



HAL
open science

Facteurs déterminants de la production d'inoculum chez *Hymenoscyphus fraxineus*, agent de la chalarose du frêne

Simon Laubray

► To cite this version:

Simon Laubray. Facteurs déterminants de la production d'inoculum chez *Hymenoscyphus fraxineus*, agent de la chalarose du frêne. *Ecologie, Environnement*. Université de Lorraine, 2023. Français. NNT : 2023LORR0381 . tel-04540737

HAL Id: tel-04540737

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04540737>

Submitted on 10 Apr 2024

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.



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Thèse de doctorat

Présentée et soutenue pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université
de Lorraine

spécialité Biologie et écologie des forêts et des agrosystèmes

par

Simon Laubray

Facteurs déterminants de la production d'inoculum chez *Hymenoscyphus fraxineus*, agent de la chalarose du frêne

Soutenance le 16 novembre 2023

Ivan SACHE	Professeur, AgroParisTech Grignon, France	Rapporteur
Marie SIMONIN	Chargée de recherche, INRAE Angers, France	Rapporteuse
Cécile ROBIN	Directrice de recherche, INRAE Bordeaux, France	Présidente du jury
Frédéric SUFFERT	Ingénieur de recherche, INRAE, Grignon	Examineur
Benoit MARCAIS	Directeur de recherche, INRAE Nancy, France	Directeur de thèse
Marc BUEE	Directeur de recherche, INRAE Nancy, France	Directeur de thèse

UMR 1136 INRAE / Université de Lorraine, Interactions Arbres - Microorganismes

INRAE Centre Grand Est - Nancy – 54280 Champenoux

École doctorale n°607

Science et Ingénierie des Ressources Naturelles (SIReNa)

Remerciements

Je souhaite commencer mes remerciements par les membres de mon jury de thèse **Marie Simonin, Ivan Sache, Cécile Robin** et **Frédéric Suffert** pour avoir accepté d'évaluer le travail réalisé.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi **Frédéric Hamelin, Corinne Vacher** pour leurs conseils.

Je remercie chaleureusement mes directeurs de thèse **Benoit Marçais** et **Marc Buée** pour l'encadrement scientifique mais également pour leur soutien et leur motivation. L'avancement a été interrompu et parfois compliqué, mais vous avez fait preuve de compréhension et de disponibilité. Nos conversations ont toujours été enrichissantes. Merci encore pour l'accompagnement durant ces années de thèse.

Je remercie ensuite les stagiaires et CDD m'ayant apporté leur aide. **Lucile, Gabrielle, Nelly, Arnaud** et **Arielle**. Votre travail m'a permis de venir à bout de l'analyse de nombreux échantillons. Un merci tout particulier à **Arnaud** et **Arielle**, votre soutien a été important et j'en suis reconnaissant. Je n'oublie pas mon acolyte pour toute la partie terrain. **Olivier**, ton aide et ton sens de l'organisation furent précieux. Tu as su également me donner les bons conseils. Un grand merci à toi.

Merci à **Méline** et **Clémentine**, nous avons partagé un bureau mais également nos expériences. Merci pour votre bonne humeur et les petites distractions qui arrivaient à point nommé. Merci **Anaïs, Axelle, Bénédicte, Christophe, Claude, Elodie, Fabien, Jérémy, Mireia** avec qui les pauses et moments de convivialités furent très agréables. Merci **Jaime, Cécile, Céline** et **Jacqueline** de m'avoir accueilli en Lorraine, j'espère vous revoir très vite.

Je tiens à remercier ma famille pour toute l'aide qu'ils ont pu m'apporter. Et pour finir merci à toi **Clémence**, ton soutien sans faille m'a permis de surmonter les moments de doute. Je ne trouverai pas assez de mots pour t'exprimer ma reconnaissance pour tout ce que tu es. Et un énorme merci à **Marius**, tu es arrivé au cours de cette thèse pour mon plus grand bonheur. Te voir grandir est la chose la plus merveilleuse que j'ai pu observer. Je vous aime.

Table des matières

Remerciements	iii
Table des matières	vi
Table des figures	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	ix
1 Introduction	1
1.1 Les maladies émergentes	1
1.1.1 Définition	2
1.1.2 Pathogènes forestiers émergents	2
1.1.3 Dynamique des invasions biologiques : cas des agents pathogènes exotiques	4
1.1.4 La production d'inoculum, vecteur de dissémination du pathogène.	8
1.2 L'épidémie de chalarose du frêne	9
1.2.1 Écologie des frênes	9
1.2.2 Représentation du frêne dans le paysage, facteur de diffusion de l'épidémie	9
1.2.3 Chronologie de l'épidémie	12
1.2.4 Impact de l'épidémie	14
1.2.5 Cycle biologique de <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	15
1.2.6 Hôtes sensibles et résistance	17
1.3 Facteurs déterminants pour la production d'inoculum	19
1.3.1 Densité dépendance de la production d'inoculum chez <i>H. fraxineus</i>	20
1.3.2 Persistance des rachis colonisés	22
1.3.3 Communauté fongique associée au frêne, description et rôle	22
1.4 Objectifs de la thèse	25
2 Densité dépendance de la production d'inoculum	27
2.1 Article 1 : Evidence of a component Allee effect for an invasive pathogen : <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> , the ash dieback agent	28

TABLE DES MATIÈRES

3	Persistence de la source d'inoculum dans la litière de frêne	47
3.1	Article 2 : <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> persistence in the ash litter	48
4	Description de la communauté fongique de la litière de frêne : régulatrice potentielle de la production d'inoculum	67
4.1	Article 3 : Fungal communities associated with ash rachises in relation with <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> colonization	68
5	Discussion générale	97
5.1	Une production d'inoculum densité dépendante	98
5.1.1	Dépendance à la densité de rachis colonisés	98
5.1.2	Densité en hôte, facteur de vulnérabilité à la chalarose	99
5.2	Dégradation de la litière de frêne et persistance d' <i>H. fraxineus</i>	100
5.2.1	Cinétique de dégradation de la litière de frêne	100
5.2.2	La litière de frêne comme réservoir d'inoculum	101
5.3	Communauté fongique de la litière de frêne	101
5.3.1	Identification d'espèces au potentiel régulateur	101
5.4	Avenir du frêne en France	103
5.4.1	Vers la naturalisation du pathogène ?	106
5.5	Conclusion	108

Table des figures

1.1	Représentation schématique de diverses situations d'évolution de l'incidence de maladies	2
1.2	Contexte d'apparition d'une maladie émergente	3
1.3	Situation spatio-temporelle des introductions de pathogènes	4
1.4	Schéma conceptuel du processus d'invasion	4
1.5	Courbe de l'invasion, représentant la surface colonisée en fonction du temps de présence de l'organisme	7
1.6	Facteurs intervenant dans l'intensité du maladie provoqué par un pathogène du sol	9
1.7	Aire de répartition du frêne oxyphylle et du frêne commun	10
1.8	Répartition du frêne commun en France	11
1.9	Chronologie de l'épidémie de chalarose	13
1.10	Aire de répartition de la chalarose du frêne	14
1.11	Cycle biologique d' <i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	16
1.12	Distribution phylogénétique des espèces du genre <i>Fraxinus</i> et définition de leur tolérance	18
1.13	Interdépendance des paramètres intervenant dans la sévérité de la chalarose du frêne.	19
1.14	Modélisation du taux de croissance en fonction de la densité de population	21
1.15	Concept du " <i>Disease tetrahedron</i> "	23
2.1	Axe 1 : Liens ensité hôtes - densités rachis colonisés - production d'inoculum - sévérité des symptômes	27
2.2	Dispositif installé dans le but de mesurer la densité de population d' <i>H. fraxineus</i> , le succès d'accouplement et le niveau d'inoculum	29
3.1	Axe 2 : lien densité hôtes - dégradation foliaire - densité de rachis colonisés - production d'inoculum	47
3.2	Chronologie de collecte des sacs contenant les rachis des différentes cohortes	49
4.1	Axe 3 : lien infection foliaire - communauté fongique antagoniste - densité de rachis colonisés	67

TABLE DES FIGURES

4.2	Stratégie d'échantillonnage et analyses réalisées pour étudier les communautés fongiques présentes sur les rachis de frênes de la litière	68
5.1	Bilan des relations des facteurs déterminants pour la production d'inoculum . . .	97
5.2	Évolution temporelle de la relation hôte/pathogène	103
5.3	Conséquence de la chararose sur les frênes en fonction du temps de présence de la maladie	104
5.4	Évolution de la proportion de rachis colonisés par <i>H. fraxineus</i> dans la litière . .	105
5.5	Facteurs pouvant mener à l'atténuation de l'épidémie de chararose	106
5.6	Évolution du taux de colonisation en fonction du taux de dégradation des houp-piers et du temps de présence de la chararose	107

Liste des tableaux

1.1 Nombre de plants de frêne vendus en France de 2008 à 2021 12

Liste des abréviations

C/N : ratio carbone azote

DSF : Département Santé des Forêts

IGN : Institut Géographique National

ITS : Internal Transcribed Spacer (Espaceur interne transcrit)

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérase en chaîne quantitative)

SIR : Susceptible Infected Recovered (Sensible Infecté Rétabli)

Chapitre 1

Introduction

Cette thèse s'intéresse à la chalarose du frêne, maladie émergente suite à l'introduction du pathogène *Hymenoscyphus fraxineus*, et plus particulièrement aux facteurs agissant sur la production d'inoculum et qui régissent la sévérité des dommages sur les frênes contaminés. Pour cela, trois études différentes ont fait appel à divers champs disciplinaires. Tout d'abord, la biologie des populations correspondant à une étude démographique cherchant à mettre en évidence la densité-dépendance du taux de croissance de la population du pathogène. La deuxième étude, de pathologie forestière, estime la persistance du pathogène dans les litières et de son impact sur la capacité de ce dernier à produire de l'inoculum. Enfin, la troisième étude porte sur l'écologie des communautés afin de décrire l'évolution de la communauté fongique entourant le pathogène durant sa période de production d'inoculum.

Ce premier chapitre introduit les différentes notions nécessaires à la compréhension des études réalisées lors de cette thèse. Tout d'abord en définissant les concepts liés à l'émergence de maladie, à la dynamique d'invasion et à l'écologie des communautés fongiques. Puis l'état des connaissances sur l'épidémie de la chalarose en cours ainsi que les éléments connus en lien avec le développement du pathogène.

1.1 Les maladies émergentes, menace majeure pour les peuplements forestiers

Les émergences de maladies sont en augmentation à travers le monde avec des conséquences importantes pour la biodiversité. La combinaison de multiples facteurs favorise leur apparition (réchauffement climatique, mondialisation, dégradation des écosystèmes...). Les forêts ne sont pas épargnées par cette menace dont la principale cause est l'introduction de pathogène exotique. Depuis la fin du XIX^e siècle, les diverses introductions ont fortement impacté les peuplements forestiers. La compréhension des mécanismes de contamination, de dissémination et de régulation des épidémies en cours sont indispensables afin de prévenir ou de lutter contre les menaces du futur.

1.1.1 Définition

Parmi les multiples définitions données pour décrire la notion de maladie émergente, celle proposée par TOMA et THIRY, 2003 vise à être la plus universelle possible en ne distinguant pas la pathologie humaine, animale ou végétale. Les auteurs définissent alors une maladie émergente comme étant "une maladie dont l'incidence réelle augmente de manière significative dans une population donnée, d'une région donnée et pendant une période donnée, par rapport à la situation épidémiologique habituelle de cette maladie". Cette émergence peut être due à une augmentation rapide de l'aire géographique de l'agent pathogène sur un territoire non affecté (émergence géographique) ou à un développement épidémique inattendue d'une maladie déjà présente (émergence réelle) (MOUTOU & PASTORET, 2015).

Statistiquement l'émergence d'une maladie peut-être définie comme un augmentation de l'incidence franchissant un seuil de détection de l'émergence. Ce seuil se définit comme étant le niveau de l'incidence à partir duquel celle-ci est différente de la situation habituelle (fig. 1.1, Encart 1).

Encart 1

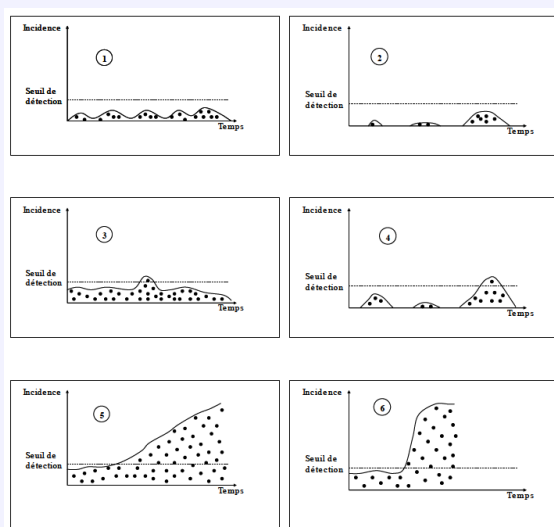


FIGURE. 1.1 — Représentation schématique de diverses situations d'évolution de l'incidence de maladies (TOMA & THIRY, 2003)

Situation 1, la maladie est présente de façon permanente et endémique dans la population.

Situation 2 est similaire avec des apparitions irrégulières au cours du temps.

Situations 3 et 4 sont comparables respectivement aux situations 1 et 2, avec un pic de l'incidence dépassant le seuil de détection, l'incidence diminue rapidement en dessous du seuil et cette maladie ne peut être considérée comme émergente.

Situations 5 et 6, l'incidence franchit le seuil et augmente lentement avec le temps (cas 5) ou alors l'incidence augmente brutalement avec un potentiel épidémique plus important (cas 6), la maladie est alors considérée comme émergente.

1.1.2 Pathogènes forestiers émergents

En pathologie végétale, le contexte d'apparition d'une maladie émergente est décrit selon le "*disease triangle*" (STEVENS, 1960) comme étant la rencontre d'un pathogène, d'un hôte compatible et d'un environnement favorable. Une modification de l'un de ces éléments du triptyque peut donc être facteur d'apparition d'une maladie émergente. GHELARDINI et al. (2016) identifie sept facteurs principaux (fig. 1.2) : le changement climatique (caractère pathogène de *Diplodia sapinea* sur les pousses de pin favorisé par les sécheresses (FABRE et al., 2011)), l'apparition de

souche plus agressive (contournement de résistance des peupliers par la rouille *Melampsora larici-populina* (PERSOONS et al., 2017)), l'hybridation et le transfert de gène de virulence (BRASIER et al., 1999 ; HUSSON et al., 2015), la multiplication soudaine de pathogènes cryptiques, une nouvelle association avec un vecteur, la plantation d'essences ou de variétés sensibles à un pathogène déjà en place ou, facteur le plus fréquent, introduction d'un pathogène exotique (ANDERSON et al., 2004 ; GHELARDINI et al., 2016 ; ROBIN & DESPREZ-LOUSTAU, 2018).

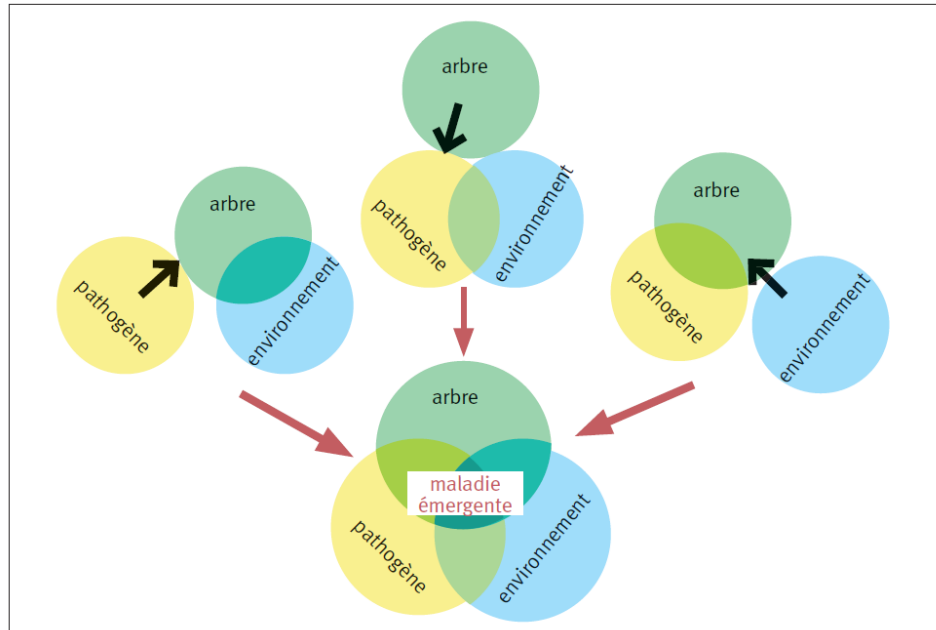


FIGURE. 1.2 – Contexte d'apparition d'une maladie émergente, modification d'un pathogène (évolution d'un pathogène endémique ou introduction d'un parasite ou vecteur exotique), d'un hôte compatible (plantation d'un nouvel hôte, accroissement de la densité d'un hôte existant) et d'un environnement favorable (changement climatique)

En France, la base de données du Département Santé des Forêts (DSF) recense depuis 1989 les problèmes sanitaires observés en forêt. De 1989 à 2000, 30% des mentions étaient attribués à une maladie émergente et plus particulièrement à un pathogène invasif, entre 2010 et 2015 les mentions d'invasifs atteignaient les 50% (DESPREZ-LOUSTAU et al., 2016 ; ROBIN & DESPREZ-LOUSTAU, 2018) (fig. 1.3b). L'analyse montre une augmentation exponentielle du nombre d'introduction de pathogènes invasifs en Europe lors de la période 1800-2008 (SANTINI et al., 2013). Les pays ayant le plus grand nombre de pathogènes invasifs sur leur territoire sont l'Autriche, la Hongrie, la Suisse, l'Italie et la France avec plus de 40 organismes connus (fig. 1.3a). Parmi les espèces introduites certaines ont été ou sont encore responsables de forts dommages sur l'écosystème forestier. L'introduction de l'oïdium du chêne *Erysiphe alphitoides* en France en 1907 a induit de forts dommages sur les chênaies au début du XX^e siècle mais a vu sa sévérité se réduire par la suite (MARÇAIS & DESPREZ-LOUSTAU, 2014). L'épidémie de graphiose de l'orme suite à l'introduction successive de *Ophiostoma ulmi* en 1920 (GIBBS, 1978) et *O. novo ulmi* au début des années 1970 (BRASIER, 1991) a quasiment éliminé les ormes des forêts européennes. Dans les années 1950, le pathogène asiatique *Cryphonectria parasitica* s'est répandu dans les châtaigneraies européennes et américaines provoquant des chancre au niveau des troncs et des

dépérissements de houpplier. Ces dernières décennies, les châtaigniers sont également victimes de la maladie de l'encre provoquée par *Phytophthora cinamomi* introduit en 1860, engendrant des mortalités conséquentes dans les peuplements (taux de mortalité en France à 15% (IGN, 2021)).

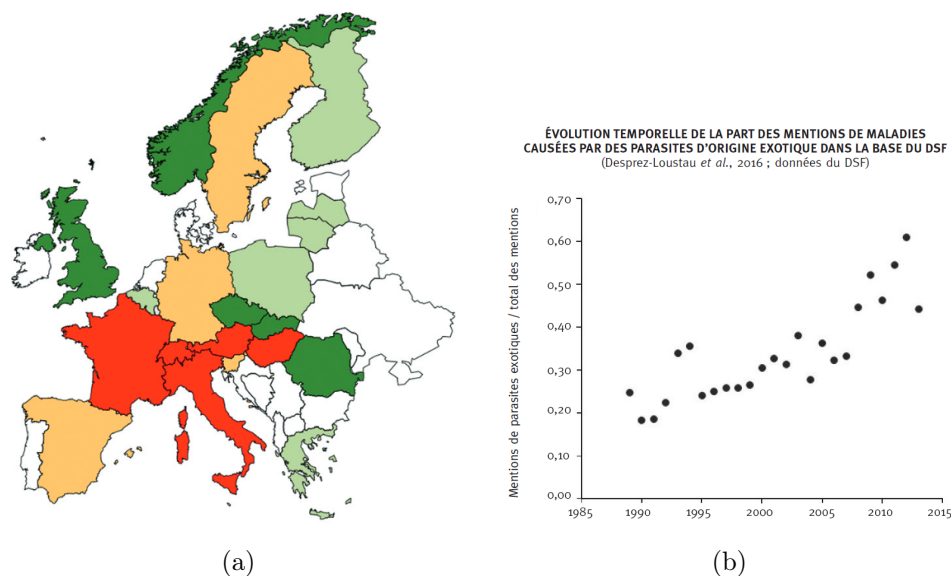


FIGURE. 1.3 – Situation spatio-temporelle des introductions de pathogènes. a. Nombre d'espèces pathogènes forestières d'origine exotique par pays européens. vert clair, 1–20; vert foncé, 21–30; orange clair, 31–40; rouge, > 41. SANTINI et al., 2013 b. Part des signalements du Département Santé des Forêts associés aux agents pathogènes introduits issue de DESPREZ-LOUSTAU et al., 2016

1.1.3 Dynamique des invasions biologiques : cas des agents pathogènes exotiques

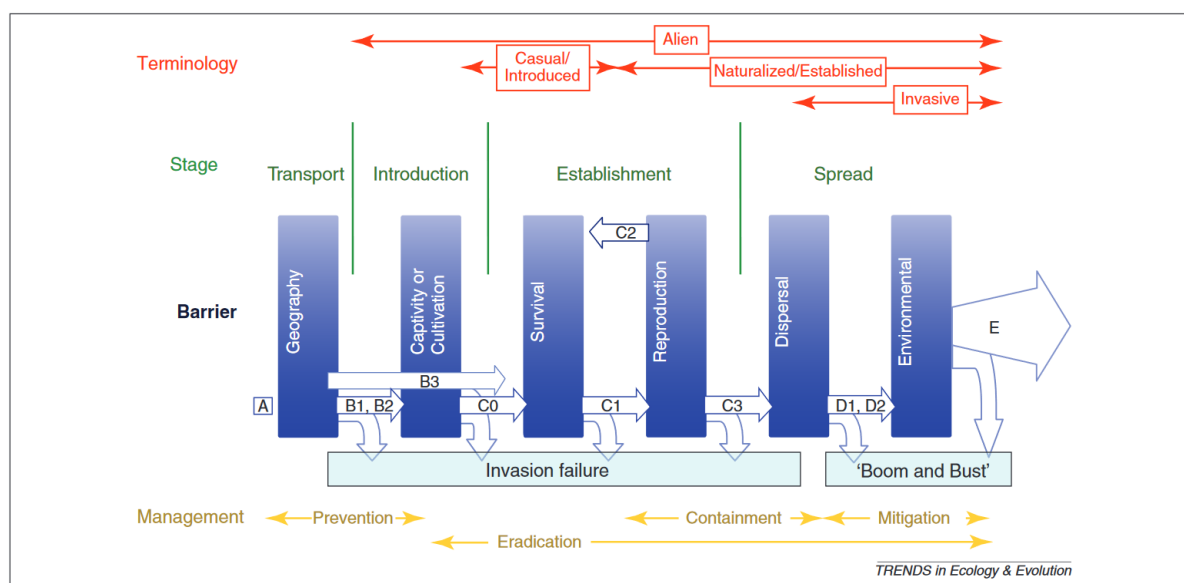


FIGURE. 1.4 – Schéma conceptuel du processus d'invasion selon BLACKBURN et al., 2011

Une espèce invasive est définie comme étant une espèce introduite hors de son aire de répartition naturelle et dont la prolifération provoque des dégâts dans l'écosystème receveur (**Site_MusÃum_Histoire_Naturelle**). Cependant, toutes les introductions d'espèces ne résultent pas en une invasion biologique. Le mécanisme d'invasion BLACKBURN et al., 2011 peut se décomposer en 4 étapes nécessitant chacune le franchissement d'une barrière pour atteindre l'étape suivante (fig. 1.4).

La première étape est le transfert depuis l'aire d'origine jusqu'au nouveau territoire. Durant cette étape, la barrière est géographique. L'espèce doit être en mesure de survivre aux conditions de transport sur de longues distances. Dans le cas d'un agent pathogène, ce transfert nécessite un support adapté permettant la survie de l'espèce, tel qu'un hôte infecté, un sol contaminé ou un insecte vecteur (GHELARDINI et al., 2017). L'augmentation du commerce de plant et la rapidité du transport améliorent les chances de survie des propagules lors du transfert (HULME, 2009; SANTINI et al., 2013; SIKES et al., 2018).

La deuxième étape est l'introduction, l'espèce s'adapte aux conditions de son nouvel environnement. Il s'agit très souvent de conditions artificielles (captivité pour des animaux, parcs ou pépinières pour des plantes, PAAP et al. (2017)). L'espèce introduite doit alors s'extraire d'un milieu aux conditions plus ou moins constantes et favorables vers un milieu naturel soumis aux aléas. Un transfert d'hôte est parfois nécessaire au pathogène introduit pour survivre et atteindre le compartiment naturel (HARRIS et al., 2018; PAAP et al., 2022; VACHER et al., 2010; WEBBER et al., 2010).

La troisième étape est l'établissement d'une population viable dans le milieu naturel. Entre en jeu deux paramètres complémentaires l'"*invasiveness*" de l'espèce introduite et l'"*invasibility*" de l'écosystème receveur (DALY et al., 2023).

Le terme "*invasiveness*" peut se traduire par la capacité d'invasion de l'espèce, c'est-à-dire le potentiel de l'organisme à coloniser une grande surface par son aptitude à établir de nouvelles populations et à se disperser. L'"*invasiveness*" d'une espèce est dépendante de toutes les caractéristiques lui conférant un avantage dans le développement de sa population tel qu'un fort taux de reproduction, un meilleur accès aux ressources ou un taux de survie plus important (BARWELL et al., 2020; GHELARDINI et al., 2016; PHILIBERT et al., 2011). Le changement des conditions climatiques en cours peut favoriser cet établissement des espèces introduites. (**poland_effects_2021**; BELLARD et al., 2013; SEIDL et al., 2018).

L'"*invasibility*" pouvant être traduit par l'invasibilité reflète la vulnérabilité de l'écosystème face à l'installation et la prolifération d'organismes invasifs. L'invasibilité prend en compte tous les éléments pouvant rendre l'écosystème vulnérable à la prolifération d'une nouvelle espèce tel que le degré de perturbation de l'écosystème, le niveau de ressource, la richesse et la diversité spécifique (DALY et al., 2023). Un écosystème sera d'autant plus vulnérable à l'arrivée d'un nouveau pathogène lorsque sa densité en hôtes vulnérables et/ou compétents est forte (GUO et al., 2019). Dans le cas d'un pathogène invasif, la forte sévérité des maladies invasives s'explique souvent par la forte sensibilité des hôtes qui n'ont pas été exposés à l'agent pathogène et n'ont donc pas co-évolué avec lui (hôte dit naïf) (PARKER & GILBERT, 2004). Plus généralement, l'invasi-

bilité d'un écosystème a souvent été reliée à sa diversité en espèces (DALY et al., 2023). L'idée sous-jacente est qu'un plus grand nombre d'espèces dans un écosystème entraîne une utilisation plus complète des ressources, qui sont alors moins disponibles pour l'organisme envahissant, ou une occupation d'une niche spécifique qui aura pour conséquence d'impacter les espèces autochtones qui l'occupent ; de plus les espèces indigènes, soumises à une compétition accrue sont plus efficaces (résistance biotique) (ELTON, 1958 ; LEVINE & D'ANTONIO, 1999). Ces mécanismes pourraient être moins efficaces pour un parasite agressif arrivant sur une population hôte naïve en bonne santé, donc sur un milieu avec peu de compétition. Mais ils restent pertinents pour la phase saprophyte du parasite invasif. De plus, un milieu diversifié peut contenir plus d'ennemis naturels potentiels pour le parasite invasif, surtout si des espèces phylogénétiquement proches y sont déjà présentes. En effet, l'établissement peut également être avantageé par le phénomène d'*enemy release*. Ce phénomène décrit la libération des contraintes de régulations de l'espèce introduite. Le cortège d'ennemis naturels (compétiteurs, prédateurs et parasites) présent dans l'aire d'origine n'a pas suivi le transfert de l'espèce introduite dans son nouvel environnement, améliorant sa capacité d'invasion en lui conférant un avantage pour son développement face à des espèces autochtones subissant une régulation par leurs ennemis naturels (COLAUTTI et al., 2004 ; MITCHELL & POWER, 2003).

La capacité d'invasion ainsi que l'invasibilité sont modulées par la pression de propagules qui se définit comme le produit du nombre moyen d'individus introduits dans le milieu receveur à chaque introduction et du nombre d'occurrence de ces introductions (LOCKWOOD et al., 2005). Cette pression s'exprime en nombre moyen d'individus introduits par unité de temps. Une forte pression de propagules accroît la persistance de la population invasive par différents mécanismes (DALY et al., 2023). La capacité d'invasion peut être limitée par un taux de croissance de la population trop faible (effet Allee) réduisant fortement sa capacité de reproduction ou menant à l'extinction de la population introduite (TAYLOR & HASTINGS, 2005). Des introductions multiples peuvent aussi accroître la diversité génétique et permettre le brassage génétique, augmentant ainsi le potentiel adaptatif de la population invasive et sa capacité d'établissement (BOCK et al., 2015).

La quatrième étape est la propagation, la population établie est capable de fournir une pression de propagules nécessaire pour se disperser dans sa nouvelle aire géographique. La propagation est alors limitée par la capacité de dispersion de l'espèce et la disponibilité d'habitats favorables dans l'environnement dans lequel une nouvelle population pourrait s'établir.

Parmi les espèces introduites, un faible nombre franchit toutes les étapes pour devenir invasives. Dans la littérature, il est estimé que le taux de franchissement de chaque barrière est faible. Il a été évoqué une valeur de 10% (WILLIAMSON, 2006), mais ce chiffre a peu de support empirique (JESCHKE, 2014). Malgré cela le préjudice économique et écosystémique est important (FEI et al., 2019 ; PIMENTEL et al., 2005 ; SEIDL et al., 2018). Afin d'éviter de nouvelles invasions pouvant nuire aux plantes (en particulier celles d'insectes ravageurs et organismes pathogènes), des stratégies de surveillance et d'éradication sont mises en place aux étapes critiques de la dynamique d'invasion : limitation de l'introduction par la détection au niveau des points d'entrée

(port et aéroport), surveillance des pépinières, prévention de l'établissement et de la dispersion en milieu naturel via la détection précoce et l'éradication des foyers présents (BRANCO et al., 2023; NOAR et al., 2021). De même que pour l'apparition d'une maladie émergente dans une population, il existe une phase durant laquelle l'organisme invasif s'installe sans pour autant être détecté. Lorsque l'on décrit la dynamique d'invasion d'une nouvelle espèce, une phase de latence suit l'introduction. Durant cette phase l'espèce introduite se multiplie et se propage sous le seuil de détection, lorsque le niveau de population devient détectable la surface colonisée devient significative et augmente de façon exponentielle. Sans mesure de contrôle, l'expansion de l'organisme ne sera limitée que par la capacité de charge du nouvel habitat (fig. 1.5). C'est pourquoi les mesures d'éradication doivent être prises rapidement après la détection pour empêcher la prolifération de l'organisme invasif (BRANCO et al., 2023; EPANCHIN-NIELL & LIEBHOLD, 2015).

