triangles), reference strains (stars). Strain origin (country) AR: Argentina, CA: Canada, FR: France, PK: Pakistan, US: United States. Shaded areas correspond to *Alnus*-infective reference strains. Phenotype of *in-planta* sporulation: Spore-positive (filled symbols), Spore-negative (empty symbols). Clades 1a to 5 are defined in the present study. G1 to G4: genomospecies of *Frankia* cluster 1 (Fernandez *et al.*, 1989). Clusters 1 to 4: (Normand *et al.*, 1996). Node reliability was assessed using both posterior probabilities (PP) and bootstrap values from 100 replicates (BV) and is indicated as PP|BV (see experimental procedures). The scale represents the average number of substitutions per nucleotide.
Pozzi *et al.*, 2015.

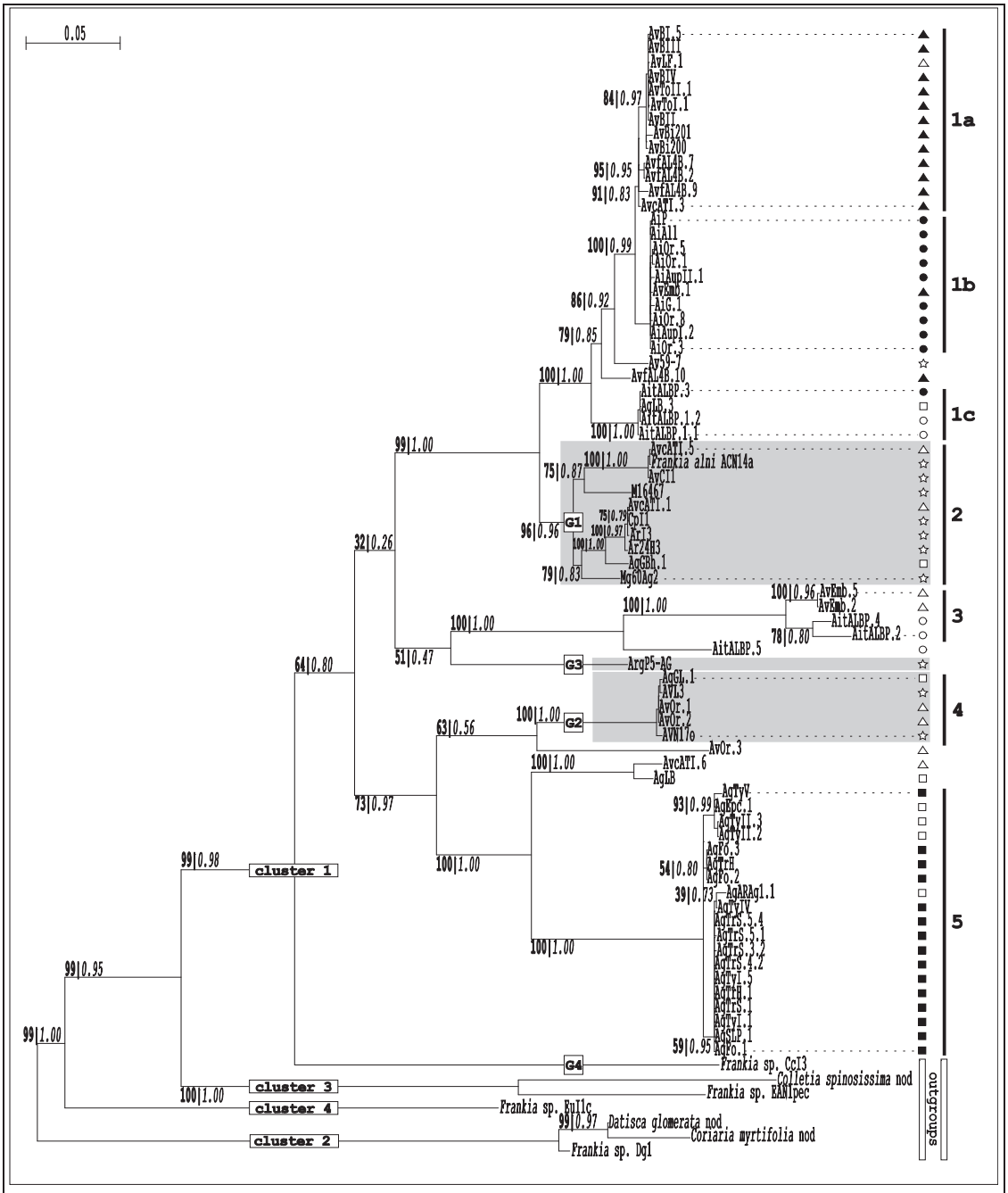


Figure 4.S1. Phylogeny of *Alnus*-infective *Frankia* based on concatenated sequences of *dnaA*, *ftsZ* and *pgk* genes and estimated by Maximum Likelihood.

Strain origin (host-plant): *Alnus glutinosa* nodules (squares), *A. incana* nodules (circles), *A. viridis* nodules (triangles), reference strains (stars). Shaded areas correspond to *Alnus*-infective reference strains. Phenotype of *in-planta* sporulation: Spore-positive (filled symbols), Spore-negative (empty symbols). Clades 1a to 5 are defined in the present study. G1 to G4: genomospecies of *Frankia* cluster 1 (Fernandez *et al.*, 1989). Clusters 1 to 4: (Normand *et al.*, 1996). Node reliability was assessed using both Bootstrap Values on 100 replicates (BV) and approximated Likelihood-Ratio Test (aLRT) and is indicated as BV|aLRT (see experimental procedures). The scale represents the average number of substitutions per nucleotide.
Pozzi *et al.*, 2015.

study (Table 4.S1). In the BI tree, the minimal phylogenetic distance between two genomospecies was equal to 0.138 (Figure S2). According to this cut-off, clades 3 and 5 could represent two new genomospecies (minimal distances from other clades 0.174 and 0.155, respectively), whereas clade 1 should belong to G1 (distance between clades 1 and 2 = 0.040).

Sp+ strains belonged to clades 1 and 5. Their phylogenetic clustering was consistently associated with the host-plant species with all *A. glutinosa* strains grouped into clade 5, while all *A. viridis* and *A. incana* strains grouped into sub-clades 1a and 1b respectively (with the exception of AitALBP.3 strain belonging to clade 1c). Sp– nodular strains were distributed in all clades of the phylogenetic tree and no structuration by the host-plant species was observed. When both Sp+ and Sp– nodules co-occurred on the same site, their nodular strains diverged from each other in the phylogeny and grouped with Sp+ and Sp– strains, respectively. For instance, Sp+ strain from site 52 (AvEmb.1) grouped into clade 1b while Sp– strains from the same site (AvEmb.5 and AvEmb.2) grouped into clade 3. Again, *A. viridis* Sp+ strain from site 66 in Québec (AvcATI.3) grouped into the sub-clade 1a with other *A. viridis* Sp+ strains from the Alps and Alaska whereas the Sp– strains either branched into clade 2 (AvcATI.1 and AvcATI.5) close to the reference strain ACN14a isolated from the same site (Normand and Lalonde, 1986) or as a sister group of clade 5 (AvcATI.6).

Table 4.S1. List of *Frankia* reference strains.

Strain name	Host plant	Geographic origin	Cluster**	References***
Ar24H3	*Alnus rubra*	Orléans, France	1	C, G
ARgP5-AG	*Alnus incana* ssp. *rugosa*	Québec, Canada	1	C, G, H
ArI3	*Alnus rubra*	Oregon, USA	1	C, G, H
Av59-7	*Alnus viridis* ssp. *viridis*	Alpe-du-Grand-Serre, France	1	J
AvCI1	*Alnus viridis* ssp. *crispa*	Ontario, Canada	1	A, B, C, E, G
AVL3	*Alnus viridis* ssp. *viridis*	Lautaret, France	1	C, G
AVN17o	*Alnus viridis* ssp. *viridis*	La Toussuire, France	1	C, G
*Colletia spinosissima nod**	*Colletia spinosissima*	Argentina	3	D
*Coriaria myrtifolia nod**	*Coriaria myrtifolia*	Nyons, France	2	D
CpI1	*Comptonia peregrina*	Massachusetts, USA	1	A, C, E, G
*Datisca glomerata nod**	*Datisca glomerata*	Argentina	2	D
Frankia sp. ACN14a	*Alnus viridis* ssp. *crispa*	Tadoussac, Canada	1	C, H
Frankia sp. CcI3	*Casuarina cunninghamiana*	Florida, USA	1	C, G, L
Frankia sp. EAN1pec	*Elaeagnus angustifolia*	Illinois, USA	3	I
Frankia sp. EuI1c	*Elaeagnus umbellata*	USA	4	B
Frankia sp. Dg1	*Datisca glomerata*	Pakistan	2	K
M16467	*Myrica pensylvanica*	New Jersey, USA	1	C, E, F
Mg60Ag2	*Alnus glutinosa*	Landes, France	1	G

(*) Direct molecular characterization from nodular DNA. (**) Clusters 1 to 4: (Normand *et al.*, 1996). (***) A: (An *et al.*, 1985), B: (Baker and Torrey, 1980), C: (Bautista-Guerrero *et al.*, 2011), D: (Bautista *et al.*, unpublished), E: (Bloom *et al.*, 1989), F: (Clawson and Benson, 1999), G: (Fernandez *et al.*, 1989), H: (Normand and Lalonde, 1986), I: (Lalonde *et al.*, 1981), J: (Moiroud and Guillaumaud, unpublished), K: (Persson *et al.*, 2011), L: (Zhang *et al.*, 1984).

A

	G2	G3	G4
G1	0.200	**0.138**	0.241
G2		0.177	0.256
G3			0.235

B

	#2 (G1)	#3	ArgP5-AG (G3)	#4 (G2)	#5	(G4)
#1	0.040	0.174	0.138	0.186	0.202	0.242
#2 (G1)		0.174	**0.138**	0.186	0.201	0.242
#3			0.202	0.250	0.266	0.305
(G3)				0.177	0.180	0.236
#4 (G2)					0.155	0.256
#5						0.258

Figure 4.S2. Matrices of phylogenetic distances.

Pairwise phylogenetic distances (A) between genomospecies and (B) between clades. The minimal distance (average number of substitutions per nucleotide, derived from the Bayesian Inferred phylogenetic tree) between two genomospecies was equal to 0.138 and was chosen as a cut-off to propose genomospecies candidates. G1 to G4: genomospecies of *Frankia* cluster 1 (Fernandez *et al.*, 1989). Clade numbers: see Figure 2.

Pozzi *et al.*, 2015.

4.3.3. Genetic diversity of Sp+ and Sp– *Frankia* strains at the alder stand scale.

A total of 99 root nodules were sampled from nine sites and at least nine nodules per site were typed except for sites 42 and 63 (Table 4.3). Sp+ frequency (ratio of number of Sp+ nodules over total number of sampled nodules per site), number of observed Operational Taxonomic Units (OTUs) and standardized number of observed OTUs (for n = five sequences) were estimated for each site. Standardization (see Experimental Procedures) allowed different samples with different sizes to be compared and five was the minimal number of sequences available for each site.

Two types of rarefaction curves were obtained**:** (i) the number of observed OTUs rapidly increased with the number of analyzed *pgk* sequences and did not saturate beyond the scope of our experiment (curve numbers 27, 42 and 58, Sp+ frequency ranged 8-20%) or (ii) the number of observed OTUs rapidly reached saturation (curve numbers 17, 28, 45, 50, 59 and 63, Sp+ frequency ranged 40-100%) (Figure 4.3A). Overall, saturation occurred more rapidly for Sp+ nodules than for Sp– nodules (Fig 4.3B). There were about 16 observed OTUs on 36 Sp– nodules against only five OTUs on 63 Sp+ nodules.

Table 4.3. Frequency of Spore-positive (Sp+) phenotype and genetic diversity of *pgk* at the site level.

Alnus species*	Site No.	Number of analysed sequences	Frequency of Sp+ phenotype	Number of observed OTUs**	Standardized number of observed OTUs**
Ag	27	13	8	6	3.24
	17	10	40	3	2.84
	28	10	90	1	1.00
Ai	42	5	20	3	3.00
	50	19	89	2	1.26
	45	17	100	1	1.00
Av	58	9	11	7	4.47
	59	10	70	2	1.91
	63	6	100	2	1.85

The number of observed Operational Taxonomic Units (OTUs) was used as a proxy for genetic variability of *Frankia*. Frequency of Sp+ phenotype: ratio of number of Sp+ nodules over total number of sampled nodules per site. (*) Ag: *Alnus glutinosa*, Ai: *A. incana* ssp. *incana*, Av: A. *viridis* ssp. *viridis*. (**) For each site, the number of OTUs was computed from the distance matrix of the pgk gene alignment (see experimental procedures for details).

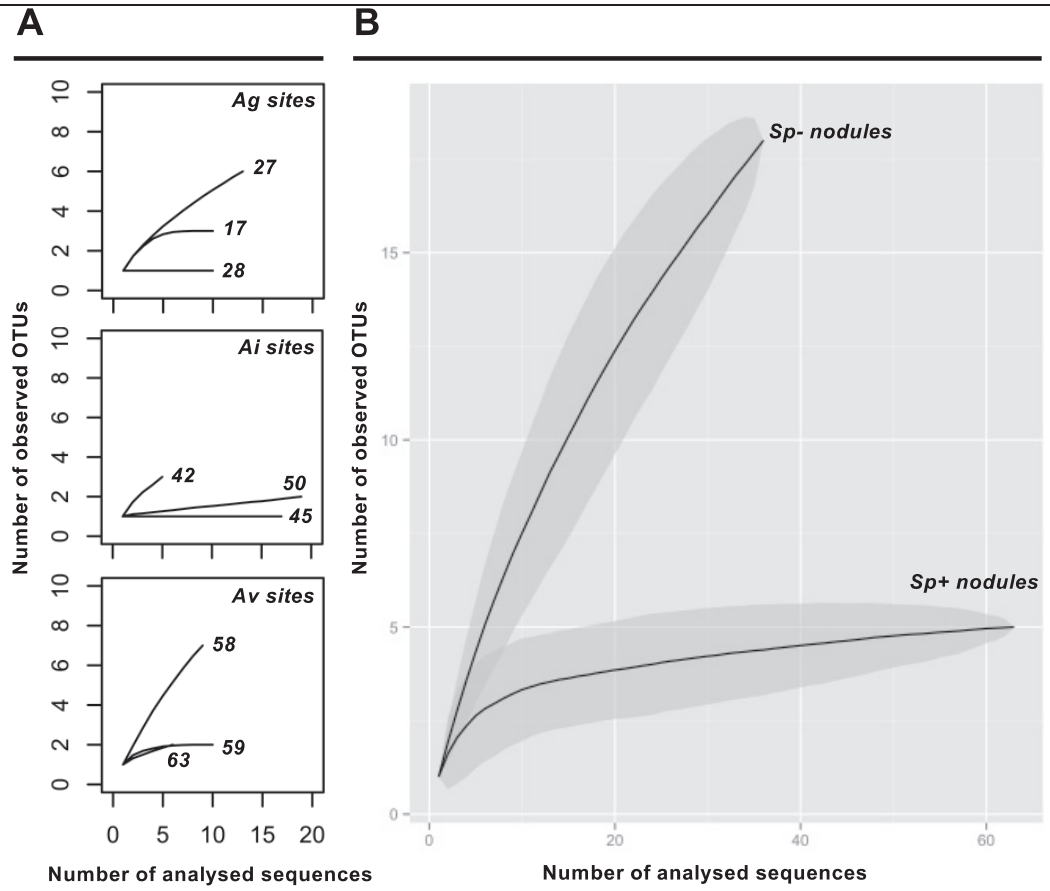


Figure 4.3. Genetic diversity of *pgk* at the site level.

(A) Analysis at the alder stand scale, with regards of host-plant species and (B) global analysis, with regards of the *in-planta* sporulation phenotype. The number of observed Operational Taxonomic Units (OTUs) was used as a proxy for genetic diversity of *Frankia*. For each graph, the number of OTUs was computed from the distance matrix of the *pgk* gene alignment (see experimental procedures for details). Curve number correspond to site numbers in Tables 1 and 3. Ag: *Alnus glutinosa*, Ai: *A. incana* ssp. *incana*, Av: *A. viridis* ssp. *viridis*. Sp+: Spore positive, Sp–: Spore-negative. Shaded area indicates 95% confidence interval. Pozzi *et al.*, 2015.

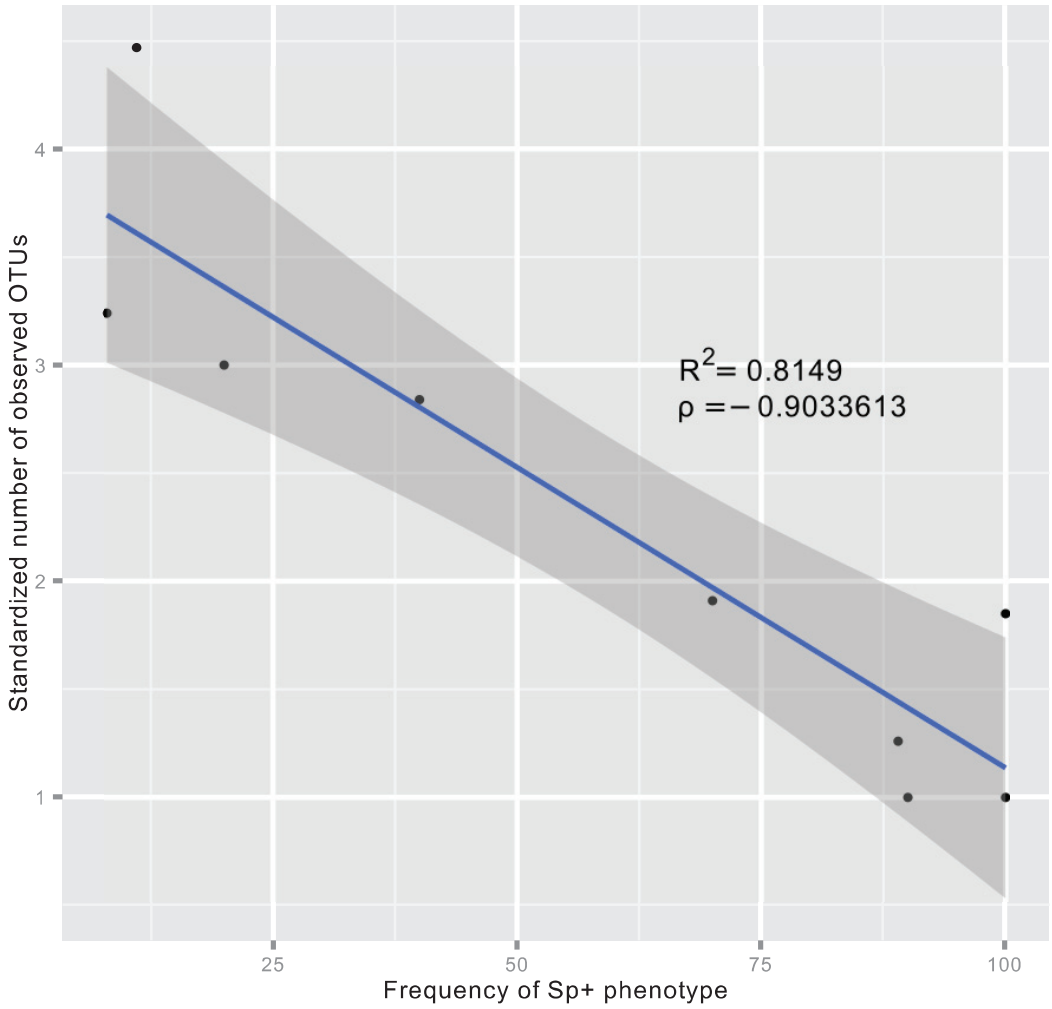


Figure 4.S3. Relation between the frequency of Sp+ phenotype and the standardized number of OTUs, at the site level.

For each site, the number of observed Operational Taxonomic Units (OTUs) was computed from the distance matrix of the pgk marker alignment and was used as a proxy for genetic diversity of *Frankia*. The standardized number of OTUs was defined as the number of OTUs observed for five analyzed sequences and was derived from each saturation curve for x=5. Frequency of Sp+ phenotype: ratio of number of Sp+ nodules over total number of sampled nodules per site. P-values<0.001 for linear model and Spearman Rank-Order correlation (see experimental procedures for details). Shaded area indicates 95% confidence interval.

Pozzi *et al.*, 2015.

The standardized number of observed OTUs was then tested as a function of the frequency of Sp+ nodule phenotype per site. Most of the variability

among the data (81,49%) was significantly explained by a linear relation between the two tested variables (linear model, F=36,22 on one and seven DF; $p<0.001$; adjusted $R^2=0.8149$) and there was significant negative correlation (about -0.90) between them (Spearman Rank-Order correlation, S=228,4034; $p<0.001$; $\rho=-0.9033613$) (Figure 4.S3). Considering the standardized number of observed OTUs as a proxy for genetic diversity, a high frequency of Sp+ phenotype on a site was correlated with a low genetic diversity among *Frankia* strains.

4.4. Discussion

Early cross-inoculation studies strongly suggested that *in-planta* sporulation depended on the *Frankia* strain genotype (van Dijk, 1978; VandenBosch and Torrey, 1985; Tjepkema *et al.*, 1986; Monz and Schwintzer, 1989). Yet, very few data are available on these strains. A first evidence of genetic difference between Sp+ and Sp– strains was given by determining ribosomal oligonucleotide primers specific to each type of strains (Simonet *et al.*, 1994). Besides, Sp+ *Alnus* strains were positioned close to *Frankia alni* (G1) in *Frankia* phylogenies (Nazaret *et al.*, 1991; Normand *et al.*, 1996; Bautista-Guerrero *et al.*, 2011). However, these studies often based on a unique or few nodules or sites did not allow describing Sp+ diversity and phylogeny.

This study was based on a large number of nodules sampled on three different *Alnus* species at a wide geographical scale. Nodules were genotyped using MLSA method that allows both to estimate genus phylogenies and to depict bacterial genomospecies, (Gevers *et al.*, 2005). Our results gave for the first time a strong evidence that (i) Sp+ and Sp– *Alnus*-infective *Frankia* strains are genetically different even when sampled from the same alder stand and the same host-plant species (ii) there are at least two distinct lineages of Sp+ *Frankia* that cluster according to the host-plant species and without regard of geographic distance and (iii) genetic diversity of Sp+ strains is very low at the alder stand scale compared with Sp– strains.

4.4.1. Phylogeny and taxonomic status of Sp+ strains.

Sp+ *Frankia* were distributed within two unrelated well-supported clades (1 and 5) (Figure 4.2). Considering the phylogenetic distance between these two lineages compared to the minimal pairwise distance recorded between *Alnus*-infective genomospecies previously described (Figure 4.S2) these two Sp+

clades obviously belong to different genomospecies. Therefore, including Sp+ strains in the phylogeny allowed revealing an unexplored diversity.

Clade 1 was close to *F. alni* reference strains (clade 2, G1) as suggested in previous studies (Nazaret *et al.*, 1991; Normand *et al.*, 1996; Bautista-Guerrero *et al.*, 2011). The genetic distance between clade 1 and clade 2 did not support the exclusion of clade 1 from G1. Clade 1 can be subdivided into three sub-clades (1a, 1b and 1c). Sub-clades 1a, 1b were highly supported and can be characterized by several phenotypic traits allowing discrimination from each other and from clade 2: (i) sub-clades 1a and 1b mostly consist of Sp+ strains while clade 2 uniquely consist of Sp– strains, (ii) sub-clades 1a and 1b gather strains according to the host-plant species (*A. viridis* and *A. incana*, respectively) while clade 2 gather strains of more diverse origins (various host-plants of *Alnus*, *Comptonia* and *Myrica* genera), (iii) sub-clades 1a and 1b consist of *Frankia* strains uncultured to date while clade 2 mostly consist of several cultured reference strains. On the base of both genotypic and phenotypic differences, we propose that clades 1a and 1b could represent subspecies of *F. alni* (G1).

Clade 5 did not matched to any of G1 to G4 genomospecies of cluster 1. The significant distances between clade 5 and other clades suggest these strains merit novel genomospecies status. These strains (i) have *A. glutinosa* as host-plant species, (ii) mostly sporulate *in-planta* and (iii) are uncultured to date.