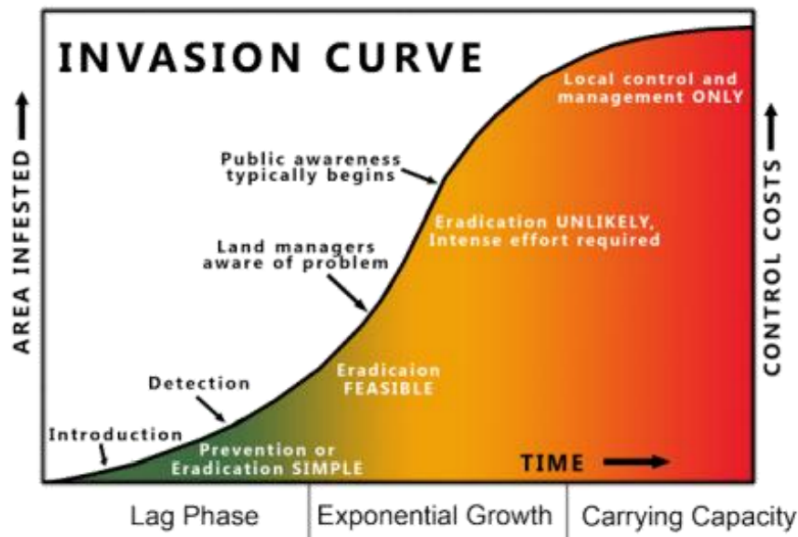


FIGURE. 1.5 — Courbe de l'invasion, représentant la surface colonisée en fonction du temps de présence de l'organisme

A long terme, la dynamique de population de l'organisme introduit atteint un équilibre par la mise en place d'un certain nombre de mécanismes concourant à une régulation de sa population et dans le cas d'un pathogène à une stabilisation ou même une atténuation de sa sévérité (BURDON & THRALL, 2009). Les cas de l'oïdium du chêne illustre ce phénomène d'atténuation, d'après la littérature l'introduction du pathogène au début du XX^e siècle était problématique pour le chêne et questionnait sur son avenir. Cette situation a pu être comparable à celle provoquée aujourd'hui par la chalarose pour le frêne (DESPREZ-LOUSTAU et al., 2019). Ceci peut être causé par une diminution de la virulence de l'agent pathogène lié au compromis virulence/ transmission. En Nouvelle-Zélande, une diminution de la virulence de l'agent pathogène de la maladie des bandes rouges (*Dothistroma septosporum*) a été constatée après 50 ans de présence du pathogène (BRADSHAW et al., 2019). Par contre, dans un délais similaire, l'agent de la graphiose de l'orme (*Ophiostoma novo-ulmi*) ne présente pas de signe de d'atténuation. La virulence reste

forte après 40 ans de présence (BRASIER & WEBBER, 2019). Les mécanismes mise en places sont encore mal compris. En dehors d'une modification de la virulence du parasite, il peut y avoir des évolutions du niveau de densité ou de la résistance des hôtes (sélection pour la résistance) ou du microbiome dans lequel le parasite évolue.

1.1.4 La production d'inoculum, vecteur de dissémination du pathogène.

L'épidémiologie étudie la dissémination d'une maladie dans une population et s'intéresse particulièrement à la quantification de l'inoculum. L'inoculum est l'ensemble des structures du parasite capables de contaminer les plantes-hôtes, pour un pathogène invasif ces structures sont considérées comme étant les propagules vecteur de la colonisation du nouvel habitat. Il existe une distinction entre l'inoculum primaire provenant généralement d'une source hivernale initiant les épidémies et l'inoculum secondaire qui diffuse la maladie au sein d'une population hôte déjà contaminée (SHURTLEFF & AVERRE, 1997). Dans le cas d'un agent pathogène invasif, la production d'inoculum primaire correspond à la pression de propagules nécessaires à son établissement, puis à sa propagation. Afin de les endiguer, il est donc primordiale de comprendre les facteurs favorisant cette production d'inoculum.

Le schéma fonctionnel proposé par SUFFERT (2006) pour expliquer le rôle du potentiel infectieux des pathogènes se développant dans le sol est transposable aux autres types de pathogènes (fig. 1.6). L'intensité de la maladie est dépendante de multiples facteurs. D'une part intervient le potentiel infectieux, c'est à dire la combinaison de la densité en inoculum, de sa capacité infectieuse et des effets de l'environnement sur celle-ci. D'autre part, la réceptivité du peuplement ou de la population résulte de la combinaison de la sensibilité de l'hôte et des effets de l'environnement sur la prédisposition de celui-ci. La source et le mode de production de l'inoculum, sa persistance et sa capacité de dispersion ainsi que les facteurs de l'environnement agissant sur le cycle biologique du pathogène sont des éléments clefs pour caractériser cet inoculum. Le niveau de production d'inoculum est généralement déterminant pour la sévérité de la maladie. Plus le niveau d'inoculum sera fort, plus les symptômes sur l'hôte seront sévères (MITCHELL, 1978; RAFTOYANNIS & DICK, 2002).

Par ailleurs, la production d'inoculum dépend de la capacité de survie du pathogène dans son environnement. La stratégie de survie est différentes selon les espèces. Certains réalisent une alternance d'hôte lors la réalisation du cycle biologique (ex : cas des différentes rouilles) ou se développent sur une large gamme d'hôtes constituant un réservoir d'inoculum *stricto sensu* (ex : *Phytophthora ramorum*), tandis que d'autres ont un développement saprophytique important permettant la production d'un réservoir extérieur aux plantes hôtes (SINGH & KUMAR, 2023). Les facteurs abiotiques de l'environnement tels que les conditions de température et d'humidité mais également les facteurs biotiques tels que la présence d'antagonistes régulateurs ou de parasites de l'agent pathogène peuvent fortement affecter la persistance du pathogène.

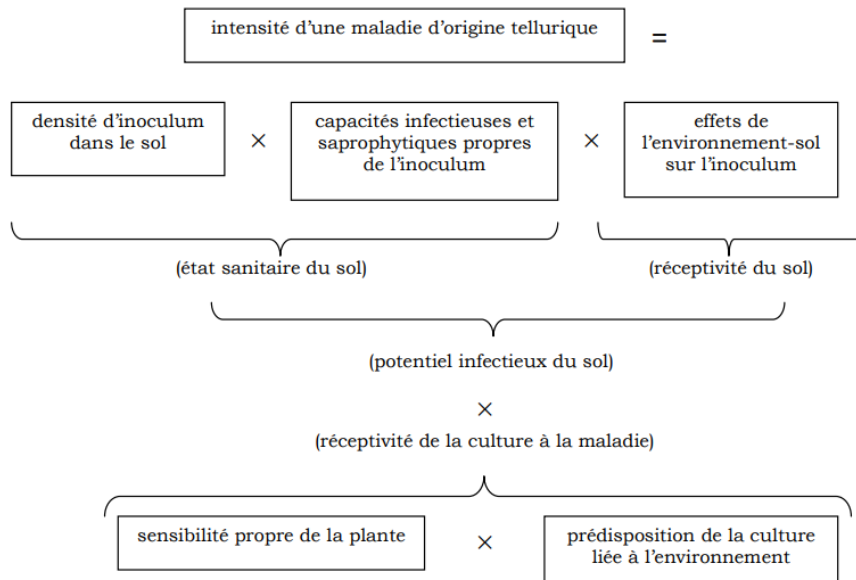


FIGURE. 1.6 — Facteurs intervenant dans l'intensité du maladie provoqué par un pathogène du sol (SUFFERT, 2006).

1.2 L'épidémie de chalarose du frêne

Depuis les années 1990, une épidémie provoquée par le champignon invasif, *Hymenoscyphus fraxineus*, se développe sur les frênes en Europe. L'identification tardive de l'agent pathogène responsable et de son caractère invasif n'ont pas permis son éradication ou son endiguement. L'impact sur les peuplements est fort et a suscité de grandes craintes sur l'avenir du frêne en Europe.

Cette partie fait le bilan de plus de vingt années de recherche qui ont permis de comprendre l'épidémiologie de la chalarose, de décrire le fonctionnement du pathogène ainsi que les facteurs favorisant le développement de la maladie. Les facteurs de régulation pouvant intervenir dans le développement du pathogène et tendre vers sa naturalisation sont des sujets majeurs des dernières années. Cette thèse s'insère dans ce contexte en s'intéressant plus particulièrement aux facteurs agissant sur la dynamique de production d'inoculum.

1.2.1 Écologie des frênes

1.2.2 Représentation du frêne dans le paysage, facteur de diffusion de l'épidémie

Les deux espèces de frênes majoritaires en Europe sont le frêne commun *Fraxinus excelsior* et le frêne oxyphylle *Fraxinus angustifolia*. L'aire de répartition du frêne oxyphylle est située au niveau du pourtour méditerranéen (fig. 1.7a) alors que celle du frêne commun couvre l'ensemble de la zone tempérée européenne (fig. 1.7b). Il est possible de trouver conjointement les deux espèces au sud de l'aire du frêne commun où celui-ci deviendra de plus en plus rare et sera rem-

placé progressivement par le frêne oxyphylle. Au niveau de cette zone, des hybridations entre les deux espèces peuvent avoir lieu.

Le frêne commun et le frêne oxyphylle sont des essences post-pionnières nomades (RAMEAU et al., 2018), ce qui signifie qu’elles interviennent dans le cycle sylvigénétique après les essences arbustives pionnières. Le caractère nomade indique que, dans certaines conditions, ces deux espèces de frênes peuvent avoir un comportement pionnier. Elles sont fréquentes dans leur aire de répartition. Préférant les sols argilo-limoneux profonds et humides, les frênes sont une composante importante des ripisylves. Ces essences de lumière à la croissance rapide sont également fréquentes dans les haies ou bosquets. Leur dissémination est favorisée par leurs fructifications abondantes disséminées par le vent. En revanche, les fleurs et les graines du frêne oxyphylle sont sensibles aux gelées printanières ce qui limite sa dispersion vers le nord de l’Europe. Considéré comme une essence neutrophile, le frêne commun accepte des sols calcaires à modérément acides. Les jeunes stades du frêne commun sont également capables de se développer en sous-étage de peuplement forestier et de profiter des perturbations pour se développer jusqu’au stade adulte. Le frêne commun est alors souvent trouvé en association avec le hêtre (*Fagus sylvatica*), le chêne pédonculé (*Quercus robur*) ou sessile (*Quercus petraea*) et l’érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*). La qualité du bois de frêne commun connu pour son élasticité et sa résistance mécanique en font une essence de choix pour la sylviculture en revanche le bois de frêne oxyphylle se trouve être de moins bonne qualité.

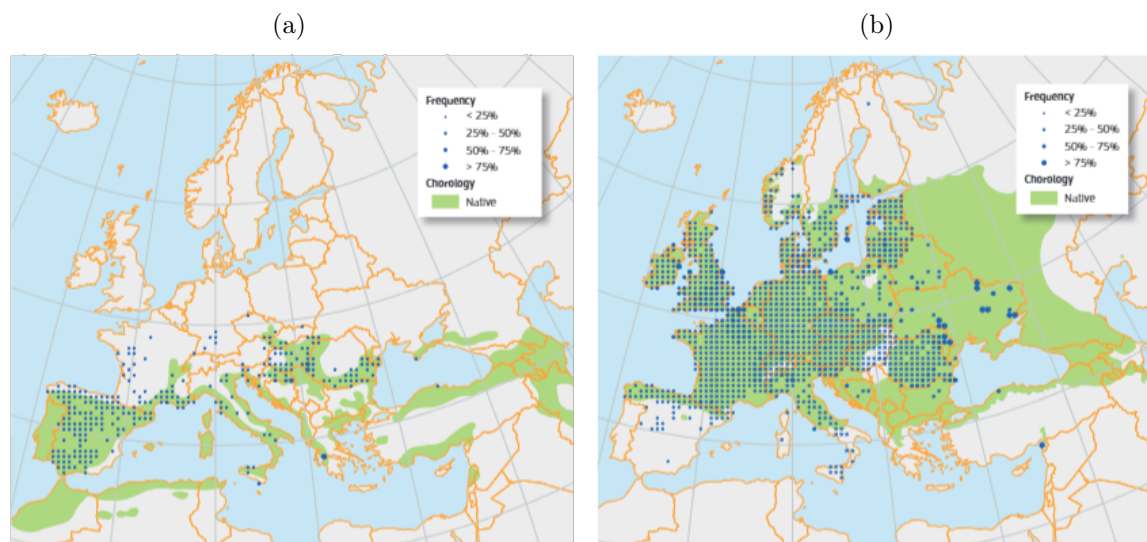


FIGURE. 1.7 — Aire de répartition européenne du frêne oxyphylle *Fraxinus angustifolia* (a) et du frêne commun *Fraxinus excelsior* (b) issu de `caudullo_fraxinus_nodate` et `beck_fraxinus_nodate`

En France, le frêne commun représentait en 2016 4% de la surface forestière avec un volume sur pied estimé à 105 millions de m³. Dans le but de produire du bois d’oeuvre, des plantations de frênes communs ont été installées en complément des peuplements arrivés spontanément. Ces plantations se trouvent sur des situations optimales en terme de profondeur de sol, de fraîcheur, d’humidité et souvent à proximité de cours d’eau. Ces frênaies de production étaient

particulièrement importantes dans les Hauts-de-France avec un nombre important de plantations pures (fig. 1.8). En 2008, environ 290 000 plants de frênes communs étaient vendus en France classant cette essence au 20^e rang des essences les plus vendues (11^e feuillus)(Tab. 1.1). En 2021, le nombre de plants vendu a été divisé par 10. Cette forte diminution de l'utilisation du frêne commun comme essence de boisement fait suite à l'arrivée de la chalarose du frêne détectée pour la première fois en Haute-Saône en 2008 puis dans le Nord Pas de Calais en 2009. Cette épidémie a généré une forte crise pour la filière, les peuplements les plus jeunes ont été fortement impactés avec des taux de mortalité conséquents. Les peuplements les plus âgés ont également connu des dépérissements, obligeant à anticiper certaines coupes afin d'éviter une trop forte perte de la valeur du bois.

Le frêne commun est par ailleurs une essence patrimoniale des haies et bocage. Par exemple, il est très présent dans le marais poitevin, région naturelle de France labélisée Grand site de France, parc naturel régional et dont certaines zones ont le statut de réserve naturelle nationale ou régionale. On le trouve alors sous forme de trogne. Au sein du marais, la gestion de l'épidémie de chalarose touchant les trognes est un enjeu important pour limiter la crise, sécuriser les voies et remplacer les individus morts. La forte représentation du frêne dans le paysage présente un enjeu pour la biodiversité, de nombreuses espèces étant associées à cette essence (MITCHELL et al., 2014).

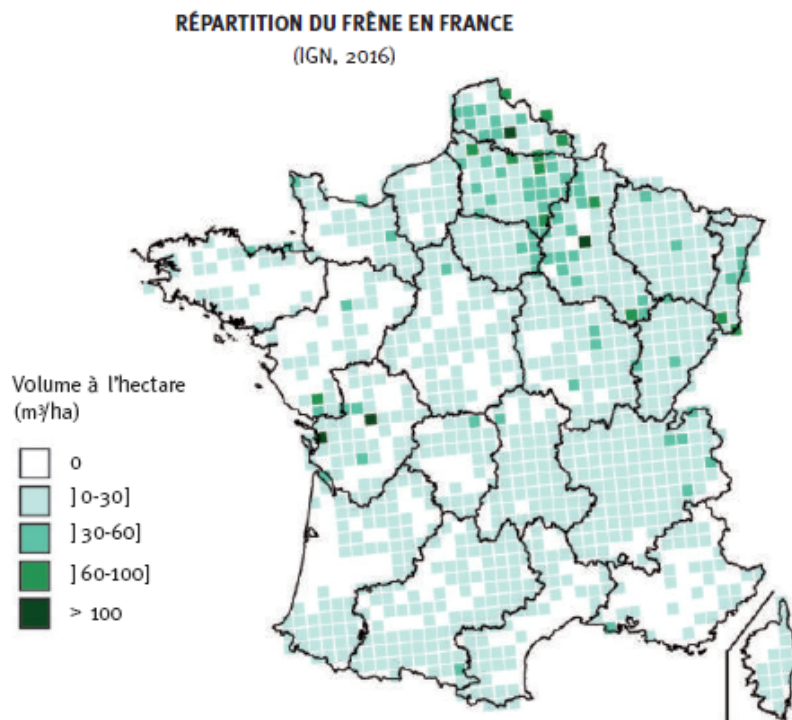


FIGURE. 1.8 — Répartition du frêne commun en France, source Inventaire Forestier National de l'IGN (2016)

TABLE 1.1 – Nombre de plants de frênes vendus en France de 2008 à 2021, source Ministère de l’Agriculture

Année	Nombre de plants		
	<i>F. excelsior</i>	<i>F. angustifolia</i>	Toutes essences
2008	291375	8094	57196431
2009	299657	12846	55078877
2010	194673	7475	40467402
2011	168751	9607	55444756
2012	125622	11162	69605532
2013	102262	6720	71581272
2014	83868	3664	71994029
2015	56018	0	73393198
2016	22792	1310	76009099
2017	22838	2064	68218902
2018	24426	0	67732582
2019	19986	0	55182852
2020	10514	5715	53253133
2021	25070	6974	60513965

1.2.3 Chronologie de l’épidémie

L’épidémie de chalarose du frêne, débute en Europe par des signalements de dépérissement de frênes (*Fraxinus excelsior*) de tout âge dans le Nord Est de la Pologne en 1992 (GIL et al., 2017 ; STOCKI, 2001), initialement attribués à des conditions abiotiques et aux températures extrêmes (fortes gelées et sécheresses au début des années 90). Durant les années 90, le nombre de signalements de dépérissements a augmenté et ils se sont étendus au pays voisins, tout d’abord la Lituanie en 1996 puis au début des années 2000 dans les autres pays baltes, la Suède, le Danemark, le Nord de l’Allemagne, l’Autriche, la République tchèque et la Slovaquie (fig. 1.9). L’extension territoriale du phénomène sur des sites aux conditions variées ainsi que l’apparition de nécrose sans écoulement de sève sur les branches ou les tiges, et des mortalités de pousses sur les individus atteints suggèrent une cause pathologique (KOWALSKI, 2006 ; PRZYBYŁ, 2002).

Le champignon *Diplodia mutila* est retrouvé sur des tissus nécrosés provenant de différents peuplements de frênes dépérissants. L’inoculation sur des tissus de frêne vivant provoque des nécroses importantes. Désigné comme responsable, ce champignon est pourtant connu pour être un pathogène secondaire, présent sur une aire plus large que celle des dépérissements de frênes signalés (PRZYBYŁ, 2002) laissant un doute sur son rôle. Des champignons du genre *Cytospora*, *Fusarium*, *Phomopsis* et *Armillaria* sont également soupçonnés car régulièrement isolés à partir des échantillons issus de frênes dépérissants (CECH, 2005 ; PRZYBYŁ, 2002 ; VASILIAUSKAS et al., 2006). Finalement, en 2006, une nouvelle espèce nommée alors *Chalara fraxinea* est découverte sur des tissus de frênes nécrosés par KOWALSKI (2006). L’inoculation du champignon engendre des symptômes similaires à ceux observés sur les frênes dépérissants (lésion nécrotique, flétrissement de feuilles) et il est retrouvé uniquement dans les peuplements touchés par la maladie démontrant le rôle de ce pathogène dans l’épidémie de dépérissement du frêne (KOWALSKI & HOLDENRIEDER, 2009a). De plus, lors d’inoculation artificielle de *Chalara fraxinea*, les champi-

1.2. L'ÉPIDÉMIE DE CHALAROSE DU FRÊNE

gnons suspectés initialement tels que *Cytospora spp.*, *Fusarium spp.*, *Phomopsis spp.* et *Diplodia mutila* ont été détectés indiquant leur caractère opportuniste. *Chalara fraxinea* est dans un premier temps décrit comme étant la forme anamorphe de l'ascomycète européenne *Hymenoscyphus albidus* (KOWALSKI & HOLDENRIEDER, 2009b) puis les analyses moléculaires ont confirmé qu'il s'agissait d'une espèce génétiquement proche mais distincte d'*H. albidus* qui est alors nommée *Hymenoscyphus pseudoalbidus* (QUELOZ et al., 2011) puis renommé *Hymenoscyphus fraxineus* (BARAL et al., 2014) pour se conformer aux règles de nomenclature ("*one fungus, one name*"). Cette épidémie de grande ampleur peut être considérée comme un échec de la stratégie de surveillance d'introduction d'organisme exotique. D'une part, au moment où il a dépassé le stade de latence (qui a duré de nombreuses années, fig. 1.9) et que sa présence induisait des dépérissements visibles, l'organisme était encore inconnu y compris dans son aire d'origine retardant son identification comme agent responsable de la maladie. D'autre part, le caractère invasif n'a été reconnu que tardivement empêchant toute mise en oeuvre de mesures d'endiguement (ex : transfert de plant ayant contribué à la diffusion de la maladie).

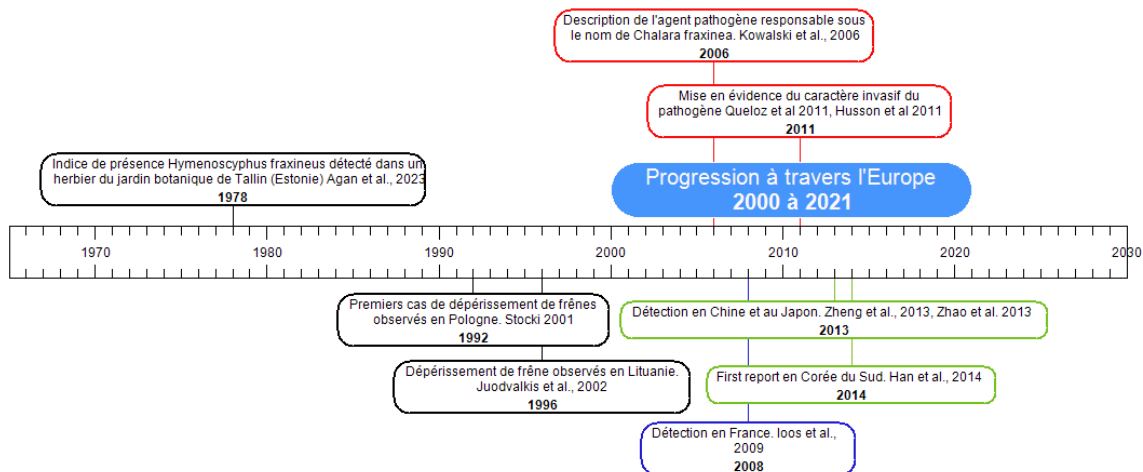


FIGURE. 1.9 — Chronologie de l'épidémie de chalarose. Les encadrés rouges correspondent aux dates de caractérisation du pathogène, les encadrés verts aux dates de détection dans l'aire d'origine probable, les encadrés bleus à la période de progression du pathogène

Durant la période d'identification de l'agent causal, l'épidémie continue de se propager à travers l'Europe. La méthode de détection par qPCR développée par Ioos et al., 2009 permet alors de confirmer la présence d'*Hymenoscyphus fraxineus* dans le reste de l'Europe (fig. 1.9).

Hymenoscyphus fraxineus est aujourd’hui présent sur la quasi totalité de l’aire de répartition de *Fraxinus excelsior* et la partie nord de l’aire de répartition de *Fraxinus angustifolia* (fig. 1.10a). L’expansion du pathogène vers le Sud est aujourd’hui limitée par les températures estivales (GROSDIDIER et al., 2018b; HAUPTMAN et al., 2013). En France, la première détection a lieu en Haute-Saône en 2008, en 2009 un signalement est enregistré dans le Nord Pas de Calais. Le pathogène se répand ensuite au rythme d’environ 70km par an et atteint en 2022 le Finistère et les Pyrénées. Le Sud-Est de la France est aujourd’hui épargné du fait du climat méditerranéen défavorable (GROSDIDIER et al., 2018b; GROSDIDIER, 2017) (fig. 1.10b). En 2014, la présence d’*H. fraxineus* est confirmé au Nord-Est de l’Asie (Japon, Corée du Sud et Chine) sur des débris foliaires de *Fraxinus mandshurica* et *Fraxinus chinensis* présentant des fructifications (fig. 1.9) (HAN et al., 2014; ZHAO et al., 2013; ZHENG & ZHUANG, 2014). La diversité génétique des populations d’*H. fraxineus* est plus importante dans le Nord Est de l’Asie qu’en Europe, laissant présumer que l’aire d’origine d’*H. fraxineus* serait dans cette région du globe (GROSS et al., 2014a; SØNSTEBØ et al., 2017). L’arrivée en Europe se serait produit par la transfert de frêne de Mandchourie depuis le Nord Est de l’Asie vers l’Europe de l’Est. La détection du pathogène sur des feuilles de frêne de Mandchourie prélevés dans un herbier du jardin botanique de Tallin datant de 1978 conforte cette hypothèse (AGAN et al., 2023) (fig. 1.9).

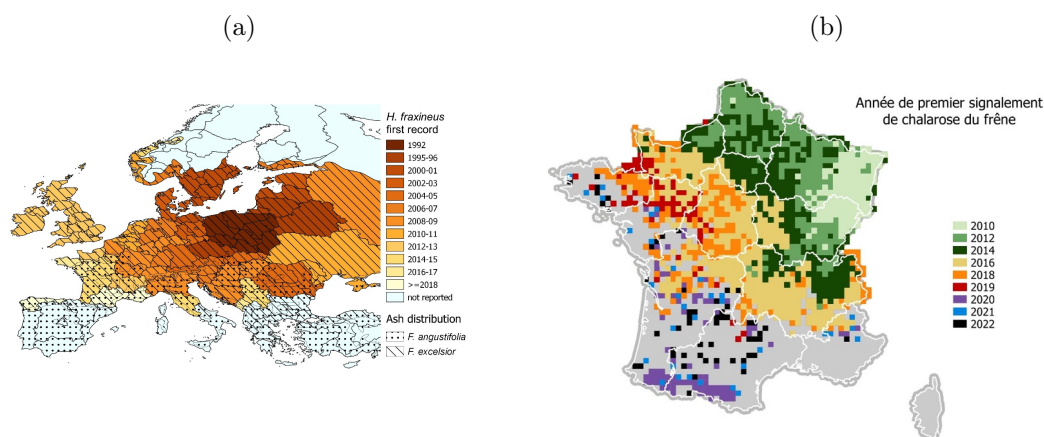


FIGURE. 1.10 – Aire de répartition de la charalrose du frêne en Europe (a) et en France (b)

1.2.4 Impact de l’épidémie

Il est reporté dans les différents pays concernés par la charalrose, un déclin massif du nombre de frênes (ENDERLE et al., 2019; MCKINNEY et al., 2014; PAUTASSO et al., 2013). Le dépérissement est progressif. Lors des premières années d’installation du pathogène les mortalités sont faibles puis celles-ci augmentent d’année en année jusqu’à pouvoir atteindre plus de 60% en moyenne (COKER et al., 2019; MADSEN et al., 2021). Le temps de développement de la maladie et sa sévérité est dépendant de divers paramètres tels que l’âge, la densité en frêne ou l’environnement de la station (GROSDIDIER et al., 2020; MADSEN et al., 2021; SKOVSGAARD et al., 2017). Bien que les arbres de tout âge présentent des signes de dépérissement (SCHUMACHER,

2011), les individus les plus jeunes (stade semis, perchis et gaulis) apparaissent plus vulnérables (GROSDIDIER et al., 2020; HUSSON et al., 2012). En situation de densité forte et d'humidité ambiante favorable, les mortalités arrivent alors plus rapidement chez les jeunes peuplements pouvant dépasser les 50% en moins de dix ans alors qu'elle est de 20% dans de vieux peuplements (MADSEN et al., 2021). Les individus les plus âgés présentant une plus grande résilience meurent beaucoup plus lentement (MARÇAIS et al., 2017). La densité du peuplement en frênes est un critère déterminant pour le développement des symptômes et la sévérité de la maladie. Les peuplements comprenant une forte densité en frêne sont fortement impactés avec des dépérissements et des mortalités massives ; *a contrario* les arbres isolés sont moins atteints (CHUMANOVÁ et al., 2019; GROSDIDIER et al., 2020; HAVRDOVÁ et al., 2017). Il a été démontré que le dépérissement des frênes est plus important lorsqu'un peuplement comprenant une forte densité de frênes dépérissants est présent dans un voisinage de 200-300 m (GROSDIDIER et al., 2020).

Cette épidémie a eu des conséquences économiques importantes car le frêne a un bois à forte valeur ajoutée et est également prisé pour l'ornementation. Une estimation anglaise prenant en compte la perte de profit dans la filière, les interventions de sécurisation, les travaux de replantation, les fonds pour la recherche et les pertes de services écosystémiques rendus par le frêne donne un chiffre avoisinant les 15 milliards d'euros soit un tiers du coût estimé de la fièvre aphteuse (HILL et al., 2019). L'impact écosystémique de la disparition du frêne est lui aussi non négligeable. De nombreuses espèces ont été identifiées comme associées à *F. excelsior* dont une bonne part avec une association très forte ou obligatoire (HULTBERG et al., 2020; MITCHELL et al., 2014). Parmi ces espèces, l'occurrence de l'espèce autochtone d'*Hymenoscyphus* inféodée à *F. excelsior*, *H. albidus* a fortement diminué suite à l'invasion d'*H. fraxineus* (MCKINNEY et al., 2012)

1.2.5 Cycle biologique de *Hymenoscyphus fraxineus*

H. fraxineus est un pathogène foliaire dont le cycle commence durant l'été par la germination des ascospores à la surface des feuilles de frêne (fig. 1.11). L'appressorium nouvellement formé permet au champignon de pénétrer l'épiderme foliaire puis les hyphes colonisent les tissus foliaires (CLEARY et al., 2013). Les hyphes pénètrent dans les cellules du tissu foliaire provoquant progressivement des nécroses sur les feuilles entre 2 et 4 semaines après l'inoculation (CLEARY et al., 2013; MANSFIELD et al., 2019; MANSFIELD et al., 2018). Il est cependant fréquent, en situation naturelle, que la colonisation d'*H. fraxineus* reste asymptomatique jusqu'à la fin du mois d'août (CROSS et al., 2017). Après la chute des feuilles colonisées par *H. fraxineus* durant l'automne, le champignon hiverne sur les résidus foliaires au sol, constitués majoritairement des rachis (veine centrale et pétiole) et parfois des veines des folioles (GROSS & HOLDENRIEDER, 2013; KIRISITS & CECH, 2009; KOWALSKI & HOLDENRIEDER, 2009b). Au printemps suivant, à la suite de la reproduction sexuée, des apothécies se forment depuis les résidus foliaires colonisés par le pathogène (KOWALSKI & HOLDENRIEDER, 2009a, 2009b; TIMMERMANN et al., 2011). Ces apothécies peuvent être observées dès le mois de mai dans certaines régions et jusqu'au mois de novembre. Mais la saison durant laquelle un maximum d'apothécies est produit est courte. Selon

l'altitude et la latitude, cette période de production maximale se situe de la mi juin à début juillet (NE de la France), de mi juillet à début août (Belgique) ou dans certaines régions de mi août à début septembre (CHANDELIER et al., 2014; GROSDIDIER et al., 2018a; GROSS et al., 2014a; HIETALA et al., 2013; TIMMERMANN et al., 2011). Les apothécies matures libèrent les ascospores le jour avec un optimum aux alentours de 7h du matin (TIMMERMANN et al., 2011). Il est estimé que seules les ascospores jouent le rôle d'inoculum et peuvent infecter les feuilles (GROSS et al., 2014b; KIRISITS & CECH, 2009; KOWALSKI & HOLDENRIEDER, 2009b). Les conidies jouent, en effet, surtout le rôle de spermaties (GROSS et al., 2012). L'argument principal pour écarter les conidies du rôle d'inoculum vient de la génétique des populations : très peu de clonalité est retrouvée dans les populations d'*H. fraxineus* que cela soit à l'échelle d'un arbre ou d'un peuplement (GROSS et al., 2014a; KRAJ et al., 2012; NGUYEN et al., 2016). Les frênes européens, très sensibles du fait de leur absence de co-évolution avec ce pathogène introduit, subissent des symptômes plus sévères. Les hyphes d'*H. fraxineus* franchissent le pétiole et atteignent les tissus des rameaux, provoquant des nécroses au niveau de l'écorce et la décoloration de l'aubier. La mort des tissus interrompt la circulation de la sève dans le phloème et le xylème impactant les parties plus hautes de l'arbre, le tout se traduisant par des mortalités de branches et un dépérissement global du houppier (GROSS et al., 2014b). Par ailleurs, les ascospores ont également la capacité de germer au niveau des collets et de pénétrer les tissus via les lenticelles de l'écorce (HUSSON et al., 2012; NEMESIO-GORRIZ et al., 2019), engendrant des nécroses favorisant le développement de l'armillaire *Armillaria gallica* ou *A. Cepistipes*, pathogènes secondaires accélérant la mortalité des arbres atteints (fig. 1.11)(CHANDELIER et al., 2016; ENDERLE et al., 2017; ENDERLE et al., 2013; MADSEN et al., 2021; MARÇAIS et al., 2016). L'apparition des symptômes les plus sévères a été observée dans les peuplements soumis à une forte pression d'inoculum (HUSSON et al., 2012).