4.4.2. Effect of host-plant *vs.* abiotic environmental factors.

Contrary to Sp– strains, Sp+ strains clustered in the phylogeny according to the host-plant species, with clades 1a, 1b and 5 corresponding to *A. viridis (A. viridis* ssp. *viridis, A. viridis* ssp. *crispa* and *A. viridis* ssp. *fruticosa), A. incana* (*A. incana* ssp. *incana,* and *A. incana* ssp. *tenuifolia*) and *A. glutinosa* strains, respectively. This result suggests that the host-plant is a driving factor of the phylogeny and that cospeciation could occur between the Sp+ *Frankia* and their respective hosts. However, we did not find phylogenetic congruence between *Alnus* species trees (Navarro *et al.*, 2003; Chen and Li, 2004; Ren *et al.*, 2010) and our *Frankia* MLSA tree. Indeed, *A. glutinosa* and *A. incana* were sister species and *A. viridis* belonged to a divergent lineage in plant phylogenies, whereas *Frankia* phylogeny tightly grouped *A. incana* and *A.*

viridis Sp+ strains. Thus, this lack of phylogenetic congruence does not support the cospeciation hypothesis.

However, host-plant effect markedly diverges on Sp+ and Sp– strains as seen by their respective host specificity. Sp– strains isolated from *Alnus* were long known to infect other host genera, such as *Comptonia* and *Myrica* (Baker, 1987). On the contrary, Sp+ strains from *A. incana* had narrow host specificity since they did not infect *A. glutinosa*, a genetically close species (Kurdali *et al.*, 1988; van Dijk *et al.*, 1988; Schwintzer, 1990). These cross-infectivity studies together with the specificity of the Sp+ *Frankia* in this study strongly suggest adaptation to different hosts. Additional works will be needed to establish whether there is coevolution between Sp+ *Frankia* and its hosts or not.

Although the host-plant species could influence the phylogenetic clustering and the genetic diversity of Sp+ strains, this effect remains confounded with the climate. Typically, *Alnus* species distribution is driven by climatic factors. For instance in the Alps, *Alnus* species are distributed along an altitudinal gradient resulting in distinct habitats for each species (with different temperature, precipitation and irradiation conditions). While *A. glutinosa* inhabits lowlands, *A. incana* and *A. viridis* inhabit highlands at an elevation of 600-1000m and 1000-2000m respectively (Richard, 1967; Lhote, 1986). However, similar climate (sub-alpine/boreal) occurs at high elevation on medium latitude sites (*e.g.* the Alps) and at low elevation on high latitude sites (*e.g.* Alaska, Québec) resulting in the occurrence of *A. incana* and *A. viridis* (and their American relatives) in both situations. Previous studies showed an effect of altitude on *Frankia* community associated to *Alnus* species (Igual *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2007) but none of these studies considered sporulation phenotype. In this study *A. viridis* Sp+ strains from the Alps, Alaska and Quebec were grouped together in clade 1 and were genetically more similar and closer to *A. incana* Sp+ strains than to *A. glutinosa* ones (Figure 4.2). Moreover, Sp+ frequency on *A. viridis* and *A. incana* in sub-alpine/boreal habitats was more than twice that of *A. glutinosa* in temperate habitats (Table 4.2), suggesting a correlation between sub-alpine/boreal habitats and high Sp+ strain frequency. These results confirm what was previously observed for *A. glutinosa* (Weber, 1986), *A. incana* (Danière *et al.*, 1986; Weber, 1986), and is first reported for *A. viridis*. While *A. incana* and *A. viridis* stands with a low Sp+ frequency were very rare in Western Europe (Danière *et al.*, 1986; Kurdali *et al.*, 1989), this was not the case for Northern American *A. incana*

(Normand and Lalonde, 1982; Holman and Schwintzer, 1987) and *A. viridis* (Normand and Lalonde, 1982). However, in Normand and Lalonde (1982) *in-planta* sporulation phenotypes were reported only for successfully isolated strains: Sp+ strains being unculturable to date (Torrey, 1987), there was an obvious bias minimizing the percentage of Sp+. In Holman and Schwintzer (1987), the sampled area (Maine, USA) was under humid continental climate and half of the sampling sites were below 91 m. elevation. Interestingly, Holman and Schwintzer (1987) reported an isolated population of *Alnus viridis* on Roan Mountain (elevation 1731 m, North Carolina, USA) that was 100% Sp+. Thus, examination of additional geographical areas in North America may uncover further Sp+ populations.

To date, additional experiments under laboratory-controlled conditions are needed to distinguish the effects of the host-plant species from the climatic factors associated with the habitat. For this, a precise protocol for determination as well as quantification of *in-planta* sporulation rate is needed. The Schiff's-malachite green staining protocol developed in this paper provided high quality observations, even for damaged nodules or when abundant plant structures hampered the phenotype determination. In the future, this method could allow better quantification of *in-planta* sporulation phenomenon.

4.4.3. Genetic homogeneity of Sp+ *Frankia*.

Our results evidenced a robust negative correlation between the number of OTUs and the Sp+ frequency (Figure 4.S3) to such a point that almost no diversity (one unique or two genotypes) was found in sites where only Sp+ were detected. Although the markers used were all housekeeping genes, they were found to discriminate between potentially closely related strains (same host-plant species and same site) (Figure 4.2). The low diversity of *Frankia* endophytes predicted in alder stands with high Sp+ frequency could be the consequence of either low *Frankia* diversity in such soils (recent divergence and/or purifying selection on the *pgk loci*.) or selective filtering by host-plant that preferentially associated to certain Sp+ genotypes. *Frankia* endophytes originating from geographically distant areas (Alps, Alaska, Québec) appeared almost clonal with the markers used suggesting that similarity in *Frankia* populations or communities is mainly determined by host-plant species whereas geographic proximity is a non-significant factor, as previously suggested (Welsh *et al.*, 2009; Higgins and Kennedy, 2012). Moreover in the

case of *A. viridis*, the high vegetative/clonal reproduction of the plant– a competitive behavior that increases its spreading capacity– was correlated to the alteration of biodiversity in sub-alpine landscapes (Anthelme *et al.*, 2007). More generally, it was shown that the less genetic diversity aboveground (plant), the less genetic and functional diversity belowground (microflora) (Hooper *et al.*, 2000; Schweitzer *et al.*, 2008). As a consequence, the low genetic diversity of *Frankia* strains observed in our study could depend from the low genetic diversity of *A. viridis*.

4.4.4. Towards a hypothetical scenario of Sp+ *Frankia* strain ecology.

In-planta sporulation is a life-history trait (Roff, 1992; Stearns, 1992) that produces, besides physiologically active offspring (hyphae, diazovesicles), a huge amount of dormant spores, which impacts the *fitness* of the strain. Here, we established that this trait is associated with distinct phylogenetic lineages and genetic homogeneity for a given host-plant species. Our results also suggested that Sp+ strains have higher host specificity than Sp– strains. This observation, in addition to the difficulty of isolating and culturing Sp+ strains (Torrey, 1987), suggests these strains have a high metabolic dependence on their host and could have evolved into obligate symbionts. *In-planta* sporulation provides abundant dormant and clonal offspring of small size and thus impacts the survival and dispersal of *Frankia* outside the host-plant. Following nodule decay, spores released into the soil would lead to the dominance of Sp+ strains in the root vicinity (Schwintzer, 1990). Their capacity to germinate in the soil and to infect new roots (van Dijk, 1979; Houwers and Akkermans, 1981; van Dijk, 1984; Schwintzer, 1990) would enable the horizontal transmission of *Frankia* without the need of saprophytic growth in the soil. These features are consistent with early hypothesis that Sp+ could represent the final stage in the succession of *Frankia* populations in alder stands (van Dijk, 1984; Holman and Schwintzer, 1987) and that their persistence on a stand would depend on the continuous colonization by the host-plant (Weber, 1986). Furthermore, *in-planta* sporulation would ensure a highly clonal multiplication rate of parental Sp+ genotype into the nodules and spores would constitute a germ bank (Evans and Dennehy, 2005) that could be less susceptible to genetic alterations (mutation, horizontal gene transfer, recombination...) partially explaining the high genetic homogeneity found in this study. In contrast, Sp– strains would be facultative symbionts

able of saprophytic growth (Chaia *et al.*, 2010) and able to persist in soils devoid of host-plant (Maunuksela *et al.*, 1999). Being active all along their life cycle, they would be more susceptible to cumulate genetic alterations.

Previous studies suggested that Sp+ *Frankia* were more infective and less efficient in nitrogen fixation than Sp– strains (Houwers and Akkermans, 1981; van Dijk, 1984; VandenBosch and Torrey, 1984; Wheeler *et al.*, 1986; Markham, 2008). Sp+ strains may thus *trade-off* their competitive behavior at the expense of mutualistic behavior (Markham, 2008), demonstrating a « cheater » strategy (Trivers, 1971) as already suggested for inefficient (non nitrogen-fixing) Rhizobia (Denison, 2000). Under that hypothesis, an arms race could be expected leading the host-plant and the bacteria to evolve defenses, sanctions and countermeasures (Denison, 2000; Ratcliff, 2010; Laguerre *et al.*, 2012). This evolutionary mechanism– referred to as « Red Queen » hypothesis (Van Valen, 1973)– would have consequences on the ecology and evolution of both *Frankia* and the host-plant. However, from a theoretical point of view, the cheater hypothesis for Sp+ strains is based on the assumptions that Sp+ symbionts would be costly to the host-plant compared to Sp– symbionts. Indeed, in the short term, a Sp+ symbiont would divert a part of the host's investment in nodule (photosynthates) from nitrogen fixation to dormancy/*in-planta* sporulation, resulting in reduced efficiency. But *in-planta* spores could confer on Sp+ strains a better survival to harsh conditions and a better dispersal after nodule decay, resulting in a better competitiveness for nodulation than Sp– strains (van Dijk, 1979; Houwers and Akkermans, 1981; van Dijk, 1984; Schwintzer, 1990). Therefore, *in-planta* sporulation would enable maintaining and spreading a Sp+ symbiont compatible with the host-plant throughout its lifetime on an alder stand. Thus, despite of the short-term reduced efficiency, Sp+ strains could be evolutionary favorable to the host-plant in the long run, especially in habitats where the extinction of Sp– is likely to occur.

4.4.5. Conclusion and perspectives

The mechanisms driving the evolutionary ecology of the *in-planta* sporogenesis of *Frankia* are still unknown. Indeed, advantages and costs of this strategy in terms of *fitness* for the bacteria and the host-plant remain unresolved. We propose *in-planta* sporulation could be considered as developmental delay allowing *Frankia* to develop "later and elsewhere" rather than "here and now" (Solbreck, 1978) in fluctuating environment, as known

in other organisms (Seger and Brockmann, 1987). But while this strategy was observed frequently on sub-alpine or boreal *Alnus* species, it is not systematically encountered even on the same alder stand. That suggests there are some ecological contexts where *Frankia* strain could profit from sporulating *in-planta* and other where they cannot if Sp+ *Frankia* are unable to survive or compete for nodulation with Sp–. Under sufficient environmental heterogeneity, we hypothesize that variations in nodule lifespan and/or density of infection sites on roots are unforeseeable. Therefore, we predict that a developmental delay strategy such as *in-planta* sporulation (Sp+ phenotype) may be selected. This hypothesis should be tested both by computational modeling using an adaptive dynamic approach (Metz *et al.*, 1996) including both environmental stochasticity and density-dependence mechanisms, as used for instance for evolution of insect dormancy (Gourbière and Menu, 2009; Rajon *et al.*, 2009; Rajon *et al.*, 2014) and by experimental approaches in order to determine the cost:benefit ratio of the symbiotic relationships in both nodule types.

More generally, the ecological properties of *in-planta* sporulation may offer an interesting model to understand the evolutionary ecology of plant-bacteria symbiotic relationships.

4.5. Experimental Procedures

4.5.1. Nodule sampling.

Nodules were collected from August 2008 to May 2012 on three *Alnus* species: *A. glutinosa* (L.) Gaertn. (black alder), *A. incana* ssp. *incana* (L.) Moench (grey alder), *A. incana* ssp. *tenuifolia* (Nutt.) Breitung (mountain/thinleaf alder), *A. viridis* ssp. *viridis* (Chaix) DC. Koch (green alder), *A. viridis* ssp. crispa (Aiton) Turrill (mountain/green alder) and *A. viridis* ssp. *fruticosa* (Ruprecht) Nyman (siberian alder). *A. viridis* is also referred to *A. alnobetula* (Ehrh.) K. Two separate sampling were done. A large-scale survey included a total of 67 sites (Table 4.1) to study the occurrence of Sp+ nodule phenotype according to host-plant species. Three to five distinct trees were sampled for each site or population. An additional sampling on nine sites was done to assess the genetic diversity of *Frankia* strains at the alder stand scale (Tables 4.1 and 4.3). Five to 19 additional trees were sampled for each site.

Nodules were washed in sterile distilled water and kept a few days at 4°C before analysis, then stored at -20°C. Two adjacent lobes of the same nodule, likely originated from a unique infection event, were sampled. One lobe was used to determine the sporulation phenotype and the other one to genotype *Frankia*.

4.5.2. Sporulation phenotype determination.

Ten to 25 transversal hand sections (according to lobe length) were stained 1-3 min. with lactophenol blue (Réactifs RAL, Martillac, France).

A double-staining protocol– modified Schiff's-malachite green stain– was developed to improve determination on semi-thin sections. Lobes were processed as recommended in (Pépin and Boumendil, 1982) with the following modifications: (i) pH of the Citrate-Phosphate buffer was 7, (ii) lobes were embedded in LR-White resin (London Resin Company Ltd, Reading, England) and (iii) polymerization of the resin was carried out at 56°C for 24 hours in capsules to avoid oxygen. Semi-thin sections (0.8 µm) were obtained using a Leica Ultracut E ultra-microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Sections were dried 10 minutes at 40°C and 5 minutes at 100°C and stained with Coleman's Schiff reagent for 10 minutes at 40-45°C followed by 1% Malachite-green for 40 seconds at 40-45°C.
Sections were examined under transmitted light microscopy using a Nikon OptiPhot2 (Nikon Instruments, Amsterdam, Netherlands). Nodule phenotype was considered Sp+ when at least one sporangium was observed out of 50 infected plant cells (Schwintzer, 1990).

4.5.3. *Frankia* strains and culture conditions.

Among the 18 reference strains used (Table 4.S1), 12 strains were representative of cluster 1 (Fernandez *et al.*, 1989; Normand *et al.*, 1996). The six other strains were used as references of clusters 2, 3 and 4 for rooting purposes.

Strains were cultured in the dark at 28°C in F *medium* containing Tween 80 (Simonet *et al.*, 1985) or in BAP medium (Murry *et al.*, 1984) with weekly manual shaking.

4.5.4. DNA extraction, PCR amplification and sequencing.

Lobes were surface-sterilized 4-5 min. in Calcium Hypochlorite 3% (m/vol) and peeled aseptically with a sterile needle to remove any potentially contaminating *Frankia* from the surface. Total nodular DNA was extracted from one single lobe as previously described (Huguet *et al.*, 2001) with slight modifications. DNA from *Frankia* cultured strains was extracted by using a DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Three housekeeping genes, *pgk*, *dna*A and *fts*Z, were amplified by a simple PCR reaction. All nodules were genotyped using *pgk loci*. A subset of 61 nodules from the first sampling was also genotyped with *dna*A and *fts*Z in order to obtain a MLSA phylogeny. For each of the three *loci*, PCR reaction contained: 2 µL template DNA, 1X PCR buffer, 0.5 mM of each primer (Table 4.S2), 5mM of a dNTP mix, 2 mM of $MgCl_2$, 10% DMSO (vol/vol), 0.4 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California) and sterile Miniversol® water. The reaction conditions were: initial denaturation for 5 min at 94 °C, 30 cycles of denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 1 min at 62°C and extension at 72°C for 1 min. A final extension step was performed at 72°C for 10 min.

PCR products were double- or single-strand sequenced by Biofidal-DTAMB (Villeurbanne, France) using an ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California) with the same set of primers described above (Table 4.S2).

Table 4.S2. List of primers used for DNA amplification and sequencing.

Gene	Primer name and sequence (5'→ 3')		Annealing temperature
dnaA	dnAfdT7F	TAATACGACTCACTATAGGGGAGGARTTCACCAACGACTTCAT	62 °C
	dnArvT3R	ATTAACCCTCACTAAAGGGACRGAAGTGCTGGCCGATCTT	
ftsZ	ftsZfdT7F	TAATACGACTCACTATAGGGCCGTCAACCGGATGATCGAA	62 °C
	ftsZrvT3R	ATTAACCCTCACTAAAGGGAGCSGCGTTGATCTCGAACAG	
pgk	pgkFwdT3	ATTAACCCTCACTAAAGGGATGAGGACGATCGACGACCTGC	62 °C
	pgkRevT7	TAATACGACTCACTATAGGGCGCSAGGAAGGTGAAGCACAT	

The nodular sequences were submitted to GenBank® under acc. no. KJ503834-KJ503887 (*dnaA*), KJ503948-KJ503998 (*ftsZ*), KJ503888-KJ503947 (*pgk*, 1st sampling), KJ503999-KJ504102 (*pgk*, 2nd sampling); the reference strain sequences were submitted under acc. no. JN684982, JN684983, JN684986-JN684989, JN685003, JN685005, JN685018, JN685020 and KJ476368 (*dnaA*), JN685040, JN685041, JN685044-JN685047, JN685060-JN685061, JN685063, JN685076 and JN685078 (*ftsZ*), JN685097-JN685098, JN685101-JN685104, JN685118-JN685120, JN685132, JN685134 and KJ476369 (*pgk*). Sequences of type strains *Frankia* sp. ACN14a, *Frankia* sp. CcI3, *Frankia* sp. Dg1, *Frankia* sp. EAN1pec and *Frankia* sp. EUI1c were retrieved from genomes in GenBank® under acc. no. (INSDC) CT573213, CP000249.1, CP002801, CP000820.1 and CP002299.1, respectively.

4.5.5. Phylogenetic analysis of Sp+ and Sp– *Alnus*-infective *Frankia* strains.

Sequence quality was verified with 4Peaks v. 1.7.2 (Griekspoor and Groothuis, 2014). Amino acid sequences of the three *loci* were aligned separately with MUSCLE v. 3.8.31 (Edgar, 2004) and concatenated as nucleotide sequences in SeaView v.4.4.2 (Gouy *et al.*, 2010). The Bayesian Inference (BI) was performed with MrBayes v. 3.313.2 (Ronquist *et al.*, 2012) and by Maximum Likelihood (ML) with PhyML v. 3.1 (Guindon *et al.*, 2010). MrBayes was run with a GTR model (Tavaré, 1986) and a gamma distribution with four categories and an estimated alpha parameter to take into account the heterogeneity of evolutionary rates among sites. Four chains were run in parallel for 10^6 generations. The first 2000 generations were discarded as burn-in. The remaining trees were sampled every 100 generations to check for convergence and to build the consensus tree. PhyML was run with a GTR+ 4 model and the NNI+SPR option for topology exploration. The branch robustness of ML trees was estimated using the nonparametric approach implemented in PhyML (100 replicates of the original alignments). The GTR+ 4 model was chosen according to the model selection tool implemented in TreeFinder v. 2011 (Akaike Information Criterion) (Jobb *et al.*, 2004).

4.5.6. Genetic diversity of the *pgk* marker at the alder stand scale.

The partial sequences of *pgk* gene were aligned using MUSCLE as described above. The distance matrices were computed from the alignment with the Dnadist tool of the PHYLYP package (Felsenstein, 1989) under Kimura-two parameters substitution model (Kimura, 1980). From these matrices, the numbers of observed Operational Taxonomic Units (OTUs) were computed in Mothur v. 1.31.2 (Schloss *et al.*, 2009) with the furthest neighbor clustering and 0.0049 as the maximum pairwise distance between sequences from a same OTU. This distance, indicated as "0.00" distance level in Mothur, allowed us to define OTUs as unique sequence genotypes. A standardized number of OTUs was defined as the number of OTUs observed for five analyzed sequences per site and was derived from each saturation curve for x=5. Statistical analyses were done in R v. 3.0.1 (R Development Core Team, 2005) in order to asses the relation between the standardized number of observed OTUs and the frequency of Sp+ nodule phenotype per site (linear model) and the correlation between them (Spearman Rank-Order correlation test).

4.6. Acknowledgments

The authors are grateful to A. Moiroud for insight, expertise and fruitful discussions that greatly assisted the research. We thank M. Gardes, P.A. Moreau, M. Roy, R. Ruess and M. Swanson for the help in samplings as well as R. Xu for assistance with phenotypic determinations. We also thank C. Brochier-Armanet and P. Normand for comments on an earlier draft of the manuscript and S. Devillard for advices on statistical analyses, as well as three anonymous reviewers for their comments that contributed to improve this paper. A. C. Pozzi and L. Cotin-Galvan are granted a doctoral fellowship by the Ministry of Higher Education and Research (MESR, France). H. Bautista Guerrero had a PhD grant from CONACYT (Mexico) and I. Nouioui had a PhD grant from PHC/CMCU (France, Tunisia).

5. APPROCHE DE MODELISATION

Nous avons prouvé pour la première fois, à partir d'un très large échantillonnage que le phénotype Sp+ était un trait d'histoire de vie spécifique de certaines lignées de *Frankia*, et que les phénotypes Sp+ et Sp– des nodosités étaient déterminés par des génotypes de *Frankia* différents, respectivement Sp+ et Sp– (CHAPITRE 4). La première condition pour que la sporulation *in planta,* en tant que trait d'histoire de vie, puisse évoluer sous sélection naturelle est donc remplie.

Comme l'indique la théorie moderne en biologie évolutive, l'évolution n'est pas finalisée vers un but mais au contraire aveugle par rapport au futur. Cependant les évolutionnistes ont pris l'habitude d'utiliser des termes (comme celui de stratégie ou d'optimisation) qui pourraient laisser penser à des chercheurs d'autres disciplines qu'ils sont finalistes. Notons, qu'il n'en est rien et que l'utilisation de ces termes ou de métaphores n'est qu'une façon de simplifier le dialogue et raccourcir les textes comme le pratiquent couramment les astrophysiciens (trou noir, big-bang, naine rouge...). Ainsi, quand nous considérons qu'un organisme « joue » une « stratégie », « fait des choix », « alloue » des ressources, *etc.*, nous utilisons le vocabulaire classique de l'écologie évolutive, sans connotation finaliste ou d'action consciente des organismes considérés. Par exemple, une stratégie est un compromis de traits biologiques, au moins en partie déterminée génétiquement, et donc susceptible d'être sélectionné ou contre sélectionné par la sélection naturelle.

L'évolution des adaptations est un processus réalisé sur le long terme (impliquant de nombreuses générations), multifactoriel et qui a lieu dans des environnements plus ou moins variables à la fois dans le temps et l'espace (CHAPITRE 1). Ainsi, l'expérimentation seule est insuffisante pour prédire les résultats de ce processus en terme d'adaptation sélectionnée. Seule une approche de modélisation couplée avec l'expérimentation est capable de répondre à cet objectif (Roff, 1992). En conséquence, l'étude du caractère adaptatif (ou non ?) de la sporulation *in planta* de *Frankia* nécessite d'utiliser une approche de modélisation afin de prédire sur le long terme laquelle(s) des stratégies de traits d'histoire de vie (Sp+ versus Sp–, ou fréquence de Sp+/Sp–) de *Frankia* serait sélectionné selon le contexte écologique considéré (niveau de variation environnementale dans le temps et l'espace, degré de prévisibilité de ces variations...). Il ne nous a pas été possible, à l'échelle de temps courte de la thèse, de réaliser les simulations numériques pour disposer

déjà de prédictions théoriques issues de notre modèle mais un travail conséquent de réflexion théorique a pu être fait en parallèle des expérimentations conduites au cours de cette thèse. L'objectif de ce chapitre est donc de résumer cette réflexion et de poser les bases conceptuelles du modèle qui sera utilisé après la thèse.

La symbiose actinorhizienne pourrait être considérée comme un système biologique dynamique dans lequel la plante-hôte et *Frankia* interagiraient avec un avantage sélectif pour les deux partenaires (Bousquet and Lalonde, 1990). Cependant deux questions fondamentales se posent : l'avantage sélectif est-il identique pour un génotype de *Frankia* de type Sp+ ou un génotype Sp– ? Quel est l'intérêt évolutif à sporuler *in planta* ? Pour *Frankia* ? Pour son hôte ?

5.1. Pourquoi sporuler *in planta*, ou quel est le trait qui évolue et en réponse à quoi ?

5.1.1. Ce qui évolue et que l'on veut modéliser

Les génotypes Sp+ et Sp– diffèrent dans leur stratégie d'allocation des ressources *in planta*. En effet, les génotypes Sp– allouent la totalité de leurs ressources à la production de descendants actifs, alors que les génotypes Sp+ allouent une partie seulement de ces ressources à la production de descendants actifs, l'autre partie étant allouée à la production de descendants dormants. Le trait d'histoire de vie dont on souhaite comprendre l'évolution et qui sera modélisé sera donc la proportion de descendants dormants produits par un génotype donné, qui résulte de la stratégie d'allocation des ressources de ce génotype. La stratégie Sp– est définie comme étant une stratégie pure : seuls des descendants actifs sont produit par le génotype parental. A l'inverse, la stratégie Sp+ est une stratégie mixte : des descendants actifs et dormants sont produits par le génotype parental, en proportions variables selon l'environnement. Une stratégie pure qui ne produirait que des descendants dormants n'est pas réaliste et n'est donc pas considérée (Table 5.1).

Bien que la littérature ne distingue (en terme de phénotypes) que les stratégies Sp+ et Sp– (van Dijk, 1978; Torrey, 1987; Schwintzer, 1990), on peut considérer qu'il existerait, en réalité, un *continuum* de stratégies Sp+ dans l'allocation aux descendants dormants produits en plus ou moins grande quantité selon les génotypes des souches parentales.

Table 5.1 : Différentes stratégies de sporulation *in planta*.

Stratégies	Sporulation *in planta*	Allocation aux descendants	Type
Sp–	Non	Uniquement actifs	Pure
Sp+	Oui	Variable	Mixte
	– *En l'absence d'un signal prédictif :*		– *PP pile-ou-face*
	Constitutive, spontanée	Actifs et dormants ensemble, quelle que soit l'étape du cycle de vie.	BH diversifiant
	Obligatoire, saisonnière	Actifs pendant une partie du cycle de vie, dormants pendant l'autre partie.	BH conservateur
	– *En présence d'un signal prédictif :*		– *PP prédictive*
	Conditionnelle	Actifs si bonnes conditions, dormants si mauvaises conditions.	

BH : bet-hedging. PP : plasticité phénotypique.

De plus, ces stratégies d'allocation pourraient correspondre à différentes stratégies de réduction des risques. Par exemple, des données de la littérature indiquent que la sporulation *in planta* (l'allocation aux descendants dormants) est spontanée et précoce au cours du développement de la nodosité (van Dijk, 1978 ; VandenBosch and Torrey, 1985 ; Monz and Schwintzer, 1989). Nous faisons l'hypothèse que ce type de stratégie pourrait correspondre à du *Bet-hedging* diversifiant (Seger and Brockmann, 1987) générée par une plasticité de type « pile ou face » qui permettrait, indépendamment des conditions environnementales à venir (*e.g.* présence ou non de l'hôte), qu'une partie des individus de *Frankia* soit sous forme dormante (« ne pas mettre tous ses œufs dans le même panier »). D'autres données indiquent que la sporulation *in planta* est saisonnière et atteint un maximum annuel en fin de saison de végétation de l'hôte (VandenBosch and Torrey, 1985). Nous faisons l'hypothèse que ce type de stratégie correspondrait à du *Bet-hedging* conservateur (Seger and Brockmann, 1987), dans lequel tous les individus se présentent sous forme dormante avant qu'intervienne une période défavorable (« un tiens vaut mieux que deux tu l'auras »). Dans ce cas, le génotype « parie » que la « mauvaise » saison sera toujours suffisamment mauvaise pour empêcher le développement et la reproduction. Cependant comme indiqué au CHAPITRE 1, ces deux types de *Bet-hedging* ne seraient pas obligatoirement exclusifs l'un de l'autre (Starffelt et Kokko, 2012) et seraient attendus sous l'hypothèse des génotypes Sp+ symbiotes obligatoires : les seuls individus pouvant réaliser la transmission horizontale d'un hôte à

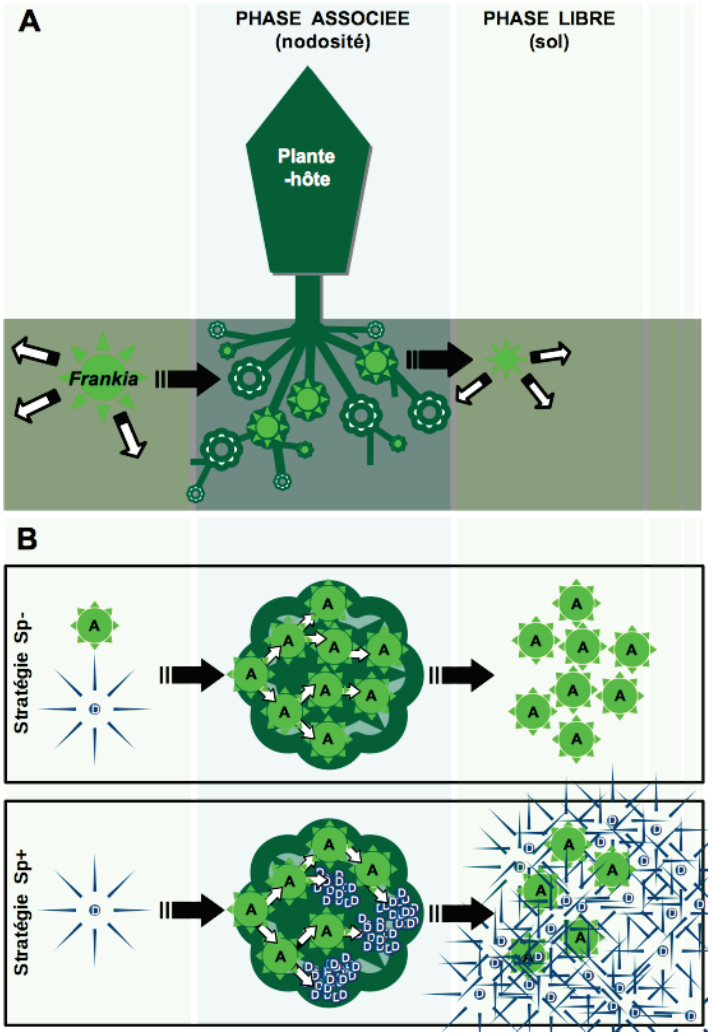


Figure 5.1 : Cycle de vie de *Frankia* et hypothèses sur les stratégies Sp+ et Sp–.

(A). PHASE LIBRE (sol). La rencontre de *Frankia* à l'état libre avec un site d'infection sur une plante hôte compatible dépend de la densité en sites libres (nodosités) dans le sol. En posant l'hypothèse, raisonnable, que le moment et le lieu d'une association avec un hôte (*i.e.* passage du sol à la nodosité, *i.e.* de l'état libre à l'état associé) ne peut pas être "prédit" par *Frankia*, l'hétérogénéité environnementale temporelle et spatiale à cette étape du cycle de vie de *Frankia* serait forte. **PHASE ASSOCIEE (nodosité).** La destruction de la nodosité qui héberge *Frankia* à l'état associé peut être provoquée par la sénescence ou la destruction accidentelle de la racine qui porte cette nodosité, ou bien par la mort de la plante hôte. Sous l'hypothèse réaliste que le moment où la nodosité hôte disparaîtra (dissociation, *i.e.* passage de la nodosité vers le sol, *i.e.* de l'état associé à l'état libre) n'est également pas « prévisible », l'hétérogénéité environnementale temporelle à cette étape du cycle de vie serait élevée. **(B). Stratégies Sp– et Sp+.** Sous l'hypothèse que les *Frankia* Sp– sont symbiotes facultatifs (capables de vie libre dans le sol) et les Sp+ symbiotes obligatoire (vie active uniquement pendant la phase associée), la stratégie optimale d'allocation des ressources est de produire uniquement des actifs (Sp–) ou à la fois des actifs et des dormants (Sp+).

A.C. Pozzi.

l'autre et contribuer ainsi à accroître le génotype parental une fois actifs dans l'hôte étant les descendants dormants. Enfin, nous faisons l'hypothèse que la sporulation *in planta* pourrait être induite par un signal de stress annonciateur d'une dégradation future de l'environnement et donc correspondre à une plasticité prédictive (CHAPITRE 1). Cette plasticité phénotypique prédictive serait attendue en réponse à la sanction de la plante-hôte (diminution de l'allocation en photosynthétats voire production de molécules de défense antibactériennes, (Denison, 2000)) sous l'hypothèse des génotypes Sp+ symbiotes tricheurs (Markham, 2008), les descendants dormants étant a *priori* moins sensibles à cette sanction que les descendants actifs. Cependant, ce type d'adaptation sort du cadre de l'évolution en environnement imprévisible et ne sera pas davantage considéré ici.

5.1.2. Type de variabilité environnementale

Frankia alterne son cycle de vie entre deux phases (libre et associée) correspondant à deux compartiments (le sol et la nodosité). Le temps de résidence y est généralement long et le passage d'un compartiment à l'autre représente les événements majeurs du cycle de vie de *Frankia* : passage du sol vers la nodosité lors de la réussite de l'association à l'hôte (infection et nodulation) et passage de la nodosité vers le sol suite à la destruction de la nodosité (Figure 5.1 A).

Les évènements d'association à l'hôte et de dissociation de l'hôte pourraient donc être, au moins en partie, imprévisibles. Or, le risque imprévisible de subir un environnement défavorable à la vie active (le sol) entre deux environnements favorables à la vie active (nodosités successives) est une pression déterminante, d'autant plus sous l'hypothèse de symbiote obligatoire, pour l'émergence, la sélection et le maintien de stratégies de réduction de ce risque. Ces stratégies doivent pouvoir répondre à l'hétérogénéité temporelle due à la destruction de la nodosité ainsi qu'à l'hétérogénéité temporelle et spatiale due à la réassociation à l'hôte. Nous faisons donc l'hypothèse que la sporulation *in planta* pourrait être une adaptation des génotypes Sp+ symbiotes obligatoires permettant l'évitement et/ou la dispersion de ces risques, à la fois dans le temps et dans l'espace (Figure 5.1 B).

5.1.3. Estimation des coûts et bénéfices pour les partenaires

D'après le concept de balance bénéfices/coûts de l'écologie évolutive (CHAPITRE 1), une stratégie pourra être sélectionnée si les bénéfices associés surpassent les coûts et donc si le bénéfice net (Bénéfices – Coûts) en terme de *fitness* est positif. Il est donc nécessaire d'indiquer les coûts et les bénéfices associés aux phénotypes actifs et dormants pour *Frankia* (Table 5.2) mais aussi du « point de vue » de la plante (Table 5.3).

Table 5.2 : Coûts et bénéfices des formes actives et dormantes pour *Frankia*.

Formes	Coûts pour *Frankia*	Bénéfices pour *Frankia*
Actives	Faible taux de multiplication du génotype	Reproduction immédiate
articles	Mortalité élevée	Colonisation des cellules végétales
vésicules	Dissémination spatiale importante	Acquisition de ressources du milieu
	Absence de dispersion temporelle	
Dormantes	Reproduction différée	Fort taux de multiplication du génotype
sporanges	Pas de colonisation des cellules végétales	Mortalité faible
spores	Pas d'acquisition de ressources du milieu	Dissémination spatiale importante
		Dispersion temporelle possible

Table 5.3 : Coûts et bénéfices des formes actives et dormantes pour l'hôte.

Formes	Coûts pour la plante-hôte	Bénéfices pour la plante-hôte
Actives	Consommation des photosynthétats (en continu)	Production de composés azotés
articles		
vésicules	Infection des cellules végétales	
	Co-infection par autres microorganismes	
Dormantes	Consommation des photosynthétats (pour produire les spores)	Pas d'infection des cellules végétales
sporanges		Absence de co-infection
spores	Pas de production de composés azotés	

5.2. Construction du modèle

5.2.1. Approches de modélisation et type de modèle choisi

Trois principales approches de modélisation phénotypiques sont disponibles en écologie évolutive : l'optimisation, la théorie des jeux et la dynamique

adaptative. Ces trois approches reposent sur (i) la maximisation d'une métrique de valeur sélective (*fitness*), ou d'une de ses composantes, permettant de prédire quelle(s) devrait être la ou les stratégies présente(s) majoritairement à l'issue du processus évolutif (après de nombreuses générations), (ii) l'existence de contraintes (*e.g.* des *trade-offs* entre traits limitant les possibles adaptatifs) et (iii) une variance génétique additive suffisamment élevée pour générer une variabilité phénotypique donnant « prise » à la sélection naturelle. L'optimisation suppose une sélection indépendante de la fréquence et de la densité des différentes stratégies. Dans ce cas, la *fitness* d'une stratégie ne dépend donc pas des autres stratégies et peut être estimée indépendamment des autres stratégies. La stratégie prédite à l'issue du processus évolutif, appelée stratégie optimale, est celle qui maximise la métrique de *fitness* utilisée. La théorie des jeux, suppose une sélection dépendant de la fréquence des stratégies, c'est-à-dire que la *fitness* d'une stratégie varie selon sa fréquence dans la population. En conséquence, la *fitness* d'une stratégie ne peut pas être calculée indépendamment des autres stratégies en compétition dans la population. La stratégie prédite à l'issue du processus évolutif, appelée stratégie évolutivement stable (ESS) est celle qui maximise la *fitness* d'invasion c'est-à-dire le taux d'accroissement d'un mutant dans une population résidente jouant une stratégie différente. Une ESS ne peut être remplacée (envahie) par aucune autre stratégie (apparaissant en faible fréquence et proche phénotypiquement de l'ESS), Cependant, la théorie des jeux ESS ne permet pas de prédire si une ESS peut être atteinte c'est-à-dire si elle est capable d'envahir toutes les autres stratégies proches phénotypiquement. La dynamique adaptative considère la sélection d'une stratégie comme le résultat d'un processus démographique entre populations résidentes et mutantes. Elle intègre la complexité des interactions entre individus en terme à la fois de sélection fréquence-dépendante et de sélection densité-dépendante, c'est à dire que *fitness* est supposée dépendre également du nombre d'individus résidents/mutants dans la population modélisée. La dynamique adaptative prédit des ESS (maximisation de la *fitness* d'invasion) comme la théorie des jeux mais également (et contrairement à la théorie des jeux) si une ESS est convergente ou non, c'est à dire si l'ESS peut remplacer ou non toute les autres stratégies phénotypiquement proche (CSS). La théorie de la dynamique adaptative est une théorie générale qui intègre comme cas particuliers l'optimisation et la théorie des jeux (je conseille aux lecteurs intéressé de se référer à la thèse de Rajon pour davantage de détails et de références (Rajon, 2008)).

Nous envisageons donc d'utiliser l'approche de dynamique adaptative afin de prédire dans quels contextes écologiques (hétérogénéité environnementale ou non, prévisibilité ou non), les différentes stratégies de sporulation envisagée chez *Frankia* (% de descendants sous formes active ou dormante... *cf.* ci-dessus) seraient sélectionnées. La mesure de *fitness* utilisée sera donc une *fitness* d'invasion c'est-à-dire la capacité d'une stratégie mutante à envahir (taux d'accroissement du mutant positif) une population résidente « jouant » une autre stratégie dans un contexte écologique donné.

5.2.2. Structure et paramétrisation du modèle

La Figure 5.2 résume la structure et les paramètres du modèle que nous avons construit et la Table 5.4 résument les principales hypothèses concernant les paramètres du modèle.

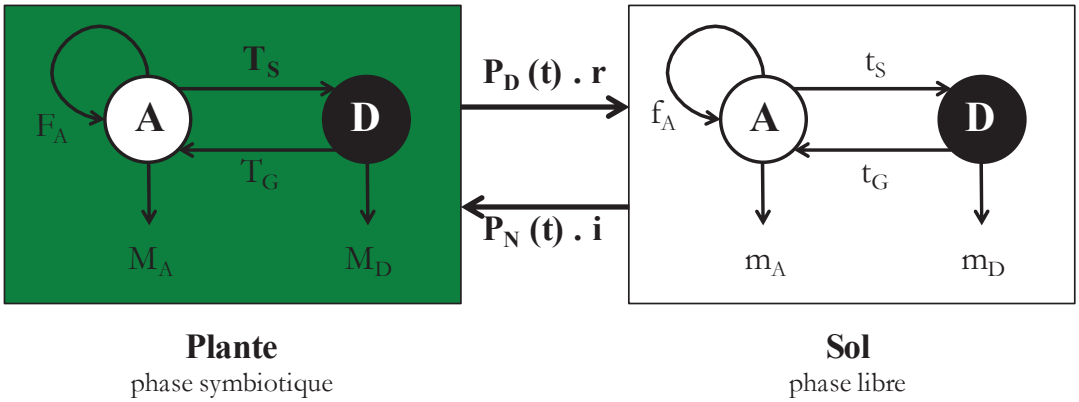


Figure 5.2 : Modèle d'évolution des stratégies de sporulation *in planta* Sp+ et Sp–.

Le modèle servira à comparer la valeur sélective des stratégies Sp+ et Sp– dans deux compartiments de qualité différente pour la reproduction et la survie : la plante (phase symbiotique dans la nodosité) et le sol (phase libre). Le trait qui évolue est le taux de sporulation *in planta* T_S : il est nul (stratégie Sp–) ou non (stratégie Sp+). Le taux de sporulation dans le sol (t_S) n'évolue pas. Dans chaque compartiment, chaque stratégie « joue » une allocation des ressources entre actifs (A) et dormants (D) différentes, selon les paramètres suivants qui sont fixés respectivement pour chaque compartiment : taux de fécondité des actifs (F_A, f_A), taux de mortalité des actifs (M_A, m_A), taux de mortalité des dormants (M_D, m_D) et taux de levée de dormance par germination (T_G, t_G). La stochasticité est introduite par le passage d'un compartiment à l'autre dont les paramètres sont les probabilités de nodulation (P_N) et de dissociation (P_D), l'infectivité du génotype de *Frankia* (i) et la réponse immunitaire de la plante (r) au cours du temps (t).

A.C. Pozzi

Table 5.4 : Hypothèses sur les paramètres du modèle.

Hypothèses sur les paramètres du modèle		Stratégie	
		Sp+	Sp–
1	Seule la stratégie Sp+ peut sporuler *in planta*.	$T_S \geq 0$	$T_S = 0$
2	Seule la stratégie Sp– peut sporuler dans le sol.	$t_S = 0$	$t_S \geq 0$
	La nodosité est un meilleur environnement que le sol pour sporuler	$T_S \geq t_S$	
3	Le taux de germination est non nul et supérieur dans le sol par rapport à la nodosité.	$t_G > T_G > 0$	Idem
4	La stratégie Sp+ est symbiote obligatoire alors que la stratégie Sp– est symbiote facultatif.	$F_A \geq 0$ $f_A = 0$	Idem $f_A \geq 0$
5	La nodosité est un meilleur environnement que le sol pour la vie active et la reproduction.	$F_A \geq f_A$	Idem
6	Dans la nodosité, la stratégie Sp+ doit allouer des ressources aux actifs et aux dormants alors que la stratégie Sp– alloue uniquement aux actifs.	$F_A < F_A$ ou $F_A+T_S = F_A$	
7	La nodosité est un meilleur environnement que le sol pour la survie, pour les actifs comme pour les dormants.	$M_A \geq m_A$ $M_D \geq m_D$	Idem Idem
8	Quel que soit l'environnement, les dormants ont une mortalité inférieure ou égale aux actifs.	$M_D \leq M_A$ $m_D \leq m_A$	Idem Idem
9	La stratégie Sp+ est plus infective que la stratégie Sp–.	$i > i$	
10	L'infectivité de *Frankia* peut varier.	Non pris en compte dans le modèle.	
11	La réponse immunitaire de la plante est fixe.	$r = r$	
12	La réponse immunitaire de la plante peut varier selon l'allocation de *Frankia* aux actifs et aux dormants.	Non pris en compte dans le modèle.	
13	La réponse immunitaire de la plante peut varier selon l'infectivité de *Frankia*.	Non pris en compte dans le modèle.	
14	Les probabilités de nodulation et de dissociation sont non nulles.	$P_N > 0$ $P_D > 0$	Idem Idem
15	Les probabilités d'association et de dissociation sont, en partie au moins, imprévisibles dans le temps.	$P_N = f(t)$ $P_D = f(t)$	Idem Idem
16	La probabilité d'association est, au moins en partie, imprévisible dans l'espace.	Non pris en compte dans le modèle.	
17	Le sol est un meilleur environnement que la nodosité pour la dissémination spatiale.	Non pris en compte dans le modèle.	

5.2.3. Validation et Prédictions du modèle

En se plaçant dans le cadre théorique précédemment décrit (CHAPITRE 1), la sporulation *in planta* de *Frankia* pourrait être considérée comme une stratégie permettant une dispersion temporelle (uniquement stratégie de dormance, en

analogie à la sporulation bactérienne), une dispersion spatiale (uniquement stratégie de dissémination, en analogie à la sporulation asexuée fongique), ou à la fois une dispersion spatiale et temporelle (stratégie combinée de dormance et de dissémination (CHAPITRES 2 ET 3). Notre modèle permettra de prédire dans quels contextes écologiques telles ou telles stratégies seront sélectionnées. Les situations écologiques extrêmes (le risque d'extinction de la nodosité racinaire varie uniquement dans le temps *versus* le risque d'extinction de la nodosité racinaire varie uniquement dans l'espace) permettront de valider la fiabilité du modèle construit en vérifiant que le modèle prédira bien des stratégies de dormance (estimé par la qualité des descendants, par exemple une mortalité M_D faible) dans le premier cas et des stratégies de dissémination spatiale dans le second (estimé par la quantité des descendants, par exemple un taux de sporulation T_S élevé). Une fois cette étape de validation du modèle faite, le modèle sera utilisé pour prédire quelle fréquence de stratégies de dormance et de dissémination spatiale est attendue quand le risque de destruction de la nodosité racinaire varie à la fois dans l'espace et le temps (estimé par l'allocation aux actifs et aux dormant, et dans l'allocation au dormants entre qualité et quantité).

Les observations empiriques montrent que *Frankia* peut se présenter uniquement sous forme de cellules actives (phénotype Sp– ne sporulant pas *in planta*) et que les *Frankia* Sp+ ne sont pas systématiquement rencontrées dans les nodosités, y compris sur une même station ou un même hôte. Cela suggère que plusieurs stratégies pourraient donc être adoptées par *Frankia* pour faire face au risque de destruction de la nodosité racinaire et que ces stratégies avec et sans sporulation *in planta* pourraient coexister. Il existerait donc des contextes écologiques où le risque de destruction de la nodosité ne constituerait pas une pression de sélection nécessaire et suffisante pour l'évolution d'une stratégie de réduction du risque par sporulation *in planta*. Notre modèle permettra d'étudier précisément ce contexte en faisant varier le degré de stochasticité environnementale, afin de déterminer un éventuel seuil au delà duquel une stratégie Sp+ est sélectionnée, et en deçà duquel une Sp– est sélectionnée ainsi que les conditions éventuelles d'une coexistence.

DISCUSSION

GENERALE

DISCUSSION GENERALE

Tout au long du manuscrit de thèse, nous avons discuté les principaux résultats et observations biologiques liés aux stratégies de sporulation chez les microorganismes en général, et chez *Frankia* en particulier. Ces discussions ont été faites à la lumière de la théorie de l'évolution à la fois dans le cadre de l'écologie évolutive (adaptations) et de la phylogénie moléculaire. L'objectif de cette discussion générale n'est donc pas de revenir sur l'ensemble des points largement discutés dans le reste du manuscrit mais de se focaliser sur les aspects nécessitant des travaux futurs. Nous aborderons d'abord des considérations phylogénétiques puis écologiques.

Phylogénie de la sporulation in planta

Pour la première fois et à partir d'un large échantillonnage, notre étude a clairement établi que les souches de *Frankia* infectives d'*Alnus* sp. Sp+ appartiennent à des lignées phylogénétiquement divergentes des souches Sp– (Pozzi *et al.*, 2015). Ce résultat, en addition des observations que le phénotype Sp+ est transmissible par inoculation d'un broyat de nodosité Sp+ (van Dijk, 1978 ; VandenBosch and Torrey, 1985 ; Monz and Schwintzer, 1989), que le phénotype Sp+ est observable dès les premiers stades de développement de la nodosité (van Dijk, 1978 ; VandenBosch and Torrey, 1985 ; Monz and Schwintzer, 1989), prouve l'existence de génotypes Sp+ et Sp–. Le phénotype Sp+ est donc déterminé par un génotype Sp+ de la souche de *Frankia* endophyte et non pas par le génotype de la plante-hôte ou son état phénologique, comme cela avait également été supposé (VandenBosch and Torrey, 1985 ; Lechevalier and Lechevalier, 1990). La composante génétique du phénotype Sp+, première condition pour l'évolution de ce trait d'histoire de vie sous sélection naturelle, a donc été vérifiée.