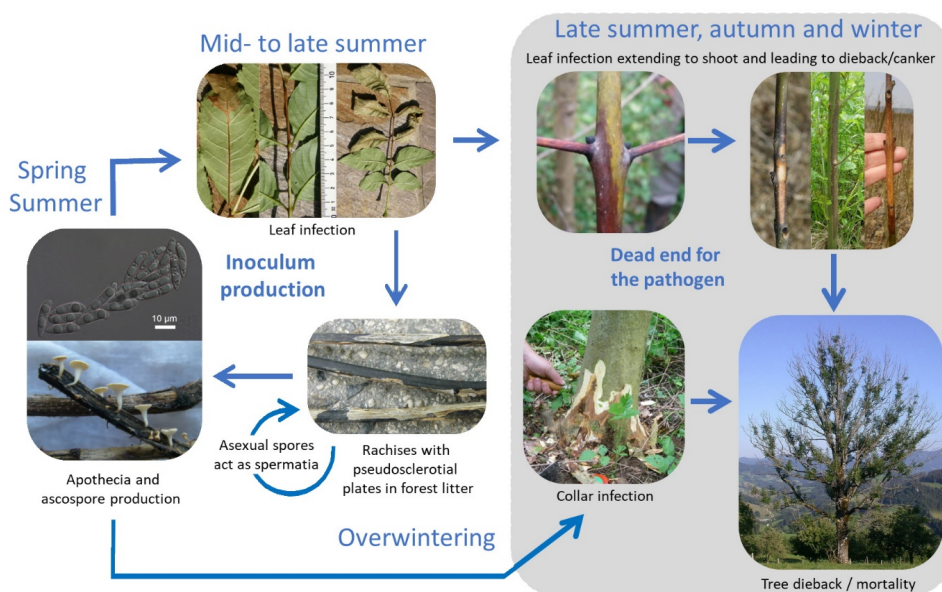


FIGURE. 1.11 – Cycle biologique d'*Hymenoscyphus fraxineus* contenant les symptômes observés sur *Fraxinus excelsior*, tiré de MARÇAIS et al. (2022)

La maladie a pu se répandre à travers l'Europe grâce à l'abondance du frêne dans les paysages, et en particulier du frêne commun. Cette forte disponibilité d'hôtes fournissant une litière ayant une capacité importante à produire de l'inoculum a facilité la dispersion du pathogène. De plus, le frêne se développe souvent sur des milieux humides qui favorisent la formation des apothécies (GROSDIDIER et al., 2020 ; SKOVSGAARD et al., 2017). Bien que cet inoculum ait une capacité de dispersion pouvant atteindre une centaine de km, conférant la possibilité d'établir de nouvelles populations loin au delà du front de la maladie, la charge de spores dans l'air diminue d'un facteur 100 dans les 50 premiers mètres d'une source d'inoculum (GROSDIDIER et al., 2018a). Les frênes proches sont donc soumis à une pression beaucoup plus forte que les frênes distants (GROSDIDIER et al., 2018a). Ainsi plus les frênes isolés seront éloignés des sources d'inoculum moins ils présenteront de symptômes sévères.

1.2.6 Hôtes sensibles et résistance

Les hôtes sensibles à la chalarose appartiennent tous au genre *Fraxinus*. L'épidémie actuellement en cours a révélé que les frênes européens *F. excelsior* et *F. angustifolia* sont très sensibles à la maladie développant les symptômes les plus sévères dans le houppier et au niveau du collet, alors que le troisième frêne Européen, *F. ornus*, se montre peu sensible à la maladie, même si des symptômes mineurs peuvent être observés dans le houppiers (KIRISITS et al., 2010). A l'heure actuelle, *H. fraxineus* est absent en Amérique du Nord. En revanche les frênes américains peuvent être infectés par le pathogène. Il a été observé dans des parcs une forte sensibilité des *F. nigra*, alors que les *F. americana* et *F. pennsylvanica* sont plus tolérants (DRENKHAN & HANSO, 2010) bien que des lésions mineures aient été observées après inoculation de rameaux de *F. pennsylvanica* (GROSS & SIEBER, 2016 ; KOWALSKI et al., 2015). L'étude de NIELSEN et al. (2017) a comparé la sévérité des symptômes ainsi que la capacité de production d'apothécies par les feuilles infectées (compétence) sur une large gamme d'espèces du genre *Fraxinus* provenant d'Asie, d'Europe ou d'Amérique du Nord et exposée à une forte pression d'inoculum de *H. fraxineus*. Sur l'ensemble des espèces testées, celles phylogénétiquement proche de l'hôte d'origine *F. mandshuirca* (peu sensible mais très compétent), composées des frênes européens *F. excelsior*, *F. angustifolia* et du frêne nord américain *F. nigra* apparaissent comme à la fois les plus sensibles et les plus compétentes. Chez les autres frênes américains, la sévérité des symptômes ainsi que la production d'apothécies sont plus variables : *F. quadrangulata* semble très sensible et très compétent, *F. americana* et *F. profunda* sont sensibles mais moins compétents alors que *F. albicans* et *F. latifolia* sont peu sensibles mais très compétents. Par opposition, les espèces proches de *F. chinensis* tels que le frêne européen *F. ornus* et les frênes asiatiques développent peu, voire pas de symptômes, et sont peu compétentes (fig. 1.12). Le pathogène est d'origine asiatique et les frênes européens ou américains n'ayant pas co-évolué avec lui présentent une sensibilité forte et permettent le développement du pathogène (hôtes naïfs).

Par contre, il a été trouvé, chez *F. excelsior*, des individus peu affectés par la chalarose. Cette caractéristique est contrôlée génétiquement et à une bonne héritabilité (MCKINNEY et al., 2011 ; PLIÚRA et al., 2011 ; SEMIZER-CUMING et al., 2019). la présence du pathogène induit donc une

forte pression de sélection et il est montré que les semis dans les peuplements infectés sont majoritairement issus de ces individus restant sains (SEMIZER-CUMING et al., 2021). En pratique, ces individus sont supposés tolérants plutôt que résistants à la maladie (LANDOLT et al., 2016). En effet, les individus qui restent sains en contexte de forte pression d'inoculum apparaissent alors comme des porteurs sains limitant la propagation du pathogène dans les tissus ligneux des rameaux sans limiter l'infection foliaire et la capacité de la litière produite à fournir de l'inoculum (MARÇAIS et al., 2023). Le développement du pathogène sur ces porteurs sains s'approche alors du développement sur l'hôte asiatique, *F. mandshurica*, et participe à la diffusion du pathogène.

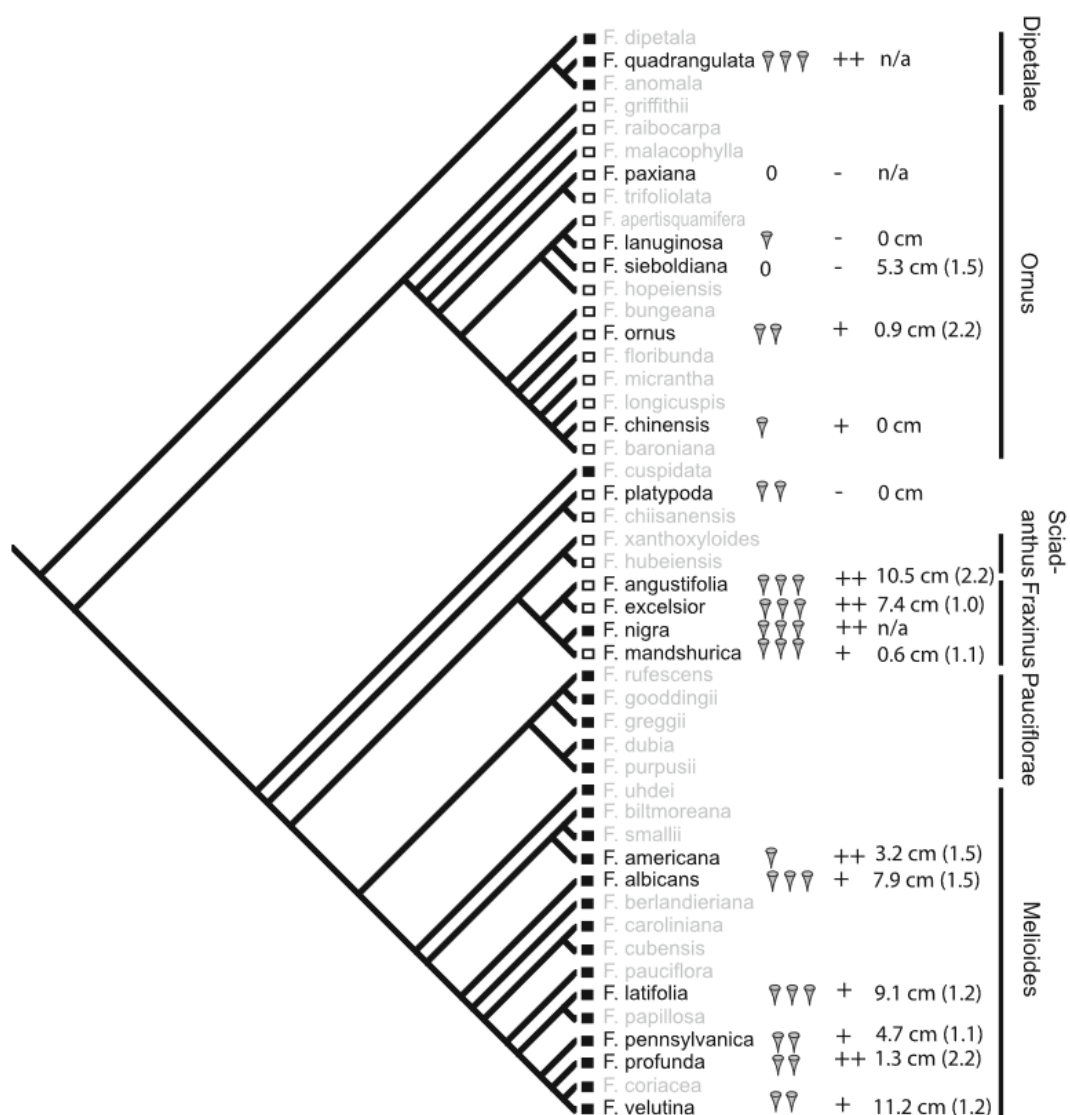


FIGURE. 1.12 – Distribution phylogénétique des espèces du genre *Fraxinus* résumant les résultats de l'étude de NIELSEN et al., 2017. 1) la compétence des feuilles hivernées, pas de cône : pas d'apothécie, 1 cône : Au moins un échantillon avec 1-3 apothécies/rachis, 2 cônes : Au moins un échantillon avec 4-10 apothécies/rachis, 3 cônes : Au moins un échantillon avec > 10 apothécies/rachis ; 2) Dégâts observés sur les arbres de l'arboretum, - pas de symptômes, + quelques symptômes, < 10 % de dégâts, ++ > 10 % de dégâts ; 3) Longueur moyenne des lésions après inoculation contrôlée des tiges.

1.3 Facteurs déterminants pour la production d'inoculum

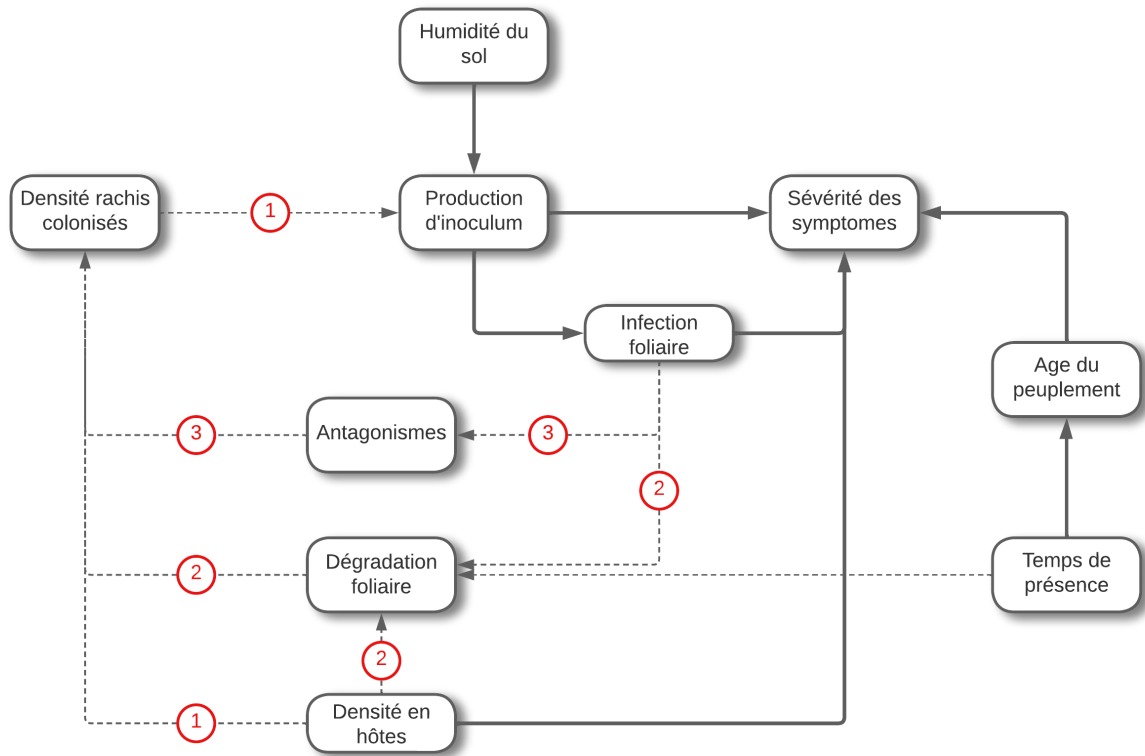


FIGURE. 1.13 – Interdépendance des paramètres intervenant dans la sévérité de la chararose du frêne. Les traits pleins sont les dépendances connues, les traits en pointillés sont celles non connues qui seront étudiées au cours de cette thèse. ① la dépendance de la reproduction sexuée du parasite et donc de sa production d'inoculum par rapport à la densité de l'hôte, ② la persistance des rachis producteurs d'inoculum dans la litière et ③ l'interaction de la communauté fongique avec *H. fraxineus* sur les rachis de la litière

Le facteur principal impactant la sévérité des symptômes est, la pression d'inoculum que subissent les arbres. Les facteurs environnementaux décrits précédemment (humidité de la station et densité de l'hôte) jouent certainement un rôle direct ou indirect important sur cette production d'inoculum, ce qui expliquerait alors leur impact sur le dépérissement des frênes (fig. 1.13). Le rôle de la densité en hôtes sur le dépérissement (①) pourrait être indirect via un accroissement de la densité de rachis dans la litière et donc de la production d'apothécies et d'inoculum (②). De même, la sévérité croissante de la chararose avec des temps de présence plus long de *H. fraxineus* pourrait être due à une accumulation des rachis producteurs d'inoculum si leur persistance dans la litière est significative. En revanche, durant sa phase saprotrophe au sein de la litière de frêne, *H. fraxineus* peut être soumis à une action antagoniste de la part des autres espèces de la communauté fongique (③).

H. fraxineus présente l'avantage d'être facilement quantifiable via la densité de rachis colonisé dans la litière. Ceux-ci sont identifiables de façon fiable grâce à l'aspect noir ébène de la plaque pseudosclérotiale. De même, les apothécies de quelques millimètres sont visibles à l'oeil, facilement reconnaissables et dénombrables. Le suivi de ces deux paramètres permet des mesures de

la taille de population du parasite, ce qui n'est pas souvent accessible en pathologie végétale.

1.3.1 ① Densité dépendance de la production d'inoculum chez *H. fraxineus*

Dépendance de la densité en hôte : La dynamique hôte/pathogène décrit l'évolution conjointe de la population du pathogène et de celle de son hôte dans le temps et dans l'espace (BURDON & CHILVERS, 1982). La transmission du pathogène entre hôte sain et hôte infecté est dépendante de la densité de la population hôte (ANDERSON & MAY, 1997), la probabilité d'infection d'un nouvel hôte augmentant avec la proximité des hôtes infectés à l'échelle de la parcelle ou du paysage. Ce modèle identifie un seuil de densité d'hôte en dessous duquel l'agent pathogène ne peut plus se maintenir. La taille de population du pathogène est estimée via le nombre d'hôtes infectés.

Dans le cas de la chalarose, nous avons vu précédemment que la sévérité des symptômes est directement liée à la densité de frêne dans la parcelle mais également dans le voisinage à l'échelle du paysage (fig. 1.13). Cependant, nous avons accès plus directement à la taille de populations de *H. fraxineus* ce qui permettrait d'étudier le lien direct entre densité en hôte et densité du pathogène (fig. 1.13).

Dépendance de la production d'inoculum à la densité de la population : Cet accès à la densité de populations du pathogène peut aussi permettre d'aborder plus facilement l'étude de la présence éventuelle d'un effet Allee. La probabilité d'établissement d'une espèce invasive est fonction de la survie de la population et de sa capacité à se reproduire. La fondation d'une population se produit généralement avec de petits effectifs. Or la capacité de reproduction peut être réduite à faible densité de population (TAYLOR & HASTINGS, 2005). Ce phénomène se nomme l'effet Allee (ALLEE, 1931 ; STEPHENS et al., 1999, Encart 2)

Dans une population soumise à un effet Allee, le taux de croissance *per capita* est réduit aux faibles densités de population, augmente avec cette densité puis diminue jusqu'à s'annuler lorsque la population atteint la capacité du milieu K (fig. 1.14). Il existe une distinction selon l'intensité de l'effet Allee. Un effet Allee fort engendre un taux de croissance négatif pour une densité de population inférieure au seuil Allee (A) tandis qu'avec un effet Allee faible, le taux de croissance est réduit, mais reste positif (fig. 1.14). Comme tout concept issu de la macro-écologie, il y a une nécessité de tester sa validité pour la microbiologie (phytopathologie ou écologie microbienne), car beaucoup de ces concepts ne sont pas si facilement transférables.

La mise en évidence d'un effet allee démographique est difficile pour un agent pathogène. En revanche, les effets Allee élémentaires sur un paramètre de fitness, comme la production d'inoculum par exemple, sont plus accessibles. Le niveau de production d'inoculum d'*H. fraxineus* est le paramètre qui déterminera le niveau de l'infection foliaire et de la sévérité des symptômes. *H. fraxineus* ne produisant qu'un inoculum primaire issu de la reproduction sexuée, la rencontre des partenaires sexuelles est un facteur limitant potentiel de la production d'inoculum. Les conidies, jouant le rôle de spermatises ont, en effet, une dispersion par splashing limitée à quelques mètres (GROSS et al., 2012 ; KOWALSKI, 2006). *H. fraxineus* étant hétérothalique, la production d'apo-

thécies résulte de la rencontre de deux mating types compatibles. Du fait de la faible dispersion des conidies, la probabilité de rencontre des partenaires sexuels, et donc la production apothécies et d'inoculum, est un paramètre de la fitness qui pourrait être dépendant de la densité de rachis dans la litière générant ainsi un effet Allee élémentaire (fig. 1.13).

Encart 2

Warder Clyde Allee est un zoologiste dont les travaux ont mis en évidence le rôle positif du nombre pour la survie et la reproduction d'une population (ALLEE, 1931, 1938). Cet effet positif peut provenir de divers aspect de la biologie d'une population tel que la dilution de la pression de prédation ou l'augmentation de la vigilance, les travaux collectifs de modification de l'environnement, l'augmentation de la fréquence de rencontre des partenaires sexuels ou encore l'amélioration du pouvoir de pollinisation.

L'effet Allee sera défini plus précisément par la suite comme étant "une relation positive entre toute composante de la fitness individuelle et le nombre ou la densité des congénères". STEPHENS et al. (1999) distinguent l'effet Allee démographique de l'effet Allee élémentaire. L'effet élémentaire est une densité dépendance d'un élément de la fitness alors que l'effet Allee démographique s'observe sur la fitness globale. La mise en évidence d'un effet Allee complémentaire suggère la présence d'un effet Allee démographique significatif, celui-ci étant plus difficile à mettre en évidence.

Le taux de croissance d'une population ($\frac{dN(t)}{dt}$) soumise à un effet Allee démographique en fonction de la densité de la population ($N(t)$) est défini par le modèle logistique de Verhulst (noir) dont le taux de croissance est limité par la capacité d'accueil du milieu K auquel est ajouté un terme d'effet Allee (rouge) avec A, la densité critique en dessous de laquelle le taux de croissance devient négatif.

$$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \left(1 - \frac{N(t)}{K} \right) \left(\frac{N(t) - A}{K} \right)$$

Le taux de croissance *per capita* correspond au taux de croissance divisé par la densité de population.

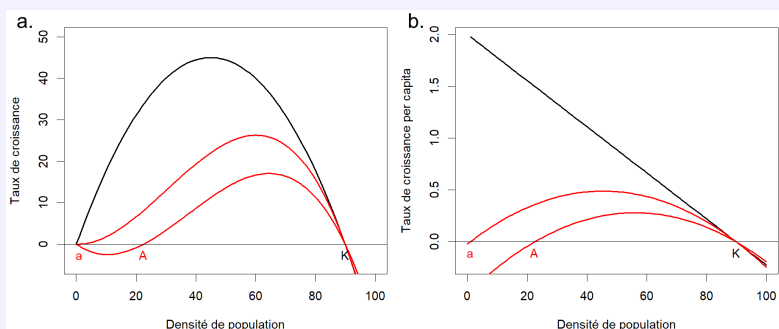


FIGURE. 1.14 – Modélisation du taux de croissance en fonction de la densité de population (a) et du taux de croissance per capita (b) avec la courbe noir correspondant au modèle logistique de Verhulst et les courbes rouges le modèle prend en compte un effet Allee. K est la capacité d'accueil du milieu, a effet Allee faible et A effet Allee fort

1.3.2 ② Persistance des rachis colonisés

Nous avons souligné l'importance des rachis colonisés par *H. fraxineus* présents dans la litière pour la sévérité de la maladie. Leur persistance est par conséquent primordiale pour la production locale d'inoculum. Les frênes utilisés en milieux urbains dans les parcs ou jardins dont les feuilles sont rapidement retirées ou fragmentées lors d'entretien de la voirie et des espaces verts sont en effet souvent peu affectés par la chalarose (KOPINGA & VRIES, 2017). La litière de frêne est par ailleurs connu pour se dégrader plus rapidement que les autres feuillus fréquents en Europe tel que le chêne, le hêtre ou le charme à cause d'un rapport carbone / azote (C/N) ainsi que d'un rapport lignine / azote plus faible (RIUTTA et al., 2012 ; STEFFENS et al., 2012). Lors de la dégradation des feuilles de frêne, les folioles disparaissent rapidement après la chute des feuilles, ne laissant subsister que les rachis sur lesquels *H. fraxineus* se développe en hiver et produit les apothécies au printemps.

Lors de son développement sur les rachis colonisés, *H. fraxineus* produit une plaque pseudosclérotiale donnant une couleur noir ébène au rachis permettant de distinguer le rachis porteur d'*H. fraxineus* des rachis non colonisés (plus clair, pouvant aller du brun au gris, GROSS et HOLDENRIEDER, 2013). Il est admis que cette plaque pseudosclérotiale est une couche protectrice riche en mélanine. La forte mélanisation de la couche externe chez des champignons de la litière protège le mycélium des UV, de la dessiccation et de l'installation de champignons compétiteurs. Des champignons produisant de la mélanine tel que des *Penicillium* et *Cladosporium* sont par exemple capable de croître dans des milieux fortement soumis aux radiations près du site de Tchernobyl ou sur la station spatiale internationale (DADACHOVA & CASADEVALL, 2008 ; ZHDANOVA et al., 2004). La production de mélanine chez le champignon ectomycorhizien *Cenococcum geophyllum* est un trait fonctionnel améliorant sa tolérance au stress hydrique (FERNANDEZ & KOIDE, 2013).

La production d'une plaque pseudosclérotiale par *H. fraxineus* permet la persistance du champignon dans les rachis plusieurs années de suite. Il a été démontré en condition artificielles (pots dans un jardin) que le champignon est capable de produire des apothécies jusqu'à 5 ans après la chute des feuilles infectées (GROSS & HOLDENRIEDER, 2013 ; KIRISITS, 2015). La persistance sur plusieurs cohortes de feuilles infectées successives pourrait donc produire un cumul d'inoculum. Par contre, la persistance de *H. fraxineus* sur les rachis pseudosclérotiaux n'a pas été quantifiée précisément *in situ* dans une litière.

1.3.3 ③ Communauté fongique associée au frêne, description et rôle¹.

Une reformulation du cadre conceptuel du triangle parasitaire hôte-pathogène-environnement propose de dissocier la composante abiotique de l'environnement des facteurs biotiques et de leurs interactions qui peuvent jouer sur la santé de la plante. Nous obtenons alors le "*disease tetrahedron*" (fig. 1.15) (BRADER et al., 2017). Les facteurs biotiques intervenant dans l'émergence d'une maladie peuvent être les associations avec un vecteur, la présence d'un hôte alternant ou,

1. Ce paragraphe est un extrait d'un chapitre d'ouvrage auquel j'ai participé, le chapitre 13 Forest Microbiology Volume 2 : Forest Tree Health (MARÇAIS et al., 2022)

1.3. FACTEURS DÉTERMINANTS POUR LA PRODUCTION D'INOCULUM

le plus souvent, le microbiote de la plante.

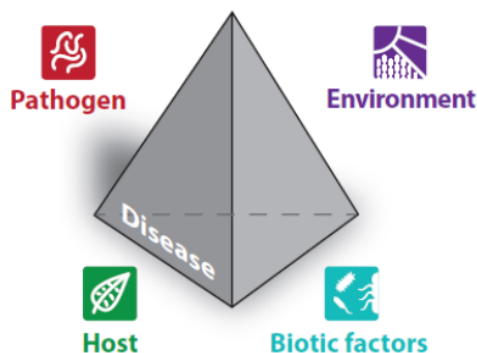


FIGURE. 1.15 — "Disease tetrahedron", considérant les facteurs biotiques indépendamment des abiotiques de l'environnement (BRADER et al., 2017)

L'altération du microbiote lié à l'installation du pathogène dans les tissus peut avoir un effet délétère. La communauté en place composée d'organismes commensaux ou mutualistes peut comprendre des organismes opportunistes qui vont engendrer un phénomène de co-infection. Le microbiome perturbées peut alors devenir un pathobiome conduisant à des symptômes plus sévères pour la plante (VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2014). Dans le cas de la chalarose, les études portant sur les communautés fongiques se développant dans les tissus des tiges ont mis en évidence la présence d'espèces ayant un rôle potentiel de pathogène telles qu' *Alternaria alternata*, *Diaporthe eres*, *Diplodia mutila*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium lateritium* et *Phomopsis spp.* (KOWALSKI et al., 2016). D'autres espèces à capacité pathogène ont également été observés aux niveaux des rachis présentant la plaque pseudosclérotique induite par le développement saprotrophe *H. fraxineus* dont *Nemania serpens*, *Nemania diffusa*, *Epicoccum nigrum* et *Fraxinicola fraxini*. La présence de ces espèces pathogènes suggère que l'infection par *H. fraxineus* génère un pathobiome, perturbant la structure et la dynamique saisonnière des communautés fongiques endophytes (CROSS et al., 2017). De plus, les nécroses induites par *H. fraxineus* pourrait permettre le développement ultérieur d'agents pathogènes opportunistes, ce qui pourrait augmenter les effets négatifs sur l'hôte (KOWALSKI et al., 2017).

A contrario, le microbiote associé à la plante peut aussi comprendre des micro-organismes endophytes bénéfiques (HAWKSWORTH, 2001). De nombreux micro-organismes endophytes sont des symbiotes mutualistes et apportent de multiples avantages à la plante, tels que la tolérance au stress hydrique ou aux températures élevées (GONTHIER et al., 2005 ; HUBBARD et al., 2012). La communauté microbiennes endophytique peut également protéger la plante contre les pathogènes (ARNOLD et al., 2003 ; BUSBY et al., 2016 ; ROMERALO et al., 2015). La régulation du pathogène peut se produire directement lorsque le champignon antagoniste fonctionne comme un mycoparasite, entre en compétition pour les ressources ou l'espace ou libère des composés chimiques inhibiteurs (antibiose). Elle peut aussi être indirecte en induisant des réponses de défense des plantes (GAJERA et al., 2013 ; OLIVA et al., 2021 ; SCHULZ et al., 2015 ; SCHULZ et al., 2019).

Les études portant sur les communautés microbiennes endophytes associées aux frênes européens et américains (*F. excelsior*, *F. lanuginosa*, *F. pennsylvanica* et *F. ornus*) ou asiatiques (*F. mandshurica* et *F. chinensis*) ont révélé un certain nombre d'espèces fongiques, appartenant principalement aux ascomycètes, ayant un potentiel antagoniste *in vitro* contre *H. fraxineus*. SCHLEGEL et al. (2016) ont identifié *Boeremia exigua*, *Kretzschmaria deusta*, *Paraconiothyrium sp.*, *Neofabraea alba*, et *Fraxinicola fraxini* comme agents de biocontrôle candidats. Les travaux ultérieurs de BECKER et al. (2020), HAŇÁČKOVÁ et al. (2017) et KOSAWANG et al. (2018) ont également démontré que la croissance *in vitro* de *H. fraxineus* était retardée par plusieurs espèces fongiques dans les essais en co-culture. En particulier *Aureobasidium pullulans* et *Papiliotrema flavescens* ont montré un taux d'inhibition remarquablement élevé. Outre les champignons, ULRICH et al. (2020) ont identifié trois espèces bactériennes - *Bacillus velezensis*, *Pantoea vagans* et *Pseudomonas caspiana* - avec un potentiel de biocontrôle de l'agent pathogène de la chalarose du frêne. La découverte d'antagonistes endophytiques de *H. fraxineus* offre un potentiel "pesticides verts" pour le biocontrôle de la maladie. Néanmoins, une validation plus poussée *in planta* doit être effectuée, car l'efficacité *in vitro* ne se traduit pas toujours par une bonne performance dans les applications sur le terrain en raison de facteurs environnementaux non contrôlés.

En outre, un mycovirus a été identifié dans des isolats européens de *H. fraxineus*. La découverte d'un tel mycovirus chez *Cryphonectria parasitica*, l'agent causal du chancre du châtaignier a réduit de manière significative la virulence du pathogène et donc les niveaux de dégâts sur *Castanea sativa* (Dawe et Nuss, 2001). Un hypovirus aussi efficace sur l'agent pathogène de la chalarose du frêne permettrait d'atténuer la gravité de la maladie en Europe. Un premier mitovirus, *Hymenoscyphus fraxineus mitovirus 1* (HfMV1), a été identifié, mais il n'altère pas la virulence de *H. fraxineus* (SCHOEBEL et al., 2014)(Schoebel et al., 2017). Récemment, quatre mycovirus à ARN différents ont été détectés dans des isolats japonais de *H. fraxineus* et des études sont en cours pour étudier leur impact sur leur hôte fongique et leur applicabilité pour la lutte biologique (PROSPERO et al., 2021). Un premier test du mitovirus HfMV2 n'est pas très concluant : selon les isolats, il réduit ou au contraire augmente la croissance *in vitro* de *H. fraxineus* (SHAMSI et al., 2023).