Nous avons mis en évidence trois principales lignées Sp+ (pouvant être considérées comme différentes espèces) chez les *Frankia* infectives d'*Alnus*. Ces lignées sont phylogénétiquement divergentes les unes des autre, et le regroupement des souches dans ces lignées se fait selon l'espèce-hôte : lignée Sp+ infective d'*A. viridis* sp. et *A. incana* sp. (CHAPITRE 4), lignée Sp+ infective d'*A. glutinosa* (CHAPITRE 4) ainsi que lignée Sp+ infective d'*A. cordata* (ANNEXE B). Les perspectives ouvertes par l'existence de souches de *Frankia* Sp+ phylogénétiquement divergentes des souches Sp– sont intéressantes comme nous allons le résumer ci-dessous.

Pour déterminer si le trait Sp+ est un caractère ayant émergé récemment ou si c'est un caractère ancestral aux souches de *Frankia* il est nécessaire de prendre en compte l'ensemble des souches Sp+ observables aujourd'hui. En effet, si notre étude s'est concentrée sur les *Frankia* Sp+ infectives d'*Alnus* sp., des nodosités Sp+ ont également été décrites chez *Elaeagnus*, *Hippophae*, *Purshia* et *Dryas* (CHAPITRE 3), mais les souches de ces nodosités n'ont été ni génotypées ni positionnées phylogénétiquement. Comme les principaux clusters dans l'arbre phylogénétique global de *Frankia* sont fortement corrélés à la famille ou au genre de la plante-hôte (Normand *et al.*, 1996; Bautista-Guerrero *et al.*, 2011), la prédiction que ces autres souches Sp+ appartiennent *a priori* aux clusters 3 et 4 peut être faite. Ces clusters sont les groupes externes de notre phylogénie (CHAPITRE 4) et s'enracinent donc plus profondément dans la phylogénie de *Frankia*. Cette prédiction est donc en faveur du caractère plutôt ancestral du trait Sp+ et devra être validée *a posteriori* par des études similaires à la nôtre. Une telle étude permettrait également de préciser s'il existe autant de lignées de *Frankia* Sp+ que d'espèces-hôtes ayant des nodosités Sp+, si l'émergence de ce trait est antérieure ou postérieure à la spécialisation des souches de *Frankia* à leur famille ou à leur genre-hôte et si son évolution se produit plutôt par perte ou par gain de la capacité à sporuler *in planta*.

Faire l'hypothèse que les génotypes Sp+ actuels sont symbiotes obligatoires (Schwintzer, 1990) implique que ces génotypes ait un moyen de se transmettre horizontalement d'un hôte à l'autre en dehors de toute vie active. Cette hypothèse fait donc un lien implicite entre sporulation *in planta* et le degré de dépendance à l'hôte. Poser la question du caractère ancestral ou émergent du trait Sp+ reviendrait alors à se demander si l'ancêtre commun à l'ensemble des *Frankia* Sp+ était un symbiote facultatif ou un symbiote obligatoire. Dans les Hamamelidae supérieures auxquelles appartient le genre *Alnus*, il a été suggéré que l'évolution aurait procédé vers une spécificité accrue (Maggia and Bousquet, 1994), ou dirions-nous, vers un degré de dépendance plus fort. A l'inverse, chez les Myricaceae, famille actinorhizienne la plus primitive, les souches de *Frankia* associées à certaines espèces de *Myrica* sont génétiquement très diverses, ce qui traduit une faible dépendance de ces souches à la plante hôte (Huguet *et al.*, 2005). Ainsi, l'ancêtre commun des *Frankia* Sp+ serait symbiote facultatif Sp– et, au cours des temps évolutifs et de l'interaction avec les plantes-hôtes, certaines des souches auraient progressivement évolué vers la symbiose obligatoire et ce qui pourrait être son corollaire, la sporulation *in planta*. L'élargissement de cette étude phylogénétique aux symbiotes de *Myrica*

sp. (plante-hôte primitive) chez lesquels le phénotype Sp+ des nodosités est parmi les plus fréquents avec *Alnus* sp. (CHAPITRE 3) serait particulièrement intéressant pour essayer de dater plus précisément l'émergence de la symbiose obligatoire et/ou de la sporulation *in planta*.

Ces futures études phylogénétiques devront tenir compte de l'hypothèse que les génotypes Sp+ puissent être tricheurs, c'est à dire avoir un degré de coopération avec l'hôte moindre (CHAPITRE 3). Sous cette hypothèse, on pourrait supposer que des mécanismes de l'hôte pour exclure les moins bons coopérateurs, et des mécanismes de ces moins bons coopérateurs pour exploiter les hôtes, soient sélectionnés. Cette « course aux armements évolutifs » (Van Valen, 1973) entre les *Frankia* Sp+ et les hôtes, pourrait avoir conduit, d'une part à l'extinction des lignées Sp+ ancestrales spécialisées à un hôte, et d'autre part, dans certaines lignées Sp+, à l'évolution de nouvelles contre-mesures par les *Frankia* Sp+ qui pourrait avoir résulté en leur expansion rapide. Ces deux phénomènes pourraient expliquer l'absence du trait Sp+ dans les branches profondes et l'apparente diversification récente des *Frankia* Sp+ dans les phylogénies qui seront obtenues dans le futur.

Contrairement aux génotypes Sp–, les *Frankia* de génotype Sp+ sont regroupés dans la phylogénie en fonction de l'espèce-hôte. Ce résultat suggère que la plante-hôte soit un facteur guidant l'évolution des *Frankia* Sp+ davantage que celle des Sp–. Cependant, l'absence de congruence entre les phylogénies de *Frankia* et de l'hôte ne supporte pas l'hypothèse de co-spéciation. Des études précédentes on suggéré un spectre d'hôte différent entre *Frankia* Sp+ et Sp– (Weber *et al.*, 1987; Kurdali *et al.*, 1988; Markham, 2008) où les Sp+ avaient un spectre d'hôte plus étroit que les Sp– (Kurdali *et al.*, 1988; van Dijk *et al.*, 1988; Schwintzer, 1990). A l'inverse, l'étude ultérieure que nous avons mené, plus rigoureuse, n'a pas mis en évidence de spectres d'hôtes différents entre *Frankia* Sp+ et Sp–, mais des associations préférentielles (ANNEXE A). Cela indique qu'un même génotype de *Frankia* s'associe de manière différente à des espèces-hôtes différentes, et qu'une même espèce-hôte s'associe différemment à des génotypes de *Frankia* différents. Cela suggère fortement qu'il existe des adaptations entre partenaires et que les différences d'associations observées pourraient être due à une coévolution entre les partenaires symbiotiques.

La coévolution des partenaires symbiotiques peut être replacée dans le contexte plus large de la diversification écologique et évolutive des

populations. De ce point de vue, les aulnes et *Frankia* constituent un système modèle, comparable à la fois sur de grandes distances géographiques, et dans une gamme d'habitats variés. Dans nos résultats, il est très surprenant que des souches de *Frankia* Sp+ provenant de continents différents se regroupent au sein de clades où elles sont génétiquement très homogènes, presque clonales (*e.g. Frankia* Sp+ d'*A. viridis* et *A. incana*). Cette distribution très large d'un ou de quelques génotypes Sp+ pose la question du succès évolutif des stratégies Sp+ relativement aux stratégies Sp– par rapport à l'histoire écologique (endémisme, insularité) et évolutive (recolonisation postglaciaire) récente de la plante-hôte. Sous l'hypothèse que la sporulation *in planta* est une stratégie combinée de dispersion temporelle et de dispersion spatiale, le trait Sp+ pourrait avoir joué un rôle particulier dans la survie des *Frankia* Sp+ lors des épisodes glaciaires et dans la co-migration avec l'hôte lors de la recolonisation végétale postglaciaire. Ceci se traduirait dans les structures de communautés de *Frankia* actuellement observées (ANNEXE B). Des travaux supplémentaires par approche phylogéographique seront nécessaires pour déterminer s'il y a, et selon quelles modalités, coévolution entre partenaires symbiotiques.

Les *Frankia* Sp+ diffèrent des Sp– non seulement par leur génotype et leur phénotype de sporulation *in planta* mais également par un ensemble de traits liés à leur écologie et à leur capacités symbiotiques : l'isolement et la cultivabilité *in vitro* (CHAPITRE 3), l'infectivité et la compétitivité, c'est à dire la capacité de nodulation d'une plante (ANNEXE A), l'efficience symbiotique, c'est à dire la capacité fixatrice d'azote dans les nodosités (CHAPITRE 3), les capacités d'association à l'hôte (ANNEXE A). Ces génotypes Sp+ constituent donc d'excellents modèles pour des approches de phylogénomiques (basée sur les génomes complets) et de génomique comparatives. A ce jour, les 13 souches de *Frankia* qui ont été séquencées sont toutes de génotype Sp– et symbiotes facultatifs (car pouvant être cultivés *in vitro*), à l'exception de *Frankia* sp. Dg1 Sp– non-cultivable (Tisa *et al.*, 2013). Actuellement, un génome Sp+ est en cours d'obtention (lignée Sp+ d'*A. incana*) et trois autres candidats, appartenant à des lignées phylogénétiques différentes sont déjà identifiés (lignées Sp+ d'*A. glutinosa*, d'*A. viridis*, et d'*A. cordata*). L'obtention de génomes de *Frankia* Sp+ et la comparaison avec les génomes Sp– disponibles permettrait de confirmer, et d'étendre à l'échelle du génome entier, la différence génotypique mise en évidence à partir des trois marqueurs étudiés ici. En plus de permettre de reconstruire des phylogénies plus robustes, cela offrirait la possibilité d'identifier des marqueurs supplémentaires discriminants les souches Sp+ et Sp–. Ces marqueurs

pourraient permettre de développer des outils qualitatifs (présence/absence) et quantitatif (abondance) pour le suivi des souches Sp+ et Sp–. En effet, les marqueurs dont nous disposons actuellement (gènes de ménage utilisés dans nos phylogénies) ne sont pas performants pour discriminer les Sp+ au sein des communautés microbiennes du sol. Au niveau expérimental, ces marqueurs permettraient le suivi de génotypes Sp+ et Sp– choisis comme modèles pour des études de dispersion spatiale et de dispersion temporelle.

Ces approches pourraient également fournir des éléments de preuves à différentes hypothèses proposées dans le cadre de ce travail. L'hypothèse de symbiose obligatoire des souches Sp+ pourrait ainsi êtres soutenue par un génome de taille réduite, un pourcentage G+C réduit et/ou l'absence de certaines voix métaboliques comme il est couramment décrit sur les symbiotes obligatoires d'insectes (Charles and Ishikawa, 1999; Akman *et al.*, 2002). En effet, chez *Frankia* la différence en taille des génomes (5 à 11 Mpb) est assez inhabituelle au sein d'un même genre et serait en lien avec le niveau de dépendance symbiotique de la souche (Normand *et al.*, 2007). L'approche par génomique comparative permettrait également de dire si les génotypes Sp+ ont les mêmes gènes et les mêmes régulateurs de la sporulation que les Sp– ou pas. Les études de transcriptomique qui en découleraient pourrait permettre d'identifier des signaux inducteurs encore hypothétiques (de *Frankia* elle-même ? de l'hôte ? de l'environnement ?) qui déclencheraient la sporulation *in planta* saisonnière chez les Sp+ (CHAPITRE 5) ou l'inhiberaient chez les Sp–. Nous rappelons quand même d'un point de vue théorique (CHAPITRES 2 ET 5), que quand la sporulation *in planta* se déroule en réponse à un signal corrélé à la qualité environnementale (plasticité phénotypique prédictive), elle est adaptative aux variations prévisibles de l'environnement ; quand elle se déroule en l'absence totale de signaux corrélés à la qualité environnementale (plasticité phénotypique pile-ou-face), elle est adaptative à la stochasticité environnementale. Les facteurs hypothétiques induisant la sporulation *in planta* pourrait donc bien expliquer la sporulation saisonnière en fin de saison de végétation de la plante-hôte et ne pas expliquer la sporulation spontanée dès le début de l'association à l'hôte.

Ecologie de la sporulation in planta

Une compréhension définitive de l'écologie de la sporulation nécessitera une approche intégrative liant modélisation et expérimentation, ces deux approches s'enrichissant mutuellement. Le modèle mathématique construit

(CHAPITRE 5) permettra de proposer des prédictions sur les stratégies de sporulation sélectionnées (Sp+ *vs.* Sp– ou fréquence de Sp+/Sp–, *Bet-hedging versus* non *Bet-hedging*, dispersion spatiale *versus* dispersion temporelle...) selon les contextes écologiques considérés (degré de variabilité, de prédictibilité de l'environnement et niveau d'hétérogénéité spatiale, *cf.* CHAPITRE 1). Il permettra également de nous guider dans le choix des hypothèses à tester expérimentalement (selon les prédictions théoriques obtenues) et des paramètres à estimer (selon les résultats des analyses de sensibilité du modèle aux principaux paramètres). Réciproquement, les nouvelles expérimentations permettront de fournir au modèle des estimations réalistes des principaux paramètres et de générer de nouvelles questions théoriques.

La compréhension des mécanismes adaptatifs liés à la sporulation *in planta* de *Frankia* nécessite une approche interdisciplinaire (théorie, modélisation, expérimentation au laboratoire et sur le terrain, approche génétique et écologique...), seule capable entre autres de discriminer le poids respectif de facteurs confondants, de prédire l'effet sur la valeur sélective d'organismes à maturité tardive (première fructification de l'aulne de l'ordre de la décennie) et de faire de l'évolution expérimentale.

Plus précisément ces approches permettront de déterminer :

(1) Quels sont les principaux facteurs sélectifs de la sporulation : espèce-hôte, facteurs climatiques (température, précipitation, ensoleillement), facteurs édaphiques (roche-mère, communautés microbiennes), *etc.*

(2) Quelles sont les aptitudes compétitives relatives des phénotypes Sp+/Sp– en terme d'infectivité de la plante hôte, selon l'espèce-hôte considérée et les facteurs abiotiques (*e.g.* type de sol, communauté microbienne),

(3) Quels sont les coûts et les bénéfices en terme de valeur sélective associés aux phénotypes Sp+/Sp– dans différents contextes écologiques (espèces-hôtes, type de sol, climat) et ceux concernant la plante hôte selon le phénotype de *Frankia* infectant.

(4) Quels sont les dynamiques de populations des différents phénotypes de sporulation selon le contexte écologique considéré.

Concernant le point (1), nous disposons déjà de premières données issues d'un échantillonnage réalisé en Corse (article en cours de rédaction, *cf.* ANNEXE B). En plus de l'insularité, l'intérêt de cet échantillonnage en Corse réside dans le fait que les facteurs pédoclimatiques peuvent varier fortement sur une faible distance et selon l'altitude (du niveau de la mer jusqu'à 3000 m) et que 3 espèces-hôtes (*A. glutinosa, A. viridis* spp. *suaveolens, A. cordata*) sont présentes. De plus la Corse représente l'un des refuges glaciaires connus pour l'aulne. Or, il est classiquement décrit pour animaux et les végétaux une diversité génétique beaucoup plus élevée dans les zones de refuges que dans les zones de recolonisation postglaciaires (Petit *et al.*, 2003). Pour la première fois nous avons recueilli des données pédoclimatiques (roches-mères, caractéristiques du sol, variables de températures, de précipitations). Pour chacun des contextes écologiques nous disposons d'estimations de la fréquence des souches Sp+ /Sp– et de leur phylogénie.

Pour le point (2), un article publié en tant que second auteur (*cf.* ANNEXE A) montre que le phénotype Sp+ présente un spectre d'hôtes beaucoup plus étroit que le phénotype Sp–, résultat en accord avec notre hypothèse que Sp+ serait un symbiote obligatoire (CHAPITRE 3). Par ailleurs, des expérimentations au laboratoire ont débuté afin de distinguer l'effet de l'espèce hôte indépendamment des facteurs climatiques sur la fréquence des deux phénotypes. En effet, *in natura* il est impossible de séparer ces deux types d'effets, les facteurs climatiques agissant aussi comme facteurs sélectifs des plantes-hôtes.

Le point (3) n'a pas encore été abordé expérimentalement et nécessitera une approche d'analyse isotopique afin d'estimer notamment les échanges de C et N au niveau des nodosités Sp+ et Sp–. L'estimation de la balance coût/bénéfice en terme de *fitness* de *Frankia* ne devrait, *a priori*, pas poser de difficulté majeure. Il n'en est pas de même pour les plantes-hôtes compte-tenu du temps de génération de ces arbres (plusieurs décennies) et dans ce cas, nous ne pourrons compter que sur l'approche de modélisation pour aborder ce point.

Enfin, concernant le point (4), nous ne disposons pas encore de données et cette perspective nécessitera de développer une méthodologie d'identification des phénotypes Sp+/Sp– dans le sol *via* la mise au point de marqueurs moléculaires du phénotypes Sp+ afin d'estimer quantitativement l'importance

relative des deux phénotypes. Ce type de méthodologie permettrait aussi d'approfondir les trois premiers points.

Les expérimentations conduites en association avec l'approche de modélisation permettront d'inférer la valeur adaptative du phénotype de sporulation *in planta* (Sp+/Sp–). Avant de conclure que le trait « type de sporulation » est adaptatif pour toutes les lignées Sp+ décrites, il ne faudra pas négliger d'étudier l'importance éventuelle de l'inertie phylogénétique, c'est à dire l'héritage ancestral du trait. Nous proposons donc de tester cette inertie à partir d'une phylogénie plus complète que celle présentée ici.

ANNEXES

ANNEXES

A. IN-PLANTA SPORULATION CAPACITY ENHANCES INFECTIVITY AND RHIZOSPHERIC COMPETITIVENESS OF *FRANKIA* STRAINS

Cette partie correspond à un article accepté pour publication dans *Microbes and Environments* (Cotin-Galvan *et al.*, 2016)[23]. Sous l'hypothèse de symbiose obligatoire, la capacité d'une spore produite *in planta* à infecter efficacement une autre plante-hôte garantirait l'accroissement du génotype Sp+, et des études précédentes ont déjà suggéré que les *Frankia* Sp+ étaient plus infectives et plus compétitives que les *Frankia* Sp– pour l'association à la plante-hôte (nodulation) et que leurs spectres d'hôte étaient différents. Cependant, la portée de ces études est très limitée : le nombre et l'origine des souches étaient très faibles, les *inocula* étaient hétérogènes et il n'y avait pas d'outils moléculaires pour typer les souches ni en estimer la diversité génétique. L'objectif de cette étude était donc de réévaluer l'infectivité, la compétitivité et le spectre d'hôte de génotypes Sp+ et Sp–, caractérisés moléculairement et représentatifs de la diversité phylogénétique précédemment décrite (Pozzi *et al.*, 2015).

Titre (FR) : Le phénotype de sporulation *in planta* augmente l'infectivité et la compétitivité des souches de *Frankia*

Résumé (FR) : Les actinobactéries du genre *Frankia* expriment différemment leur capacité de sporuler en culture pure (*in vitro*) ou en symbiose avec les plantes actinorhiziennes (*in planta*). Les souches de *Frankia* Sp+ maintiennent cette capacité à sporuler en symbiose avec les plantes actinorhiziennes en produisant d'abondants sporanges à l'intérieur des cellules de la plante-hôte contrairement aux souches Sp– incapables de sporuler *in planta*. Dans ce papier, nous examinons le rôle possible de la sporulation *in planta* sur l'infectivité et la compétitivité des souches de *Frankia* pour l'infection des racines en réalisant des inoculations expérimentales avec des broyats de nodosité obtenues en conditions de laboratoire contrôlées. Un total de 15 souches, incluant les souches représentatives de chacune des lignées phylogénétiques Sp+ récemment décrites et des souches Sp– de

[23] Cotin-Galvan *et al.*, *Microbes and Environments* (2016) **31**(1):11-18. Publisher's website. Download pdf.

référence, ont été inoculées sur des plantules d'*Alnus glutinosa* et *Alnus incana*. La compétitivité des souches pour l'infection a été étudiée par des co-inoculations Sp+/Sp– et des marqueurs oligonucléotidiques spécifiques ont été développés pour identifier les souches Sp+ et/ou Sp– dans les nodosités formées. Nos résultats confirment que les souches Sp+ sont significativement les plus infectives. De plus, des capacités infectives différentes ont été mises en évidence entre souches Sp+ des deux lignées phylogénétiques. Contrairement aux études précédentes, nous n'avons pas mis en évidence de différence de spectres d'hôtes entre souches Sp+ et Sp–. Cependant, des préférences peuvent être notées selon l'origine (espèce-hôte) des *inocula*. Finalement, les souches Sp+ étaient presque entièrement dominantes dans les nodosités formées suite à la co-inoculation d'un mélange Sp+/Sp– quelle que soit la proportion, ce qui suggère que les souches Sp+ ont une compétitivité accrue pour l'infection. Nos résultats révèlent pour la première fois la coexistence de différentes souches dans une même nodosité à l'aide de marqueurs moléculaires.

NOTICE: this is the author's version of a work that has been accepted for publication in Environmental Microbiology and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1264/jsme2.ME15090 or as Cotin-Galvan, L., A. C. Pozzi, G. Schwob, P. Fournier, F. M.P. and A. Herrera-Belaroussi (2016). *In-planta* sporulation capacity enhances infectivity and rhizospheric competitiveness of *Frankia* strains. *Microbes and Environments*. **31**(1):11-18. This article is protected by copyright. All rights reserved.

*In-planta s*porulation capacity enhances infectivity and rhizospheric competitiveness of *Frankia* strains

LAETITIA COTIN-GALVAN[1,2], ADRIEN C. POZZI[1,2], GUILLAUME SCHWOB[1,2], PASCALE FOURNIER[2], MARIA FERNANDEZ[1,2] and AUDE HERRERA-BELAROUSSI[1,2]*

[1] PRES Université de Lyon, F-69361, Lyon, France and Université Lyon 1, F-69622, Villeurbanne, France.

[2] CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, F-69622, France.

* Corresponding author: E-mail: aude.herrera-belaroussi@univ-lyon1.fr, Tel: (33) 472 448 200 - Fax: (33) 426 234 468

Running headline: *In-planta* sporulating *Frankia* symbiosis

Key-words: *In-planta* sporulation, *Frankia*, competitiveness, infectivity, host-range, actinorhizal symbiosis.

Abstract

Frankia Sp+ strains maintain their ability to sporulate in symbiosis with actinorhizal plants, producing abundant sporangia inside host plant cells, contrary to Sp– strains that are unable of *in-planta* sporulation. We examined the possible role of *in-planta* sporulation on *Frankia* infectivity and competitiveness for root infection. Fifteen strains belonging to different Sp+ and Sp– phylogenetic lineages were inoculated on seedlings of *Alnus glutinosa* (Ag) and *A. incana* (Ai). Strain competitiveness was studied by performing Sp–/Sp+ co-inoculations. Plant inoculations were standardized using crushed nodules obtained under laboratory-controlled conditions (same plant species, age and environmental factors). Specific oligonucleotide primers were developed to identify *Frankia* Sp+ and/or Sp– strains in the resulting nodules. Single inoculation experiments showed (i) significantly higher infectivity of Sp+ strains compared to Sp– strains, (ii) genetically divergent Sp+ strains showed different infective abilities and (iii) Sp+ and Sp– strains showed different host preferences according to the origin (host species) of the inocula. Co-inoculations of Sp+ and Sp– strains showed an increased competitiveness of Sp+ strains (98.3 to 100% of Sp+ nodules, with up to 15.6% nodules containing both Sp+ and Sp– strains). This paper highlights differences in Sp+/Sp– strain ecological behaviour and provides new clues that strengthen the obligate symbiont hypothesis for Sp+ strains.

Introduction

Frankia is a soil filamentous Actinobacterium, capable of forming N_2-fixing symbiotic root nodules on a diverse array of actinorhizal plants. Hyphae, diazovesicles (specialized cells for N_2-fixation under aerobic conditions) and multilocular sporangia have been described as typical cell morphological features of *Frankia* grown in culture (4, 28). Unlike hyphae and diazovesicles,

sporangia are not constantly observed *in-planta*. Two types of nodules can be distinguished: Sp+ nodules, hosting abundant sporangia inside plant cells, and sporangia-free Sp– nodules (46). Sp+ nodules have been reported for 9 of 23 actinorhizal plant genera, with a high frequency for genus *Alnus* (37). Historically, *in-planta* sporulation has been considered to be a genetically stable characteristic (43), suggesting the existence of two types of *Frankia* strains (Sp+ *vs.* Sp–). However, the absence of isolated strains from Sp+ nodules, despite numerous attempts, has limited their study.