Par ailleurs, au vu de l'importance de la phase saprophytique de *H. fraxineus* dans les rachis, son interaction avec la communauté microbienne de la litière est particulièrement importante à prendre en compte. L'inhibition de pathogènes se développant dans le sol est fréquemment liée aux micro-organismes présents (sols dits suppressifs, **jamesborneman _identifying_ 2007**; GARBEVA et al., 2004; MAZZOLA, 2002; MENDES et al., 2011; WELLER et al., 2002). L'utilisation d'une espèce antagoniste pour lutter contre un agent pathogène forestier durant sa phase saprotrophe a déjà largement fait ses preuves. En effet, la pulvérisation de solution contenant des spores du saprotrophe xylophage *Phlebiopsis gigantea* sur les souches de résineux après leur exploitation limite l'installation du pourridié racinaire *Heterobasidion annosum*. Cette lutte biologique est appliquée de façon routinière sur des milliers d'hectares dans le pays scandinaves et en Pologne. La communauté fongique se développant la litière pourrait donc avoir un rôle de régulateur lors de la phase saprotrophe d'*H. fraxineus*. En effet, des champignons de la litière

ont également présentés des signes d'antagonismes. KOWALSKI et BILAŃSKI (2021) ont démontré que 50% des espèces fongiques fructifiant sur les rachis pouvait limiter la croissance d'*H. fraxineus* en boîte de pétrie par compétition ou par mycoparasitisme. Parmi celles ci, *Cyathicula coronata*, *C. fraxinophila*, *Hypoderma rubi*, *Hymenoscyphus caudatus*, *H. scutula*, *Leptosphaeria sp.*, *Pyrenopeziza petiolaris* et *Typhula sp* sont les espèces rencontrées le plus fréquemment sur les rachis. En revanche, les interactions *in situ* de la communauté fongique de la litière avec le développement d'*H. fraxineus* ne sont pas encore décrites.

1.4 Objectifs de la thèse

Dans cette thèse, nous nous intéresserons donc aux facteurs pouvant agir sur le production d'inoculum selon ces trois axes.

Le premier axe porte sur la production d'inoculum en fonction de la densité de population d'*H. fraxineus* (densité de rachis au sol) et plus particulièrement à faible densité (effet Allee). Les travaux seront réalisés selon un gradient de densité en frêne en supposant que la densité de la population d'*H. fraxineus* est reliée à la densité d'hôte.

Le deuxième axe vise à quantifier plus précisément le degrés de persistance d'*H. fraxineus* sur les rachis au sol et sa capacité à produire de l'inoculum en fonction de son temps de présence dans la litière. L'effet de la densité en hôte sera également évalué en comparant des peuplements avec des mélange frênes / autres essences différents.

Le troisième décrit l'évolution de la communauté fongique sur les rachis de frênes entre la chute des feuilles et la période de production d'inoculum. La fréquence des espèces trouvées sur les rachis sera confrontée à leur degré de colonisation par *H. fraxineus* afin de repérer d'éventuels antagonistes que l'on pourrait étudier ultérieurement.

Chapitre 2

Densité dépendance de la production d'inoculum

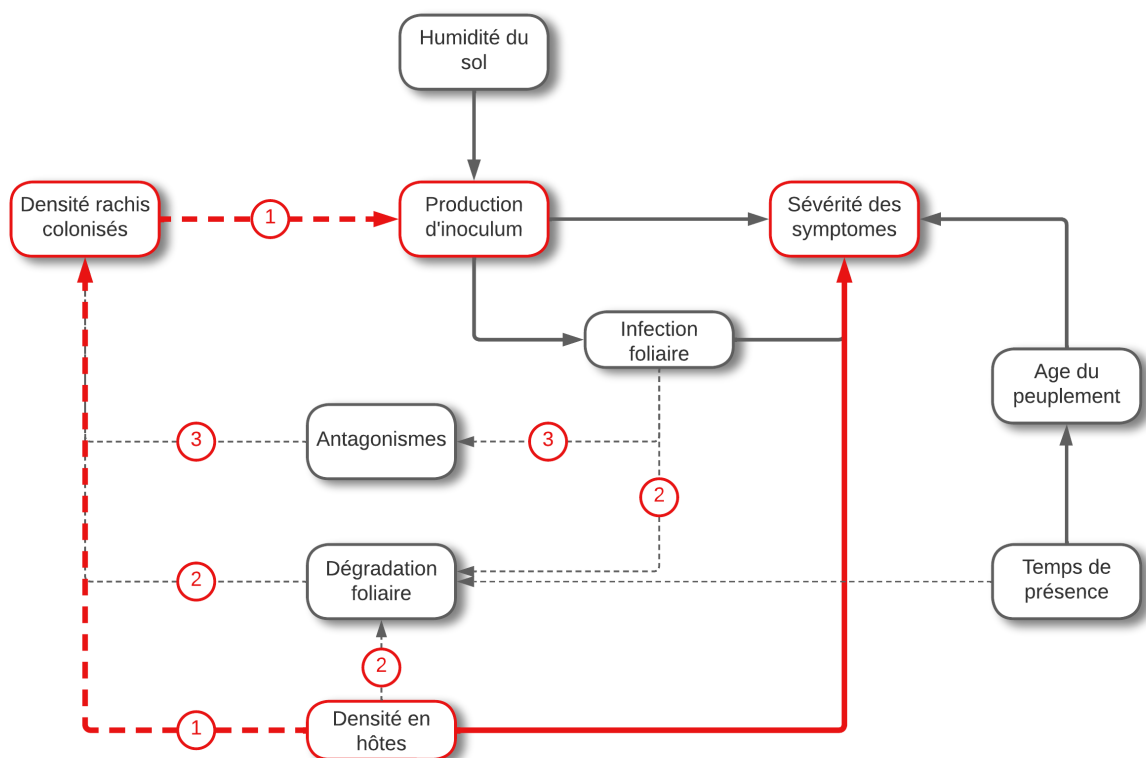


FIGURE. 2.1 – Axe 1 d'étude : lien densité hôtes - densités rachis colonisés - production d'inoculum - sévérité des symptômes

Cette première étude a pour objectif de mettre en évidence l'effet de densité de l'hôte sur la production d'inoculum et si cela peut être amplifié par un effet Allee élémentaire sur la formation des apothécies. C'est-à-dire les liens entre hôte, symptômes, pathogène et inoculum. Le lien hôte et symptômes est établi avec une sévérité des symptômes plus fortes dans les peuplements denses et un taux de mortalité supérieur. Le lien entre symptômes et inoculum a été mis en évidence : plus le niveau d'inoculum sera élevé plus les symptômes observés seront sévères. En revanche les liens hôte - pathogène, pathogène - inoculum et hôte - inoculum ne sont pas déterminés (fig.2.1).

Chez *H. fraxineus*, la production d'inoculum est directement liée au succès d'accouplement de deux mating types compatibles menant à la formation des apothécies. Il n'existe pas de production d'inoculum secondaire chez ce pathogène, les conidies jouant le rôle de spermatie. Une relation positive entre la densité de population du pathogène et le succès d'accouplement révélerait un effet Allee sur ce paramètre de la fitness. La présence d'un effet Allee dans la population d'*H. fraxineus* impliquerait une production d'inoculum réduite lorsque la densité de population d'*H. fraxineus* est faible et donc une sévérité des symptômes moins importantes.

2.1 Article 1 : Evidence of a component Allee effect for an invasive pathogen : *Hymenoscyphus fraxineus*, the ash dieback agent

Le dispositif de cette étude consiste alors à i) évaluer la sévérité de la maladie en fonction de la densité en hôtes ; ii) quantifier la densité de population d'*H. fraxineus* selon la densité en hôtes ; iii) suivre la production d'apothécies en fonction de la densité de population d'*H. fraxineus*. Pour cela, la densité de population d'*H. fraxineus*, la production d'inoculum et la sévérité de la maladie ont été mesurées au sein d'un réseau de parcelles sélectionnées selon un gradient de densité en *Fraxinus excelsior*.

L'avantage d'*H. fraxineus* est que la densité de sa population peut être aisément estimée en quantifiant la densité de rachis infectés au sol identifiables grâce à leur aspect noir ébène (plaque pseudosclérotiale). Son succès d'accouplement est également quantifiable par le nombre d'apothécies présentes sur les parties noires des rachis. Le niveau d'inoculum a été apprécié la quantité de spores capturées. Enfin la sévérité des symptômes a été évaluée par le pourcentage de branches mortes dans le houppier.

La méthodologie consistait donc à caractériser chaque parcelle selon le taux de fermeture (surface terrière totale), densité en hôtes (surface terrière en frêne) toutes deux exprimées en $\text{m}^2 \cdot \text{ha}^{-1}$, puis à estimer le pourcentage de branches mortes selon 5 classes (0-10%, 10-50%, 50-75% et + 75%). Ensuite, l'intégralité des rachis a été récoltée sur 10 surfaces de $0,1\text{m}^2$ réparties le long de deux transects sur lesquels les apothécies ont été dénombrées. Les rachis ont par la suite été séchés et triés selon leur aspect sain ou infecté. La densité de population d'*H. fraxineus* correspond donc à la masse sèche de rachis infectés. m^{-2} et le succès d'accouplement au nombre d'apothécies par masse sèche de rachis infecté au m^2 . Durant les périodes de récolte des rachis, des pièges passifs ont été installés pendant 15 jours, le niveau d'inoculum est exprimé par nombre

2.1. ARTICLE 1 : EVIDENCE OF A COMPONENT ALLEE EFFECT FOR AN INVASIVE PATHOGEN : *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS*, THE ASH DIEBACK AGENT

de spores aux cm^2 (fig. 2.2)

La sélection et la caractérisation des parcelles ont débuté en mars 2020 avant d'être interrompu par le premier confinement et n'ont pu être finalisées qu'au mois de mai 2020. Deux prélèvements des rachis ont ensuite eu lieu en juin et juillet 2020. Les conditions météorologiques de l'été 2020, et particulièrement la sécheresse, n'ont pas été favorables à la formation des apothécies, l'opération a alors été répétée en juin et juillet 2021, année plus favorable à la fructification. Les mesures ont pu être réalisées grâce à la participation d'Olivier Caël, technicien de recherche, et Arielle Beltran, recrutée en tant que main d'oeuvre occasionnelle.

Les résultats de cette étude ont été retranscrits dans l'article suivant intitulé "Evidence of a component Allee effect for an invasive pathogen : *Hymenoscyphus fraxineus*, the ash dieback agent" publié dans la revue Biological Invasion en mars 2023.

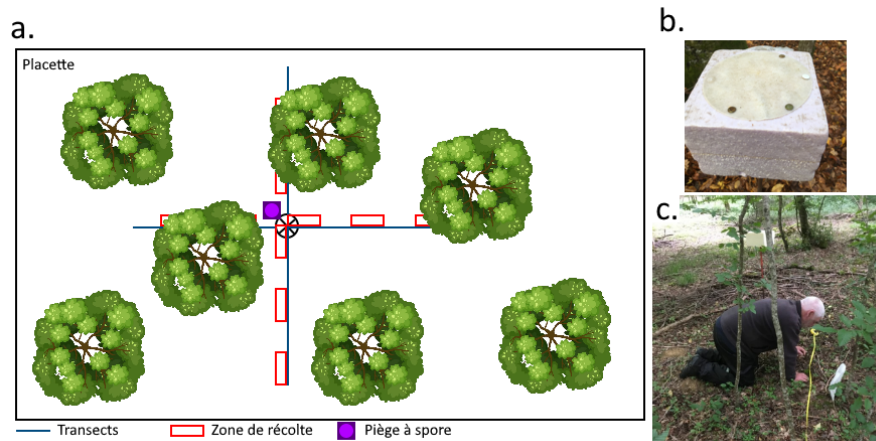


FIGURE. 2.2 — Dispositif installé dans le but de mesurer la densité de population d'*H. fraxineus* (via la densité de rachis infectés), le succès d'accouplement (via le nombre d'apothécies) et le niveau d'inoculum (via le piège à spore) a. Schéma d'une placette de collecte b. piège à spore. c. Prélèvement des rachis au sein de la litière



Evidence of a component Allee effect for an invasive pathogen: *Hymenoscyphus fraxineus*, the ash dieback agent

Simon Laubray · Marc Buée · Benoît Marçais

Received: 29 June 2022 / Accepted: 27 March 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2023

Abstract Invasive pathogens are a major threat to forest health especially in managed forest with a low diversity of tree species. The dieback of *Fraxinus spp.* caused by the fungus *Hymenoscyphus fraxineus* that occurs in Europe is the latest example of pathogen invasion causing widespread damage in forests. Ash dieback severity has been shown to be strongly affected by environment, in particular by stands features such as overall tree density or proportion of ashes. The fact that *H. fraxineus* reproduce mostly through heterothallic sexual reproduction suggest that an Allee effect could limit the mating success at low host densities, thus limiting inoculum production and disease development. Populations of *H. fraxineus* were monitored during the vegetation period in a network of stands across a host density gradient in forest and non-forest environment (hedges and small woods). Ash dieback, basal area of ash, density of infected ash leaf debris (rachis) and apothecia in the litter and ascospores load in the air were determined in the different environments during two years. We showed significant differences between forest and

non-forest environment with ash dieback, infection rate and inoculum production higher in forest settings. Host density significantly affected disease development, with crown dieback, density of infected rachis in the litter and inoculum production increasing with host density. We also demonstrated that fruiting rate, i.e. the number of apothecia per infected rachis dry weight, is strongly dependent on infected rachis density. Inoculum production is therefore limited at low host densities. Such a component Allee effect could be important in *H. fraxineus* epidemiology and invasion dynamic.

Keywords Component Allee effect · Mating success · Host density · Inoculum production · *Hymenoscyphus fraxineus*

Introduction

Emerging infectious diseases are major threats to forest ecosystems. They are frequently induced by invasive fungi and can have very important consequences on the biodiversity (Desprez-Loustau et al. 2007, 2009). The most frequently cited examples of tree species that were drastically reduced by an invasive pathogen include chestnut in USA with *Cryphonectria parasitica* or elm in Europe and the USA with *Ophiostoma novo-ulmi*. The number of new f invasive forest pathogens has been increasing exponentially has been increasing from 1980 to

S. Laubray (✉) · M. Buée · B. Marçais
UMR Interactions Arbres/Microorganismes, Université de Lorraine - INRAE, 54000 Nancy, France
e-mail: simon.laubray@inrae.fr

M. Buée
e-mail: marc.buee@inrae.fr

B. Marçais
e-mail: benoit.marcais@inrae.fr

Published online: 21 April 2023

Springer

2.1. ARTICLE 1 : EVIDENCE OF A COMPONENT ALLEE EFFECT FOR AN INVASIVE PATHOGEN : *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS*, THE ASH DIEBACK AGENT

S. Laubray et al.

2008 in Europe, with a particular importance of ascomycetes (Santini et al. 2013). Invasive pathogens currently represent a proportion of about 50% of the disease cases reported by the forest health survey system in France, with a high share of currently severe epidemics such as ash dieback caused by *Hymenoscyphus fraxineus* (Desprez-Loustau et al. 2016).

As any alien species, invasion success of exotic fungal pathogens depends on overcoming different barriers (Blackburn et al. 2011; Paap et al. 2022) to thrive in their new environment. The pathogen needs to be transported to the new environment, then it must adapt to the environment, which implies finding available hosts (Engering et al. 2013). During this establishment step, the invasive pathogen needs to reproduce and to survive efficiently off season to produce a stable population. The next step is the spread throughout the new territory that depends on the dispersal abilities and on the availability of favourable habitats. The establishment is a critical phase; it depends strongly on the habitat suitability, but also on the pathogen population dynamic (Taylor and Hastings 2005) and on the host density present in the landscape (Park et al. 2001; Condeso and Meentemeyer 2007). Founding populations of invasive species are often small and could be subjected to an Allee effect (Tobin et al. 2011). An Allee effect is a mechanism that may reduce the population growth at a low density and thus reduce the establishment likelihood. Stephens et al. (1999) defined the Allee effect as “a positive relationship between any component of individual fitness and either numbers or density of conspecifics”. The authors further distinguished the component Allee effect, which affects an individual fitness component and demographic Allee effect which affects the total species fitness. A component Allee effect would be a positive correlation between a fitness parameter such as the mating success with the population density whereas the demographic Allee effect implies a relationship between the per capita growth rate and the population density and is more difficult to demonstrate. An Allee effect may limit the population growth rate at low density with different strength. A strong Allee effect results in negative growth rate at very low population density, leading to extinction while weak Allee effect will only reduce the population growth rate through density dependence.

In an invading non-native species, the Allee effect may result in a latency phase at the colonisation front in which population growth is highly dependent on population density followed by an important growth increase when the population reach a so-called Allee threshold (Hastings 1996; Veit and Lewis 1996). In populations that are denser than the Allee threshold population density is no longer the limiting factor for growth. In addition, another factor limiting invasion is the strong dependence of the invasive pathogen population on the population density of its host. This is one of the major factors that explains why pathogens are usually less detrimental in locations with a high species diversity (Mitchell et al. 2002; Keesing et al. 2010; Hantsch et al. 2014). As a result, low tree species diversity often associated with high host abundance in the landscape allows the pathogen to colonize the area more easily (Jules et al. 2002). It was shown that this is a major factor explaining the number of invasive forest parasites (insects and microorganism) that are present at the county level in the USA (Guo et al. 2019). Moreover, as other parasites, plant pathogens are known to be drivers of the host population size (Cobb et al. 2012). Pathogens appear to strongly structure host populations limiting growth and regeneration or induce mortality. On the contrary, low host density could limit the development of the pathogen population especially if its dynamic is subject to Allee effect.

The invasive pathogen *H. fraxineus* was described as the responsible of ash dieback (Kowalski et al. 2009; Gross et al. 2014a; Baral et al. 2014). The first cases of ash dieback in Europe were observed in Poland in the 1990s (Przybył 2002) and was attributed a posteriori to the introduction of the ascomycete *H. fraxineus* (Gross et al. 2014a). This pathogenic fungus of common ash (*Fraxinus excelsior*) and narrow-leaved ash (*Fraxinus angustifolia*) is native to East Asia (Zhao et al. 2013; Gross et al. 2014b; McMullan et al. 2018) and spread through Europe to reach Ireland in 2012 (Short et al. 2019), Montenegro in 2016 (Milenković et al. 2017), north of Spain in 2021 (Stroheker et al. 2021). This pathogen causes serious damage to ash stands, threatening associated species and biodiversity (Pautasso et al. 2013; Marçais et al. 2022).

H. fraxineus biological traits and the constant spread rate observed over time in France led Hamelin et al (2016) to suggest the existence of a component

Allee effect caused by the mating success. This hypothesis is based on three facts. First, *H. fraxineus* is a heterothallic fungus, *i.e.* successful sexual reproduction needs presence of two mating types (Gross et al. 2012). The reproduction of this foliar pathogen occurs early in summer on residual leaf debris present in the litter (the petiole and central vein of the compound leaf hereafter collectively called rachis) and result in formation of apothecia. Despite rare observations of apothecia production on other infected tissues by *H. fraxineus* (Kirisits and Freinschlag 2012; Kowalski and Holdenrieder 2009; Wylder et al. 2018), the infected rachis density in the litter could be considered as main sexual reproductive population. Moreover, the ascospores released by apothecia are the main inoculum vector. Indeed, conidia produced on the rachis are believed to act only as spermatia (Gross et al. 2012), and their spread by splashing is limited to few centimetres or few metres. As a consequence, fecundation might be limited at low density of infected rachis in the litter.

Second, the spread of the pathogen is strongly linked to the host density. The genus *Fraxinus* is widely present in the landscape and its distribution area extends from South of Scandinavia from North of Turkey and North of Spain (*F. excelsior*) and South of Europe and Turkey (*F. angustifolia*) (EUFORGEN) making it easier for the pathogen to spread. A study showed the importance of ash density and tree cover fragmentation for establishment and disease development at the landscape scale (Grosdidier et al. 2020). Damage on the crown and collar was severe in dense ash stands in forest while isolated ashes out the forest were less affected. Moreover, the severity of ash dieback is correlated with the load of inoculum produced in the litter (Marçais et al. 2016). A component Allee effect on the reproduction success could further reduce the inoculum production at low ash density.

Finally, the environmental conditions strongly constrain the severity of ash dieback. The inoculum production is particularly affected by the level of ambient humidity. Abundant apothecia formation needs high humidity (Hietala et al. 2013; Dvorak et al. 2016; Grosdidier et al. 2020) and thus, factors influencing ambient humidity such as tree cover, vicinity to river, topography and precipitation will impact inoculum production and damages to the ashes (Havrdová et al. 2017; Enderle et al. 2019;

Skovsgaard et al. 2017; Grosdidier et al. 2020). Further, temperatures higher than 35 °C are lethal for *H. fraxineus* which explains limited spread in the Mediterranean region with hot summers (Grosdidier et al. 2018a; Hauptman et al. 2013).

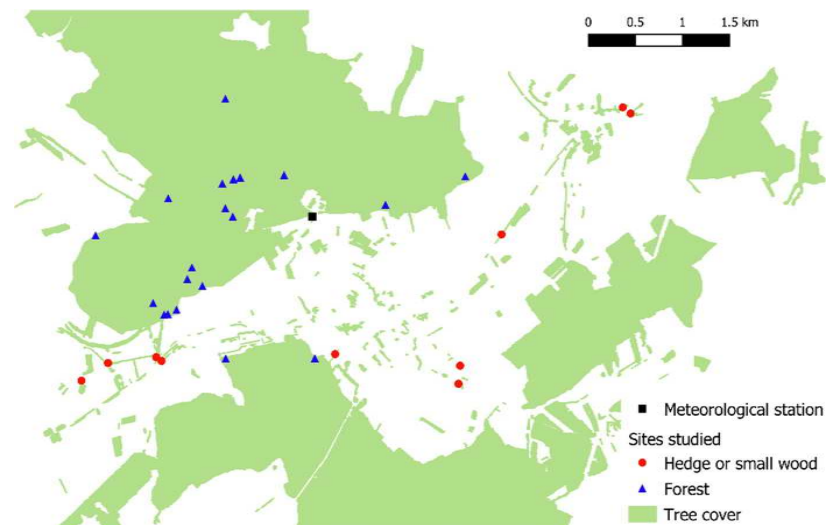
The objective of this study was to unravel the relationship between host density and their leaf litter production (rachis density), their crown health status, infected rachis density in the litter as reproductive pathogen population size and inoculum production by apothecia density in ash dieback. Assuming that the population size of *H. fraxineus* can be measured by infected rachis density in the litter and depends on ash density and level of infection, we hypothesised that a component Allee effect on the success mating limits inoculum production and the ash dieback at low population density (host and pathogen). We monitored the population dynamics of *H. fraxineus* during the period of inoculum production in an ash density gradient in forest and open landscape.

Materials and methods

Stand characterisation

A network consisting in 20 sites in forest stands and 10 in hedges and small woods was set up on the village of Champenoux in North East France (WGS84 48.7521N 6.3409 E, Fig. 1). The network was established in order to obtain a gradient of host density. Host density was measured by the basal area of ash (*Fraxinus excelsior*). At each studied site, three concentric circular plots were established. All tree stems with a diameter at breast height (DBH) over 7.5 cm were measured within a radius of 7 m (154 m²) while only tree stems with a DBH over 22.5 cm were measured in a radius of 7–16 m (805 m²) and with a DBH over 47.5 cm in a radius of 16–21 m (1386 m²). The basal area of ash in m² ha⁻¹ was computed by summing individual stem area at breast height weighted by the sampling surface. We also measured the basal area of other trees species present in the stand and total basal area was used as a proxy of canopy closure. Ash basal area was used to explain local density of rachis in the litter. However, in order to evaluate the impact of ash density on ash health, we weighted basal area by the rate of tree cover within the 100-m radius around the points;

Fig. 1 Site distribution around Champenoux village of the ash stands sampled for ash density and health status, rachises densities (total and infected), apothecia density and ascospores trapping (red dot and blue triangle)



this enabled to account for the very patchy presence of trees outside forest stands. The tree cover rate was computed with QGIS software using an IGN shape file corrected with aerial photograph (BD Ortho® edition 2018 and BD FORET® version 2.0 available in Web Map Service flow on <https://geoservices.ign.fr>). The size and health status of ash trees included in the basal area assessment was recorded with their DBH measure and the following rating of crown mortality: 0–10% (healthy), 10–50% (symptomatic), 50–75% (declining) and >75% (strongly declining). The average health status of each site was then computed as the mean of the tree ratings (using the median of their health class, i.e. 0.05 for the healthy class, 0.3 for the symptomatic ...) and the ash size was estimated with the mean of DBH. Four plots were moved by a short distance in 2021 because the 2020 location was compromised by logging. The meteorological conditions covering the sampling periods (from 1 June to 31 July 2020 and 2021) were collected at the Champenoux weather station (Fig. 1). The heat level was expressed by the mean of daily maximal temperature and mean of daily mean temperature, the humidity level was expressed by mean of daily humidity and sum of precipitation.

Hymenoscyphus fraxineus population size and inoculum production

In each stand, the density of ash rachises at the soil surface and their frequency of colonisation by *H. fraxineus* was determined in June 2020, June 2021 and July 2021. For that, two 10-m perpendicular transects were set up at the site centre. All ash rachises present along ten 0.1-m² quadrats located along the transects were collected (10-cm wide × 1 m long quadrat, separated by 1 m not sampled). The rachises were sorted in the laboratory according to their colonisation status by *H. fraxineus*. Rachis with the presence of a distinct black pseudosclerotial plate is characteristic of *H. fraxineus* infection while rachis un-colonized by the pathogen remain light brown to grey with absence of a pseudosclerotial plate and are considered as healthy. To confirm the assessment, a part of rachis identified as infected or healthy were placed in moist chamber for 8 weeks to monitor appearance of apothecia. The proportion of rachises from both categories that produced *H. fraxineus* apothecia was then computed.

Infected and healthy rachises collected on plots and sorted in lab were dried for 48 h at 50 °C and then weighted. The number of apothecia present on these rachises was counted during the sample collection of rachises. The mean dry weight of rachis (infected and total) and the mean apothecia frequency per plot were then computed in g m⁻² and No. of units m⁻²,

respectively. The fructification rate was computed as the number of apothecia per infected rachis dry weight ($N g^{-1}$). Data on number of apothecia and infected rachises density per m^2 from previous work were used in the analysis of fructification rate (15 plots sampled in 2012 from Grosdidier et al. 2018a, 23 plots sampled in 2016 and 31 plots sampled in 2017 from Grosdidier et al. 2020). The sampling method is similar to our method except that the infected rachises density is measured in length of rachis per unit surface ($cm.m^{-2}$), the rachis density was converted in weight per m^2 ($g m^{-2}$) according to the relationship ($L=163.73 * DW$, where L is the length in cm and DW, the dry weights of rachises, Grosdidier et al. 2020).

The spore trapping method developed by Grosdidier et al. (2017) was used to determine the air load of *H. fraxineus* ascospores on the studied plots. Shortly, the spore traps were passive traps composed of cellulose filter (Whatman™ 150 mm diameter Cat No 1001–150) imbibed of 5 ml of glycerine and were placed on a styrofoam block at 1 m above the ground. Three spore traps were set up per plot and left exposed for two consecutive periods of 15 days (22 June to 8 July and from 9 to 22 July). After exposure on the plots, the filters were recovered and put individually in plastic bags. In the laboratory, 30 ml of 4×TE buffer (40 mM Tris–HCl, 4 mM EDTA, pH 8.0) heated at 60 °C was added into each plastic bag with filter. The filters were gently hand rubbed through the plastic to separate the captured particles from the filter. The TE buffer was then transferred in 50 ml vials and centrifuged 15 min at 2700 g. The supernatant was removed to keep approximately the bottom 3 ml of suspension containing most of the particles. This 3 ml of suspension was transferred in two 2-ml microtubes, centrifugated 5 min at 18,620 g and, 750 μ l of supernatant was removed from each tube. The remaining 750 μ l were vortexed, pooled in one tube and centrifugated once again 5 min at 18,620 g. The 200 μ l bottom of the concentrated particles solution was kept at –20 °C until DNA extraction.

DNA was extracted from the 200 μ l concentrated particles solutions using the DNeasy plant mini kit (Qiagen). Two 3-mm and twenty 2-mm glass beads were added to the particles solutions together with 400 μ l of lysis buffer and 4 μ l RNase. The samples were grounded twice 50 s at 6 $m.s^{-1}$ with FastPrep-24

MP BIO and incubated 30 min at 65 °C to lyse the cell. The following steps were done as described by the manufacturer. Total DNA was then eluted in 200 μ l AE buffer.

The number of *H. fraxineus* ascospores from spore traps was quantified by qPCR using the method developed by Loos et al. (2009). The 15 μ l of reactional mix were composed of 1×Brilliant II qPCR master mix (Agilent Technologies), 0.03 μ M ref dye provided with the master mix, 0.01 $U.\mu l^{-1}$ UDG (New England BioLabs), 0.3 μ M each Cfrax primers (Cfrax-F, 5'-ATTATATTGTTGCTTTAG CAGGTC-3' and Cfrax-R, 5'-TCCTCTAGCAGG CACAGTC-3'), 0.1 μ M Cfrax-probes (Cfrax-P, 5'-FAM-CTCTGGGCGTCGGCCTCG-BHQ1-3') and 2 μ l template DNA. The real time reaction was performed in a Quantstudio 6 thermocycler (Applied Biosystem). The qPCR reaction was initiated by first pre-cycling step at 37 °C for 10 min for UDG activation and the initial denaturation step at 95 °C for 15 min followed by 50 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and hybridization/elongation at 65 °C for 55 s. The ascospore quantification was performed using ascospore solutions obtained by tenfold cascade dilution with from 50,000 to 5 ascospores per μ l.

Statistical analyses

Crown decline, rachis densities in the litter (total and infected by *H. fraxineus*) and the infection rate of rachis in the litter were analysed with generalised linear mixed models (glmm) using the R library glmmTMB. In both cases, the plot was declared as random effect.

The crown decline rate and the rachis infection rate were modelled using a Beta-distribution that is well adapted to variables lying between 0 and 1 (Figueroa-Zúñiga et al 2013); we used the logit link function. The explicative variables were the host density (ash basal area) and environmental variables, with the measured year added for the rachis infection rate as fixed factor. The densities of ash rachis in the litter which is a positive continuous variable was modelled with the Gamma distribution with a log link function. Ash density, crown decline and mean ash diameter were included as explicative variables. The apothecia density, the amount of ascospore detected in the spore traps and the infected rachis density were modelled with the negative binomial using an identity link

function. The sampled plots were declared as random factor.

These GLMs relationships were used to build a Structural Equation Modelling (SEM) using the R-package “piecewise” (Fig. 3). SEM highlighted the correlation between host variables (ash basal area, average size and health status, total rachis density), *H. fraxineus* population variable (infected rachis density) and inoculum production (apothecia density and amount of ascospores). The year of sampling was added to evaluated the summer variability and the environment to compare the forest to hedges and small woods. The coefficient estimates were standardised in order to compare the effect of the different parameters.

To assess whether a component Allee effect was present for mating success, the relation between the apothecia production rate and *H. fraxineus* population size (infected rachis density in the litter) was studied. The fruiting rate (τ) was define as the number of apothecia produced per unit of dry weight of infected rachis present in the soil litter:

$$\tau = \frac{\alpha}{\rho}$$

where α , is the apothecia number per m^2 and ρ , the infected rachis density ($g\ m^{-2}$). Without Allee effect, τ is constant, while in presence of a component Allee effect, it should be positively correlated with the infected rachis density. The Allee effect should be most effective at low rachis density, with no density dependence above a threshold value (Allee threshold). Therefore, the relationship between τ and the infected rachis density can be modelled with a Gompertz function (Eq. 1) with the hypothesis that the fruiting rate may be zero at very low density, positively dependent in low density and reach an optimum at high density superior of Allee threshold (Fig. 2).

$$\tau = Ae^{-e^{-\frac{\mu}{\lambda}(\rho-\rho_0)+1}} \quad (1)$$

With A , the maximum fruiting rate (optimal mate encounter), μ , the maximum slope and λ , the strength of Allee effect, i.e. the value of infected rachis density under which mate encounter does not occur and no apothecia are produced. The *Allee threshold* is defined as the value of infected rachis density ρ above which

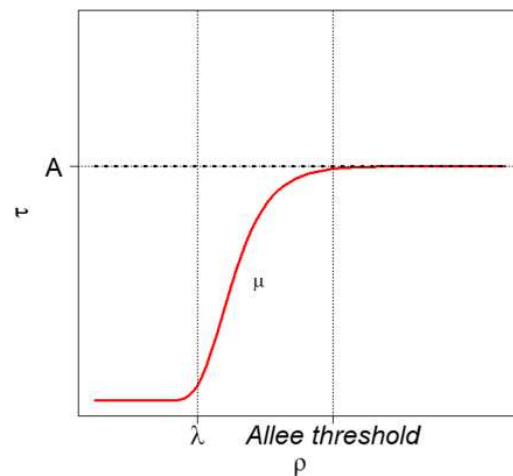


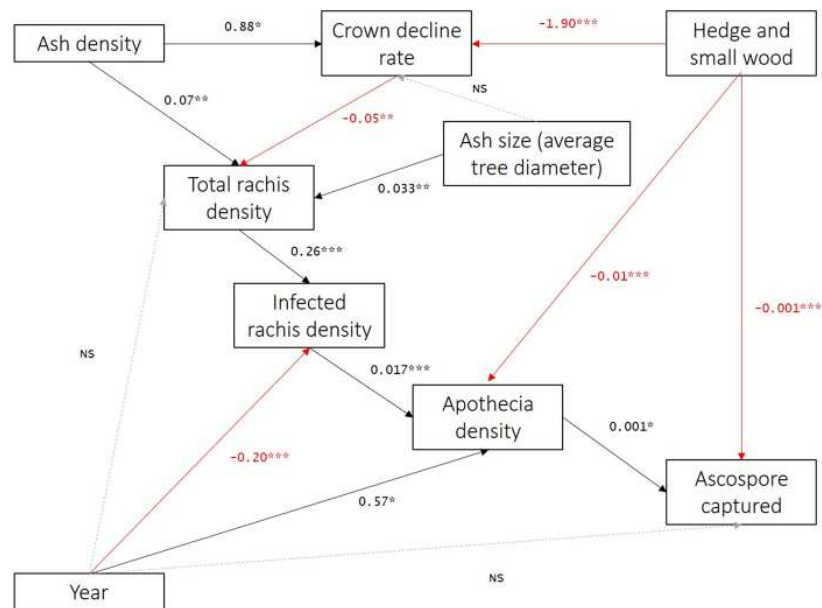
Fig. 2 Theoretic curve of (τ) with in bold dashed black line no Allee effect and in red line presence of Allee effect according to Gompertz equation. With the parameter of Gompertz equation: A as the average τ reached for density $\rho >$ Allee threshold, μ as the maximal slope and λ the minimum value of density ρ where $\tau > 0$

the fruiting rate τ is A on average and does not depend on ρ anymore (Fig. 2).

The Gompertz function was fitted in a Bayesian framework using the R2jags package. The fructification rate τ was assumed to follow a Gamma distribution with the mean following Eq. 1. Parameters A and μ were assumed to depend on environment (forest or hedge/small wood) and on a year random effect. Flat priors were assumed for the parameters: normal distribution $N(0, 0.0001)$ for parameters for A , uniform distribution $U(20, 100)$ for parameters for μ , uniform distribution $U(0, 5)$ for λ and uniform distribution $U(0, 100)$ for variance of the random factors and of the Gamma distribution. We run 3 MCMC chains for 100,000 iteration with a burn-in of 75,000 and a thin of 10. The convergence was assessed by Gelman-Rubin tests. The fit of the model was checked by comparing the mean and dispersion of observed data and of data simulated according to the model. We tested whether a significant Allee effect was present by computing the value of the Allee threshold, defined as the value of infected rachis density ρ for which average fructification rate τ reached $0.99 * A$, and assessing whether this threshold was significantly different from 0.

Evidence of a component Allee effect for an invasive pathogen: *Hymenoscyphus fraxineus*, the...

Fig. 3 Structural equation modeling (SEM) to highlight the relation between hosts parameters (ash density and total rachis density), tree health status (crown decline rate), pathogen population (rachis density infected *H. fraxineus*) and fungal inoculum production (apothecia density and captured ascospores) according to year and environment. Black line positive correlations, red line negative correlations and dotted line no correlations, the coefficients of correlation estimated were scaled with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$



The total density of rachises in the litter needed to reach the Allee threshold depends on the infection rate (Eq. 2). On the other hand, the log of total density of rachises in the litter is also proportional to ash basal area (Eq. 3).

$$I_R = \frac{A_t}{T_d} \tag{2}$$

and

$$\log(T_d) \sim AB \tag{3}$$

where I_r the litter rachises infection rate minimum to reach Allee threshold is determined by A_t the infected rachis density of the Allee threshold divided by T_d the total rachis density provided by AB , the ash basal area.

We estimated the litter rachises infection rate needed to reach the Allee threshold depending on the ash basal area AB . For that, a bootstrap procedure was used. Values for the Allee threshold were derived from the Bayesian analysis of *H. fraxineus* fruiting rate. The total ash rachis density (infected and healthy by *H. fraxineus*) was estimated depending on the ash basal area according to the Gamma fitted regression. First, 7500 set of simulated model parameters were generated assuming a multinormal distribution of the

parameters using the function `mvrnorm` of the MASS R package. Using this set of simulated parameters and average values of ash dieback rating and DBH, the total rachis density was computed for plots with an ash basal area AB from 1 to 40, and ash dieback and DBH values equal to the mean values of the studied plots. The litter rachises infection rate needed to reach the Allee threshold was then computed as the ratio between the Allee threshold and the total rachis density. We computed its mean and its 2.5% and 97.5 quantiles.

Results

Estimated values of basal area ranged from 2.2 $m^2 ha^{-1}$ to 18.3 $m^2 ha^{-1}$ with 50% of stands below 4.6 $m^2 ha^{-1}$. In hedge and small wood, this basal area was between 2.5 $m^2 ha^{-1}$ and 37.5 $m^2 ha^{-1}$ with a median of 10.7 $m^2 ha^{-1}$. Pure ash stands were no longer present in forests around Champenoux. The highest ash basal areas were observed in small wood, where ashes were concentrated in isolated small areas. The ash basal area obtained after weighting by tree cover in a 100-m radius in hedges and small woods ranged between 0.12 $m^2 ha^{-1}$ and 13.5 $m^2 ha^{-1}$ with a median at 1.8 $m^2 ha^{-1}$. The weighted range of total basal area

was between $0.12 \text{ m}^2 \text{ ha}^{-1}$ and $35.8 \text{ m}^2 \text{ ha}^{-1}$ with a median of $19.7 \text{ m}^2 \text{ ha}^{-1}$.

Weather conditions of the summer 2020 and 2021, during the apothecia production and ascospores release period (June and July), were relatively different. While average daily maximal temperature was similar ($p > 0.05$, $18.4 \pm 0.7 \text{ }^\circ\text{C}$ in 2020 and $18.6 \pm 0.6 \text{ }^\circ\text{C}$ in 2021), air humidity and precipitation were very different, with summer 2020 being drier than summer 2021 ($p < 0.001$, total rainfall in July–August of 76.0 mm in 2020 and 221.5 mm in 2021).

The SEM analysis showed strong positive relationships between the population dynamic of *H. fraxineus* and the density of its host (Fig. 3). The amount of ascospores load in air increased with the apothecia density (0.001 , $p < 0.05$), which in turn increased with the infected rachis density present in the stand litter (0.017 , $p < 0.001$). The infected rachis density depended on the total rachis density (0.26 , $p < 0.001$) which itself depended on ash basal area

(0.07 , $p < 0.01$) and ash diameter (0.03 , $p < 0.01$). Increasing crown dieback had a negative effect on total rachis density (-0.05 , $p < 0.01$). Crown dieback was more severe when ash density, i.e. ash basal area, was high (0.88 , $p < 0.05$). Thus, in dense ash stands with severe dieback, the total rachis density was reduced which could decrease the density of infected rachis. The apothecia density and the amount of ascospores captured were affected by the environment with lower values in hedges and small woods (respectively 0.01 , $p < 0.001$ and 0.1 , $p < 0.001$). The year affected the apothecia density and even more the infected rachis density (0.57 , $p < 0.05$), with lower value in 2020.

Crown decline and ashes density

A total of 302 ash trees were assessed for crown dieback, with 30% of them located in forest plots and 70% in hedge and small wood plots. The ash trees were overall in good condition with 128 trees

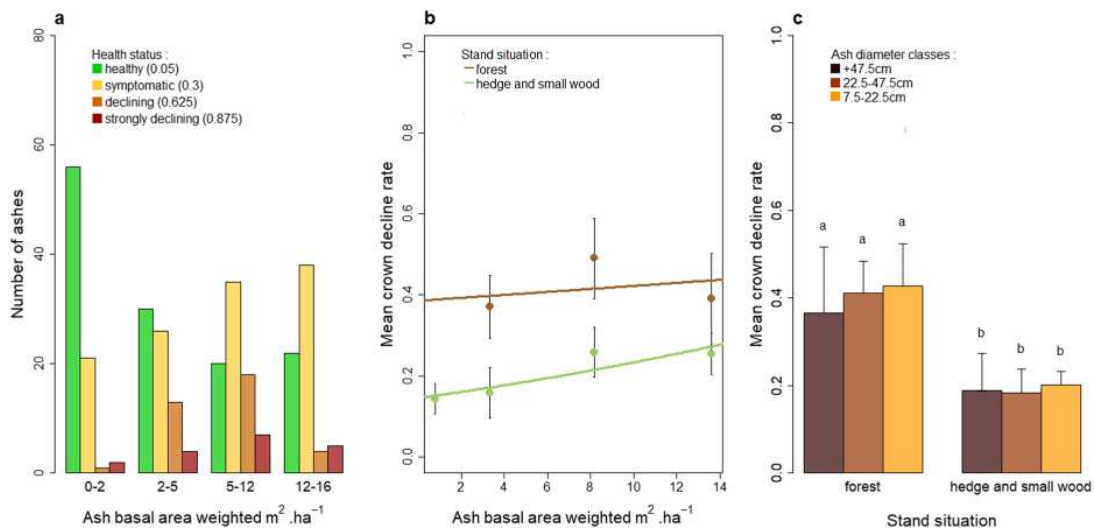


Fig. 4 **a** Ash distribution according to ash density and health status class (with median crown decline rate for each class). **b** Mean crown decline rate of the ash stand according to ash

density and the environment. **c** Mean crown decline rate in different ash diameter classes in forest and hedge and small wood

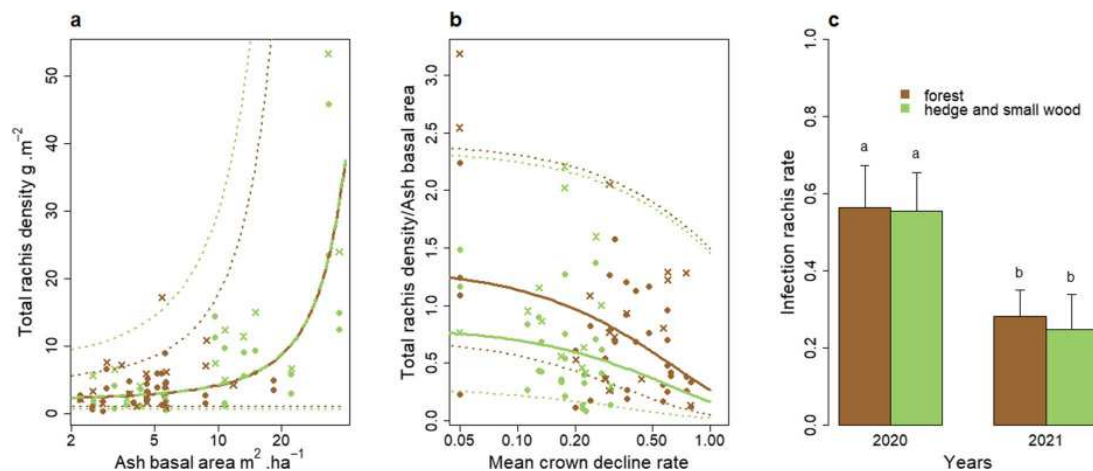
Evidence of a component Allee effect for an invasive pathogen: *Hymenoscyphus fraxineus*, the...


Fig. 5 **a** Total ash rachis density collected in the litter in forest (brown points) and in hedge and small wood (green points) according to ash density and their associated total rachis density, confidence intervals at 97.5% (dotted lines). **b** Rachis production by ashes according to mean crown decline rate for

forest situation (brown), hedge and small wood (green) and the fitted regression model (line) and confidence intervals at 97.5% (dotted lines). **c** Infection rate according to ash density for forest situation (brown), and hedge and small wood (green), for year 2020

rated as healthy, 120 trees as symptomatic and the most severe dieback classes unfrequently observed (36 trees rated as declining and 18 trees as severely declining. Healthy ashes were predominant at ash density less than 2 while the number of symptomatic and declining trees increased with ash density. Figure 4a). Indeed, the mean site crown dieback rating significantly deteriorates with increasing ash density (0.14 ± 0.01 , $p < 0.001$, Fig. 4b). Additionally, the mean crown decline was greater in forest than hedges and small woods with a mean crown dieback rating of 0.41 ± 0.05 (confidence interval, CI 95%) in forest and 0.19 ± 0.03 (CI 95%) in hedges and small woods (Fig. 4b) $p < 0.001$. Ash trunk diameter was not related to dieback severity (Fig. 4c, $p > 0.05$) and did not differ between forest and hedges/small woods.

Hymenoscyphus fraxineus population size and inoculum production

The fruiting test confirmed that the classification of rachises as infected / healthy was adequate. A total of $3.6 \pm 1.1\%$ of rachises classified as healthy produced *H. fraxineus* apothecia, while $96.0 \pm 1.2\%$ of rachises classified as infected were producers.

Total rachis density present in the litter significantly depended on ash density, mean ash

diameter and health status of ash crowns (Fig. 5). The total rachis dry weight per square meter significantly increased with the ash basal area and mean ash diameter (respective coefficients 0.07 ± 0.01 , $p < 0.001$ and 0.02 ± 0.01 , $p < 0.01$). The deterioration of ashes crowns reduced the density of rachis present in the litter (-1.25 ± 0.55 , $p < 0.05$) (Fig. 5a). The density of rachis per unit ash basal area was decreased with increasing mean crown dieback rate (-1.64 ± 0.60 , $p < 0.01$) (Fig. 5b). In hedges and small wood, the rachis production was slightly lower than in forest situation (-0.54 ± 0.24 , $p < 0.05$) (Fig. 5b). The rachis infection rate showed no relationship with the ash density ($p > 0.05$). The mean rate of infected rachis was higher in 2020 (0.55 ± 0.07) than in 2021 (0.26 ± 0.05) ($p < 0.001$ Fig. 5c). However, the infection rate was similar for plots in forest or in hedges / small woods ($p > 0.05$, Fig. 5c).

In 2020, the amounts of apothecia produced were very weak. No apothecia were observed in June 2020 and only four plots were sampled in July. In 2021, the apothecia appeared mid-June and all the sites were sampled both in June and July. In 2012, 2016, 2017 and 2020, the observed density of infected rachis was significantly higher than 2021 with a mean between 4.3 and 8.7 g m⁻² in forest and between 2.7 and

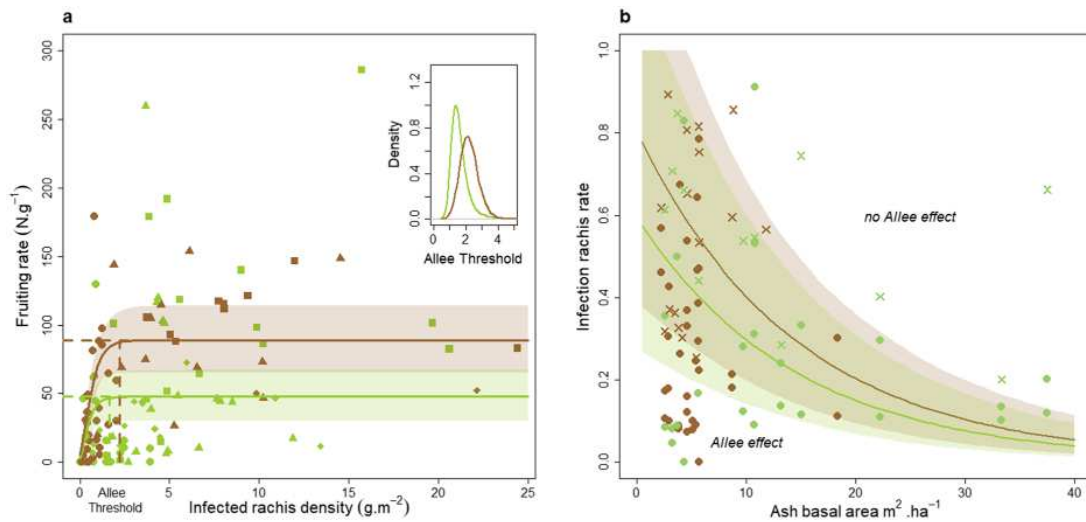


Fig. 6 a Evolution of the fruiting rate as a function of the infected rachis density. In brown, measure from forest, in green, measure from hedge and small wood with their Gompertz function associated with year 2012 (diamonds), year 2016 (squares), year 2017 (triangles) and year 2021 (circles).

b Estimated infection rate as a function of ash basal area to reach the Allee threshold in forest (brown curve) and in hedge and small wood (green curve), with measured infection rate in each situation in 2020 (cross) and 2021 (circle). Shaded areas correspond to 97.5% confidence intervals

16.0 g m⁻² in hedges and small woods (some values over 20 g m⁻² in 2012), whereas the infected rachis density in 2021 was less than 5 g m⁻² (1.3 ± 0.4 g.m⁻² in forest and 0.8 ± 0.2 g m⁻² in hedges/small woods, $p < 0.001$). The gradient of infected rachis in the litter obtained allowed us to document a dependence of the fruiting rate of *H. fraxineus* with the density of infected rachis in the litter (Fig. 6a). Indeed, the estimated Allee threshold was significantly different from 0, with very similar values in forest (1.9 CI [1–2.9] g m⁻²) and in hedges and small woods (1.5 CI [0.8–2.5] g m⁻²). Below the threshold, the fruiting rate increased significantly with the density of infected rachis ($\mu = 93.8$ CI [59.5–153.3] in forest and 63 CI [39.3–93.5] in hedges and small woods). For density values above the Allee threshold, the fruiting rate did not depend on the density of infected rachis with a mean fruiting rate given by the parameter A of the Gompertz equation. The mean fruiting rate depended on the environment with a higher value in forest (88.6 CI [52.2–124.8] apothecia g⁻¹) than in hedges and small woods (48.2 CI [30.3–65.8] apothecia g⁻¹). The parameter λ was not significantly different to 0 (0.01 CI [0–0.037]) (Fig. 6a). The rachis infection rate to reach the Allee threshold depended

on the amount of rachises produced by the ash trees present in the stand, so on ash basal area (Fig. 6b). The Allee threshold would be reached at an infection rate inferior to 0.2 for an ash basal area higher than 20 m² ha⁻¹ and need an infection rate higher than 0.5 for low ash densities (<5 m² ha⁻¹). In 2020, 72% of studied ash stands had an infection rate sufficient for a *H. fraxineus* inoculum production not subjected to the Allee effect, whereas only 27% of the ash stands exceeded the Allee threshold in 2021 (Fig. 6b).

The amount of ascospores detected in the spore traps in 2021 significantly increased with the density of apothecia observed in the plot litter in 2021 (0.01 $p < 0.05$, Fig. 7a). In addition, the quantity of ascospores detected in the spore traps in 2020 and 2021 was positively correlated with the density of infected rachis observed in the same year and also depended on plot environment and year (Fig. 7b). Indeed, the amount of trapped ascospores was higher in forests (0.26 in 2020 and 0.7 in 2021 $p < 0.01$) than in hedges and small woods for similar infected rachis density (-0.03 in 2020 and 0.4 in 2021 $p < 0.01$). Furthermore, the amount of ascospores trapped was significantly higher in 2021, than 2020 in particular

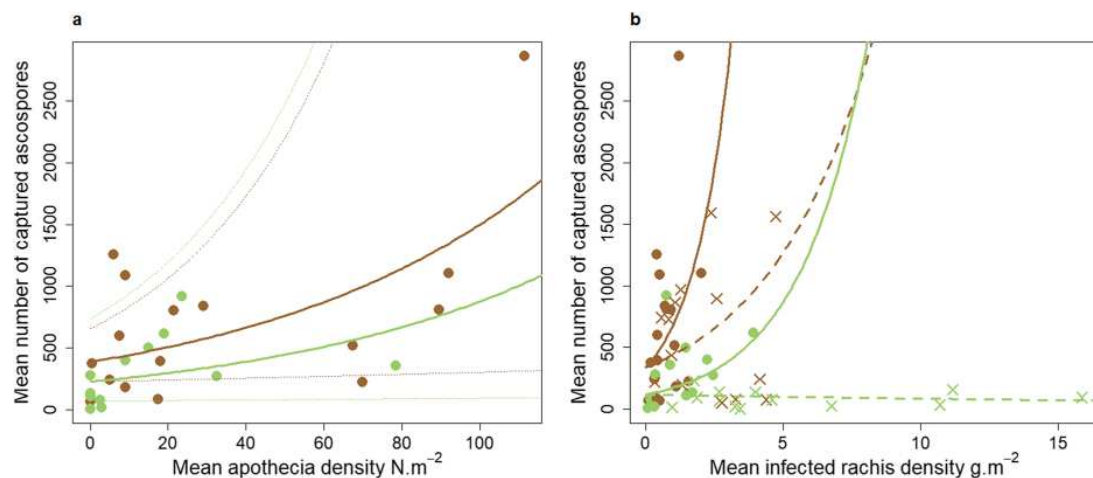
Evidence of a component Allee effect for an invasive pathogen: *Hymenoscyphus fraxineus*, the...


Fig. 7 a Mean of ascospores captured in the ash stand according to the apothecia density for the year 2021. Brown points represent forest environment and green points represent the hedge and small wood environment. **b** Relation between mean of ascospores captured and infected rachis density in

forest environment (brown) and hedge and small wood (green) during summer 2020 (cross points) and summer 2021 (circle points). Line represents the regression for 2021 and dashed line year 2020 (brown: forest, green: hedge and small wood)

in hedges and small woods where the amount of ascospores trapped was very weak (Fig. 7b).

Discussion

This study investigated the relationship between ash, its health status and the population dynamics of *H. fraxineus* in relation to the stand environment. Our results revealed that host density is an important factor in the development of *H. fraxineus* populations, their inoculum production and subsequent health impacts on ash. We show that a component Allee effect on the fruiting rate exists for this fungal pathogen and is limiting inoculum production in the ash stands studied.

The larger negative impact of *H. fraxineus* on crown health at higher ash density that we observe is consistent with what has been reported in previous studies (Grosdidier et al. 2020; Havrdová et al. 2017), although this effect could not be observed early in the ash dieback epidemic (Bakys et al 2013; Marçais et al 2016). The average crown decline measured in the present study was in the same range as the one observed in 2016 and 2017 in the same area of Champenoux (Grosdidier et al. 2020). The value

in forest was of 40% in 2016, 2017 and 2020 while in hedges and small woods, it was of 19% in 2020, slightly lower than the 20% reported by Grosdidier et al (2020) in 2016–2017. This might suggest that ash health status stabilized within the past 5 years, so less than 10 years after ash dieback was first observed in Champenoux (2010, see Grosdidier et al 2020). This seems surprising because mortality caused by ash dieback has been reported to develop late, approximately 10 years after the pathogen arrives in old trees (Marçais et al. 2017; Madsen et al. 2021) and it has been reported that ash mortality does not stabilize in the 15 first years of the epidemic (Coker et al. 2019).

Several features might explain that discrepancy. On one hand, the ash density in the studied forest is low and decreased even more as the few pure ash stands present were clear-cut for sanitary reasons between 2017 and 2020. Heavy decline and mortality occurred in the first decade of the epidemic and the logging of severely dieback trees probably removed the less tolerant ashes (Cleary et al. 2017; Børja et al. 2017; Skovsgaard et al. 2017). The remaining ashes might be more tolerant individuals which would limit dieback severity but not *H. fraxineus* presence. On the other hand, severe heat-waves and droughts

periods occurred in the area in 2015, 2018, 2019 and 2020. The development of *H. fraxineus* is strongly limited by temperature above 35 °C (Hauptman et al. 2013; Grosdidier et al. 2018a). In addition, apothecia production and ascospore release are influenced by air and soil humidity (Dvorak et al. 2016; Gross et al. 2012; Hietala et al. 2013; Kirisits and Freinschlag 2012; Schumacher 2011). Therefore, infection rate of ash rachis in the litter and the crown decline may have been reduced by high temperatures in previous summers (Grosdidier et al. 2018a). The drought observed in June and July 2020 may have prevented the apothecia production which would explain the low amount of ascospores that we observed in our spore traps in 2020 and the low proportion of rachis colonized by *H. fraxineus* in the litter 2021.

Grosdidier et al. (2020) reported that ash trees in hedges and small woods in the Champenoux area were healthier than those in forested areas and that the crown decline remained stable at about 20% from 2012 to 2018. Our data confirmed that the crown decline observed in 2020 and 2021 in hedges and small woods remained at about 20%. Furthermore, as noticed by Grosdidier et al (2020), we showed that, despite the greater decline of ash trees in forest conditions, the total amount and colonization rate by *H. fraxineus* of ash rachis in the litter were similar in hedges and small woods plots than in forest plots. Despite a similar infection rate of rachises, we observed lower apothecia production on them in hedges and small woods compared to forest locations in 2012, 2016, 2017 (Grosdidier et al 2020) and 2021. These lower apothecia production in non-forested areas, certainly due to different microclimate (lower humidity, higher temperature), may partly explain the observed difference in ash dieback severity in hedges and small woods although the infection rate of rachises does not differ between the two environments.

The demonstration that *H. fraxineus* is subjected to a component Allee effect linked to mating success offers a new insight into the invasion biology of the pathogen. Although the existence of this component Allee effect was suggested by (Hamelin et al. 2016), it has never been shown that it effectively limits inoculum production in ash stands. The Allee threshold was estimated to be of a similar magnitude in forests and in hedges and small woods (respectively, 1.9 IC [1–2.9] and 1.5 IC [0.8–2.5] g of

infected rachis m⁻²). The parameter λ was estimated to be near 0 which means that, even at very low rachis density in the litter, the mating success remains greater than zero. Thus, the observed effect can be considered as a weak Allee effect. At low ash density, a strong infection rate is necessary to reach the Allee threshold. According to our results, in an ash stands with a density lower than 5 m² ha⁻¹, the *H. fraxineus* population could be subjected to Allee effect below an infection rate of 50%. In years unfavourable to leaf infection, like 2020, such an infection rate was seldom reached.

Consequently, the development of ash dieback is highly dependent on ash density. Biodiversity can limit disease development by several mechanisms (Keesing et al 2010). First, when the population is more diverse, the density of individual species is reduced, which may limit the density of hosts and reduce disease transmission. This is the mechanism we observe. At low ash density, significant apothecia and inoculum production occurs only when the infection rate of rachis is high. However, example of disease limitation in more diverse populations for similar host densities have also been reported (Keesing et al 2010). For ash dieback, Havrdová et al (2017) suggested that the composition of the litter is important for decomposition rate of the rachises and depends on the tree species present in the stand. They showed that ash dieback was milder when ash was associated with pine or maple and was more severe when ash was associated with oaks. We did not however study these features.

The component Allee effect might be expected to reduce inoculum production when infection is scattered in newly infected areas, and thus should reduce the overall dispersion rate (Lewis and Kareiva 1993; Taylor and Hastings 2005). This is consistent with the hypothesis raised by Hamelin et al (2016) and may explain why the dispersal speed observed in France has remained constant over time, *i.e.* around 60 km per year (Grosdidier 2017). This dispersal speed is very similar to what has been observed elsewhere in Europe (between 30 and 75 km per year Børja et al. 2017; Queloz et al. 2017; Ghelardini et al. 2017). This component Allee effect might also explain why introduction of the pathogen through planting of infected seedlings can result in foci that remain limited for extended periods of time. This was observed in central

England, where dendrochronological analyses revealed the presence of *H. fraxineus* as early as 2005 in ash tree plantations remote from any other sources of inoculum, that is seven years before the pathogen was first reported in the country (Wylder et al. 2018).

In addition, the increase of the disease severity could limit the pathogen population growth. Indeed, we observed, as expected, a positive relationship between total rachis density in the litter and ash basal area. However, the rachis production also decreases with increasing crown decline: the total rachis density of declining stands was strongly reduced compared to a healthier stand. As a consequence, the suitable reproduction substrate available for *H. fraxineus* became scarcer as the dieback progressed. The density of infected rachis in the litter, which is a good measure of *H. fraxineus* population size, may also be reduced by the tree dieback. This could lead to infected rachis densities below the Allee threshold for mating success. A population density below the Allee threshold has a lower fruiting rate, the amount of ascospores release is weaker, the infection rate will decrease and this could lead local population extinction.

The last point concerns the potential impact of an Allee effect on the pathogen genetic diversity during the invasion process. Indeed, it was shown through modelling by Roques et al. (2012) that a population subjected to an Allee effect spreads as a pushed wave which results in a genetic diversity that remains stable throughout the colonization process. In this case, the bottleneck-induced loss of genetic diversity for a long-dispersal founder event is rare. Such founder events are usually characterized by low population density and strongly limit the growth of populations subject to the Allee effect (Roques et al. 2012). Noteworthy, Burokiene et al (2015) showed that *H. fraxineus* populations present in eastern Europe, in anciently colonized areas present similar genetic diversity compared to populations present on the expansion front. This is in line with the hypothesis of the invasion of Europe by pushed waves mechanism.

The management suggested to date to control ash dieback in affected stands is too thin to reduce host density (Skovsgaard et al. 2017; Enderle et al. 2019; Short and Hawe 2019). A known consequence is a drier and warmer microclimate due to the reduced tree cover which is unfavourable to ash dieback.

But, we have shown that the lower ash density also results in lower total rachis density in the litter and, as a consequence, in lower infected rachis density. This will decrease inoculum production and the Allee effect should exacerbate this mechanism. Reducing ash density to reduce the production of *H. fraxineus* inoculum should thus be beneficial to the health of the remaining ash trees. Indeed, the severity of damage is directly related to the level of inoculum present in the area. In case of high inoculum presence, the pathogen induces not only crown dieback but also collar necrosis, pathway to the establishment of other parasites such as *Armillaria spp* (Husson et al. 2012; Madsen et al. 2021; Marçais et al. 2016). The use of Allee effect to promote local extinction in eradication program has been suggest to be a promising control measure for some invasive forest insect pest (Barron et al. 2020). However, this is not possible for ash dieback because the Allee effect observe is only a weak Allee effect and because *H. fraxineus* disperses at long range, with an average dispersal distance of about 2 km (Grosdidier et al 2018b). Indeed, the eradication of *H. fraxineus* undertaken in Ireland was not successful (Baxter et al. 2022). Regarding the future of ash in Europe, it appears that after 10 years of the epidemic, some ash trees remain relatively healthy. This is partly related to the existence of ash trees tolerant toward *H. fraxineus*, which have moreover been shown to better reproduce compared to not tolerant individuals (Semizer-Cuming et al. 2019). However, the Allee effect that we observed is another partial explanation. It limits the disease severity at low ash density in particular in conditions such as hedges and small woods where microclimate is already unfavourable to the disease development.