To the best of our knowledge, Sp+ *Frankia* strains represent a unique model of endophytic symbiont able to sporulate inside host cells. Indeed, when sporulation occurs during plant infection, for instance in the case of pathogenic fungi, spores are only produced on the surface of infected or necrotic tissues (40) and never inside living plant cells. Spores are dormant cells generally described as an optional adaptive strategy permitting both spatial and temporal escape from local conditions that are unfavorable to growth (7, 25). In a symbiotic context, the ecological advantage of *in-planta* sporulation could be linked to the fate of the numerous spores produced within Sp+ nodules once released into the soil. After nodule decay, spores would provide abundant infective propagules increasing Sp+ strain infectivity and competitiveness in the soil environment (32). A few studies, based on host plant inoculations, analyzed the behavior of Sp+ and Sp– strains in the rhizosphere or during root infection and suggested a higher infectivity of Sp+ (2, 13, 45). Sp+ *Frankia* strains would also differ in their host specificity (17, 23) and their competitiveness for nodulation in co-inoculation assays (18).

However, the conclusions of these studies have been biased, first by the heterogeneity of the material used as inocula. Indeed, because of the unculturability of Sp+ strains, Sp– cultured cells were often opposed to Sp+ crushed nodules in inoculation experiments, even though phenolic compounds and tannins contained in nodule tissues are known to impact the symbiotic association (20 , 31). Second, most of these studies were limited to Sp+ nodules from only one host origin (except in the large Markham *et al.* study (23)) and at that time, no knowledge about genetic diversity of Sp+ strains was available. A recent study conducted on *Alnus* field nodules from diverse geographical origins revealed at least two divergent lineages among Sp+ strains according to the host plant species: *A. incana* and *A. viridis* strains grouped in clade 1 (1a and 1b, respectively), whereas *A. glutinosa* Sp+ strains grouped in clade 5 (32). This genetic diversity suggests a possible diversity in

strain life history traits and thus should be considered to impact the ecological behavior of Sp+ strains. Third, in the absence of molecular tools available to discriminate between Sp+ and Sp–, strain identifications were based on microscopic observations of spores from hand-cut nodule sections. However the possibility of false Sp– identification, due to delay in Sp+ phenotype expression, could not be ruled out and, in co-inoculation experiments, co-occurrence of both types of strains in the same nodule could be missed (3).

The aim of the present study was thus to re-examine the role of *Frankia in-planta* sporulation in (i) the infectivity and host range of *Frankia* strains and (ii) their competitiveness for root infection. Fifteen nodule sources of Sp+ and Sp– *Frankia* strains from three different *Alnus* species (*A. glutinosa*, *A. incana* and *A. viridis*) were used, including representative strains from the different Sp+ phylogenetic lineages recently described (32). Sp+ and Sp– inocula were tested on both *A.glutinosa* and *A.incana* host seedlings and the resulting nodules were characterized at the molecular level, using Sp+ and Sp– strain specific oligonucleotide primers.

Materials and Methods

Plant culture

Alnus glutinosa and *A. incana* seeds, from Lyon (Rhône, France) and Fond de France (Isère, France), respectively, were surface-sterilized by agitation for 30 min in absolute alcohol followed by 30 min in $Ca(ClO)_2$ 3% (wt/vol) with 50µl/L of Tween 20 and rinsed three times in sterile water. Seeds were then incubated at room temperature on Fåhraeus medium (8) agar (10 g/L) for germination. After 15 days, seedlings were transplanted into hydroponic pouches (8) containing 30 mL of Fåhraeus medium containing 5 mM NH_4Cl and incubated in a growth chamber (16 h day-length with 22°C day / 18°C night temperatures).

Selection of Sp+ and Sp– Frankia strains from field nodules

Since no pure-cultured Sp+ *Frankia* have been obtained so far, all *Frankia* strains were obtained from field nodules, including Sp– nodules in order to ensure similar inoculation conditions for both types of strains. Nodules containing either Sp+ or Sp– *Frankia* were collected between September and October 2012, from different sites (previously described by Pozzi *et al.* (32)) and 3 different *Alnus* species: *A. glutinosa* (L.) Gaertn, *A. incana* (L.) Moench

and *A. alnobetula* (Ehrh.) K. Koch– hereafter referred to as *A. viridis* (Chaix) DC (Ag, Ai and Av, respectively) (Table A.1).

Nodule sporulation phenotype was determined (from at least one lobe) by microscopic observation of nodule hand sections stained with Lactophenol Blue (Réactifs RAL, Martillac, France), as previously described (32). Nodules were considered to be Sp+ phenotype when more than one sporangium was observed over 50 infected plant cells. Otherwise, nodules were considered to have a Sp– phenotype. After surface sterilization of the nodules in calcium hypochlorite 3% (m/vol) and peeling, nodular DNA was extracted and endophytic *Frankia* were genetically characterized by *pgk* and *dnaA* gene partial amplifications with specific primers (Table A.2). Each PCR reaction contained in a final volume of 50 µL: 2µL of DNA (0.1 µg/mL), 1X PCR buffer, 0.2 mM of each dNTP, 2 mM $MgCl_2$, 0.5mM of each primer, 10% DMSO vol/vol, 16 µg of bovine serum albumin and 2U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Oxon, United Kingdom). The amplification conditions were: initial denaturation 5 min at 94°C, and 30 cycles including denaturation 1 min at 94°C, annealing 1 min at 62°C and elongation 1 min at 72°C. A final 10 min extension step was performed at 72°C. PCR products were purified using a MiniElute PCR purification Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) before sequencing (Biofidal, Villeurbanne, France) with an ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California). Resulting sequence alignments and pairwise-distance matrix calculations were performed using the BioEdit software (version 7.2.2.). For each nodule, at least 5 lobes were genetically characterized. Nodules for which all tested lobes resulted in *pgk* and *dnaA* sequences with more than 99.9 % of similarity were considered to contain a single *Frankia* strain. All nodules used as inocula in the following experiments met this criterion (data not shown). A total of 7 Sp+ strains and 8 Sp– strains were used. Among Sp+ strains, the two clades previously described (32) were represented with 2 Ag strains belonging to clade 5, and 2 Ai and 3 Av strains belonging to clade 1 (Table A.1).

Plant inoculation and growth assessments

Two distinct experiments were carried out to compare Sp+ and Sp– strain infectivity (*Experiment A*) and competitiveness (*Experiment B*).

> *Experiment A (Sp+/Sp– Infectivity):* Two-month-old seedlings were transferred to nitrogen-free medium 24 hours before inoculation. Each Sp+ and Sp– *Frankia* strain was inoculated on 17-42 seedlings per

condition (Table A.1) (total of 760 Ag and Ai seedlings), using a suspension of crushed nodules freshly collected in the field and stored few days at 4°C. Inocula density was used as in Périnet *et al.* (29), with 2 g of nodules per thousand seedlings. This relatively low density was chosen to avoid saturation of root infection sites, allowing to highlight different nodulation rates. For each strain, field nodules were washed in 3% $Ca(ClO)_2$ (w/vol) with Tween 20 (50 µl/mL), rinsed in sterile water and then crushed with 3% (w/vol) PVP (polyvinyl pyrrolidone). Nodule suspensions were filtered through a 100 µm mesh filter (17). Plant roots were inoculated with 3 mL of crushed nodules suspensions directly in the hydroponic pouches and the seedlings were then incubated in a plant growth chamber for 5 months. Fåhraeus medium (8) was added weekly. For each plant, the total number of nodules was monitored every 2 weeks, and plant growth was followed by measuring the longest root and stem height.

Experiment B (Sp+/Sp– Competitiveness): Competitiveness experiments focused on Ag infective strains. The two Ag Sp+ strains, AgTrS1 and AgTyI.5, obtained from field nodules (Table A.1) were confronted to two *in-vitro* cultured Sp– strains, ACN14a (28) and Mg60Ag2 (9). These two Sp– strains were chosen because of (i) their genetic divergence with Ag Sp+ strains allowing to design specific oligonucleotides and (ii) their difference of infectivity, with ACN14a being less infective than Mg60Ag2 on Ag. In order to standardize inocula for the competitiveness experiments (same age and plant origin of the crushed nodules), each of the four strains was inoculated on Ag seedlings grown in pouches. After approximately 4 months, the produced nodules were harvested and used to prepare crushed nodule suspensions. Four distinct Sp+/Sp– mixtures (AgTrS1/ACN14a, AgTrS1/Mg60Ag2, AgTyI.5/ACN14a, AgTyI.5/Mg60Ag2) with 3 different ratios (v/v) were prepared: 15/85, 50/50 and 85/15 (percentage of Sp+/Sp– inocula in the final volume), leading to 12 distinct conditions. A total of 15-16 plants per condition were inoculated using the protocol previously described. Four additional conditions based on single strain inoculations were included as controls. After 5 months in a growth chamber (same conditions as *Experiment A*), nodules were recorded and plant growth assessed as described above.

Genotypic identification of Frankia strains present in nodules of inoculated plants

Experiment A (Sp+/Sp– Infectivity): Five months after inoculation, at least 2 nodules per plant were phenotyped and genotyped using *pgk* and *dna*A gene sequencing as previously described, in order to ensure that the *Frankia* strains in the inocula were the same as those found in nodules.

Experiment B (Sp+/Sp– Competitiveness): For each condition, at least 30 nodules randomly sampled from all plants were surface-sterilized and their DNA extracted as previously described (32). The following Sp+ and Sp– primers specific for *dnaA* were used: *F3 Sp+* and *R2 Sp+* primers for Sp+ strains, *F3 Sp–* and *R2 Sp–* primers for ACN14a strain, and F2 and R2 primers for Mg60Ag2 strain (Table A.2). Nodular DNA was PCR amplified with both Sp+ and Sp– specific primers as described above. Amplicons were characterized by 2% w/v agarose gel electrophoresis.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using R software v. 3.0.1 (41).

Experiment A (Sp+/Sp– Infectivity): Chi-square statistics with one degree of freedom were used to compare nodulated plant proportions, in order to test the effects of the strain sporulating phenotype and the host plant origin, on the ability to infect Ag and Ai seedlings. The effects of possible interactions between these factors (in addition to the factor "species of inoculated seedlings") on strain infectivity were tested with a Generalized Linear Model (GLM) on nodulated plant proportion data. ANOVA (Analysis Of Variance) followed by post hoc analyses (Tukey's Honestly Significant Difference -HSD- tests) were used to test strain phenotype and host plant origin on strain nodulation rates by comparing log nodule number data (for normalized distribution) of infected plants. Root length and stem height data were summed to calculate the "growth index" (cm) of nodulated plants. As the "growth index" data were not normally distributed, the effect of strain sporulating phenotype on plant development (growth index) was tested using Wilcoxon rank sum statistical tests.

Experiment B (Sp+/Sp– Competitiveness): Plant nodule numbers and growth indices were compared between the different conditions of co-inoculations and the Sp+ controls (single Sp+ strain inoculations), in

order to test the effect of mixed strain co-inoculation on nodulation rate and plant development. ANOVA (Analysis Of Variance) followed by post hoc analyses (Tukey's Honestly Significant Difference -HSD-tests) were used to compare log nodule number data (for normalized distribution) of infected plants. As the growth index data were not normally distributed, Wilcoxon rank sum statistical tests were used.

Results

Experiment A– Infectivity of Sp+ and Sp– Frankia strains and plant growth

Seven Sp+ strains and 8 Sp– strains were inoculated on 456 *Alnus glutinosa* (Ag) and 304 *A. incana* (Ai) seedlings. Three inocula never nodulated under the conditions tested (AvTol.2, AiGBh and AvFF1.1). For all infective inocula, first nodules appeared 2 weeks after inoculation and presented at least 3 lobes 60 days after inoculation. Phenotypic and genotypic characterizations always confirmed the presence of the *Frankia* strain used as the initial inoculum.

The percentage of nodulated seedlings was significantly higher for Sp+ strains compared to Sp– strains, on both Ag and Ai inoculated hosts (Figure A.1A). In total, 46.8% and 13.6% of Ag (Chi^2 test, *p*-value = $3.170e^{-7}$) and 60.6% and 10.5% of Ai (Chi^2 test, *p*-value = $1.350e^{-13}$) were infected by Sp+ and Sp– strains, respectively. The nodulation rate (mean nodule number per plant) similarly varied between Sp+ and Sp– strains (Figure A.1B). Sp+ strains produced significantly more nodules than Sp– strains on both Ag seedlings (9.9 ± 0.8 vs 3.2 ± 0.9 nodules per plant, respectively, ANOVA, *p*-value = $1.450e^{-6}$) and Ai seedlings (4.6 ± 0.8 vs 2.2 ± 0.3 nodules per plant, respectively, ANOVA, *p*-value = $3.360e^{-3}$). Av strains presented a different behavior according to the inoculated host plant species (Table A.3). While Av strains followed the general scheme on Ai (higher proportion of nodulated seedlings for Sp+ than Sp– strains), they were poorly infective on Ag, irrespective of their phenotype (less than 6% of nodulated plants).

Multifactorial stastistical analyses showed significant effects of interactions between strain phenotype, strain origin and inoculated host species on strain infectivity expressed as number of nodulated seedlings (GLM, *p*-value =0.007) and nodule number per plant (ANOVA, *p*-value = 0.007).

Sp+ strains chosen belonged to two divergent phylogenetic clades correlated to the host plant species: clade 1 (Ai and Av strains) and clade 5 (Ag strains) (Table A.1) (32). Clade 5 strains were significantly more infective than clade 1 strains with a higher proportion of nodulated seedlings (91.5 % vs 36.2 % respectively, Chi^2 test, *p*-value = $2.200e^{-16}$) and a higher nodulation rate (10.7 ± 0.8 vs 4.1 ± 0.3 nodules per plant, respectively, ANOVA, *p*-value = $1.060e^{-13}$).

As expected, altogether Sp+ strains induced lower plant index on Ai seedlings compared to Sp– strains (6.1 cm ± 0.3 and 9.9 cm ± 2.2, respectively – Wilcoxon rank sum tests, W = 981, *p*-value = 0.024) (Figure A.1C). Conversely, no significant difference was observed on Ag seedlings (14.2 cm ± 0.9 and 10.7 cm ± 1.7, respectively – Wilcoxon rank sum tests, W = 1309.5, *p*-value = 0.134). Depending on strain origin (Ag, Ai or Av nodules), Sp+ and Sp– inocula impacted differently plant growth (Table A.3): Ag Sp+ strains induced significantly higher growth on Ag seedlings (Pairwise Wilcoxon rank sum test, *p*-value = $6.800e^{-4}$) but not on Ai seedlings (Pairwise Wilcoxon rank sum test, *p*-value > 0.05). In comparison, Ai Sp+ led to significantly lower growth than Ai Sp– strains on Ai seedlings (Pairwise Wilcoxon rank sum test, *p*-value = $1.910e^{-2}$) and similar tendency is observed on Ag (Pairwise Wilcoxon rank sum test, *p*-value > 0.05).

Host compatibility of Sp+ and Sp– Frankia strains

Identical host compatibility was observed for Sp+ and Sp– strains, both being able to infect Ag and Ai seedlings (Table A.3). Among Sp+ strains, host preferences were observed according to their genotype. Clade 5 Sp+ strains infected significantly more Ag than Ai seedlings (96.3 % vs 84.0 %, respectively – Chi^2 test, *p*-value = 0.034), whereas clade 1 Sp+ strains infected significantly more Ai than Ag seedlings (51.5 % vs 25.4 %, respectively – Chi^2 test, *p*-value = $3.61e^{-6}$). In contrast, none of the Sp– strains showed significant differences in infected plant proportions between Ag and Ai seedlings (Chi^2 test, *p*-values > 0.05), although the same tendency was observed (different host preferences of Ag, Ai and Av Sp– strains).

Experiment B– Competitiveness of Sp+ and Sp– co-inoculated Frankia strains

Two Sp+ strains (AgTyI.5 and AgTrS1) and two Sp– strains (ACN14a and Mg60Ag2) were used to assess their competitiveness for Ag infection under

co-inoculation conditions. In single inoculation conditions (control plants), the Sp– strain Mg60Ag2 (9.8 ± 1.4 nodules per plant) and the two Sp+ strains had similar nodulation rates (Tukey's HSD tests, *p*-values > 0.05). As expected, ACN14a strain induced significantly less nodules than the 3 other strains (3.5 ± 0.9 against 10.7 ± 0.9 nodules per plant, Tukey's HSD tests, *p*-values < 0.05).

The *Frankia* strain(s) present in nodules were identified using *dnaA* sequences. Irrespective of the strain used and the Sp+/Sp– ratio in the inocula, Sp+ strains were present in 98.3 to 100% of the nodules (Table A.4). In 5 of the conditions tested, Sp+ strains were found co-existing with the Sp– strain in the same nodule (3.3 to 15.8% of the nodules). Sp– strains were never recovered alone, with the exception of the 15/85 AgTyI.5/Mg60Ag2 inoculum where 1.7% of the nodules were Sp–. ACN14a, the low infective Sp– strain, was totally absent (100% of Sp+ nodules) in 5 out of 6 tested co-inoculation conditions.

For both Sp+ strains tested, the number of nodules per plant tended to decrease with lower proportions in the inocula (Table A.4). However, only AgTyI.5/ACN14a co-inoculation with the ratio 15/85 was significantly different from the control (AgTyI.5 single inoculation) (Tukey's HSD test, *p*-value = $4.464.e^{-3}$).

No significant effect of Sp+/Sp– co-inoculation was found on plant growth, except for the 15/85 AgTyI.5/ACN14a and 100% ACN14a inocula (Sp– control plants), where a significant decrease in growth was observed compared to the Sp+ control plants (Wilcoxon rank sum tests, *p*-value < 0.05) (Figure A.2).

Discussion

Sp+ *Frankia* strains represent a unique model of *in planta* sporulation. As bacterial sporulation commonly occurs to ensure survival under unfavorable growth conditions, its expression is paradoxical in a symbiotic context where the nodule supplies a highly favorable ecological niche to the bacteria. The role of the numerous spores produced in plant tissues is thus questionable. They could play an important ecological role at nodule decay, allowing new root infections once released in the rhizosphere. Decaying nodules could provide a source of infective particles depending on the survival and dispersal abilities of released bacteria in the soil, as well as their competitiveness with

other symbiotic strains. Here, we aimed at studying Sp+ and Sp– strain behaviour in the rhizosphere by comparing their infectivity and competitiveness under co-inoculation conditions. In order to reflect the fate of decayed nodules in soil, exclusively crushed nodules were used as inocula. As a large part of released particles can be carried deep into the soil and only little would reach the roots, low density inocula were used.

Our results showed that compared to Sp–, Sp+ strains had (i) greater infectivity on both Ag and Ai species (larger proportion of nodulated seedlings and higher nodulation rate, Figure A.1A-B) and (ii) better competitiveness (Table A.4). These two ecological traits are linked, as the specific infectivity of two different strains is expected to condition the relative number of nodules they produce when simultaneously inoculated (26). The difference in infectivity and competitiveness between Sp+ and Sp– nodules could be due to the higher number of infective particles released by Sp+ nodules. While one Sp– nodule releases only hyphae and vesicles in soils, one Sp+ nodule is able to release in addition a huge number of spores. Based on microscopic observations of thousand Sp+ nodule sections, we estimated between 10^7 and 10^8 the number of spores released from 1g of nodules (data not shown). The capacity of these spores to become infective propagules is supported by (i) their ability to germinate and form hyphae when transferred to fresh growth medium (16, 42), and (ii) the durability of nodulation capacity of old inocula (likely due to spore survival during culture senescence) (19). Moreover, isolated spores from cultured *Frankia* were shown to develop a higher infectivity compared to hyphae (5). Spores released by Sp+ nodule tissues could completely invade the roots vicinity. Germination could occur in the soil in response to root secondary compounds, producing infective hyphae that would in turn induce new infections (16, 22, 42, 49). Alternatively, spores could also directly attach to the roots as described for many species of sporulating biotrophic fungal pathogens (21, 48). The capacity of spores to rapidly saturate the root system, a limited resource, and thus deprive the Sp– strain of available infection sites, would result in a competitive exclusion (10, 34) and the elimination of Sp– strains. According to our results, this would particularly occur for low infectivity Sp– strains (*e.g.* ACN14a) (Table A.4). Besides, the exclusion of Sp– strains by Sp+ strains could be the result of antagonistic interactions between both types of strains. Indeed, Actinobacteria are known for their capacity to synthesize antibiotics and diverse secondary metabolites involved in antagonistic interactions with other microorganisms. Both types of competition (competition for host infection

sites or direct antagonism) have previously been described within symbiotic microbial populations (6, 14, 15, 26) and a combination of both cannot be excluded between Sp+ and Sp– strains. However, the unculturability of Sp+ strains renders these competition hypotheses hard to test in the case of actinorhizal symbioses.

Both infectivity and competitiveness of rhizospheric bacteria can be modulated by the host plant. In this study, we did not see differences in host compatibility between Sp+ and Sp– strains. Indeed, despite important variations in strain infectivity according to the inoculated plant species, both types of strains were able to infect Ag and Ai species. However, unlike Sp– strains, Sp+ *Frankia* strains showed differences in their ability to infect both host species. Clade 5 (Ag) strains were significantly more infective on Ag seedlings than clade 1 (Ai and Av) strains, while clade 1 strains were significantly more infective on Ai seedlings than on Ag seedlings, confirming preliminary results (47) (Table A.3). Compared to Sp– strains, Sp+ strains had therefore a better compatibility when inoculated on their original host species, suggesting closer symbiotic relationships. Under this hypothesis, some *Alnus* species could preferentially select Sp+ genotypes as suggested by the higher occurrence of Sp+ strains in Av and Ai alder stands compared to Ag alder stands (32). Symbiotic host plants are indeed able to select their microbial partner: defense mechanisms are used during infection to regulate root infection rate by a given strain (24, 27, 33). In the case of actinorhizal plants, differential expressions of such mechanisms have been reported based on metabolomic or transcriptomic approaches during the early infection steps, depending on the compatibility of the strains (11, 30, 31). Therefore, strain infectivity and competitiveness depend not only on strain phenotype but additional factors, such as host-symbiont specificity, strongly influence the success of infection.

It was expected that the significant differences in infectivity and competitiveness between Sp+ and Sp– strains could impact plant growth. Indeed, previous studies had led to the conclusion that Sp+ strains are less effective (plant dry matter, total N and/or N-fixed) than Sp– strains (17, 38). By coincidence, both studies mainly based their conclusions on Ai Sp+ nodules and Sp– isolates from various hosts as inocula, tested on Ai host plants. Our results with Ai strains confirmed this conclusion (Figure A.1C). However, by testing different Sp+ and Sp– nodule origins from 3 different *Alnus* species, we unexpectedly found that Sp+ strains can show higher

effectivity than Sp– (*e.g.* Ag strains on Ag seedlings). Thus Sp+ and Sp– strains display different host specificity, which impacts not only their infectivity and competitiveness for root infection, but also their effectivity. Moreover, by including nodules from several geographical origins, we noted a probable site effect on strain behavior (data not shown). Therefore, the hypothesis of Sp+ strains having a lower efficiency cannot be fully verified unless numerous host and geographical origins are tested.

Our co-inoculation experiments demonstrated for the first time, by using DNA-based genotype characterization, that two distinct *Frankia* strains can inhabit the same nodular lobe (up to 15% of Sp+/Sp– co-inoculations – Table A.4). A few studies mentioned the presence of different *Frankia* strains in a single *Alnus* nodule (3, 39). The co-existence of both Sp+ and Sp– strains within a unique lobe would explain Sp– strain isolation from Sp+ typed nodules. Indeed, repeated culturing attempts from Sp+ nodules mostly failed but led in rare cases to the isolation of *Frankia* strains. However, these cultures never differentiated *in-planta* sporangia when inoculated on different host species and were thus considered Sp– strains (4, 35, 36). Although our protocol aimed at eliminating nodule surface contaminations, we cannot exclude that some external *Frankia* cells or their DNA remain and are amplified. The question of Sp+ and Sp– strains localization and their relative proportions inside the nodule would need further investigations. Additional molecular experiments based on *in-situ* hybridization from nodule sections and quantitative-PCR could shed light on those recurrent questions.

In conclusion, we confirmed the higher infectivity and competitiveness of Sp+ strains and showed their higher host specificity compared to Sp– strains. Moreover, these traits were differentially expressed depending on the phylogenetic clades the Sp+ strains belong to. These results, associated to the non-culturability of Sp+ strains, suggest they are dependent on the host plant for a large part of their life cycle and support the obligate symbiont scenario previously discussed (32, 37). Their higher infectivity and competitiveness could explain why they have been found to be highly invasive in the field (5, 32, 37, 44). Indeed, Sp+ strains have been found with a higher occurrence in old alder stands (12, 45), suggesting they could represent the final stage in the succession of *Frankia* populations (32). To date, the persistence of *Frankia* spores in the soil still remains uncharacterized and further investigations of Sp+ strain detection directly from soil samples are needed to shed light on

fundamental issues about their *fitness* during their saprophytic life, or their fate in soils devoid of host-plants.

Acknowledgments

The authors are grateful to the greenhouse platform (Lyon University). We thank the IBIO platform (UMR-CNRS 5557) and Sébastien Devillard for advices on statistical analyses. The authors also thank Elise Simonazzi and Nelly Queruel for help with experimental assays. Laetitia Cotin-Galvan and Adrien Pozzi were granted a doctoral fellowship by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR; France) through the doctoral school Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation (ED341 E2M2; Lyon, France).

Table A.1: Sp+ and Sp– field nodules used as inocula

Nodule phenotype[1]	*Alnus* species	Site designation[2]	Nodule acronyme	Nb of inoculated seedlings[3]	
				A. glutinosa	*A. incana*
Sp+	*A. glutinosa*	Thury	AgTyI.5	40	25
		Le Tremblay, Le-Bourget-du-Lac	AgTrS1	40	25
	A. incana	Ornon	AiOR8	40	24
		Allemont	AiAll	42	27
	A. viridis	La Bérarde	AvBI.5	40	25
		Col de la Croix de Fer	AvCf11.1	23	27
		La Toussuire	AvToI.2	40	27
Sp–	*A. glutinosa*	Arandon	AgARaG1	25	25
		Le Blanchet, Bourget-en-Huile	AgLB4.3	26	25
		Le Grand-Lemps	AgGL1	22	NT
	A. incana	Fond-de-France	AiFF2.1	25	24
		Le Blanchet, Bourget-en-Huile	AiGBh	17	NT
	A. viridis	Col de la Croix de Fer	AvCf3	22	NT
		Col de la Croix de Fer	AvCf13.1	26	24
		Fond-de-France	AvFF1.1	28	26

[1]Sp+ and Sp– = *in-planta* sporulating and non-sporulating phenotype, respectively.
[2]All sites from Pozzi et al (32)
[3]NT = non-tested conditions

Table A.2: List of PCR primers used for *Frankia* strain genotyping

	Gene	Primer name[1]	Sequence (5'→3')	Tm (°C)
Field nodule identification (infectivity experiments)				
	dnaA	dnAfdT7F	TAATACGACTCACTATAGGGGAGGARTTCACCAACGACTTCAT	62
		dnArvT3R	ATTAACCCTCACTAAAGGGACRGAAGTGCTGGCCGATCTT	
	pgk	pgkFwdT3	ATTAACCCTCACTAAAGGGATGAGGACGATCGACGACCTGC	62
		pgkRevT7	TAATACGACTCACTATAGGGCGCSAGGAAGGTGAAGCACAT	
Sp+/Sp– discrimination in nodules (co-inoculation experiments)				
	dnaA	F2 Sp–	CCATGGAGACGCCGAAGTAC (*1341*)[2]	65
		F3 Sp–	CGTCCGGGATCAGGTCG (*1275*)	64-65
		R2 Sp–	CATCGCGATCCTGTCGAAGAAG (*1089*)	65
		F3 Sp+	GCGTCAGGGATCAGGTCA (*1275*)	64
		R2 Sp+	CATCGCGATCCTGTCGAAAAAA (*1089*)	64

[1] "fd", "Fwd" or "F" in the name indicate forward primers and "rv", "Rev" or "R" indicate reverse primers.
[2] Position on *dnaA* sequence of ACN14a strain (Genbank accession NC_008278).

Table A.3: Sp+ and Sp– strain infectivity on *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* seedlings.

Inoculated strains		% of nodulated plants[1]		Nodule mean number per plant[2]		Plant growth index (cm)[2]	
Phenotype	Original *Alnus* species	*A. glutinosa*	*A. incana*	*A. glutinosa*	*A. incana*	*A. glutinosa*	*A. incana*
Sp+	*A. glutinosa*	96.3 (80)	84.0 (50)	13.7 ± 0.8	5.2 ± 0.5	18.7 ± 1.1	6.3 ± 0.6
	A. incana	52.4 (82)	82.4 (51)	7.0 ± 0.0	4.9 ± 0.4	6.6 ± 0.4	4.5 ± 0.3
	A. viridis	3.9 (103)	31.6 (79)	2.3 ± 0.6	3.3 ± 0.7	10.8 ± 3.3	8.4 ± 0.5
Sp–	*A. glutinosa*	27.4 (73)	16.0 (50)	3.0 ± 0.9	1.9 ± 0.4	8.1 ± 1.2	6.8 ± 1.2
	A. incana	4.8 (42)	16.7 (24)	4.1 ± 0.5	3.0 ± 1.2	30.7 ± 1.7	17.5 ± 5.2
	A. viridis	5.3 (76)	2.0 (50)	1.5 ± 0.5	1.0 (1 plant)	13.7 ± 4.9	5.0 (1 plant)

[1] (n) number of inoculated seedlings.

[2] only nodulated plants included

Table 1.4: Competitiveness of co-inoculated Sp+ and Sp– strains on *Alnus glutinosa* host plant.

Inoculated strains		Sp+ / Sp– ratio	Nb nodule per plant	Nodule proportions (%)[1]		
Sp+	Sp–			Sp+	Sp–	Sp+/Sp–
AgTyI.5	None (Sp+ control)	100/0	10.0 ± 1.3	100.0	0.0	0.0
	Mg60Ag2	85/15	8.2 ± 1.0	96.7	0.0	3.3
		50/50	6.9 ± 1.0	84.2	0.0	15.8
		15/85	5.9 ± 0.6	98.3	1.7	0.0
	ACN14a	85/15	7.5 ± 1.9	100.0	0.0	0.0
		50/50	7.4 ± 2.2	96.6	0.0	3.4
		15/85	4.3* ± 0.8	100.0	0.0	0.0
AgTrS1	None (Sp+ control)	100/0	12.3 ± 2.1	100.0	0.0	0.0
	Mg60Ag2	85/15	10.2 ± 1.3	96.7	0.0	3.3
		50/50	8.9 ± 1.9	100.0	0.0	0.0
		15/85	6.7 ± 1.1	96.7	0.0	3.3
	ACN14a	85/15	12.5 ± 1.9	100.0	0.0	0.0
		50/50	9.0 ± 1.8	100.0	0.0	0.0
		15/85	6.2 ± 1.2	100.0	0.0	0.0

[1] Sp+ : % of nodules with strain AgTyI.5 or AgTrS1; Sp–: % of nodules with strain Mg60Ag2 or ACN14a; Sp+/Sp–: both Sp+ and Sp– coexisting strains.

* Significantly different from the corresponding Sp+ control plants (without Sp– co-inoculation, grey lines), using Tukey's HSD tests (*p-value* < 0.05).

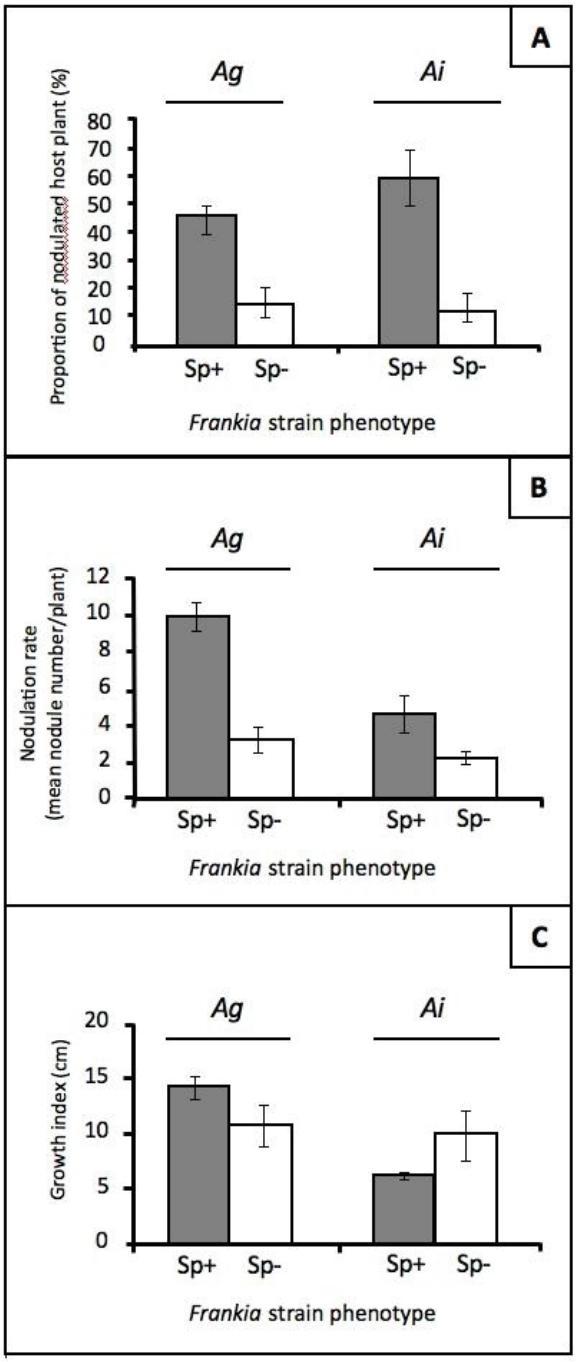


Figure A.1: Effect of *Frankia* strain sporulating phenotype (Sp+ or Sp–) on their ability to infect *A. glutinosa* (Ag) and *A. incana* (Ai) seedlings (A), their nodulation rate (B) and plant growth (C).

"Growth index" (in cm) corresponds to the sum between root length and stem height data. Figures B and C only include nodulated plants. Error bars indicate 95% confidence intervals (CI) computed with the modified Wald method (1) (A) or standard deviations (B and C).

Cotin-Galvan *et al.*, 2016.

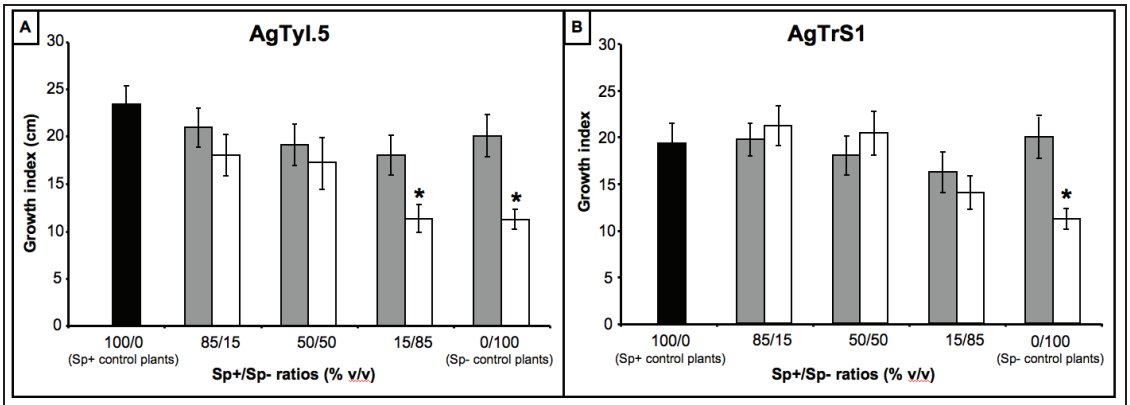


Figure A.2: Effect of Sp+/Sp– *Frankia* strains co-inoculation on plant development.

Two Sp+ strains were tested: AgTyI.5 (A) and AgTrS1 (B) in co-inoculation with two Sp– strains (Mg60Ag2 = grey bars and ACN14a = white bars). "Growth index" (cm) was the sum between root length and stem height data. Error bars indicate 95% confidence intervals (CI). Stars indicate significant differences with the Sp+ control plants tested with Wilcoxon rank sum statistical tests (p-value < 0.05).

Cotin-Galvan *et al.*, 2016.

B. FACTEURS SELECTIFS DE LA SPORULATION *IN PLANTA*

L'aire géographique du genre *Alnus* est la plus vaste de celles des plantes actinorhizienne. Des espèces d'aulnes de continents différents (Amérique et Europe par exemple) semblent s'associer à des *Frankia* Sp+ génétiquement très proches (CHAPITRE 4), ce qui peut suggérer une étroite coévolution entre les aulnes et ces *Frankia* Sp+ ou une co-migration efficace des partenaires symbiotiques. Les aulnes et *Frankia* constituent ainsi un système modèle, comparable à la fois sur de grandes distances géographiques, et dans une gamme d'habitats variés, mais aussi dans un cadre historique et évolutif. Ce projet a bénéficié d'une collaboration avec Mélanie Roy (UMR 5174, Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, Université de Toulouse) dont la thématique de recherche concerne la diversification écologique et évolutive des populations, en particulier celles de champignons ectomycorrhiziens associées à *Alnus* sp. La collaboration a été concrétisée par des programmes de recherche, des campagnes d'échantillonnages et des expérimentations communs.

L'objectif de ce projet est donc de comprendre comment l'histoire écologique et évolutive récente de la plante-hôte et les facteurs bioclimatiques ont pu influencer la diversité et la spécificité des génotypes de *Frankia* en symbiose avec *Alnus* sp.

Contextes des populations d'Alnus sp. étudiées

Pour répondre au précédent objectif, nous avons identifié trois contextes particuliers de population hôtes :

(1) Zones refuges glaciaires : Les refuges glaciaires sont des zones où les organismes se sont maintenus pendant la dernière glaciation et à partir desquelles ils ont recolonisé de nouveaux habitats. Ces zones sont considérées comme des points chauds de biodiversité. La diversité des génotypes de *Frankia* est-elle plus importante en zone refuge, quels sont les génotypes qui ont dispersé spatialement ? En particulier quel rôle ont joué les souches Sp+ dans la survie de *Frankia* lors des épisodes glaciaires et de la recolonisation ?

(2) Zones de recolonisation postglaciaire : Les évènements de recolonisation s'accompagnent généralement d'une réduction de la diversité (goulot d'étranglement) qui résulte en des richesses et des

abondances spécifiques entre deux zones pourtant recolonisées depuis le même refuge. La diversité des génotypes de *Frankia* en zones recolonisées est elle plus pauvre qu'en zones refuges ? Les génotypes Sp+ et Sp– subissent-ils de la même manière cette réduction de la diversité ?

(3) Zones d'endémisme : Comme les zones refuges, les zones d'endémisme sont généralement caractérisées par une diversité importante, puisque c'est finalement la zone à partir de laquelle tous les autres peuplements proviennent. La problématique entre zones d'endémisme et zone de colonisation est donc la même que pour les zones refuges/de recolonisation postglaciaire. Cependant, l'échelle de temps considérée est nettement plus grande.

Matériel collecté

Pour répondre à l'ensemble de ces questions, des nodosités racinaires ont donc été échantillonnées en Corse (zone refuge, endémisme d'*A. cordata* et *A. viridis* ssp. *suaveolens*, insularité), en Géorgie (zone refuge), en Italie (endémisme *A. cordata*) et au Japon (insularité, endémisme *A. incana* ssp. *hirsuta* et *A. viridis* ssp. *maximowiczii*) que nous avons comparé avec des données obtenues principalement en Europe et en Amérique du Nord. Comme les conditions bioclimatiques actuelles peuvent être un facteur confondant de la biogéographie de la plante-hôte et de *Frankia*, nous avons collecté un ensemble complet de variables de géographie, de l'hôte, du sol et du climat (Table B.1).

Table B.1 : Type et catégories des variables étudiées.

Type de variable – *catégorie*	**Variables**
A expliquer	
– *Génotypes Frankia*	Matrice d'association de *Frankia*
– *Génotypes Sp+*	Occurrence de génotypes Sp+
	Fréquence de génotypes Sp+
Explicatives	
– *Géographie*	Latitude
	Longitude
	Altitude
– *Plante-hôte*	Sous-genre
	Espèce
	Sous-espèce

– *Génotypes champignons*	Matrice d'association fongique
– *Sol*	pH
	Capacité d'échange cationique
	% Matière organique
	Carbone
	Azote
	Potassium
	Phosphore
– *Climat*	Température annuelle moyenne
	Intervalle des températures diurnes moyennes
	Isotherme
	Saisonnalité de la température (déviation standard)
	Température maximale du mois le plus chaud
	———— minimale du mois le plus froid
	Intervalle des températures annuelles
	Température moyenne du quartier le plus humide
	———————— le plus sec
	———————— le plus chaud
	———————— le plus froid
	Précipitations annuelles
	———— du mois le plus humide
	———— du mois le plus sec
	Saisonnalité des précipitations (coefficient de variation)
	Précipitations du quartier le plus humide
	———————— le plus sec
	———————— le plus chaud
	———————— le plus froid

Résultats préliminaires

Les résultats obtenus sont cohérents avec certaines questions posées dans la discussion générale et font l'objet de deux articles en cours de rédaction, l'un en second auteur (Diversité des souches de *Frankia* et des champignons ectomycorrhiziens associés à *Alnus* ssp. *barbata* dans un refuge glaciaire en Géorgie) et l'autre en premier auteur dont nous allons présenter les principaux résultats préliminaires. Les méthodes employées sont similaires à celle décrites précédemment (CHAPITRE 4). Le projet m'a également amené à encadrer un stage de Master 1 et co-encadrer un stage de Master 2 Recherche (G. Schwob) sur les thématiques d'endémisme et insularité des *Frankia* associées aux espèces d'aulnes de Corse et du Japon.

(1) Fréquence du trait Sp+ (Table B.2) : En Corse, les espèces d'aulne présentes sont *A. glutinosa*, *A. cordata* (endémique) et *A. viridis* ssp. *suaveolens* (endémique également). Les *Frankia* de phénotype Sp+

tendent à être plus fréquemment associé aux espèces d'aulne en habitats montagnard ou alpins (*A. cordata*, *A. viridis* ssp. *suaveolens*).

Table B.2 : Fréquences des nodosité Sp+ par espèce-hôte du genre *Alnus*.

Espèce-hôte	Nombre de nodosités Sp+	Nombre de nodosités total	Pourcentage de Sp+ estimé	IC 95% [c]	[d]
Alnus cordata	61	81	75	[64 ; 84]	
Alnus cremastogyne	0	5	0	[0 ; 54]	*
Alnus firma	0	2	0	[0 ; 80]	*
Alnus glutinosa	48	290	17	[13 ; 21]	
– *A. glutinosa* ssp. *glutinosa*	– *38*	– *250*	– *15*	– *[11 ; 20]*	
– *A. glutinosa* ssp. *barbata*	– *10*	– *40*	– *25*	– *[13 ; 41]*	
Alnus incana	87	130	67	[58 ; 74]	
– *A. incana* ssp. *hirsuta*	– *1*	– *6*	– *17*	– *[1 ; 63]*	*
– *A. incana* ssp. *incana*	– *80*	– *107*	– *75*	– *[65 ; 82]*	
– *A. incana* ssp. *tenuifolia*	– *6*	– *17*	– *35*	– *[15 ; 61]*	
Alnus maritima	0	5	0	[0 ; 54]	*
Alnus matsumurae	5	6	83	[36 ; 99]	*
Alnus nepalensis	4[b]	15	27	[9 ; 55]	
Alnus rugosa	5	8	63	[26 ; 90]	*
Alnus viridis [a]	277	348	80	[75 ; 84]	
– *A. viridis* [a] ssp. *crispa*	– *16*	– *27*	– *59*	– *[39 ; 77]*	
– *A. viridis* [a] ssp. *fruticosa*	– *29*	– *38*	– *76*	– *[59 ; 88]*	
– *A. viridis* [a] ssp. *suaveolens*	– *9*	– *10*	– *90*	– *[54 ; 99]*	
– *A. viridis* [a] ssp. *viridis*	– *218*	– *268*	– *81*	– *[76 ; 86]*	
– *A. viridis* [a] ssp. *maximowiczii*	– *5*	– *5*	– *100*	– *[46 ; 100]*	*

a, *Alnus viridis* est également dénommé *Alnus alnobetula* (Ehrh.) K. Koch ; b, sporulation *in planta* ectopique, dans les couches supérieures de l'épiderme de la nodosité ; c, intervalle de confiance du pourcentage de Sp+ au seuil de confiance de 95% (fonction prop.test dans R) ; d, Pourcentage et IC sujets à caution en raison du faible nombre de nodosités analysées.

(2) Phylogénie des *Frankia* (Figure B.1) : En Corse, les *Frankia* sont également regroupées par espèce-hôte, à quelques exceptions près pour une souche Sp+ d'*A. cordata* (étoile bleue, clade 1c) et une

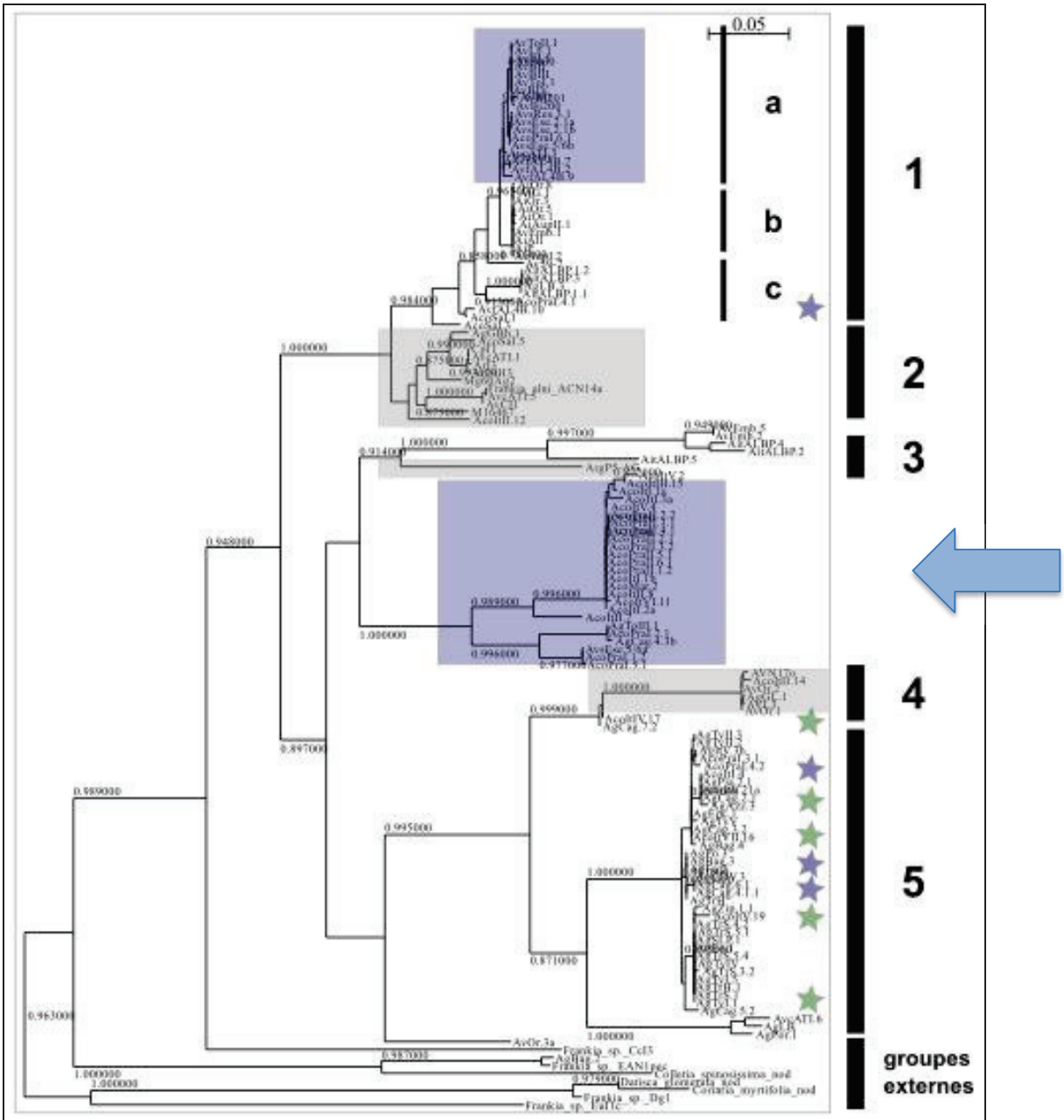


Figure B.1 : Phylogénie des *Frankia* infectives d'*Alnus* basé sur les séquences concaténées des 3 *loci dnaA, ftsZ* et *pgk* et estimée par Maximum de Vraisemblance.