Acknowledgements We wish to thank Olivier Caël and Arielle Beltran for his large involvement in data collection and Mireia Gomez-Gallego for here useful comments on the manuscript. The work was funded by the Homed H2020 project (grant no. 771271). The UMR1136 research unit is supported by a grant managed by the French National Research Agency (ANR) as part of the “Investissements d’Avenir” program (ANR-11-LABX-0002-01, Laboratory of Excellence ARBRE).

Author contributions The design of this study was developed by BM and SL. The data were collected by SL. The statistical analyses were performed by BM and SL. The first draft of the manuscript was written by SL and all author commented and corrected it. The final version was revised and agreed by all author.

2.1. ARTICLE 1 : EVIDENCE OF A COMPONENT ALLEE EFFECT FOR AN INVASIVE PATHOGEN : *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS*, THE ASH DIEBACK AGENT

S. Laubray et al.

Funding The work was funded by the Homed H2020 project (grant no. 771271). The UMR1136 research unit is supported by a grant managed by the French National Research Agency (ANR) as part of the “Investissements d’Avenir” program (ANR-11-LABX-0002-01, Laboratory of Excellence ARBRE).

Data availability Data available on DRYAD <https://doi.org/10.5061/dryad.83bk3j9vt>.

Declarations

Conflict of interest The authors declare to have not conflict of interests.

References

- Bakys R, Vasaitis R, Skovsgaard JP (2013) Patterns and severity of crown dieback in young even-aged stands of European ash (*Fraxinus excelsior* L.) in relation to stand density, bud flushing phenotype, and season. *Plant Protect Sci* 49:120–126. <https://doi.org/10.1722/70/2012-PPS>
- Baral H-O, Queloz V, Hosoya T (2014) *Hymenoscyphus fraxineus*, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe. *IMA Fungus* 5:79–80. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2014.05.01.09>
- Barron MC, Liebhold AM, Kean JM, Richardson B, Brockerhoff EG (2020) Habitat fragmentation and eradication of invading insect herbivores. *J Appl Ecol* 57(3):590–598
- Baxter E, Cooke LR, Spaans F et al (2022) The introduction of *Hymenoscyphus fraxineus* to Northern Ireland and the subsequent development of ash dieback. *For Pathol*. <https://doi.org/10.1111/efp.12789>
- Blackburn TM, Pyšek P, Bacher S et al (2011) A proposed unified framework for biological invasions. *Trends Ecol Evol* 26:333–339. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.023>
- Børja I, Timmermann V, Hietala AM, et al (2017) Ash dieback in Norway—current situation. In: Vasaitis R, Enderle R (eds.), *Dieback of European Ash (Fraxinus spp)—Consequences and Guidelines for Sustainable Management, Report on European Cooperation in Science & Technology COST Action FP1103 FRAXBACK*, 166–175
- Burokiene D, Prospero S, Jung E et al (2015) Genetic population structure of the invasive ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in its expanding range. *Biol Invasions* 17:2743–2756. <https://doi.org/10.1007/s10530-015-0911-6>
- Cleary M, Nguyen D, Stener LG, et al (2017) Ash and ash dieback in Sweden: A review of disease history, current status, pathogen and host dynamics, host tolerance and management options in forests and landscapes. In: Vasaitis R, Enderle R (eds.), *Dieback of European Ash (Fraxinus spp): Consequences and Guidelines for Sustainable Management, Report on European Cooperation in Science & Technology COST Action FP1103 FRAXBACK*, 195–208
- Cobb RC, Filipe JAN, Meentemeyer RK et al (2012) Ecosystem transformation by emerging infectious disease: loss of large tanoak from California forests. *J Ecol* 100:712–722. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2012.01960.x>
- Coker TLR, Rozsypálek J, Edwards A et al (2019) Estimating mortality rates of European ash (*Fraxinus excelsior*) under the ash dieback (*Hymenoscyphus fraxineus*) epidemic. *Plants, People, Planet* 1:48–58. <https://doi.org/10.1002/ppp3.11>
- Condeso TE, Meentemeyer RK (2007) Effects of landscape heterogeneity on the emerging forest disease sudden oak death. *J Ecol* 95:364–375. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01206.x>
- Desprez-Loustau M-L, Robin C, Buée M et al (2007) The fungal dimension of biological invasions. *Trends Ecol Evol* 22:472–480. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.04.005>
- Desprez-Loustau M-L, Courtecuisse R, Robin C et al (2009) Species diversity and drivers of spread of alien fungi (*sensu lato*) in Europe with a particular focus on France. *Biol Invasions* 12:157. <https://doi.org/10.1007/s10530-009-9439-y>
- Desprez-Loustau M-L, Aguayo J, Dutech C et al (2016) An evolutionary ecology perspective to address forest pathology challenges of today and tomorrow. *Ann for Sci* 73:45–67. <https://doi.org/10.1007/s13595-015-0487-4>
- Dvorak M, Rotkova G, Botella L (2016) Detection of airborne inoculum of *Hymenoscyphus fraxineus* and *H. albidus* during seasonal fluctuations associated with absence of apothecia. *Forests* 7:1. <https://doi.org/10.3390/f7010001>
- Enderle R, Stenlid J, Vasaitis R (2019) An overview of ash (*Fraxinus* spp.) and the ash dieback disease in Europe. *CABI Rev* 2019:1–12. <https://doi.org/10.1079/PAVSN.NR201914025>
- Engering A, Hogerwerf L, Slingenbergh J (2013) Pathogen–host–environment interplay and disease emergence. *Emerg Microbes Infect* 2:1–7. <https://doi.org/10.1038/emi.2013.5>
- Figuerola-Zúñiga JI, Arellano-Valle RB, Ferrari SLP (2013) Mixed beta regression: a Bayesian perspective. *Comput Stat Data Anal* 61:137–147. <https://doi.org/10.1016/j.csda.2012.12.002>
- Ghelardini L, Migliorini D, Santini A, et al (2017) From the Alps to the Apennines: possible spread of ash dieback in Mediterranean areas. In: Vasaitis R, Enderle R (eds.), *Dieback of European Ash (Fraxinus spp): Consequences and Guidelines for Sustainable Management, Report on European Cooperation in Science & Technology COST Action FP1103 FRAXBACK*, 140–149.
- Grosdidier M, Aguayo J, Marçais B, Ioos R (2017) Detection of plant pathogens using real-time PCR: how reliable are late Ct values? *Plant Pathol* 66:359–367. <https://doi.org/10.1111/ppa.12591>
- Grosdidier M, Scordia T, Ioos R, Marçais B (2020) Landscape epidemiology of ash dieback. *J Ecol* 108:1789–1799. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13383>
- Grosdidier M, Ioos R, Marçais B (2018a) Do higher summer temperatures restrict the dissemination of *Hymenoscyphus fraxineus* in France? *For Pathol* 48:e12426. <https://doi.org/10.1111/efp.12426>

Evidence of a component Allee effect for an invasive pathogen: *Hymenoscyphus fraxineus*, the...

- Grosdidier M, Ioos R, Husson C et al (2018b) Tracking the invasion: dispersal of *Hymenoscyphus fraxineus* airborne inoculum at different scales. FEMS Microbiol Ecol 94:fiy049. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy049>
- Grosdidier M (2017) Épidémiologie de la chalarose du frêne, une maladie causée par l'agent pathogène *Hymenoscyphus fraxineus*. Phd thesis, Université de Lorraine HAL Id : tel-01760779
- Gross A, Zaffarano PL, Duo A, Grünig CR (2012) Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Fungal Genet Biol 49:977–986. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.08.008>
- Gross A, Holdenrieder O, Pautasso M et al (2014a) *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. Mol Plant Pathol 15:5–21. <https://doi.org/10.1111/mpp.12073>
- Gross A, Hosoya T, Queloz V (2014b) Population structure of the invasive forest pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. Mol Ecol 23:2943–2960. <https://doi.org/10.1111/mec.12792>
- Guo Q, Fei S, Potter KM et al (2019) Tree diversity regulates forest pest invasion. Proc Natl Acad Sci 116:7382–7386. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821039116>
- Hamelin FM, Castella F, Doli V et al (2016) Mate finding, sexual spore production, and the spread of fungal plant parasites. Bull Math Biol 78:695–712. <https://doi.org/10.1007/s11538-016-0157-1>
- Hantsch L, Bien S, Radatz S et al (2014) Tree diversity and the role of non-host neighbour tree species in reducing fungal pathogen infestation. J Ecol 102:1673–1687. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12317>
- Hastings A (1996) Models of spatial spread: a synthesis. Biol Cons 78:143–148. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(96\)00023-7](https://doi.org/10.1016/0006-3207(96)00023-7)
- Hauptman T, Piškur B, de Groot M et al (2013) Temperature effect on *Chalara fraxinea*: heat treatment of saplings as a possible disease control method. Forest Pathol 43:360–370. <https://doi.org/10.1111/efp.12038>
- Havrdová L, Zahradník D, Romportl D et al (2017) Environmental and silvicultural characteristics influencing the extent of ash dieback in forest stands. Balt for 23:168–181
- Hietala AM, Timmermann V, BørjaSolheim IH (2013) The invasive ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* exerts maximal infection pressure prior to the onset of host leaf senescence. Fungal Ecol 6:302–308. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.03.008>
- Husson C, Cael O, Grandjean J-P et al (2012) Occurrence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on infected ash logs. Plant Pathol 61:889–895. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02578.x>
- Ioos R, Kowalski T, Husson C, Holdenrieder O (2009) Rapid in planta detection of *Chalara fraxinea* by a real-time PCR assay using a dual-labelled probe. Eur J Plant Pathol 125:329–335. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9471-x>
- Jules ES, Kauffman MJ, Ritts WD, Carroll AL (2002) Spread of an invasive pathogen over a variable landscape: a non-native root rot on port orford cedar. Ecology 83:3167–3181. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[3167:SOAIP0\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[3167:SOAIP0]2.0.CO;2)
- Keesing F, Belden LK, Daszak P et al (2010) Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. Nature 468:647–652. <https://doi.org/10.1038/nature09575>
- Kirisits T, Freinschlag C (2012) Ash dieback caused by *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in a seed plantation of *Fraxinus excelsior* in Austria. J Agric Exten Rural Develop 4:184–191
- Kowalski T, Holdenrieder O (2009) The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. For Pathol 39:304–308. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2008.00589.x>
- Lewis MA, Kareiva P (1993) Allee dynamics and the spread of invading organisms. Theor Popul Biol 43:141–158. <https://doi.org/10.1006/tpbi.1993.1007>
- Madsen CL, Kosawang C, Thomsen IM et al (2021) Combined progress in symptoms caused by *Hymenoscyphus fraxineus* and *Armillaria* species, and corresponding mortality in young and old ash trees. For Ecol Manag 491:119177. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119177>
- Marçais B, Husson C, Godart L, Caël O (2016) Influence of site and stand factors on *Hymenoscyphus fraxineus* induced basal lesions. Plant Pathol 65:1452–1461. <https://doi.org/10.1111/ppa.12542>
- Marçais B, Husson C, Cael O et al (2017) Estimation of Ash Mortality Induced by *Hymenoscyphus fraxineus* in France and Belgium. Balt for 23:159–167
- Marçais B, Kosawang C, Laubray S, et al (2022) Ash dieback. In: Asiebu F, Kovalchuk, editors. Forest microbiology Volume 2: Forest Tree Health. Academic Press; p. 215-237.
- McMullan M, Rafiqi M, Kaithakottil G et al (2018) The ash dieback invasion of Europe was founded by two genetically divergent individuals. Nat Ecol Evol 2:1000–1008. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0548-9>
- Milenković I, Jung T, Stanivuković Z, Karadžić D (2017) First report of *Hymenoscyphus fraxineus* on *Fraxinus excelsior* in Montenegro. For Pathol 47:e12359. <https://doi.org/10.1111/efp.12359>
- Mitchell CE, Tilman D, Groth JV (2002) Effects of grassland and plant species diversity, abundance, and composition on foliar fungal disease. Ecology 83:1713–1726. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[1713:EOGPSD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[1713:EOGPSD]2.0.CO;2)
- Paap T, Wingfield MJ, Burgess TI et al (2022) Invasion frameworks: a forest pathogen perspective. Curr for Rep 8:74–89. <https://doi.org/10.1007/s40725-021-00157-4>
- Park AW, Gubbins S, Gilligan CA (2001) Invasion and persistence of plant parasites in a spatially structured host population. Oikos 94:162–174. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2001.10489.x>
- Pautasso M, Aas G, Queloz V, Holdenrieder O (2013) European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback—a conservation biology challenge. Biol Cons 158:37–49. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.08.026>
- Przybył K (2002) Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. Forest Pathol 32:387–394. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00301.x>
- Queloz V, Hopf S, Schoebel CN, et al (2017) Ash dieback in Switzerland: history and scientific achievements. In: Vasaitis R, Enderle R (eds.), Dieback of European

2.1. ARTICLE 1 : EVIDENCE OF A COMPONENT ALLEE EFFECT FOR AN INVASIVE PATHOGEN : *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS*, THE ASH DIEBACK AGENT

S. Laubray et al.

- Ash (*Fraxinus* spp): Consequences and Guidelines for Sustainable Management, Report on European Cooperation in Science & Technology COST Action FP1103 FRAXBACK, 68–78.
- Rouges L, Garnier J, Hamel F, Klein EK (2012) Allee effect promotes diversity in traveling waves of colonization. PNAS 109:8828–8833. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201695109>
- Santini A, Ghelardini L, Pace CD et al (2013) Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. New Phytol 197:238–250. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04364.x>
- Schumacher J (2011) The general situation regarding ash dieback in Germany and investigations concerning the invasion and distribution strategies of *Chalara fraxinea* in woody tissue. EPPO Bull 41:7–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2010.02427.x>
- Semizer-Cuming D, Finkeldey R, Nielsen LR, Kjær ED (2019) Negative correlation between ash dieback susceptibility and reproductive success: good news for European ash forests. Ann Sci 76:1–9
- Short I, Hawe J (2019) Ash dieback in Ireland—a review of European management options and case studies in remedial silviculture. Irish for 75(1&2):44–72
- Skovsgaard JP, Wilhelm GJ, Thomsen IM et al (2017) Silvicultural strategies for *Fraxinus excelsior* in response to dieback caused by *Hymenoscyphus fraxineus*. Forestry (lond) 90:455–472. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpx012>
- Stephens PA, Sutherland WJ, Freckleton RP (1999) What Is the Allee effect? Oikos 87:185–190. <https://doi.org/10.2307/3547011>
- Stroheker S, Queloz V, Nemesio-Gorritz M (2021) First report of *Hymenoscyphus fraxineus* causing ash dieback in Spain. New Dis Rep. <https://doi.org/10.1002/ndr2.12054>
- Taylor CM, Hastings A (2005) Allee effects in biological invasions. Ecol Lett 8:895–908. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00787.x>
- Tobin PC, Berec L, Liebhold AM (2011) Exploiting Allee effects for managing biological invasions: exploiting Allee effects. Ecol Lett 14:615–624. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01614.x>
- Veit RR, Lewis MA (1996) Dispersal, population growth, and the Allee effect: dynamics of the house finch invasion of Eastern North America. Am Nat 148:255–274. <https://doi.org/10.1086/285924>
- Wylde B, Biddle M, King K et al (2018) Evidence from mortality dating of *Fraxinus excelsior* indicates ash dieback *Hymenoscyphus fraxineus* was active in England in 2004–2005. For an Int J for Res 91:434–443. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpx059>
- Zhao Y-J, Hosoya T, Baral H-O et al (2013) *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. Mycotaxon 122:25–41. <https://doi.org/10.5248/122.25>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Chapitre 3

Persistance de la source d'inoculum dans la litière de frêne

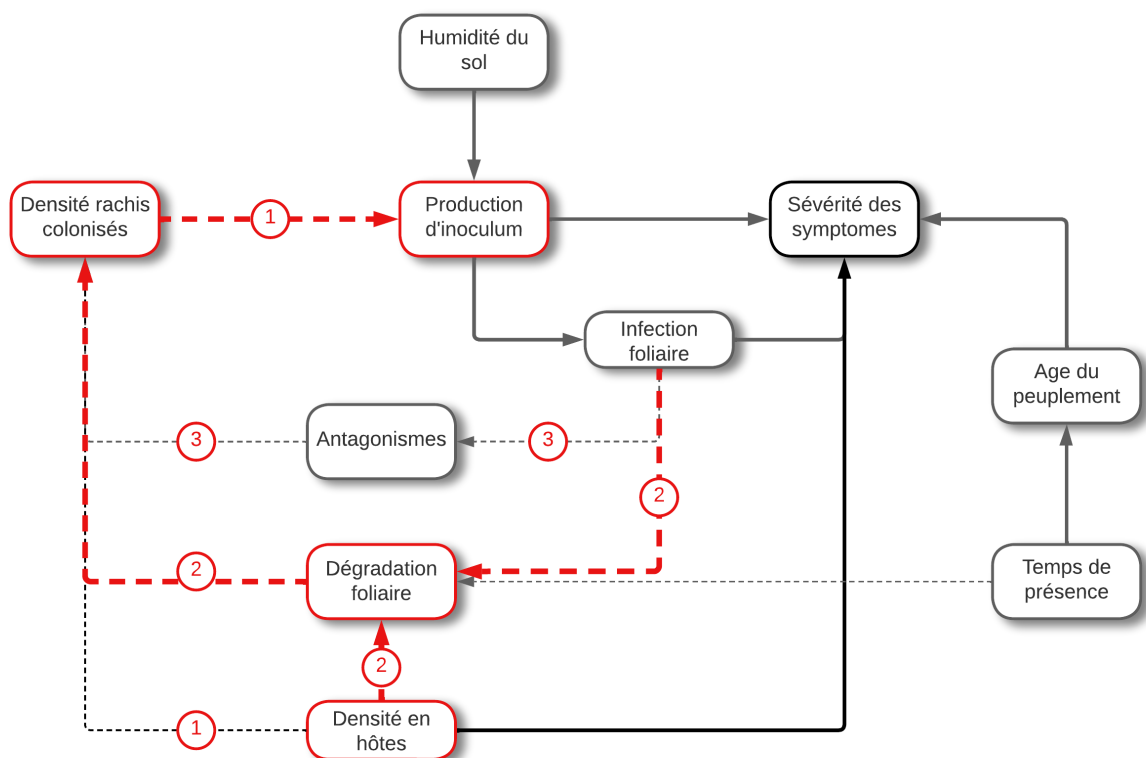


FIGURE. 3.1 — Axe 2 d'étude : lien densité hôtes - dégradation foliaire - densité de rachis colonisés - production d'inoculum

Le chapitre précédent a permis de mettre en évidence la relation entre la densité en hôte, la densité de population d'*H. fraxineus* et la production d'inoculum. Cependant, le dispositif mis en place pour cette première étude ne permettait pas de déterminer l'âge des rachis présents dans la litière. Or la cinétique de dégradation des feuilles de frêne et la persistance d'*H. fraxineus* dans la litière sont des facteurs déterminants pour la production d'inoculum. En effet, il a été démontré, dans des conditions artificielles, que *H. fraxineus* avait la capacité de produire des apothécies plusieurs années de suite. Un cumul annuel de rachis colonisés par le pathogène contribue à l'augmentation de la densité de population de ce dernier au niveau du sol et pourrait constituer un réservoir d'inoculum.

Cette deuxième étude vise donc à déterminer la cinétique de dégradation des rachis de frêne en fonction du taux d'infection foliaire à la chute des feuilles et de la densité en hôtes ainsi que la capacité du pathogène à fructifier en fonction du temps de présence dans la litière (fig.3.1). Les paramètres influençant la dégradation des litières forestières tels que le pH du sol, le C/N du sol ou le mélange des essences accompagnatrices peuvent alors jouer un rôle majeur dans la persistance du pathogène.

3.1 Article 2 : *Hymenoscyphus fraxineus* persistence in the ash litter

Le dispositif mis en place a pour but de i) suivre la cinétique de dégradation des rachis en fonction des conditions stationnelles, ii) suivre le taux de présence du pathogène lors de la dégradation des rachis et iii) quantifier la capacité du pathogène à produire des apothécies en fonction de l'âge des rachis. Pour cela, les rachis ont été récoltés à la chute des feuilles dans divers peuplements à l'automne 2019, 2020 et 2021 puis placés dans des filets (mailles en losange de 2mm) laissant entrer les macroinvertébrés et installés dans la litière des peuplements d'origines (fig. 3.2). Pour la cohorte de 2019, un tiers des rachis est resté sur site durant 6 mois, un tiers pendant 18 mois et le dernier tiers 36 mois. Pour la cohorte de 2020, la moitié des rachis est restée 6 mois et l'autre 18 mois et enfin la cohorte de 2021 est restée seulement 6 mois. Pour chaque cohorte, un lot de rachis a été ramené au laboratoire au moment de la récolte afin de quantifier l'infection foliaire. Lorsque les rachis sont retirés de la litière, un tiers est mis en chambre humide afin de déclencher l'apparition des apothécies d'*H. fraxineus* ; puis ils sont triés en fonction de leur aspect porteur ou non d'*H. fraxineus*, séchés et pesés. Les deux tiers restants sont directement triés, mis à sécher puis pesés. Les peuplements d'origine sont caractérisés par leur composition (surface terrière de chaque essences présentes), par leur type d'humus et la composition physico-chimique du sol.

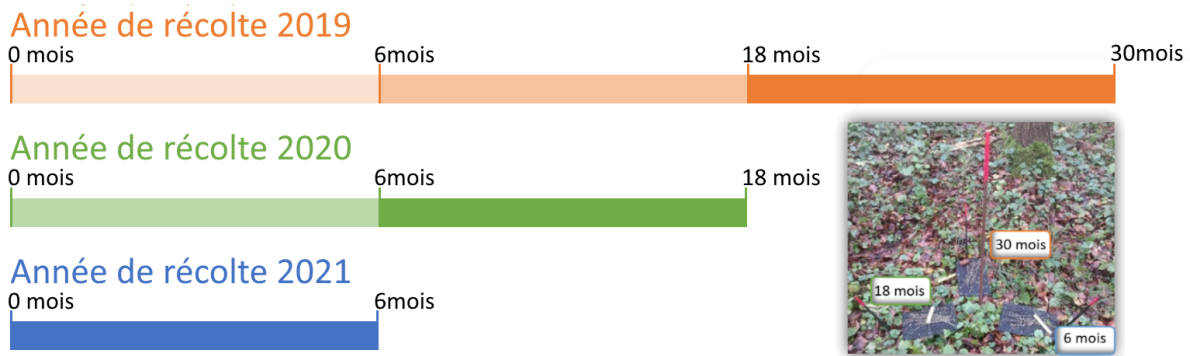


FIGURE. 3.2 – Chronologie de collecte des sacs contenant les rachis des différentes cohortes. La photo illustre la situation au printemps 2022 avec l'âge des rachis de chaque cohorte.

Une partie des mesures réalisées a eu lieu parallèlement à celles de l'étude précédente avec l'aide d'Olivier Caël et Arielle Beltran pour la première année puis celle de Gabrielle Laval (main d'oeuvre occasionnelle) la deuxième année et enfin celle de Nelly Peracchia (stage de L3) et Arnaud Giraudel (Stage de M2) la dernière année. Les résultats de cette étude ont été retranscrits dans l'article suivant intitulé "*Hymenoscyphus fraxineus* persistence in the ash litter" soumis prochainement à la revue Forest Pathology.

Hymenoscyphus fraxineus persistence in the ash litter

Simon Laubray; Marc Buée; Benoit Marçais
Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000 Nancy, France.

Abstract

The foliar pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* is known to be responsible for the epidemic of ash dieback in Europe. The life cycle of this pathogen involves a saprotrophic phase on ash leaf residus (rachis) during the winter within the forest litter. In late spring, the fungus undergoes reproduction on the rachis and produces apothecia that release ascospores to infect ash leaves. Prior studies reported that, *H. fraxineus* was able to produce apothecia on rachis for 5 years after the leaf infection in artificial condition. However, ash litter is known to decay rapidly *in situ*. We therefore monitored the decomposition kinetics of ash leaves debris and the pathogen persistence *in situ*, as well as its ability to produce apothecia in the forest litter. In this aim, leaves shed in autumn in stands affected by ash dieback were placed in mesh bags and left *in situ* in the forest litter for 6, 18 and 30 months. At each sampling time, the loss of litter mass and the level of colonisation by *H. fraxineus* of leaves residuals (rachis) were measured as well as the ability of the pathogen to produced apothecia in them. The results showed that, after 30 months, about 20% of the rachis dry weight remained in the mesh bags and that the pathogen retained the ability produces apothecia from these rachises thus representing an inoculum reservoir. A simulation estimating the age composition of the colonised rachis present in the litter during the fruiting period was developed from these results. This shows that persistence of *H. fraxineus* in old litter rachis represents an inoculum reservoir that could compensate for the low colonization of autumn leaves and relaunch the local epidemic after years that were temporarily unfavourable to the pathogen's development.

Keywords:

¹ *Hymenoscyphus fraxineus*, pathogen persistence, inoculum reservoir

² 1 Introduction

³ Ash dieback is the most serious epidemic in European forests in recent decades. It started in the 1990s
⁴ in Poland (Kowalski, 2006; Przybył, 2002) and has now spread to almost the entire *Fraxinus excelsior*
⁵ distribution area representing most European countries including the UK and Ireland, where it was first
⁶ detected in 2012 and most recently northern Spain (Stroheker et al., 2021). The impact of ash dieback on
⁷ European forests has been devastating. Mortality was estimated to reach up to 60% (Coker et al., 2019),
⁸ leading to significant losses in biodiversity and ecosystem services. Ash trees are an important component
⁹ of many European landscape, whether it is in forests or in hedges, and provide habitat for a wide range of
¹⁰ wildlife (Mitchell et al., 2014). Trees of all ages are affected (Madsen et al., 2021; Skovsgaard et al., 2010).

11 The youngest are more susceptible and die quickly, 65% mortality observed in 10-years-old ash trees after
12 10 years of disease arrival. For older trees, the dieback is slower with 25% mortality observed after 10 years
13 (Madsen et al., 2021).

14 The disease is caused by the fungus *Hymenoscyphus fraxineus* (Kowalski, 2006), which probably arrived
15 from Northeast Asia (Sønstebo et al., 2017; Zhao et al., 2013) and caused leaf necrosis, branch mortality and
16 crown necrosis. The ascospore of *H. fraxineus* are released during the summer (Timmermann et al., 2011),
17 germinate on leaf surface and penetrate into the tissues during the rest of the growing season. In autumn,
18 after leaf fall, *H. fraxineus* continues to develop in the remaining leaf tissue consisting of the central vein and
19 the petiole without the leaflets hereafter referred to as the rachis. In winter, the pathogen creates a black
20 pseudoclerotial plate in the rachis tissue. In late spring, the pathogen realises sexual reproduction on rachises
21 with a pseudosclerotial plate (referred to as pseudosclerotial rachis) and produce apothecia which release the
22 ascospores that contaminate new leaves. As apothecia only form on pseudosclerotial rachises (Gross et al.,
23 2012), these are essential for the pathogen inoculum production and persistence.

24 The pseudosclerotial rachis is functionally equivalent to a sclerotia. In fungi kingdom, the sclerotia is
25 a protective structure that helps the fungus to survive difficult conditions such as frost, desiccation, enemy
26 attack or microbial competitions and allows the persistence of the organism (Coley-Smith & Cooke, 1971;
27 Townsend & Willetts, 1954; Willetts, 1971). This ability is found in many fungal phylogenetic lineages
28 and functional guilds and is widespread among pathogen (Smith et al., 2014). It was demonstrated that
29 *H. fraxineus* is able to persist and produce apothecia on pseudoclerotial rachis for up to five years (Gross &
30 Holdenrieder, 2013; Kirisits, 2015). However, this persistence was observed in artificial conditions (plastic box
31 in a garden) and not studied *in situ*, in the forest litter. More over the dynamic of pseudosclerotial rachises
32 decay was not quantified precisely and it is not known whether it is different from non pseudosclerotial
33 rachises. Ash leaves are known to decay rapidly in the forest litter compared to other tree species such as
34 oak or beech leaves (Slade & Riutta, 2012), because of a lower C/N and lignin/N ratio (Riutta et al., 2012;
35 Steffens et al., 2012). Ash leaves decay 1,5x faster than oak leaves (Riutta et al., 2012). Moreover, the kinetic
36 of ash leaves decay is affected by the stand composition. In mixed stands with beech or oak, ash leaves decay
37 rate is slower compared to stand dominated by ash trees (factor of 1.3) (Dahlsjö et al., 2023).

38 Nevertheless, the ability of *H. fraxineus* to persist on old pseudosclerotial rachises in the litter should
39 be an important factor for inoculum production. As for seed banks in plant populations, the persistence
40 of pseudosclerotial rachises would constitute an inoculum reservoir and could be a key element to boost the
41 epidemic of this invasive pathogen. The role of the seed bank as a reservoir of propagules has been described
42 in invasive plants as an advantage for population establishment (Gioria et al., 2012; Gioria & Pyšek, 2016;
43 Pyšek et al., 2015), allowing the plant to survive unfavorable conditions and constituting a reservoir limiting
44 genetic erosion (Levin, 1990; Mandák et al., 2012).

45 The aim of this study was thus to better document the dynamic of *H. fraxineus* persistence in the forest
46 litter and its ability to produce apothecia during several years. We tested the hypothesis that i. decay of
47 ash rachises extend over several years *in situ* in the forest litter. ii. the pseudosclerotial plate formed by
48 *H. fraxineus* slows down the decay of colonized rachises compared to the non-colonized. iii. the ability of

49 pseudoclerotial rachises to produce apothecia remains constant over the years. For this purpose, we monitored
50 the decay kinetic, the level of colonization by *H. fraxineus* and the fruiting potential of different rachis cohorts
51 placed in the forest litter over several years and their relationship with stands and site parameters.

52 2 Material and method

53 2.1 Plot characterization

54 Four sites were selected in north-eastern France for this study (Sélestat, Languimberg, Thionville and Cham-
55 penoux). All present ash trees were *Fraxinus excelsior*. In each site, a plot was set-up in two types of ash
56 stand, one with a high density of ash trees and one with a low density. At maximum 20 m from the plot
57 center, three sub-plots were set-up near the bases of ash trees (at least 20 m between the sub-plots). Plots
58 were characterized by their total basal area, tree diversity, ash density (basal area of ash), density of ash
59 rachises in the litter, health status of ashes, soil chemistry and type of humus.

60 The basal area was estimated within three concentric circle. The diameter at breast height (DBH) of
61 all tree stems larger than 7.5 cm was measured inside a first 7 m radius circle, the DBH of trees with stem
62 superior to 22.5 cm in a second circle of 16 m radius, and DBH of trees with stem superior to 47.5 cm in a last
63 circle of 21 m radius. The basal area in $\text{m}^2 \cdot \text{ha}^{-1}$ was the sum of the area of individual stems at breast height
64 weighted by the area of the sampling circle. The species of the measured trees was determined and the tree
65 diversity was calculated from the basal area of each species present on the plot. Ash density was the basal
66 area of the sampled ash trees. The health status was estimated by scoring the level of crown decline of ash
67 trees. This scoring considers the percentage of branch mortality: 5, 0-10% healthy, 30, 10-50% symptomatic,
68 62.5, 50-75% declining and 82.5, > 75% heavily declining.

69 Rachis density in the litter was measured in 2020 and 2022 within ten 0.1 m^2 areas distributed along
70 two 10 m perpendicular transects (Laubray et al., 2023). The operation was repeated on each of the three
71 sub-plots in each stand. Rachises collected were dried for 48h at 55°C and weighed. The rachis density was
72 the mean of the 3 samples and expressed in $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$. The rachis density was divided by the ash density to
73 compute the mass of rachis per ash basal area.

74 Soil was sampled in the top 20 cm using an auger at each of the three sub-plots in each plot. The samples
75 were dried for 8 days at 35°C , sieved to 2 mm. Sub-sample of 300 g for each soil sample were sent to the LAS
76 analysis platform (Arras, France) to measure the pH in KCL, particle size distribution, amount of Carbon and
77 of Nitrogen. The soil texture was expressed by the sand versus clay ratio of the determined by the particle
78 size distribution. The efficiency of organic matter degradation in the litter was assessed by characterizing the
79 humus. This was done according to a humus determination key (Brethes et al., 1995; Jabiol et al., 2007).