Pour plus de clarté, la phylogénie présentée reprend les souches et la numérotation des clades utilisés précédemment (CHAPITRE 4) : le clade 1 regroupe les *Frankia* Sp+ d'*A. incana* (b, c) et *A. viridis* (a), le clade 2 les souches de référence Sp– (en gris), le clade 3 des souches Sp– d'*A. incana* et *A. viridis*, le clade 4 des souches Sp– d'*A. viridis* et le clade 5 les souches Sp+ et Sp– d'*A. glutinosa*. Le support statistique des nœuds a été estimé par la méthode non paramétrique aLRT (approximated Likelyhood Ratio Test) et seules les valeurs supérieures à 0,85 sont indiquées. L'échelle représente le nombre moyen de substitutions par nucléotide.
A.C. Pozzi

souche Sp– d'*A. glutinosa* (étoile verte, clade 4). Les génotypes de *Frankia* associés à *A. viridis* ssp. *suaveolens*, tous Sp+, sont regroupés (encadré bleu, clade 1a) avec les *Frankia* Sp+ d'*A. viridis* et ses sous-espèces des Alpes, d'Alaska, du Québec (et également du Japon, données non présentée ici). Les *Frankia* Sp+ associées à *A. cordata* forment un nouveau clade, homogène, et parent du clade 3 (encadré bleu indiqué par la flèche). Compte-tenu de la distance phylogénétique apparente entre ce nouveau clade et les autres, il est très probable que ces *Frankia* Sp+ puissent constituer une nouvelle espèce génomique. Enfin, les souches Sp+ et Sp– associées à *A. glutinosa* sont regroupées dans le clade 5 (étoiles bleues et vertes).

(3) Influence des variables bioclimatiques sur la diversité des *Frankia* : D'une manière générale, la structure des communautés est très fortement corrélée aux variables bioclimatiques. Les structures des communautés de *Frankia* associés à *A. glutinosa* et *A. viridis* ssp. *suaveolens* sont corrélées de manière inverse aux mêmes variables bioclimatiques. La structure des communautés de *Frankia* associés à *A. cordata* est corrélée de manière intermédiaire (Figure B.2).

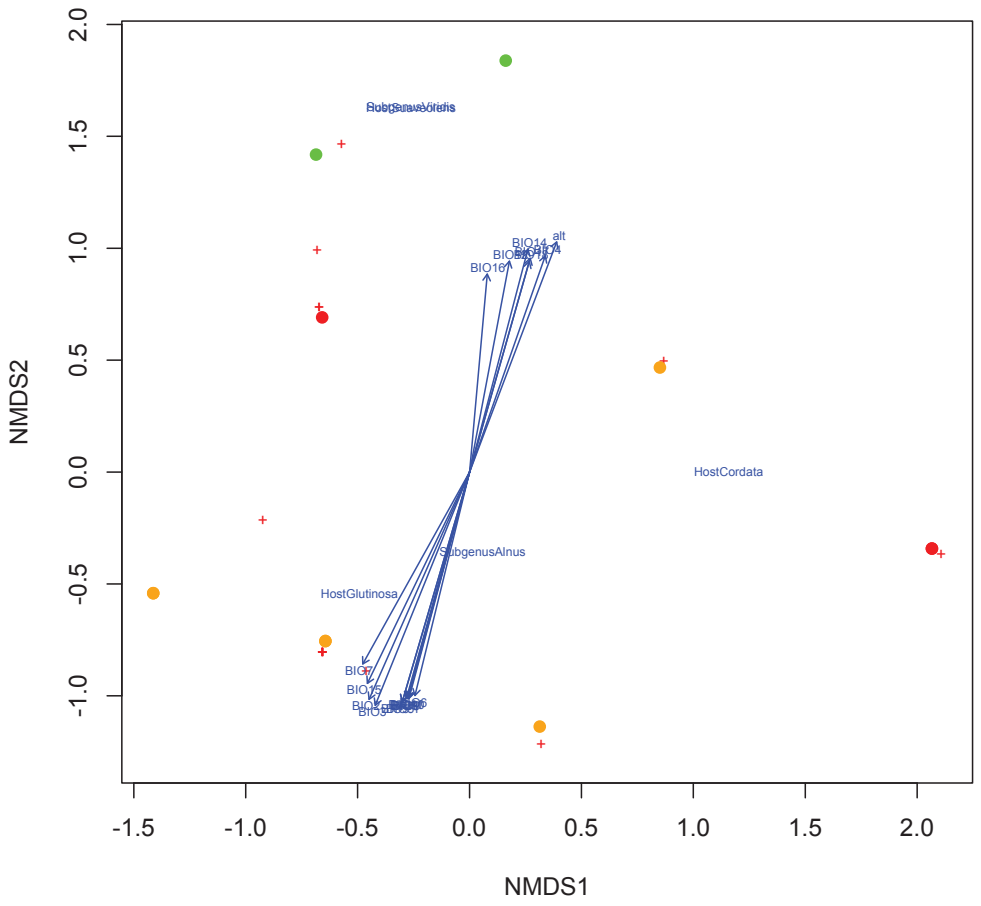


Figure B.2 : Corrélation des variables étudiées et de la structure des communautés de *Frankia*.

Ce graphique est obtenu par une analyse NMDS (méthode d'ordination de type analyse en composante principale) et permet d'identifier visuellement les variables bioclimatiques corrélées à la structure des communautés de *Frankia* échantillonnées en Corse. La structure des communautés est représentée par les cercles verts (*A. glutinosa*), rouges (*A. cordata*) et les croix (*A. viridis* ssp. *suaveolens*), les variables bioclimatiques sont représentées par les flèches bleues, les facteurs sous-genre et espèce de l'hôte sont également pris en compte.

M. Roy et A.C Pozzi.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abel-Santos, E. (ed) (2012) *Bacterial Spores, Current Research and Applications*. Norfolk, United Kingdom: Caister Academic Press.

Agresti, A., and Coull, B.A. (1998) Approximate is better than exact for interval estimation of binomial proportions. *American Journal of Statistics* **52**: 119-126.

Akkermans, A., and van Dijk, C. (1976) The formation and nitrogen-fixing activity of the root nodules of *Alnus glutinosa* under field conditions. In *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. Nutman, P.S. (ed). London, United Kingdom: Cambridge University Press, pp. 511-520.

Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., and Aksoy, S. (2002) Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature Genetics* **32**: 402-407.

Angert, E.R. (2005) Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 214-224.

Anthelme, F., Villaret, J.-C., and Brun, J.-J. (2007) Shrub encroachment in the Alps gives rise to the convergence of sub-alpine communities on a regional scale. *Journal of Vegetation Science* **18**: 355-362.

Arcularius, J. (1928) Zytologische Untersuchungen an einigen endotrophen Mykorrhizen. *Centralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde und Infektionskrankheiten II* **74**: 191-207.

Arveby, A.S., and Huss-Danell, K. (1988) Presence and dispersal if infective *Frankia* in peat and meadow soils in Sweden. *Biology and Fertility of Soils* **6**.

Baker, D. (1982) A cumulative listing of isolated *Frankiae*, the symbiotic nitrogen-fixing actinomycetes. *The Actinomycetes* **17**: 35-42.

———— and Schwintzer, C. (1990) Introduction. In *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. Schwintzer, C.R., and Tjepkema, J.D. (eds). San Diego, California, United States: Academic Press, Inc., pp. 1-13.

Baker, D. (1987) Relationships among pure cultured strains of *Frankia* based on host specificity. *Physiologia Plantarum* **70**: 245-248.

Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**: 1622-1625.

Bautista-Guerrero, H.H., Cruz, H.A., Nesme, X., Valdes, M., Mendoza, H.A., and Fernandez, M.P. (2011) Genomospecies identification and phylogenomic relevance of AFLP analysis of isolated and non-isolated strains of *Frankia* spp. *Systematic and Applied Microbiology* **34**: 200-206.

————, Abby, S., Herrera-Belaroussi, A., Xu, R., Valdes, M., and Fernandez, M.P. (en préparation) A robust phylogeny of the symbiotic actinobacteria *Frankia* sp. based on Multi-Locus Sequence Analysis.

Becking, J. (1970) *Frankia*ceae *fam. nov.* (Actinomycetales) with one new combination and six new species of the genus *Frankia* Brunchorst 1886, 174. *International Journal of Systematic Bacteriology* **20**: 201-220.

Benson, D., and Hanna, D. (1983) *Frankia* diversity in an alder stand as estimated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of whole-cell proteins. *Canadian Journal of Botany* **61**: 2919-2923.

——— and Dawson, J.O. (2007) Recent advances in the biogeography and genecology of symbiotic *Frankia* and its host plants. *Physiologia Plantarum* **130**: 318-330.

Bernouilli, D. (1954) Exposition of a new theory on the meaurment of risk. *Econometrica* **22**: 23-36.

Berry, A., McIntyre, L., and McCully, M. (1986) Fine-structure of root hair infection leading to nodulation in the *Frankia-Alnus* symbiosis. *Canadian Journal of Botany* **64**: 292-305.

Bertrand, J.C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., and Normand, P. (eds) (2011) *Ecologie Microbienne, Microbiologie des Milieux Naturels et Anthropisés*. Pau, France: Presses de l'Université de Pau et des pays de l'Adour.

Bousquet, J., and Lalonde, M. (1990) The genetics of actinorhizal *Betulaceae*. In *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. Schwintzer, C., and Tjepkema, J. (eds). San Diego, California, United States: Academic Press, Inc., pp. 239-261.

Buoro, M., and Carlson, S.M. (2014) Life-history syndromes: integrating dispersal through space and time. *Ecology Letters* **17**: 756-767.

Burggraaf, A., Quispel, A., Tak, T., and Valstar, I. (1981) Methods of isolation and cultivation of *Frankia* species from actinorhizas. *Plant and Soil* **61**: 157-168.

Burleigh, S., and Torrey, J. (1990) Effectiveness of different *Frankia* cell types as inocula for the actinorhizal plant *Casuarina*. *Applied Environmental Microbiology* **56**: 2565-2567.

——— and Dawson, J. (1994) Occurrence of *Myrica*-nodulating *Frankia* in Hawaiian volcanic soils. *Plant and Soil* **164**: 283-289.

Callaham, D., Del Tredici, P., and Torrey, J. (1978) Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science* **199**: 899-902.

Chaia, E.E., Wall, L.G., and Huss-Danell, K. (2010) Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte *Frankia*. A review. *Symbiosis* **51**: 201-226.

Chao, M.C., and Rubin, E.J. (2010) Letting sleeping *dos* lie: does dormancy play a role in tuberculosis? *Annual Review of Microbiology* **64**: 293-311.

Charles, H., and Ishikawa, H. (1999) Physical and genetic map of the genome of *Buchnera*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acrythosiphon pisum*. *Journal of Molecular Evolution* **48**: 142−150.

Chen, Z., and Li, J. (2004) Phylogenetics and biogeography of *Alnus* (Betulaceae) inferred from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS region. *International Journal of Plant Sciences* **165**: 325-335.

Chung, J.D., Stephanopoulos, G., Ireton, K., and Grossman, A.D. (1994) Gene expression in single cells of *Bacillus subtilis*: evidence that a threshold mechanism controls the initiation of sporulation. *Journal of Bacteriology* **176**: 1997-1984.

Cohen, D. (1966) Optimizing reproduction in a randomly varying environment. *Journal of Theoretical Biology* **12**: 119-129.

Cooper, W.S., and Kaplan, R.H. (1982) Adaptive "Coin-flipping": a decision-theoretic examination of natural selection for random individual variation. *J Theor Biol* **94**: 135-151.

Cotin-Galvan, L., Pozzi, A.C., Schwob, G., Fournier, P., Fernandez, M.P., and Herrera-Belaroussi, A. (2016) *In-planta* sporulation capacity enhances infectivity and rhizospheric competitiveness of *Frankia* strains. *Microbes and Environments* **31**(1): 11-18.

Crane, P.R. (1989) Early fossil history and evolution of the Betulaceae. In *Evolution, Systmatics, and Fossil History of the Hamamelidae*. Crane, P.R., and Blackmore, S. (eds). Oxford, United Kingdom: Clarendon Press, pp. 87-116.

Danière, C., Capellano, A., and Moiroud, A. (1986) Dynamique de l'azote dans un peuplement naturel d'*Alnus incana* (L.) Moench. *Acta œcologica-Œcologia plantarum* **7**: 165-175.

Darwin, C. (1859) *The Origin of Species by Means of Natural Selection, or The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. London, United Kingdom: John Murray.

Dawkins, R. (1976) *The selfish gene*. London, United Kingdom: Oxford University Press.

Dawson, J.O. (2008) Ecology of Actinorhizal Plants. In *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*. Pawlowski, K., and Newton, W.E. (eds). Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 199-234.

den Boer, P.J. (1968) Spreading of risk and stabilization of animal numbers. *Acta Biotheoretica* **18**: 165-194.

Denison, R.F. (2000) Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *The American Naturalist* **156**: 567-576.

Dixon, R.O.D., and Wheeler, C.T. (1986) *Nitrogen Fixation in Plants*. Glasgow, United Kingdom: Blackie & Son ltd.

Dobzhansky, T. (1973) Nothing in Biology Makes Sense Except In The Light Of Evolution. *The American Biology Teacher*: 125-129.

Domenach, A.-M., Kurdali, F., Danière, C., and Bardin, R. (1988) Détermination de l'identité isotopique de l'azote fixé par le *Frankia* associé au genre *Alnus*. *Canadian Journal of Botany* **66**: 1241-1247.

Dowling, D.N., and Broughton, W.J. (1986) Competition for nodulation of legumes. *Annual Review of Microbiology* **40**: 131-157.

Duda, V.I., Lebedinsky, A.V., Mushegjan, M.S., and Mitjushina, L.L. (1987) A new anaerobic bacterium, forming up to five endospores per cell – Anaerobacter polyendosporus gen. et spec. nov. *Archives of Microbiology* **148**: 121-127.

Duputié, A., and Massol, F. (2013) An empiricist's guide to theoretical predictions on the evolution of dispersal. *Interface Focus* **3**: 20130028.

Dworkin, J., and Shah, I.M. (2010) Exit from dormancy in microbial organisms. *Nature Reviews Microbiology*.

Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792-1797.

Elliot, S.L., Mumford, J.D., and de Moraes, G.J. (2002) The role of resting spores in the survival of the mite-pathogenic fungus *Neozygites floridana* from *Mononychellus tanajoa* during dry periods in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* **81**: 148-157.

Evans, M.E., and Dennehy, J.J. (2005) Germ banking: bet-hedging and variable release from egg and seed dormancy. *Quarterly Review of Biology* **80**: 431-451.

Fåhraeus, G. (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Journal of General Microbiology* **16**: 374–381.

Felsenstein, J. (1989) Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 163-166.

Fenton, A., and Hudson, P.J. (2002) Optimal infection strategies: shoul macroparasite hedge their bets? *Oïkos* **96**: 92-101.

Fernandez, M., Meugnier, H., Grimont, P., and Bardin, R. (1989) Deoxyribonucleic acid relatedness among members of the genus *Frankia*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39**: 424-429.

Fisher, R.F. (1930) *The Genetical Theory of Natural Selection*: Clarendon.

Flint, J.F., Drzymalski, D., Montgomery, W.L., Southam, G., and Angert, E.R. (2005) Nocturnal production of endospores in natural populations of *Epulopiscium*-like surgeonfish symbionts. *Journal of Bacteriology* **187**: 7460-7470.

Forde, S.E., Thompson, J.N., Holt, R.D., and Bohannan, B.J. (2008) Coevolution drives temporal changes in *fitness* and diversity across environments in a bacteria–bacteriophage interaction. *Evolution* **62**: 1830-1839.

Friese, C.F., and Allen, M.F. (1991) The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia* **83**: 409-418.

Furlow, J. (1979) The systematics of the American species of *Alnus* (Betulaceae). *Rhodora* **81**: 151-248.

Gevers, D., Cohan, F.M., Lawrence, J.G., Spratt, B.G., Coenye, T., Feil, E.J. *et al.* (2005) Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 733-739.

Gilchrist (2006) Identifying *fitness* and optimal life-history strategies for an asexual filamentous fungus. *Evolution* **60**: 970-979.

Gourbière, S., and Mallet, J. (2005) Has adaptive dynamics contributed to the understanding of adaptive and sympatric speciation. *Journal of evolutionary biology* **18**: 1201-1204.

———— and Menu, F. (2009) Adaptive dynamics of dormancy duration variability: evolutionary *trade-off* and priority effect lead to suboptimal adaptation. *Evolution* **63**: 1879-1892.

Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010) SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 221-224.

Gouyon, P.H., Arnould, J., and Henry, J.-P. (1997) *Les Avatars du Gène, La Théorie Néodarwinienne de l'Evolution*. Paris, France: Belin.

Griekspoor, A., and Groothuis, T. (2014). 4Peaks : Nucleobytes.com : Software for Research [WWW document]. URL http://nucleobytes.com/index.php/4peaks

Gtari, M., Ghodhbane-Gtari, F., Nouioui, I., Beauchemin, N., and Tisa, L.S. (2012) Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing actinobacteria. *Archives of Microbiology* **194**: 3-11.

Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010) New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**: 307-321.

Hall, R.B., Mcnabb, H.S., Maynard, C.A., and Green, T.L. (1979) Toward Development of Optimal *Alnus glutinosa* Symbioses. *Botanical Gazette* **140**: S120-S126.

Hamilton, W.D. (1964) The genetical evolution of social behaviour i. *Journal of Theoretical Biology* **7**: 1-16.

Hibbing, M., Fuqua, C., Parsek, M., and Peterson, S. (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 15–25.

Higgins, L.M., and Kennedy, P.G. (2012) Symbiotic *Frankia* bacteria in *Alnus* forests in Mexico and the United States of America: is geographic location a good predictor of assemblage structure? *Botany* **90**: 423-431.

Hocher, V., Alloisio, N., Auguy, F., Fournier, P., Doumas, P., Pujic, P. *et al.* (2011) Transcriptomics of actinorhizal symbioses reveals homologs of the whole common symbiotic signaling cascade. *Plant Physiology* **156**: 700-711.

Holman, R.M., and Schwintzer, C.R. (1987) Distribution of spore-positive and spore-negative nodules of *Alnus incana* ssp. *rugosa* in Maine, USA. *Plant and Soil* **104**: 103-111.

Hooper, D.U., Bignell, D.E., Brown, V.K., Brussaard, L., Dangerfield, J.M., Wall, D.H. *et al.* (2000) Interactions between aboveground and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: Patterns, mechanisms, and feedbacks. *Bioscience* **50**: 1049-1061.

Houwers, A., and Akkermans, A.D.L. (1981) Influence of inoculation on yield of *Alnus glutinosa* in the Netherlands. *Plant and Soil* **61**: 189-202.

Huenneke, L.F. (1987) Demography of a clonal shrub, *Alnus incana* ssp. *rugosa* (Betulaceae). *American Midland Naturalist* **117**: 43-55.

Hugh-Jones, M., and Blackburn, J. (2009) The ecology of *Bacillus anthracis*. *Molecular Aspects of Medecine* **30**: 356-367.

Huguet, V., Gouy, M., Normand, P., Zimpfer, J.F., and Fernandez, M.P. (2005) Molecular phylogeny of Myricaceae: a reexamination of host-symbiont specificity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **34**: 557-568.

————, Batzli, J.M., Zimpfer, J.F., Normand, P., Dawson, J.O., and Fernandez, M.P. (2001) Diversity and specificity of *Frankia* strains in nodules of sympatric *Myrica gale*, *Alnus incana*, and *Shepherdia canadensis* determined by *rrs* gene polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2116-2122.

Huss-Danell, K. (1997) Tansley Review No. 93, Actinorhizal symbioses and their N_2 fixation. *New Phytologist* **136**: 375-405.

————, Sverrisson, H., Hahlin, A.-S., and Danell, K. (1999) Occurrence of *Alnus*-infective *Frankia* and *Trifolium*-infective *Rhizobium* in circumpolar soils. *Arctic Antarctic and Alpine Research* **31**: 400-406.

Igual, J.M., Valverde, A., Velázquez, E., Regina, I.S., and Rodríguez-Barrueco, C. (2006) Natural diversity of nodular microsymbionts of *Alnus glutinosa* in the Tormes River Basin. *Plant and Soil* **280**: 373-383.

Jobb, G., von Haeseler, A., and Strimmer, K. (2004) TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* **4**: 18.

Josephson, K., and Pepper, I. (1984) Competitiveness and effectiveness of strains of *Rhizobium phaseoli* isolated from the Sonoran desert. *Soil Biology and Biochemistry* **16**: 651-655.

Kaplan, R.H., and Cooper, W.S. (1984) The evolution of developmental plasticity in reproductive characteristics– an application of the adaptive coin-flipping principle. *American Naturalist* **123**: 393-410.

Kashanski, C., and Schwintzer, C. (1987) Distribution of spore-positive and spore-negative nodules of *Myrica gale* in Maine, USA. *Plant and Soil* **104**: 113-120.

Khan, A., Myrold, D.D., and Misra, A.K. (2007) Distribution of *Frankia* genotypes occupying *Alnus nepalensis* nodules with respect to altitude and soil characteristics in the Sikkim Himalayas. *Physiologia Plantarum* **130**: 364-371.

Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111-120.

Koppenhöfer, A., Kaya, H., Shanmugam, S., and Wood, G. (1995) Interspecific competition between steinernematid nematodes within an insect host. *Journal of Invertebrate Pathology* **66**: 99-103.

Krumholz, G.D., Chval, M.S., McBride, M.J., and Tisa, L.S. (*2003*) Germination and physiological properties of *Frankia* spores. *Plant and Soil* ***254***: *57–67*.

Kurdali, F., Capellano, A., Moiroud, A., and Domenach, A.M. (1989) Study of the contribution of the shoot and/or root of *Alnus* sp. in the compatibility between the host and a Sp+ *Frankia* strain using a grafting technique. *Plant and Soil* **113**: 101-109.

————, Rinaudo, G., Moiroud, A., and Domenach, A. (1990) Competition for nodulation and $^{15}N_2$-fixation between a Sp^+ and a Sp– *Frankia* strain from *Alnus incana*. *Soil Biology and Biochemistry* **22**: 57-64.

————, Domenach, A.M., Fernandez, M.P., Capellano, A., and Moiroud, A. (1988) Compatibility of *Frankia* spore positive and spore negative inocula with *Alnus glutinosa* and *Alnus incana*. *Soil Science and Plant Nutrition* **34**: 451-459.

Laguerre, G., Heulin-Gotty, K., Brunel, B., Klonowska, A., Le Quere, A., Tillard, P. *et al.* (2012) Local and systemic N signaling are involved in *Medicago truncatula* preference for the most efficient *Sinorhizobium* symbiotic partners. *New Phytologist* **195**: 437-449.

Lalonde, M., and Calvert, H. (1979) Production of *Frankia* hyphae and spores as an infective inoculant for *Alnus* species. In *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests*. JC Gordon, C.W., DA Perry (ed). Corvallis, OR: Oregon State University, Forest Research Laboratory, pp. 95-110.

Law (1979) Optimal life histories under age-specific predation. *American Naturalist*: 399-417.

Lazniewska, J., Macioszek, V., and AK, K. (2012) Plant-fungus interface: The role of surface structures in plant resistance and susceptibility to pathogenic fungi. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **78**: 24e30.

Lechevalier, M. (1983) Cataloging *Frankia* strains. *Canadian Journal of Botany* **61**: 2964-2967.

———— and Lechevalier, H.A. (1990) Systematics, Isolation, and culture of *Frankia*. In *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Schwintzer, C.R., and Tjepkema, J.D. (eds). San Diego, California, United States: Academic Press, Inc., pp. 35-60.

Lenski, R.E. (2003) *Phenotypic and Genomic Evolution during a 20,000-Generation Experiment with the Bacterium Escherichia coli*. New York, United States: Wiley.

Levins, R. (1968) *Evolution in Changing Environments: Some Theoretical Explorations*. Princeton, United States: Princeton University Press.

Lhote, P. (1986) Etude écologique des aulnes dans leur aire naturelle en France. Grenoble: IDF-ENGREF-Université de Franche-Comté, p. 67.

Locci, R. (2005) Actinomycete spores. *Encyclopedia of Life Science*. John Wiley & Sons, Ltd., pp. 1-13.

MacLuckie (1923) Studies in symbiosis III. Contribution to the morphology and physiology of the root nodules of *Podocarpus spinulosa* and *P. elata*. *Proceedings of the Linnaean. Society,* N. S. Wales, 48: 82-93.

Maggia, L., and Bousquet, J. (1994) Molecular phylogeny of the actinorhizal Hamamelidae and relationships with host promiscuity towards *Frankia*. *Molecular Ecology* **3**: 459-467.

Mansour, S., Dewedar, A., and Torrey, J. (1990) Isolation, culture, and behavior of *Frankia* strain HFPCgI4 from root nodules of *Casuarina glauca*. *Botanical Gazette* **151**: 490-496.