80 2.2 Study design

81 Ash leaves were collected from late November to early December in 2019, 2020 and 2021, just after they had
82 fallen. An annual rachis sampling will subsequently be referred to as a cohort. The leaflets were removed

83 to keep only the rachis (petiole + central vein). Each year, a set of 30 rachises per plots (10 per sub-plot)
84 was immediately brought back to the laboratory to be dried at 55°C for 48h and weighed. The rachises were
85 the grounded and DNA extracted and the level of *H. fraxineus* was quantified by qPCR (Laubray et al.,
86 2023). For the 2019 cohort, nine sets of 20 rachises were placed in mesh bags and left *in situ* (3 at each of
87 the sub-plot). The litter was brushed away, the mesh bag was placed directly on the soil and maintained
88 in place with a stake and the litter was placed back on the mesh. One mesh bag per sub-plot was sampled
89 in May after 6 months, 18 months and 30 months incubation in the forest litter. For the 2020 cohort, six
90 sets of 20 rachises were incubated in the litter *in situ* using the same method and sampled after six months
91 and 18 months while for the 2021 cohort, only three sets were incubated in the litter during 6 months. Once
92 the mesh bags were collected from the plots, the rachises from the three mesh bags of a plot x cohort x age
93 combination were pooled and separated in two samples. One third of them (n=15) were placed in a wet
94 chamber to estimate their potential to produce *H. fraxineus* apothecia. After the end of this fruiting assay,
95 they were dried at 55°C for 48h and weighted. The remaining two thirds were dried at 55°C for 48h, weighed
96 and analyzed by qPCR to determine their colonization by *H. fraxineus*. The total mass of rachis contained
97 in each mesh bag was computed as the sum of the dry weight of rachises used for the fruiting test and for
98 *H. fraxineus* quantification by qPCR.

99 **2.2.1 Fruiting potential and colonization rate**

100 For each plot x cohort x age combination, fifteen rachises from mesh bags were placed in a wet chamber for 8
101 weeks at ambient temperature (for a total of 720). The bottom of the wet chamber was covered with paper
102 towel soaked in osmotic water and it cover was perforated to allow oxygenation. Every week, the number of
103 apothecia was counted, the wet chamber was disinfected with 70% alcohol and the paper towel was changed.
104 After 8 weeks, the rachises were sorted according to their colonization status. Rachises that had developed
105 pseudosclerotial plates (black melanized plectenchyma) were considered to be colonized by *H. fraxineus* while
106 those without were considered as non-colonized. Sorted rachises were dried and weighed. The colonization
107 rate was the dry mass of colonized rachis divided by the total mass. The fruiting potential was defined as
108 the maximal number of apothecia counted per week divided by the colonized rachis dry weight (Number of
109 apothecia.g⁻¹).

110 **2.2.2 *H. fraxineus* level in rachises**

111 The rate of colonisation of rachises by *H. fraxineus* was quantify by qPCR. For this, the dried rachises were
112 cut in piece of 5 mm long and grounded with pestle and porcelain mortar containing liquid nitrogen. From
113 the powder obtained, 3 x 20 mg from each plot x cohort combination were put into microtube of 2 ml with
114 two tungsten beads of 3 mm. The DNA extraction was performed with the DNeasy plant minikit provide
115 by Qiagen with some adjustments: 15 mg of PVPP were added for lysis phase and 200 µl of Guanidine
116 thiocyanate were added for DNA precipitation phase to eliminate eventual inhibitors of polymerase. The
117 elution volume was of 200 µl. Before qPCR, sample was diluted to the tenth with H₂O. The level of
118 infection by *H. fraxineus* was determined with the qPCR method developed by Ioos et al. (2009). The 15

119 μl reaction mixture contained 1x Brilliant II qPCR master mix and 0.03 μM ref dye supplied by Agilent
120 Technologies. 0.01 U. μl^{-1} of UDG (New England BioLabs) was added. 0.3 μM each Cfrax primers (Cfrax-
121 F, 5'-ATTATATTGTTGCTTTAGCAGGTC-3' and Cfrax-R, 5'-TCCTCTAGCAGGCACAGTC-3'), 0.1 μM
122 Cfrax-probes (Cfrax-P, 5'-FAM-CTCTGGGCGTCGGCCTCG-BHQ1-3') and 2 μl template DNA. The real
123 time reaction was performed in a Quantstudio 6 thermocycler (Applied Biosystem). The qPCR reaction was
124 initiated by first pre-cycling step at 37°C for 10 min for UDG activation and the initial denaturation step
125 at 95°C for 15 min followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec and hybridization /elongation
126 at 65°C for 55 sec. A plasmid DNA solution containing the CFRA region of the *H. fraxineus* genome was
127 cascade diluted by a factor of ten from 16.4 ng. μl^{-1} of DNA to 1.64x10⁻⁷ ng. μl^{-1} of DNA. This calibration
128 serial dilution was then added to the qPCR tests to quantify *H. fraxineus* DNA.

129 2.2.3 Statistical analysis

130 The tree species composition of the stands was compared by Principal Component Analysis (PCA) with the
131 basal area of each tree species. Humus type, soil pH, soil C/N, soil texture, ash crown decline and rachis
132 density per ash density were added to the PCA as supplementary variables.

133 The data of from a plot x cohort x age combination was standardized by dividing it by the dry weight at
134 leaf shedding of 60 rachises from the same cohort and the same plot. The value is thus in the [0, 1] interval
135 and is an estimate of how much of the original rachis weight remained at each sampling time. The weight loss
136 was modelled by mixed glm with a logit link and a beta distribution. The fixed effect is the rachis age (time
137 of incubation the the forest litter, in month) and some plot characteristics (humus type, ash basal area) and
138 the random factor were the plot and the cohort (year in which cohort was collected in autumn and origin
139 plot). Half-life time, corresponding to the number of months needed to reach 50% of the original dry weight
140 was computed. To assess whether pseudosclerotial rachises decayed at the same rate as non-pseudosclerotial
141 rachises, we assumed that the initial colonization rate was the same for all samples of a cohort, whether left
142 in the litter for 6, 18 or 30 months and we used the colonization rate after 6 month in the litter to characterize
143 each cohort (3 cohorts x 8 plots). We then introduced this initial colonization rate as a fixed effect in the
144 previously described mixed model to assess the effect of the colonization rate on the dry weight dynamic.

145 The quantification of *H. fraxineus* DNA by qPCR and the colonization rate of rachis between cohort, age
146 and humus type were analysed by a mixed glm (gamma distribution with a log link and beta distribution
147 with a logit link respectively) with the plot of origin as a random effect. Fruiting rate as a function of rachis
148 age and humus type was estimated using a mixed glm (gamma distribution with a log link) with cohort and
149 plot of origin as random effect.

150 We developped a simple model to assess the annual cohort composition of ash rachises colonized by
151 *H. fraxineus* in spring in the litter of an hypothetic stand located in Champenoux and shedding the same
152 amount of ash rachises each autumn. We assumed that the colonization of the rachises shedded in autumn
153 in a cohort would depend only on the climate of the preceeding summer. It was shown in Marçais et al.
154 (2023) that the proportion of rachises shed in autumn that are colonized by *H. fraxineus* in the next spring

155 (p) increases with July-August rainfall (Rain78) according to the equation :

$$\text{logit}(p) = 0.35 + 0.98 * \text{Rain78}$$

156 . This equation was used to estimate the level of colonization of fallen rachises each autumn, assuming,
157 for simplicity, that the inoculum the trees are exposed to just depends on climate and not on the amount
158 of colonized ash rachis in the litter in the stand and the vicinity. The proportion of rachises produced
159 in a cohort each autumn then decayed at the rate modelled during this work. We assumed that rachises
160 colonized or non-colonized by *H. fraxineus* decay at the same rate, which is an acceptable hypothesis (see
161 results). We used a boot strap procedure. For each prediction, a set of model parameters was generated
162 for both the colonization rate of rachises shed in autumn and the decay rate in the litter models. This was
163 done assuming a multi-normal distribution for the model parameters using the parameter fitted values and
164 variance-covariance matrix (function `mvrnorm` of R). A prediction of the colonization rate of each cohort of
165 rachises shed in autumn was done using rainfall data of the Champenoux INRAE meteorological station for
166 2013-22. The proportion of colonized rachis remaining after 6, 18, 30 and 42 months was computed for each
167 annual cohort of rachises. Then the proportion of colonized rachises of 6, 18 and ≥ 30 months-old in the
168 litter was computed each year in May. This bootstrap procedure was repeated 10000 times.

169 3 Results

170 The ash stands selected for this study had an ash basal area between 1.1 m².ha⁻¹ and 18.4 m².ha⁻¹ with
171 an average of 8.1 m².ha⁻¹ and a total basal area between 10.4 m².ha⁻¹ and 36.7 m².ha⁻¹ with an average
172 of 21.6 m².ha⁻¹. Other trees species in the stands were oak (*Quercus petraea* and *Q. robur*) and hornbeam
173 (*Carpinus betula*) for four plots, maple (*Acer pseudoplatanus*), lime tree (*Tillia cordata*) for two plots while
174 the remaining two plots were pure ash stands. Soil parameters found in the different stands varied in terms
175 of pH (between 4.7 and 7.1, median at 6) and C/N ratio (between 10.6 and 14.2, median at 12.5). Soil
176 textures showed a dominance of clay over sand with values of clay/sand ratio of less than 1 (range 0.09-0.46,
177 median 0.29). The humus types were related to tree species present. The type of humus with the highest
178 organic matter degradation efficiency (eumull) were found in stands with high density of ash, lime and maple
179 while humus type with less efficient organic matter degradation was found in stands with a high density of
180 oak and hornbeam (Fig. 1). The soil characteristics were related to the type of humus. The eumull were
181 found on soil with a higher value of pH, lower value of C/N ratio and soil texture. On the contrary, oligomull
182 and mesomull were found on a more acidic soil, with a higher C/N ratio and soil texture (Fig. 1). The
183 ratio of rachis density per ash density depends on the humus type. It is lower in stand with a eumull than in
184 those with mesomull (pvalue<0.001) or oligomull (pvalue<0.001) whereas no difference was observed between
185 mesomull and oligomull (pvalue=0.7). Thus, less rachises were present in the litter at comparable ash density
186 in faster decaying humus type. For 1 m².ha⁻¹ of ash basal area, the density of rachis was 2 times lower in the
187 eumull litter compared to mesomull and oligomull. At the same time, crown decline increased significantly

CHAPITRE 3. PERSISTANCE DE LA SOURCE D'INOCULUM DANS LA LITIÈRE DE FRÊNE

188 with basal ash surface (coef 0.1 ± 0.04 pvalue <0.01) with no significant difference between the humus type
 189 (pvalue= 0.128). However, the eumull litter was found in stands with higher ash density (Fig. 1).

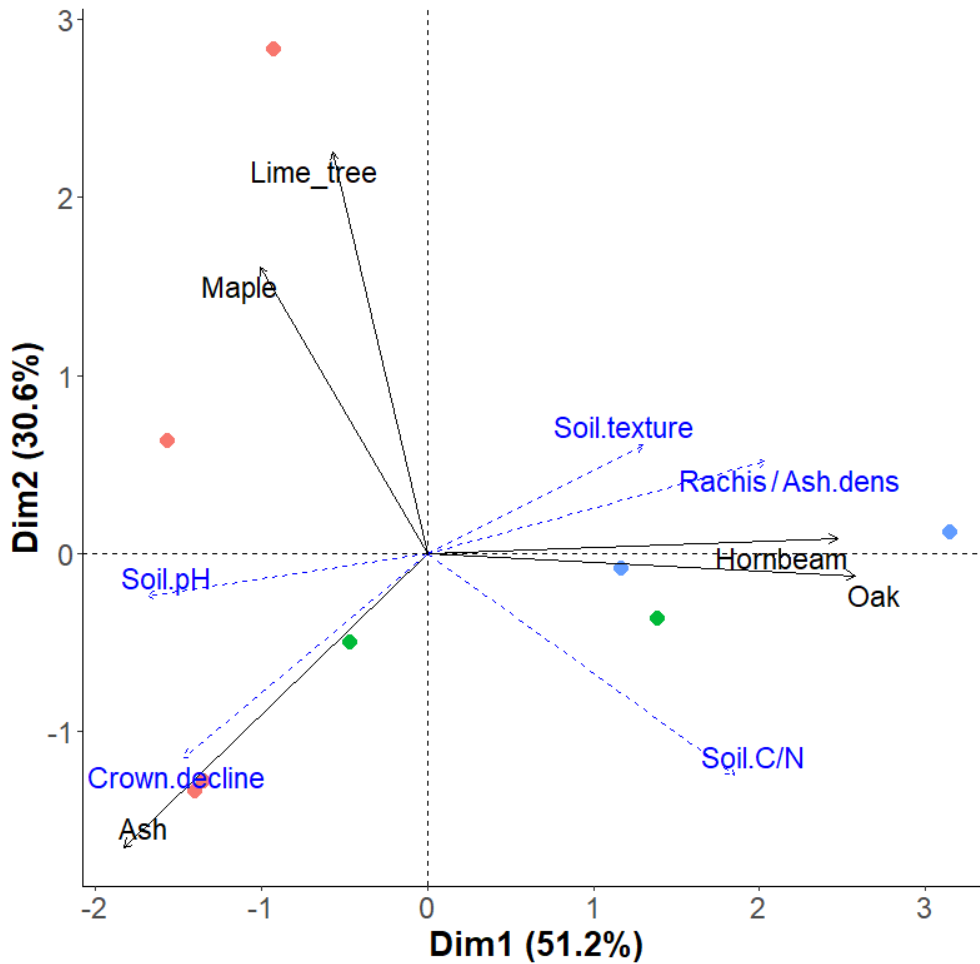


Figure 1: Principal component analysis constructed with basal area of each tree species present in the studied stands with as quantitative supplemental data the soil pH, soil C/N ratio, the soil texture, the crown decline of ash and the ratio rachis density/ash density (Rachis / Ash.dens) represented by blue arrows and as qualitative supplemental data the humus type present in the stand (Eumull in red, mesomull in green and oligomull in blue).

190 We observed a progressive degradation of the rachis in the litter (Fig. 2). After 6 months in the forest
 191 litter, the rachises still appeared intact, whereas after 18 and 30 months they were strongly fragmented.
 192 Nevertheless, after 30 months, the rachises remaining in the mesh bags still represent 0.14 (CI 0.05) of the
 193 dry weight of those initially present. Modelling of the degradation kinetics enabled us to estimate the half-
 194 life of the rachises in the litter at 6.9 months [4.3-12.4]. Ash density had no effect on rachises degradation
 195 dynamic, with residual rachis rate comparable between low and high ash density for each rachis age (Fig.
 196 3a). However, the type of humus present in the stand litter had an effect on the residual rachis rate. Indeed,
 197 after 30 months in the litter, the residual rachis rate was significantly lower (coef 1.6 pvalue $9.8 \cdot 10^{-3}$) in

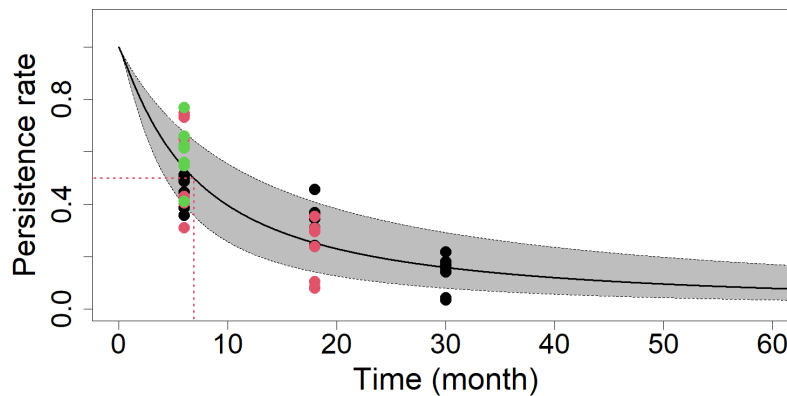


Figure 2: Kinetics of rachis degradation in the litter. Proportion of rachis dry weight remaining (Persistence rate) in the litter as a function of the time the rachis were in the litter for the three cohorts of rachis (black:2019, red:2020 and green:2021), modelled kinetics represented by the curve and the confidence interval by the area (the estimated half-life is highlighted by red segments).

198 eumull (mean of 0.10 ± 0.06) than in mesomull and oligomull (mean of 0.18 ± 0.03) (Fig. 3b). The rate of
 199 rachises degradation was not significantly related to the initial colonization rate of *H. fraxineus* as assessed
 200 by the proportion of pseudoclerotial rachises at 6 months (pvalues for the main effect of initial *H. fraxineus*
 201 colonization rate and its interaction with incubation time in the litter of 0.85 and 0.46).

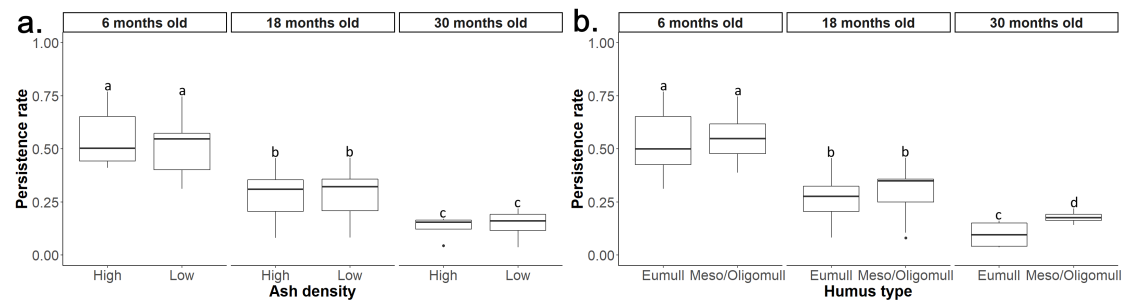


Figure 3: Influence of stand characteristics on rachis degradation. a. Persistence rate of rachises in different ages as a function of ash density. b. Persistence rate of rachises in different ages as a function of humus type.

202 The DNA quantity of *H. fraxineus* in rachises at the leaf shedding was different between the three analyzed
 203 cohorts. The amount of *H. fraxineus* DNA detected by qPCR was similar (pvalue = 0.57) in the 2019 ($8.6.10^{-6} \pm 9.4.10^{-6}$ ng.mg⁻¹) and 2020 cohorts ($4.5.10^{-6} \pm 4.3.10^{-6}$ ng.mg⁻¹). In the 2021 cohort, the measurements
 204 of *H. fraxineus* DNA in rachises were higher with an average value of $3.7.10^{-5} \pm 2.2.10^{-5}$ ng.mg⁻¹ (pvalue <
 205 0.05)(fig4.a). The rachises colonization rate was strongly correlated with the quantity of *H. fraxineus* DNA
 206 measured by qPCR (pvalue < 0.001). In addition, the DNA quantification measured in autumn within fallen
 207 leaves was a good predictor for the level of colonization of rachis 6 months later in a given year (coef 0.13
 208 ± 0.04 pvalue < 0.001, figure S1). However, this strongly depended on the year: Figure 4 shows that with
 209 similar low level of *H. fraxineus* detected in autumn rachises, the colonization in spring was very different
 210 for the 2019 and 2020 cohorts. After 6 months in the litter, the 2019 and 2021 rachis cohorts showed
 211 similar colonization rates (respectively 0.43 ± 0.15 and 0.39 ± 0.10 , pvalue= 0.5), while the 2020 cohort
 212 similar colonization rates (respectively 0.43 ± 0.15 and 0.39 ± 0.10 , pvalue= 0.5), while the 2020 cohort

CHAPITRE 3. PERSISTANCE DE LA SOURCE D'INOCULUM DANS LA LITIÈRE DE FRÊNE

213 was significantly less colonized (0.20 ± 0.17 pvalue < 0.001). The colonization rate decreases with rachis age
 214 for the 2019 cohort (mean of 0.30 ± 0.20 at 18 months and 0.18 ± 0.18 at 30 months, coef = -0.05 pvalue <
 215 0.001), while it remained stable for the 2020 cohort (mean 0.25 ± 0.65 at 18 months pvalue = 0.5).

216 The *H. fraxineus* DNA quantification at leaf fall and the colonization rate were not significantly related
 217 to humus type (respective pvalue = 0.96 and 0.77).

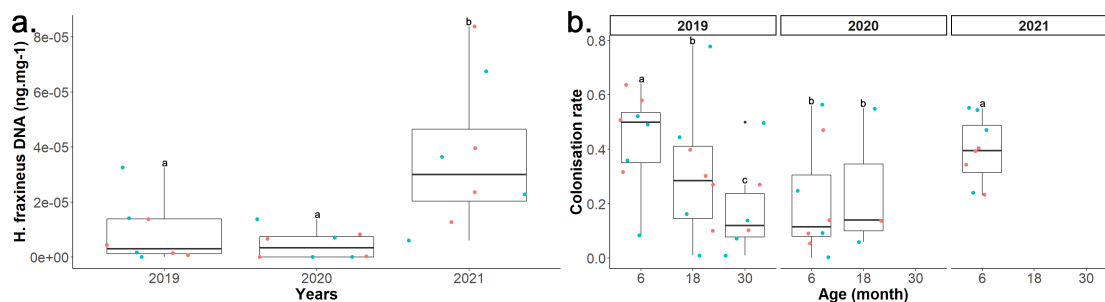


Figure 4: Level of *H. fraxineus* in rachises cohorts of the ash stands. a. Quantification of *H. fraxineus* DNA in rachis tissues just after fallen leaves during the three years of the study. b. Evolution of the rate of *H. fraxineus* colonization in the rachises of the three studied cohorts at different ages. (Red point: rachises from eumull litter, blue point: rachises from meso or oligomull litter).

218 The fruiting potential averaged 220.5 ± 107.6 apothecia.g⁻¹ for rachises 6 months old (Fig 5). The fruiting
 219 potential of colonized rachises remained stable as rachises aged with a mean of 190.2 ± 103.2 apothecia.g⁻¹
 220 for 18 months-old rachises (pvalue = 0.86) and 116.6 ± 84.6 apothecia.g⁻¹ for 30 monthsold rachises (pvalue
 221 = 0.54). The humus type had no effect on fruiting potential (pvalue 0.53) (Fig. 5).

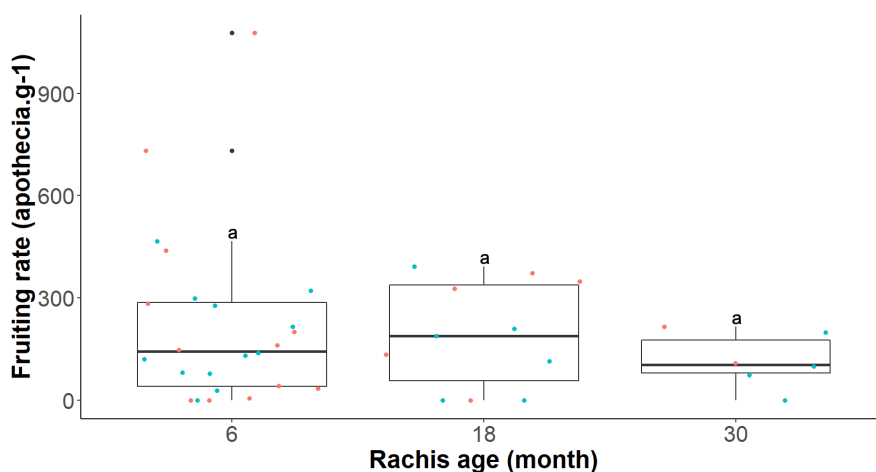


Figure 5: Evolution of *H. fraxineus* fruiting potential on rachises colonized incubated in the forest litter for increasing length (expressed by number of apothecia per dried weight of colonized rachises). Red point: rachises from eumull litter, blue point: rachises from meso or oligomull litter.

222 The results of our model to estimate the cohort composition of an hypothetical stand of North Eastern
 223 France providing each year a similar amount of ash rachises is presented in Fig. 6. The importance of the
 224 more recent cohort (fallen in the previous autumn) strongly depend on the year with values between 40 and
 225 70%. It strongly depends on the recent climate sequence. In spring 2022, the cohort shed in the previous

226 autumn, in 2021 was well colonized by *H. fraxineus* after a rainy summer ([90.6, 99.9]), while older cohort
 227 from 2018-20 cohorts were poorly colonized after very dry summers (respectively [43.7, 69.4], [34.1, 54.9] and
 228 [18.1, 37.7]). Conversely, in 2021, the 2020 cohort was poorly colonized ([18.1, 37.7]). while the 2017 cohort
 229 was very well colonized ([77.5, 99.0]). Despite strong weight loss after 4 years in the litter, the 2017 cohort
 230 still significantly contribute to the pool of colonized rachis in the litter in spring 2021. The persistence of
 231 colonized rachises for several years thus strongly stabilize the pool of colonized rachises in the litter enabling
 232 sustained *H. fraxineus* ascospore production.

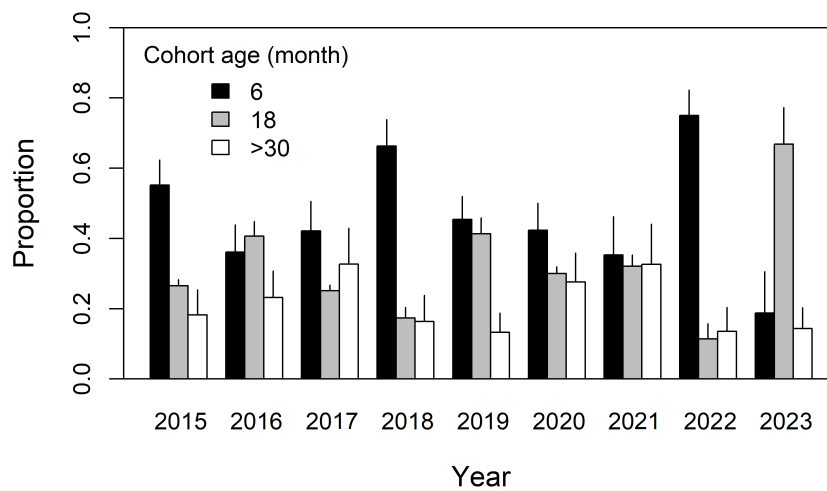


Figure 6: . Simulation of cohort composition of rachises colonised by *H. fraxineus* present in the litter in spring of an hypothetical stand in North Eastern France where amount of shed ash rachis remains constant

233 4 Discussion

234 The persistence of *H. fraxineus* on rachis during several years had already been documented *ex situ* (Gross
 235 & Holdenrieder, 2013; Kirisits, 2015). The present study provides new insights about the degradation kinetic
 236 *in situ*, in the forest litter, over 30 months and its potential modulation by several site factors. We show that
 237 depending on the years, rachis cohorts of over 2-year-old may represent a contribution to the inoculum pool
 238 of the forest litter as high as the most recent rachis cohort thus representing a significant reservoir.

239 The rachis density found in the litter depended on the humus type with a lower density in eumull humus
 240 for similar ash densities. This was in agreement with the faster rachis decay in this humus form with a lower
 241 proportion of the initial rachis dry weight remaining after 30 months compared to other humus forms (Ponge,
 242 2003). However, the relation between the rachis density in litter and humus type is likely to be complex.
 243 The stands with an eumull humus form had a higher ash basal area, which usually results in more severe ash
 244 dieback (Grosdidier et al., 2020; Laubray et al., 2023). While the amount of rachis shed should increase with

CHAPITRE 3. PERSISTANCE DE LA SOURCE D'INOCULUM DANS LA LITIÈRE DE FRÊNE

245 ash basal area, increased crown dieback of ash trees would be expected to decrease the amount of rachis shed,
246 thus decreasing the rachis density / ash density ratio compared to healthier ash stands with low ash density.
247 Conversely, we can assume that many necrotic twigs and branches that have fallen to the ground constitute a
248 large pool of *H. fraxineus* inoculum for several years. Also, the litter of some stands consisted mainly of ash
249 leaves with in some case maple and lime leaves. These provide fast decaying organic matter compared to oak
250 or hornbeam (Mitchell et al., 2016). In mull humus type, especially eumull, the litter fragmentation is realised
251 by macroinvertebrate (Jabiol et al., 2007; Ponge, 2003). We indeed observed that the rachises were strongly
252 fragmented after more than 6 months in the litter. Dahlsjö et al. (2023) showed a high consumption of ash
253 leaves by the macroinvertebrate (woodlouse, earthworm and millipedes), with reduced fragmentation of the
254 rachises when they are in mixture with less suitable leaves from oak or beech. The leaves of those two species
255 have a higher C/N ratio than ash leaves due to their higher lignin composition (Steffens et al., 2012), which
256 makes them less palatable to macroinvertebrates whereas lime leaves have a lignin composition comparable
257 to that of ash, making the litter more palatable overall (Steffens et al., 2012). It was demonstrated that in
258 controlled conditions, the ash leaves decay faster when mixed with lime leaves while they decay slower when
259 mixed with hornbeam leaves (Bartha et al., 2017). In addition, for the part of decay carried out by saprophytic
260 fungi, a 'Gadgil effect' might occur in mixed stands containing oak or hornbeam. Unlike ash and maple, oak,
261 hornbeam and lime are ectomycorrhizal tree species (Brundrett & Tedersoo, 2020). Ectomycorrhizal (ECM)
262 fungi associated with roots have a negative effect on litter decay. While saprotrophic fungi mobilise carbon
263 (C) from forest floor and soil organic matter (SOM), ECM fungi are supplemented with C by their host.
264 This symbiosis makes them more competitive to extract nitrogen than saprophytic fungi when both fungal
265 guilds come to foraging nutrients in the litter. The presence of ECM fungi tends to increase C/N and in the
266 same potentially release chemical inhibitors limiting saprotrophic development (Fernandez & Kennedy, 2016;
267 Gadgil & Gadgil, 1971). The inter-annual variability in decay kinetics could be explained by meteorological
268 conditions, in particular winter precipitation during the first months of decay. For leaf litter, the low level of
269 precipitation reduces the rate of mass loss (Austin & Vitousek, 2000; O'Neill et al., 2003; Staley et al., 2007)
270 and that leaching losses are reduced with low levels of precipitation (Salamanca et al., 2003)

271 It was expected that the production of a pseudosclerotial plate on colonized rachises by *H. fraxineus*
272 might have decreased the decay rate. The pseudosclerotial plate is likely due to the synthesis of a melanin
273 pigment by the fungus (Butler & Day, 1998), which plays a protective role in preventing desiccation and
274 UV radiation damage to the fungal hyphae (Butler & Day, 1998; Campbell, 1934; Campbell, 1933; Pearce,
275 1991). Moreover, it have an antagonistic role in preventing the development of other fungi (Adams & Roth,
276 1969). However, no conclusive effect of the proportion of pseudosclerotial rachises on the decay rate was
277 found. *H. fraxineus* persistence on the rachis should require the consumption of organic matter from the
278 rachis and participate to it decay. But, the rachis not colonized by *H. fraxineus* could be expected to harbor
279 more efficient saprotrophic fungi and decay faster. It has to be pointed out that between 6 and 18 months
280 we observed a strong fragmentation of the rachises, presumably because of the litter macroinvertebrate.
281 The pseudosclerotial plate maybe far less efficient to protect the rachises from the grazing activity. The
282 *H. fraxineus* colonization effect on rachis decay may depend on a variety of factors, as the pH in the litter.

283 Impacting the melanisation (Tudor et al., 2013), soil moisture enhances the development of *H. fraxineus*
284 (Grosdidier et al., 2020) and also the decay of the litter (Krishna & Mohan, 2017) and the appetence of
285 rachises for macroinvertebrate (earthworms, millipedes and woodlouses) (Dahlsjö et al., 2023).