Markham, J.H. (2008) Variability of nitrogen-fixing *Frankia* on *Alnus* species. *Botany-Botanique* **86**: 501-510.

———— and Chanway, C.P. (1998) *Alnus rubra* (Bong.) nodule spore type distribution in southwestern British Columbia. *Plant Ecology* **135**: 197-205.

Matthysen, E. (2012) Multicausality of dispersal: A review. In *Dispersal Ecology and Evolution*. Clobert, J., Baguette, M., Benton, T.G., and Bullock, J.M. (eds). Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, p. 462.

Maunoury, N., Redondo-Nieto, M., Bourcy, M., Van de Velde, W., Alunni, B., Laporte, P. *et al.* (2010) Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in Medicago truncatula nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS One* **5**: e9519.

Maunuksela, L., Zepp, K., Koivula, T., Zeyer, J., Haahtela, K., and Hahn, D. (1999) Analysis of *Frankia* populations in three soils devoid of actinorhizal plants. *FEMS Microbiology Ecology* **28**: 11–21.

McArthur, J.V. (2006) *Microbial Ecology, an Evolutionary Approach*: Academic Press.

McVean, D.N. (1953) *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Journal of Ecology* **41**: 447-466

Menu, F., Roebuck, J., and Viala, M. (2000) *Bet-hedging* diapause strategies in stochastic environments. *American Naturalist* **155**: 724-734.

Metz, J.A.J., Geritz, S.A.H., Meszéna, G., Jacobs, F.J.A., and van Heerwaarden, J.S. (1996) Adaptive dynamics– a geometrical study of the consequences of nearly faithful reproduction. In *Stochastic and Spatial Structures of Dynamical Systems*. van Strien SJ, and Verduyn Lunel, S. (eds). Amsterdam, The Netherlands: *Proceedings of the Royal Dutch Academy of Science* (KNAW Verhandelingen), pp. 183-231.

Meyen, J. (1829) Uber das herauswachsen parasitischer Gewächse aus den Wurzeln anderer Pflanzen. *Flora* **12**: 49-64.

Miller, I., and Baker, D. (1985) The initiation, development and structure of root nodules in *Elaeagnus angustifolia* L. (Elaeagnaceae). *Protoplasma* **128**: 107-119.

Monz, C.A., and Schwintzer, C.R. (1989) The physiology of spore-negative and spore-positive nodules of *Myrica gale*. *Plant and Soil* **118**: 75-87.

Murai, S. (1964) Phytotaxonomical and geobotanical studies on genus *Alnus* in Japan III. Taxonomy of whole world species and distribution of each sect. *Bulletin of the Government Forest Experiment Station (Tokyo)* **171**: 1-107.

Murry, M.A., Fontaine, M.S., and Torrey, J.G. (1984) Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp. HFPArI 3 grown in batch culture. *Plant and Soil* **78**: 61-78.

Myrold, D., and Huss-Danell, K. (1994) Intrageneric variation in nodulation of *Alnus*: consequences for quantifying *Frankia* nodulation units in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 525-531.

Navarro, E., Bousquet, J., Moiroud, A., Munive, A., Piou, D., and Normand, P. (2003) Molecular phylogeny of *Alnus* (Betulaceae), inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Plant and Soil* **254**: 207-217.

Nazaret, S., Cournoyer, B., Normand, P., and Simonet, P. (1991) Phylogenetic relationships among *Frankia* genomic species determined by use of amplified 16S rDNA sequences. *Journal of Bacteriology* **173**: 4072-4078.

Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., and Setlow, P. (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**: 548-572.

Nickel, A., Pelz, O., Hahn, D., Saurer, M., Siegwolf, R., and Zeyer, J. (2001) Effect of inoculation and leaf litter amendment on establishment of nodule-forming *Frankia* populations in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2603-2609.

Nicol, H., and Thornton, H. (1941) Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. *Proceedings of the Royal Society* **130**: 32-59.

Niehaus, K., Kapp, D., and Puhler, A. (1993) Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant? *Planta* **190**: 415-425.

Normand, P., and Lalonde, M. (1982) Evaluation of *Frankia* strains isolated from provenances of two *Alnus* species. *Canadian Journal of Microbiology* **28**: 1133-1142.

——— and Lalonde, M. (1986) The genetics of actinorhizal *Frankia*: a review. *Plant and Soil* **90**: 429-453.

——— and Bousquet, J. (1989) Phylogeny of nitrogenase sequences in *Frankia* and other nitrogen-fixing microorganisms. *Journal of Molecular Evolution* **29**: 436-447.

——— and Fernandez, M.P. (2009) Evolution and diversity of *Frankia*. In *Prokaryotic Symbionts in Plants*. Pawlowski, K. (ed). Berlin, Deutchland: Springer Berlin Heidelberg, pp. 103-125.

———, Orso, S., Cournoyer, B., Jeannin, P., Chapelon, C., Dawson, J. *et al.* (1996) Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family *Frankia*ceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 1-9.

———, Lapierre, P., Tisa, L.S., Gogarten, J.P., Alloisio, N., Bagnarol, E. *et al.* (2007) Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Res* **17**: 7-15.

Nouioui, I., Ghodhbane-Gtari, F., Beauchemin, N.J., Tisa, L.S., and Gtari, M. (2011) Phylogeny of members of the *Frankia* genus based on *gyrB*, *nifH* and *glnII* sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* **100**: 579-587.

Paschke, M., and Dawson, J. (1994) *Frankia* in prairie, forest, and cultivated soils of central Illinois, USA. *Pedobiologia* **38**: 546-551.

Pasternak, A.F., and Victor N. Mikheev, V., E. Tellervo (2000) Life history characteristics of *Argulus foliaceus* L.(Crustacea: Branchiura) populations in Central Finland *Annales Zoologici Fennici* **37**: 1964-2000.

Pawlowski, K., and Newton, W.E. (eds) (2008) *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Peklo, J. (1910) Die Pflanzlichen Aktinomykosen. *Centralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde und Infektionskrankheiten II* **27**: 451-579.

Pélisson, P.F., Bernstein, C., Debias, F., Menu, F., and Venner, S. (2013) Dispersal and dormancy strategies among insect species competing for a pulsed resource. *Ecological Entomology* **38**: 470–477.

Pépin, R., and Boumendil, J. (1982) Preservation of fine-structure in the sclerotium of *Sclerotinia tuberosa*– a discomycete fungus, a model for preparing infiltration resistant and heterogeneous specimens. *Cytologia* **47**: 359-377.

Périnet, P., Brouillette, J., Fortin, J., and Lalonde, M. (1985) Large scale inoculations of actinorhizal plants with *Frankia*. *Plant and Soil* **87**: 175-183.

Petit, R., Aguinagalde, I., de Beaulieu, J.L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R. *et al.* (2003) Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* **300**: 1563-1565.

Philippi, T. (1993) *Bet-hedging* germination of desert annuals: beyond the first year. *American Naturalist* **142**.

——— and Seger, J. (1989) Hedging ones evolutionary bets, revisited. *Trends in Ecology & Evolution* **4**: 41-44.

Pommer, E. (1959) Uber die Isolierung des Endophyten aus den Wurzelknöllchen *Alnus glutinosa* Gaertn. und uber erfolgreiche Re-Infektionsversuche. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **72**: 138-150.

Popovici, J., Walker, V., Bertrand, C., Bellvert, F., Fernandez, M.P., and Comte, G. (2011) Strain specificity in the Myricaceae-*Frankia* symbiosis is correlated to plant root phenolics. *Functional Plant Biology* **38**: 682-689.

————, Comte, G., Bagnarol, E., Alloisio, N., Fournier, P., Bellvert, F. *et al.* (2010) Differential Effects of Rare Specific Flavonoids on Compatible and Incompatible Strains in the *Myrica gale-Frankia* Actinorhizal Symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 2451–2460.

Pozzi, A.C., Bautista-Guerrero, H.H., Nouioui, I., Cotin-Galvan, L., Pépin, R., Fournier, P. *et al.* (2015) *In-planta* sporulation: a major life-history trait to understand the evolution of *Alnus*-infective *Frankia*. *Environmental Microbiology* **17**(9):3125-3138.

Prosser, J.I. (2007) The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 384-392.

Pucciariello, C., Innocenti, G., Van de Velde, W., Lambert, A., Hokins, J., Clément, M. *et al.* (2009) (Homo)glutathione depletion modulates host gene expression during the symbiotic interaction between *Medicago truncatula* and *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Physiology* **151**: 1186-1196.

Pulliam, H. (2000) On the relationship between niche and distribution. *Ecology Letters* **3**: 349-361.

Quispel, A. (1990) Discoveries, discussions, and trends in research on actinorhizal root nodule symbioses before 1978. In *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*. Schwintzer, C., and Tjepkema, J. (eds). San Diego, California, United States: Academic Press, Inc., pp. 15-33.

———— and Tak, T. (1978) Studies on the growth of the endophyte of *Alnus glutinosa* (L.) Vill. in nutrient solutions. *New Phytologist* **81**: 587-600.

R Development Core Team (2005) R: A language and environment for statistical computing. *R foundation for Statistical Computing*.

Racette, S., Torrey, J.G., and Berg, R.H. (1991) Sporulation in root nodules of actinorhizal plants inoculated with pure cultured strains of *Frankia*. *Can J Bot* **69**: 1471-1476.

Rajon, E. (2008) Adaptation locale et optimalité des stratégies de dormance en environnement imprévisible : développements théoriques et validation expérimentale chez le balanin de la châtaigne, Curculio elephas. In *Biologie*. Lyon, France: Université Claude Bernard – Lyon 1, p. 258.

————, Venner, S., and Menu, F. (2009) Spatially heterogeneous stochasticity and the adaptive diversification of dormancy. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 2094-2103.

————, Desouhant, E., Chevalier, M., Debias, F., and Menu, F. (2014) The evolution of bet hedging in response to local ecological conditions. *The American Naturalist* **184**: E1-15.

Ratcliff, W.C. (2010) Resource hoarding facilitates cheating in the legume-rhizobia symbiosis and bet-hedging in the soil. In: University of Minnesota, p. 110.

Ren, B.Q., Xiang, X.G., and Chen, Z.D. (2010) Species identification of *Alnus* (Betulaceae) using nrDNA and cpDNA genetic markers. *Molecular Ecology Resources* **10**: 594-605.

Richard, L. (1967) L'aire de répartition de l'aulne vert (*Alnus viridis* Chaix). *Documents pour la Carte de la Végétation des Alpes* **V**: 81-112.

Rodriguez-Barrueco, C. (1968) The occurrence of the root-nodule endophytes of *Alnus glutinosa* and *Myrica gale* in soils. *Journal of General Microbiology* **52**: 189-194.

Roff, D.A. (1992) *The Evolution of Life Histories, Theory and Analysis*. London, United Kingdom: Chapman & Hall.

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Hohna, S. *et al.* (2012) MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**: 539-542.

Sache, I. (1997) Effect of density and age of lesions on sporulation capacity and infection efficiency in wheat leaf rust (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*). *Plant pathology* **46**: 581-589.

Sayed, W.F. (2011) Preliminary evidence on photoreactivation of *Frankia* spores with visible light after exposure to UV-C radiation. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **58**: 93-103.

Schaede, R. (1932) Über die Symbioten in den Knöllchen der Erle und des Sanddorns und die cytologischen Verhältnisse in ihnen. *Planta* **19**: 389-416.

——— (1938) Die actinomyceten-Symbiose von *Myrica gale*. *Planta* **29**: 32-46.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B. *et al.* (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 7537-7541.

Schweitzer, J.A., Bailey, J.K., Fischer, D.G., LeRoy, C.J., Lonsdorf, E.V., Whitham, T.G., and Hart, S.C. (2008) Plant–soil–microorganism interactions: heritable relationship between plant genotype and associated soil microorganisms. *Ecology* **89**: 773-781.

Schwintzer, C.R. (1990) Spore-positive and spore-negative nodules. In *The biology of Frankia and actinorhizal plants*. Schwintzer, C.R., and Tjepkema, J.D. (eds). San Diego, California, United States: Academic Press, Inc., pp. 177-193.

——— and Tjepkema, J.D. (eds) (1990) *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plantes*. San Diego, California, United States: Academic Press, Inc.

Seger, J., and Brockmann, H.J. (1987) What is bet-hedging? *Oxford surveys in evolutionary biology* **4**: 182–211.

Sellstedt, A., Ahlqvist, A., and Huss-Danell, K. (1986) Nitrogen fixation and biomass production in symbioses between *Alnus incana* and *Frankia* strains with different nitrogen metabolism. *Physiologia Plantarum* **66**: 99-107.

Simonet, P., Normand, P., Moiroud, A., and Lalonde, M. (1985) Restriction enzyme digestion patterns of *Frankia* plasmids. *Plant and Soil* **87**: 49-60.

———, Bosco, M., Chapelon, C., Moiroud, A., and Normand, P. (1994) Molecular characterization of *Frankia* microsymbionts from spore-positive and spore-negative nodules in a natural alder stand. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 1335-1341.

———, Navarro, E., Rouvier, C., Reddell, P., Zimpfer, J., Dommergues, Y. *et al.* (1999) Co-evolution between *Frankia* populations and host plants in the family

Casuarinaceae and consequent patterns of global dispersal. *Environmental Microbiology* **1**: 525-533.

Singh, B., Ghosh, J., Islam, N.M., Dasgupta, S., and Kirsebom, L.A. (2010) Growth, cell division and sporulation in mycobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **98**: 165-177.

Slatkin, M. (1974) Hedging one's evolutionary bets. *Nature* **250**: 704-705.

Smolander, A., and Sundman, V. (1987) *Frankia* in acid soils of forests devoid of actinorhizal plants. *Physiologia Plantarum* **70**: 297-303.

——————, van Dijk, C., and Sundman, V. (1988) Survival of *Frankia* strains introduced into soil. *Plant and Soil* **106**: 65-72.

Solbreck, C. (1978) Migration, diapause, and direct development as alternative life histories in a seed bug, *Neacoryphus bicrucis*. In *Evolution of insect migration and diapause*. US: Springer, pp. 195-217.

Solomon, P.S., Tan, K.-C., and Oliver, R.P. (2005) Mannitol 1-phosphate metabolism is required for sporulation *in-planta* of the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 110–115.

Starrfelt, J., and Kokko, H. (2012) *Bet-hedging*–a triple *trade-off* between means, variances and correlations. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **87**: 742-755.

Stearns, S.C. (1992) *The Evolution of Life Histories*. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.

Stumpf, M.P., Laidlaw, Z., and Jansen, V.A. (2002) Herpes viruses hedge their bets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 15234-15237.

Sussman, A. (1976) Activators of fungal spore germination. In *The Fungal Spore Form and Function*. Webber DJ, H.W. (ed). New York: John Wiley and Sons, pp. 101–137.

Swensen, S.M., and Benson, D.R. (2008) Evolution of Actinorhizal Host Plants and *Frankia* Endosymbionts. In *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*. Pawlowski, K., and Newton, W.E. (eds). Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 73-104.

Tan, I.S., and Ramamurthi, K.S. (2014) Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports* **6**: 212-225.

Tavaré, S. (1986) Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* **17**: 57–86.

Thomas, F., Lefèvre, T., and Raymond, M. (eds) (2010) *Biologie Evolutive*. Bruxelles, Belgique: Editions De Boek Université.

Tisa, L.S., Beauchemin, N., Gtari, M., Sen, A., and Wall, L.G. (2013) What stories can the *Frankia* genomes start to tell us? *Journal of Biosciences* **38**: 719-726.

Tjepkema, J.D., Schwintzer, C.R., and Benson, D.R. (1986) Physiology of actinorhizal nodules. *Annual Review of Plant Physiology* **37**: 209-232.

Torrey, J.G. (1987) Endophyte sporulation in root nodules of actinorhizal plants. *Physiologia Plantarum* **70**: 279-288.

Tortosa, R., and Cusato, M. (1991) Effective nodulation of rhamnaceous actinorhizal plants induced by air dry soils. *Plant and Soil* **131**: 229-233.

Trivers, R.L. (1971) The Evolution of Reciprocal Altruism. *The Quarterly Review of Biology* **46**: 35-57.

Tzean, S., and Torrey, J. (1989) Spore germination and the life cycle of *Frankia* in vitro. *Canadian Journal of Microbiology* **35**: 801-806.

Valdes, M. (2008) *Frankia* Ecology. In *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*. Pawlowski, K., and Newton, W.E. (eds). Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 49-71.

van Dijk, C. (1978) Spore formation and endophyte diversity in root nodules of *Alnus glutinosa* (L.) Vill. *New Phytologist* **81**: 601-615.

——— (1979) Endophyte distribution in the soil. In *Symbiotic Nitrogen Fixation in the Management of Temperate Forests*. Gordon, J.C., Wheeler, C.T., and Perry, D.A. (eds). Corvallis, Oregon, United States: Oregon State University, Forest Research Laboratory, pp. 84-94.

——— (1984) Ecological aspects of spore formation in *Frankia-Alnus* symbiosis. In: Leiden, The Netherlands, State University, p. 157.

——— and Merkus, E. (1976) A microscopical study of the development of a spore-like stage in the life cycle of the root-nodule endophyte of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *New Phytologist* **77**: 73-91.

———, Sluimer, A., and Weber, A. (1988) Host range differentiation of spore-positive and spore-negative strain types of *Frankia* in stands of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* in Finland. *Physiologia Plantarum* **72**: 349-358.

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

VandenBosch, K., and Torrey, J. (1983) Host-endophyte interactions in effective and ineffective nodules induced by the endophyte of *Myrica gale*. *Canadian Journal of Botany* **61**: 2898-2909.

——— and Torrey, J.G. (1984) Consequences of sporangial development for nodule function in root nodules of *Comptonia peregrina* and *Myrica gale*. *Plant Physiology* **76**: 556-560.

——— and Torrey, J.G. (1985) Development of endophytic *Frankia* sporangia in field- and laboratory-grown nodules of *Comptonia peregrina* and *Myrica gale*. *American Journal of Botany* **72**: 99-100.

Veening, J.-W., Smits, W.K., and Kuipers, O.P. (2008) Bistability, epigenetics, and bet-Hedging in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **62**: 193–210.

Velagapudi, R., Hsueh, Y.P., Geunes-Boyer, S., Wright, J.R., and Heitman, J. (2009) Spores as infectious propagules of Cryptococcus neoformans. *Infection and Immunity* **77**: 4345-4355.

Weber, A. (1986) Distribution of spore-positive and spore-negative nodules in stands of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana* in Finland. *Plant and Soil* **96**: 205-213.

———, Nurmiaho-Lassila, E.-L., and Sundman, V. (1987) Features of the intrageneric *Alnus-Frankia* specificity. *Physiol Plant* **70**: 289-296.

Weber, D., and Hess, W. (1975) Diverse spores of fungi. In *Spores VI*. Gerhardt P, C.R., Sadoff HL. (ed). Washington, DC.: American Society of Microbiology. pp. 97–111.

Welsh, A.K., Dawson, J.O., Gottfried, G.J., and Hahn, D. (2009) Diversity of *Frankia* populations in root nodules of geographically isolated Arizona alder trees in central Arizona (United States). *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 6913-6918.

Wheeler, C., Hooker, J., Crowe, A., and Berry, A. (1986) The improvement and utilization in forestry of nitrogen fixation by actinorhizal plants with specific reference to *Alnus* in Scotland. *Plant and Soil* **90**: 393-406.

————, Akkermans, A.D.L., and Berry, A. (2008) *Frankia* and actinorhizal plants: a historical perspective. In *Nitrogen-fixing Actinorhizal Symbioses*. Pawlowski, K., and Newton, W.E. (eds). Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 1-24.

Willerslev, E., Hansen, A.J., Ronn, R., Brand, T.B., Barnes, I., Wiuf, C. *et al.* (2004) Long-term persistence of bacterial DNA. *Current Biology* **14**: R9-10.

Wilson, D.S., and Wilson, E.O. (2007) Rethinking the theoretical foundation of sociobiology. *The Quarterly Review of Biology* **82**: 327-348.

Wollum, A.I., Youngberg, C., and Chichester, F. (1968) Relation of previous timber stand age to nodulation of *Ceanothus velutinus*. *Forest Science* **14**: 114-118.

Zelinger, E., Hawes, C., Gurr, S., and Dewey, F. (2006) Attachment and adhesion of conidia of *Stagonospora nodorum* to natural and artificial surfaces. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **68**: 209-215.

Zimpfer, J.F., McCarty, B., Kaelke, C.M., Mulongwe, L., Igual, J.M., C.A., S., and Dawson, J.O. (2002) Casuarina cunninghamiana cladode extracts increase the *Frankia* infectious capacity of a tropical soil. *Symbiosis* **33**: 73-90.

Titre (FR)

Rôles adaptatifs et contraintes de la sporulation chez les microorganismes associés aux plantes : cas de la sporulation *in planta* dans la symbiose actinorhizienne *Frankia* (*Frankia*ceae)–*Alnus* (Betulaceae).

Title (EN)

Adaptive roles and constraints of the sporulation in plant-associated microorganisms: case of the *in-planta* sporulation in the actinorhizal symbiosis *Frankia* (*Frankia*ceae)–*Alnus* (Betulaceae).

Résumé (FR) – Version plus détaillée à l'intérieur.

Frankia est une actinobactérie capable d'établir une symbiose racinaire avec les plantes actinorhiziennes dont le genre *Alnus*. Seulement certaines souches de *Frankia* sont capables de sporuler *in planta*, ce qui est illustré par la présence (Sp+) ou l'absence (Sp–) de sporanges dans les cellules végétales de la nodosité. C'est à notre connaissance un cas unique de sporulation endophyte. Cependant la description et l'interprétation écologique de ce trait d'histoire de vie (THV) original étaient incomplètes. Notre contribution à l'étude de la sporulation *in planta* des *Frankia* infectives de l'aulne intègre des approches théorique, descriptive et expérimentale, pour préciser (i) l'influence relative de la souche bactérienne, de l'espèce de la plante-hôte et des conditions pédoclimatiques sur ce THV, (ii) le rôle de la variabilité environnementale sur la distribution, la diversité et la sélection du trait, ainsi que (iii) les coûts et bénéfices associés pour les deux partenaires.

Nous avons démontré pour la première fois que la sporulation *in planta* est un THV (i) spécifique de certaines lignées de *Frankia*, (ii) majeur pour en comprendre l'histoire évolutive et (iii) significativement corrélé à des caractéristiques génétiques des souches. Nous avons également confirmé que l'occurrence du trait varie selon l'environnement. Nous avons enfin établi un modèle de l'évolution du trait abordant sa valeur adaptative. L'ensemble des réflexions menées et des résultats obtenus nous permet de discuter de la sporulation i*n planta* dans le cadre d'un *continuum* de stratégies symbiotiques, et plus généralement de discuter de l'écologie évolutive des symbioses entre microorganismes et plantes.

Abstract (EN) – More detailed version inside.

Frankia sp. is a telluric actinobacteria able to establish a root symbiosis with actinorhizal plant such as *Alnus* sp. Only some *Frankia* strains are able to sporulate *in-planta*, as spores can be present in (Sp+) or absent from (Sp–) the vegetal cells of the root nodule. It is to our knowledge a unique case of endophytic sporulation. However, the description and the ecological interpretation of this original life-history trait (LHT) were scarce. Our contribution to the study of the *in-planta* sporulation of *Alnus*-infective *Frankia* sp. combines theoretical, descriptive and experimental approaches to precise (i) the relative effect of the bacterial strain, the host-plant species and the pedoclimatic conditions on this LHT, (ii) the effect of the of the environmental variability on the distribution, diversity and selection of the trait, and (iii) the associated costs and benefits for the two symbiotic partners.

We demonstrated for the first time that the *in*-planta sporulation is a LHT (i) specific to some *Frankia* lineages, (ii) major to understand their evolutionary history and (iii) significantly correlated to particular genetic features. We also shown that the occurrence of the trait varies according to the environment We also proposed a model of the evolution of the trait taking its *fitness* into account. We bring all the previous considerations and results to discuss the *in-planta* sporulation trait within a *continuum* of symbiotic strategies and more generally to discuss the evolutionary ecology of plant-microbe symbioses.

Mots-clés (FR) – Version plus détaillée à l'intérieur.

Frankia ; Symbiose actinorhizienne ; Coopération ; Dépendance ; Sporulation *in planta* ; Sporanges ; Réduction des risques ; *Bet-hedging*.

Keywords (EN) – More detailed version inside.

Frankia; Actinorhizal symbiosis; Cooperation; Dependency; *In-planta* Sporulation; Sporangia; Risk reduction; *Bet-hedging*.