286 We found that the quantity of *H. fraxineus* DNA in autumn was poorly relate to the colonization rate of
287 the pathogen in spring, 6 months later. Low level of *H. fraxineus* DNA in fallen rachises in autumn may result
288 in very different colonization rate in the next spring depending on the year cohort. It would appear that the
289 final colonization of rachises by *H. fraxineus* depends on climatic parameters not only during the season, but
290 also after shedding in late autumn and winter. The colonization of the rachises during the following spring is
291 highly dependent on rainfall in July and August, a favourable condition for increasing ascospore production
292 and, consequently, leaf infection (Marçais et al., 2023). Conversely, leaf colonisation is limited by summer
293 temperatures above 35°C (Grosdidier et al., 2018; Hauptman et al., 2013). Winter conditions could also be
294 decisive for the colonization of rachises by *H. fraxineus* in the litter.

295 The persistence of *H. fraxineus* on pseudoclerotial rachises is even more important for the pathogen
296 as they retain ability to produce apothecia and thus inoculum for at least 30 months. Indeed, this study
297 shows that one gram of pseudoclerotial rachis has the same potential for spore production whether it is 6,
298 18 or 30 months old. It had been demonstrated that ash pseudosclerotial rachises kept in bulk in plastic
299 containers could produce apothecia up to the age of 5 years (Gross & Holdenrieder, 2013; Kirisits, 2015)
300 but not pseudosclerotial rachises left in the forest litter and subject to optimal conditions for decay. The
301 accumulation, year after year, of *H. fraxineus* pseudosclerotial rachis that retain their ability to produce
302 inoculum constitutes a reservoir that favor disease development. Populations of *H. fraxineus* are subject to
303 dependence on the density of colonized rachises in the litter for apothecia production (Laubray et al., 2023).
304 A low density of colonized rachis in the litter reduces apothecia production (Allee effect). The long persistence
305 of pseudosclerotial rachises in the litter should help *H. fraxineus* to reach the Allee threshold above which
306 production of apothecia no longer depends on colonized rachises density. Our model clearly shows that a
307 long persistence of colonised rachis in the litter also has the effect of stabilising the inoculum pool. The
308 level of colonization of leaves shed in autumn strongly depends on summer rainfall. NE France, experienced
309 very dry and hot summers in the 2018-20 period, which resulted in poor colonization by *H. fraxineus* of the
310 rachis cohort produced these years. The presence of an inoculum reservoir of pseudosclerotial rachises in
311 the litter probably allowed the epidemic to be rekindled after such unfavorable year for the pathogen's foliar
312 development. This was observed in NE France 2021 after the very wet summer.

References

- Adams D. H. and Roth L. F. (1969). Intraspecific competition among genotypes of *Fomes cajanderi* decaying young-growth Douglas-Fir. *Forest Science* **15**, 327–31.
- Austin A. T. and Vitousek P. M. (2000). Precipitation, Decomposition and Litter Decomposability of *Metrosideros polymorpha* in Native Forests on Hawai'i. *Journal of Ecology* **88**, 129–138.

- Bartha B., Mayer A., and Lenz H. D. (2017). Acceleration of ash petiole decomposition to reduce *Hymenoscyphus fraxineus* apothecia growth - a feasible method for the deprivation of fungal substrate. *Baltic Forestry* **23**, 82–88.
- Brethes A. et al. (1995). Classification of forest humus forms: a French proposal. *Annales des Sciences Forestières* **52**, 535–546. DOI: 10.1051/forest:19950602.
- Brundrett M. C. and Tedersoo L. (1, 2020). Resolving the mycorrhizal status of important northern hemisphere trees. *Plant and Soil* **454**, 3–34. DOI: 10.1007/s11104-020-04627-9. (Visited on 09/15/2023).
- Butler M. J. and Day A. W. (1998). Fungal melanins: A review.
- Campbell A. (1934). Zone Lines in Plant Tissues: II. The Black Lines Formed by *Armillaria Mellea* (Vahl) Quel. *Annals of Applied Biology* **21**, 1–22. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1934.tb06887.x.
- Campbell A. (1933). Zone lines in plant tissues. I. The black lines formed by *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grew in hardwoods. *Annals of Applied Biology* **20**, 123–145. DOI: 10.1111/j.1744-7348.1933.tb07431.x.
- Coker T. L. R. et al. (2019). Estimating mortality rates of European ash (*Fraxinus excelsior*) under the ash dieback (*Hymenoscyphus fraxineus*) epidemic. *PLANTS, PEOPLE, PLANET* **1**, 48–58. DOI: 10.1002/ppp3.11.
- Coley-Smith J. R. and Cooke R. C. (1971). Survival and Germination of Fungal Sclerotia. *Annual Review of Phytopathology*, 65–92. DOI: doi:10.1146/annurev.py.09.090.
- Dahlsjö C., Attins T., and Malhi Y. (2023). Macrofauna Invertebrates Contribute to Faster Leaf Litter Decomposition in *Fraxinus Excelsior*-Dominated Habitats: Implications of Ash Dieback. Rochester, NY. DOI: 10.2139/ssrn.4336985.
- Fernandez C. W. and Kennedy P. G. (2016). Revisiting the 'Gadgil effect': do interguild fungal interactions control carbon cycling in forest soils? *New Phytologist* **209**, 1382–1394.
- Gadgil R. L. and Gadgil P. D. (1971). Mycorrhiza and Litter Decomposition. *Nature* **233**, 133. DOI: 10.1038/233133a0.
- Gioria M., Pyšek P., and Moravcová L. (2012). Soil seed banks in plant invasions: promoting species invasiveness and long-term impact on plant community dynamics. *Preslia* **84**, 327–350.
- Gioria M. and Pyšek P. (2016). The Legacy of Plant Invasions: Changes in the Soil Seed Bank of Invaded Plant Communities. *BioScience* **66**, 40–53. DOI: 10.1093/biosci/biv165.
- Grosdidier M., Ioos R., and Marçais B. (2018). Do higher summer temperatures restrict the dissemination of *Hymenoscyphus fraxineus* in France? *Forest Pathology* **48**, e12426. DOI: 10.1111/efp.12426.
- Grosdidier M. et al. (2020). Landscape epidemiology of ash dieback. *Journal of Ecology* **108**, 1789–1799. DOI: 10.1111/1365-2745.13383.
- Gross A. and Holdenrieder O. (2013). On the longevity of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in petioles of *Fraxinus excelsior*. *Forest Pathology* **43**, 168–170.
- Gross A. et al. (2012). Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Fungal Genetics and Biology* **49**, 977–986. DOI: 10.1016/j.fgb.2012.08.008.
- Hauptman T. et al. (2013). Temperature effect on *Chalara fraxinea*: heat treatment of saplings as a possible disease control method. *Forest Pathology* **43**, 360–370. DOI: 10.1111/efp.12038.

3.1. ARTICLE 2 : *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* PERSISTENCE IN THE ASH LITTER

- Ioos R. et al. (2009). Rapid in planta detection of *Chalara fraxinea* by a real-time PCR assay using a dual-labelled probe. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 329–335. DOI: 10.1007/s10658-009-9471-x.
- Jabiol B. et al. (2007). *L’humus sous toutes ses formes*, deuxième édition. ENGREF.
- Kirisits T. (2015). Ascocarp formation of *Hymenoscyphus fraxineus* on several-year-old pseudosclerotial leaf rachises of *Fraxinus excelsior*. *Forest Pathology* **45**, 254–257. DOI: 10.1111/efp.12183.
- Kowalski T. (2006). *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology* **36**, 264–270. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x.
- Krishna M. and Mohan M. (2017). Litter decomposition in forest ecosystems: a review. *Energy, Ecology and Environment* **2**. DOI: 10.1007/s40974-017-0064-9.
- Laubray S., Buée M., and Marçais B. (2023). Evidence of a component Allee effect for an invasive pathogen: *Hymenoscyphus fraxineus*, the ash dieback agent. *Biological Invasions*, 1-16.
- Levin D. A. (1990). The Seed Bank as a Source of Genetic Novelty in Plants. *The American Naturalist* **135**, 563–572. DOI: 10.1086/285062.
- Madsen C. L. et al. (2021). Combined progress in symptoms caused by *Hymenoscyphus fraxineus* and *Armillaria* species, and corresponding mortality in young and old ash trees. *Forest Ecology and Management* **491**, 119177. DOI: 10.1016/j.foreco.2021.119177.
- Mandák B. et al. (2012). Can Soil Seed Banks Serve as Genetic Memory? A Study of Three Species with Contrasting Life History Strategies. *PLOS ONE* **7**, e49471. DOI: 10.1371/journal.pone.0049471.
- Marçais B., Giraudel A., and Husson C. (20, 2023). Ability of the ash dieback pathogen to reproduce and to induce damage on its host are controlled by different environmental parameters. *PLOS Pathogens* **19**. Publisher: Public Library of Science, e1010558. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010558. (Visited on 05/06/2023).
- Mitchell R. J. et al. (1, 2014). Ash dieback in the UK: A review of the ecological and conservation implications and potential management options. *Biological Conservation* **175**, 95–109. DOI: 10.1016/j.biocon.2014.04.019. (Visited on 09/14/2023).
- Mitchell R. J. et al. (2016). How to Replicate the Functions and Biodiversity of a Threatened Tree Species?: The Case of *Fraxinus excelsior* in Britain. *Ecosystems* **19**, 573–586. DOI: 10.1007/s10021-015-9953-y.
- O’Neill E. G. et al. (2003). Acute seasonal drought does not permanently alter mass loss and nitrogen dynamics during decomposition of red maple (*Acer rubrum* L.) litter. *Global Change Biology* **9**, 117–123. DOI: 10.1046/j.1365-2486.2003.00538.x.
- Pearce R. B. (1991). Reaction zone relics and the dynamics of fungal spread in the xylem of woody angiosperms. *Physiological and Molecular Plant Pathology (United Kingdom)*.
- Ponge J.-F. (1, 2003). Humus forms in terrestrial ecosystems: a framework to biodiversity. *Soil Biology and Biochemistry* **35**, 935–945. DOI: 10.1016/S0038-0717(03)00149-4. (Visited on 09/15/2023).
- Przybył K. (2002). Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. *Forest Pathology* **32**, 387–394. DOI: 10.1046/j.1439-0329.2002.00301.x.
- Pyšek P. et al. (2015). Naturalization of central European plants in North America: species traits, habitats, propagule pressure, residence time. *Ecology* **96**, 762–774. DOI: 10.1890/14-1005.1.

- Riutta T. et al. (2012). Experimental evidence for the interacting effects of forest edge, moisture and soil macrofauna on leaf litter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* **49**, 124–131. DOI: 10.1016/j.soilbio.2012.02.028.
- Salamanca E. F., Kaneko N., and Katagiri S. (2003). Rainfall manipulation effects on litter decomposition and the microbial biomass of the forest floor. *Applied Soil Ecology* **22**, 271–281. DOI: 10.1016/S0929-1393(02)00153-1.
- Skovsgaard J. P. et al. (2010). Associations among symptoms of dieback in even-aged stands of ash (*Fraxinus excelsior* L.) *Forest Pathology* **40**, 7–18. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2009.00599.x>.
- Slade E. M. and Riutta T. (1, 2012). Interacting effects of leaf litter species and macrofauna on decomposition in different litter environments. *Basic and Applied Ecology* **13**, 423–431. DOI: 10.1016/j.baae.2012.06.008. (Visited on 09/15/2023).
- Smith M., Henkel T., and Rollins J. (2014). How many fungi make sclerotia? *Fungal Ecology* **13**. DOI: 10.1016/j.funeco.2014.08.010.
- Sønstebo J. H. et al. (2017). “Genome-wide population diversity in *Hymenoscyphus fraxineus* points to an eastern Russian origin of European Ash dieback”. *bioRxiv*, 154492. DOI: 10.1101/154492.
- Staley J. T. et al. (2007). Effects of summer rainfall manipulations on the abundance and vertical distribution of herbivorous soil macro-invertebrates. *European Journal of Soil Biology* **43**, 189–198. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2007.02.010.
- Steffens Christina n. L., Helfrich M., and Flessa H. (2012). Effects of beech (*Fagus sylvatica*), ash (*Fraxinus excelsior*) and lime (*Tilia spec.*) on soil chemical properties in a mixed deciduous forest. *Plant and Soil* **352**, 389–403. DOI: 10.1007/s11104-011-1004-7.
- Stroheker S., Queloz V., and Nemesio-Gorriz M. (2021). First report of *Hymenoscyphus fraxineus* causing ash dieback in Spain. *New Disease Reports* **44**. DOI: 10.1002/ndr2.12054.
- Timmermann V. et al. (2011). Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway*. *EPPO Bulletin* **41**, 14–20. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2010.02429.x>.
- Townsend B. B. and Willetts H. (1954). The development of sclerotia of certain fungi. *Transactions British Mycological Society* **37**, 213–221. DOI: doi:10.1016/s0007-1536(54)80003-9.
- Tudor D., Robinson S. C., and Cooper P. A. (2013). The influence of pH on pigment formation by lignicolous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* **80**, 22–28. DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.09.013.
- Willetts H. (1971). The survival of fungal sclerotia under adverse environmental conditions. *Biological Reviews*, 387–407.
- Zhao Y.-J. et al. (2013). *Hymenoscyphus pseudoalboidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. *Mycotaxon* **122**, 25–41. DOI: 10.5248/122.25.

Supplemental data

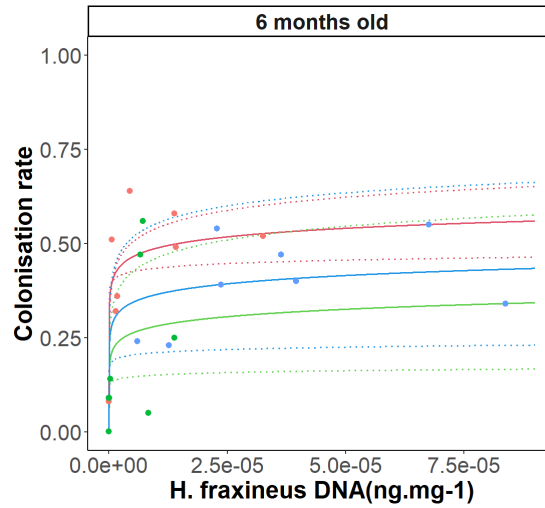


Figure S1. Relation between the level of *H. fraxineus* in rachises cohorts at 6 months according to quantification of *H. fraxineus* DNA in rachis tissues just after leaf shedding for the 3 cohort with their regression curve and their confidence interval in dotted line (red:2019, green:2020 and blue:2021)

Chapitre 4

Description de la communauté fongique de la litière de frêne : régulatrice potentielle de la production d'inoculum

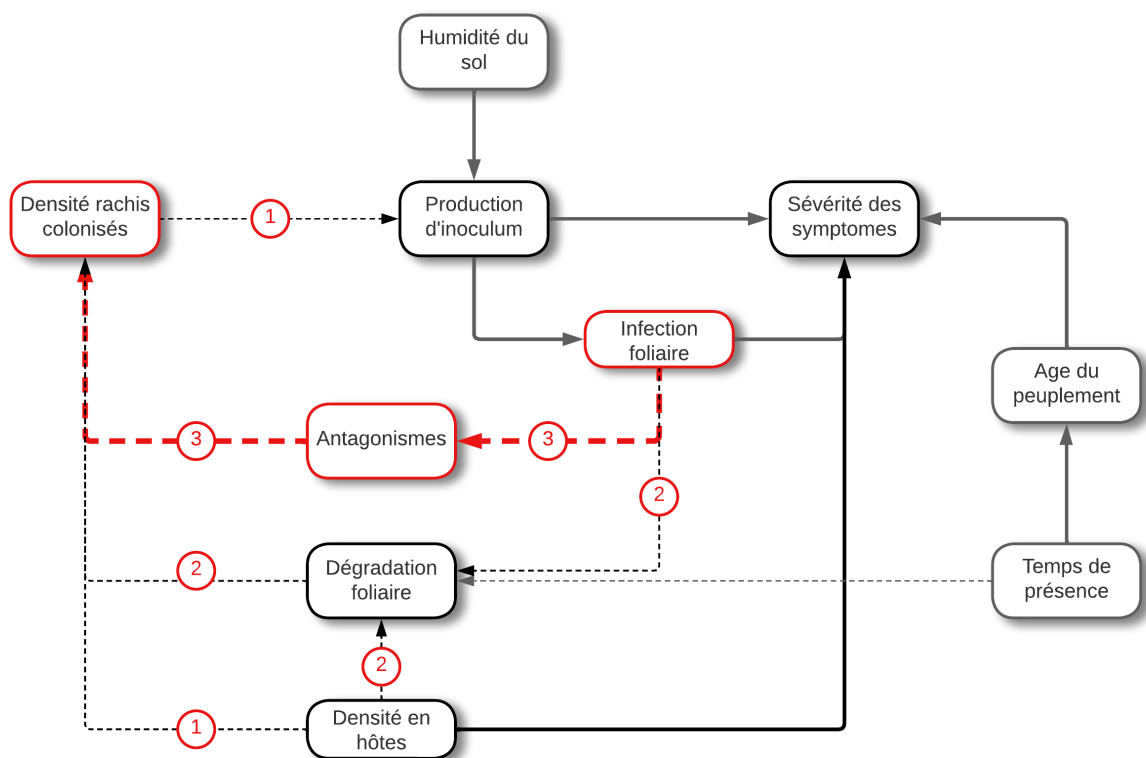


FIGURE. 4.1 — Axe 3 d'étude : lien infection foliaire - communauté fongique antagoniste - densité de rachis colonisés

CHAPITRE 4. DESCRIPTION DE LA COMMUNAUTÉ FONGIQUE DE LA LITIÈRE DE FRÊNE : RÉGULATRICE POTENTIELLE DE LA PRODUCTION D'INOCULUM

Dans le chapitre précédent, il a été décrit que le type d'humus dans lequel se dégrade la litière de frêne appartenait à la famille des mulls. Les mulls sont connus pour avoir une dégradation rapide principalement due à l'activité des macroinvertébrés tels que les vers de terre, les cloportes ou les milles pattes (DUCHAUFOR, 1995 ; PONGE, 2003). Cependant, les débris foliaires sont également le support de développement de la communauté fongique. Celle-ci connaît de profond changement en terme de structure et de composition durant la décomposition de feuilles. Les espèces fongiques dominantes sur les feuilles sénescentes sont amenées à être remplacées par des espèces saprotrophes. Cette communauté fongique en transition peut entrer en compétition avec *H. fraxineus* lors de son développement hivernal et réduire sa capacité à fructifier à la fin du printemps suivant. Cette étude a pour objectif de décrire l'évolution de la communauté fongique présente à la chute des feuilles vers celle présente à la période de production d'inoculum, six mois plus tard, en fonction de l'abondance d'*H. fraxineus*.

4.1 Article 3 : Fungal communities associated with ash rachises in relation with *Hymenoscyphus fraxineus* colonization

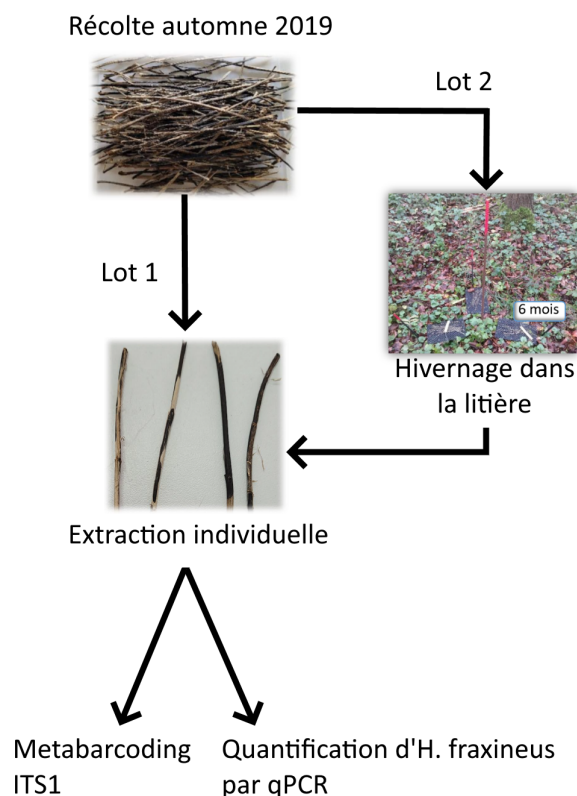


FIGURE. 4.2 – Stratégie d'échantillonnage et analyses réalisées pour étudier les communautés fongiques présentes sur les rachis de frênes de la litière

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

Le dispositif mis en place consiste à i) décrire et comparer les communautés fongiques présentes sur les rachis des feuilles nouvellement tombées à l'automne et sur les rachis persistants après 6 mois "d'hivernage" *in situ* dans la litière, ii) identifier les espèces fongiques des communautés étudiées dont l'abondance est corrélée négativement ou positivement à la présence d'*H. fraxineus*. Dans ce but, des rachis ont été récoltés dès la chute des feuilles dans les 8 peuplements de frênes de l'étude précédente (fig.4.2). Sur chaque site, la récolte a été divisée en deux. Un premier lot a été directement analysé au laboratoire et le deuxième lot a été conditionné dans un filet et laissé sur site dans la litière pendant 6 mois avant d'être également analysé. L'extraction de l'ADN a été réalisée individuellement pour chaque rachis. La détermination des espèces fongiques a été faite par metabarcoding en ciblant la région ITS1 à l'aide d'amorces spécifiques aux champignons. La région ITS1 et les amorces ont été choisies et testées antérieurement dans le but d'identifier à la fois *H. fraxineus* et les espèces fongiques associées, sans craindre que l'abondance de séquence *H. fraxineus* ne réduise la profondeur de séquençage. Parallèlement, la quantification de la présence d'*H. fraxineus* a été mesurée par qPCR.

Le choix de sites et l'installation du dispositif ont été réalisés avec Olivier Caël. Pour l'extraction de l'ADN, j'ai pu bénéficier de l'aide d'Arielle Beltran et Gabrielle Laval. Les résultats de l'étude sont le sujet de l'article suivant intitulé "Fungal communities associated with ash rachises in relation with *Hymenoscyphus fraxineus* colonization" soumis prochainement à la revue *Environmental microbiology*.

Fungal communities associated with ash rachises in relation with *Hymenoscyphus fraxineus* colonization

Simon Laubray; Marc Buée; Benoit Marçais

Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000 Nancy, France.

Abstract

The development of pathogens within fungal communities is widely studied in order to understand the various mechanisms that could be used to regulate them, such as competition or parasitism. *Hymenoscyphus fraxineus*, the fungus responsible for the ash dieback epidemic in Europe, is a foliar pathogen with a saprotrophic phase on leaf debris during the winter leading to the production of inoculum in the spring. During this critical phase, the pathogen is exposed to the development of the saprophytic guild present in the litter. The appearance of competitors could reduce its development and therefore its inoculum production. The aim of this study was to compare the fungal communities present in leaf debris (rachis=central vein + petiole) between autumn and spring in ash stands of various compositions. Half of the rachises collected in autumn were conditioned for analysis and the other half were placed in a mesh bag and left in the litter of the original plot until spring before being analysed. The individual rachis analysis consisted to describe the fungal communities present by metabarcoding using ITS1 region sequencing and quantify the level of colonisation by *H. fraxineus* with qPCR. Fungi communities change profoundly between autumn and spring. The dominant classes in autumn (Dothideomycetes and Tremellomycetes) disappeared or became a minority in spring. On the contrary, in spring the dominant classes were not present in autumn or present in minority (Agaricomycetes and Leotiomycetes). While the quantification of *H. fraxineus* progressed little between the season. The presence of species: *Hymenoscyphus caudatus*, *Hymenoscyphus scultula*, *Cyathicula fraxinophila*, *Cyathicula coronata* was negatively correlated with the quantification of *H. fraxineus*. These species, present in stands with a high ash density, could play a potential antagonistic role to development of *H. fraxineus* during the winter, thus demonstrating the regulation of *H. fraxineus* and the integration process of the pathogen in the ecosystem.

Keywords:

Fungal communities, seasonal succession, *Hymenoscyphus fraxineus*

1 Introduction

- 1 Mycobiota living within plant tissues are studied for their potential role in enhancing growth, repelling
- 2 herbivory or protecting against pathogens (Arnold et al., 2003; Busby et al., 2016). The plant fitness, whether
- 3 it be their growth or their health, strongly depends on their associated fungal communities (Gonthier et al.,
- 4 2005; Hubbard et al., 2012). Plant tissues infection by pathogens has a significant impact on the growth and

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

5 development of the plant, disrupting the physiology of the host. This disruption may promote the development
6 of a cohort of secondary pathogens or a change in the behaviour of endophytic fungi (pathobiome concept)
7 (Vayssier-Taussat et al., 2014; Mannaa & Seo, 2021). However, the microbial communities associated with
8 the plant act as regulators for pathogen installation or development within the host throughout direct or
9 indirect effect. Direct effect may involve the presence of competitors for resources or mycoparasites in the
10 community while indirect effect may be mediated by the induction of defence reactions in the plant, such
11 as release of a chemical compound that can damage the pathogen (antibiosis) or modification of the cellular
12 physiology of the plant tissue (Gajera et al., 2013; Schulz et al., 2015; Schulz et al., 2019). In addition,
13 greater diversity in endophytic communities may constitute a barrier to the establishment or development of
14 pathogens, because fewer niches are available and competitors are more abundant (Oliva et al., 2021).

15 Enemy release may favor the development of exotic pathogens and enhance the success of the invasion,
16 as for any other invasive species (Mitchell & Power, 2003; Prior et al., 2015). During the introduction of
17 the pathogen to a new environment, competitors and parasites that limited its development in the area of
18 origin may be not transferred together with the organism. The endophyte community of suitable hosts in the
19 invaded area may not be able to significantly compete or affect the exotic pathogen. Therefore, the invasive
20 pathogen population may not be regulated and thus severely affect its host, disturbing the associated native
21 microbial community in the process, which could lead to a pathobiome situation (Pauvert et al., 2020;
22 Qiu et al., 2022). In addition, among the criteria of ecosystem invasibility are the level of specific diversity
23 and functional diversity (Lonsdale, 1999). The concept of diversity resistance was defined as a negative
24 relationship between species richness and the probability of invasion by alien species (Elton, 1958). Some
25 studies have shown a positive effect of diversity on invasibility, while others have shown a more complex
26 effect of diversity (Richardson & Pyšek, 2006; Zhang et al., 2020). The diversity resistance must consider
27 functional diversity, the available niche and resources (Davis et al., 2000), the competitors present and the
28 strength of the interaction in the ecosystem network (Naeem et al., 2000; Hui et al., 2016).

29 The pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* (Kowalski, 2006) identified as responsible for ash dieback in
30 Europe is a fungus which was introduced into Eastern Europe from North-East Asia at the end of the 20th
31 century (Agan et al., 2023). The consequences of this introduction have been catastrophic for European ash
32 trees and particularly for the most widespread ash tree on this continent, *Fraxinus excelsior*. Since the first
33 observations of ash dieback in Poland in 90's, the pathogen spread to reach Ireland in 2012, North Spain in
34 2021 Montenegro in 2017 (Milenković et al., 2017; Short & Hawe, 2018; Stroheker et al., 2021). New hosts
35 in this new territory that had not co-evolved with *H. fraxineus* are particularly vulnerable to the fungus
36 (Ghelardini et al., 2017). The mortality rate in European ash stand is estimate at 60% after two decade of
37 pathogen presence in the region (Coker et al., 2019) impacting tree of all ages but more severe on younger
38 tree, limiting the regeneration capacity of ash tree populations. The great representation of *F. excelsior*
39 in the European landscape and the lack of coevolution between the host and the pathogen gives the host
40 weak barriers to resist the installation, spread and development of the pathogen (Zhao et al., 2013; Gross
41 et al., 2014). In addition, like other introduced species, *H. fraxineus* may benefit from the release of enemies
42 (Colautti et al., 2004). Parasitic or competitive species present in the origin area that did not follow the

CHAPITRE 4. DESCRIPTION DE LA COMMUNAUTÉ FONGIQUE DE LA LITIÈRE DE FRÊNE : RÉGULATRICE POTENTIELLE DE LA PRODUCTION D'INOCULUM

43 transfer are absent in the new territory, thus improving the pathogen fitness. As example some mycovirus
44 able to reduce the virulence were discovered in the native range of the pathogen and not in Europe (Shamsi
45 et al., 2022; Shamsi et al., 2023).

46 The life cycle of *H. fraxineus* alternates between a pathogenic phase within leaf tissue and a saprophytic
47 phase on ash leaf debris in the litter. The pathogenic phase begins with the germination of ascospores on
48 the leaf surface in spring and continues through the summer with the development of hyphae through leaf
49 tissue inducing necrosis (Gross et al., 2012). As in other temperate deciduous trees, the endophytic microbial
50 community of ash leaves evolves over the growing season (Unterseher et al., 2007; Unterseher, 2011). Leaf
51 tissues are rapidly colonized by endophytic fungi after budburst and the diversity of the endophytic fungal
52 community increases until leaf senescence in autumn. The development of *H. fraxineus* in leaf tissue therefore
53 takes place within an evolving fungal community. In late spring, *H. fraxineus* develops within an endophytic
54 community of young leaves, and then the pathogen spreads into leaf tissue with an increasingly diverse
55 endophytic community during the growing season. Different studies have shown an antagonist power of
56 local fungi. In controlled conditions, Schlegel et al., 2016 demonstrated the inhibitory action on ascospore
57 germination of fungal strains isolated from ash leaf communities to the ash leaf endophytic community such
58 as *Kretzschmaria deusta*, *Boeremia exigua*, *Paraconiothyrium* sp., *Neofabraea alba*, *Fraxinicola fraxini*. In late
59 summer, a change of the microbial community structure is observed that occurs at approximately the same
60 time as *H. fraxineus* induces leaf necrosis (Cross et al., 2017). The fungal diversity increases and a higher
61 relative abundance of genus, having a pathogenic potential, *Fusarium*, *Phoma*, *Pleospora*, *Boeremia*, and
62 *Epicoccum*, is detected, the endophyte community was disturbed by this pathobiome system. On European
63 ashes, in contrast to its development within its hosts in its area of origin, *H. fraxineus* is able to spread in
64 the xylem and phloem of shoots and stems, leading to branch mortality. The fungal community present in
65 these tissues is different from that in leaves and depends on the season (Haňáčková et al., 2017). In summer,
66 the community is composed of non-pathogenic fungi, while in winter, the community is more diverse and
67 composed of other pathogenic fungi. However, these communities in presence haven't inhibition power on *H.*
68 *fraxineus* growth in shoot tissues (Haňáčková et al., 2017).

69 After leaf fall, *H. fraxineus* enters its saprophytic phase. During the winter, the fungus creates a pseu-
70 dosclerotial plate on the ash leaf residues (petiole + main vein of the compound leaf, hereafter referred to as
71 the rachis). From this support, the following spring, the pathogen reproduces and forms its apothecia, which
72 release the ascospores (Gross et al., 2012). During this phase, the community undergoes a profound change,
73 with the disappearance of biotrophic fungi and the development of saprophytic fungi (Kosawang et al., 2023)
74 leading to a high diversity of the fungi community on the spring rachis (Kowalski & Bilański, 2021). In
75 addition, some fungi as *Cyathus olla*, *Trichoderma atroviride* and *T. polysporum* are able to develop on the
76 pseudosclerotial plate synthesized by *H. fraxineus* on the rachis, while others are present on the decomposing
77 apothecia (*Clonostachys rosea*, *Trichoderma atroviride* and *T. harzianum*), showing the adaptation of local
78 species to the presence of the pathogen (Kowalski & Bilanski, 2022).

79 The development of *H. fraxineus* after leaf fall in autumn until spring is determinant for inoculum produc-
80 tion and could depend of fungi communities of the litter. These communities could be strongly linked to the

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

81 ash stand condition. We hypothesized that the fungal communities associated with ash leaves may affect the
82 subsequent colonization of the rachis by the pathogen. We thus planned to document the transition between
83 this community in autumn and the fungal community present in the rachis in spring. This study had three
84 aims: I. describe the fungal community present on rachises at leaf fall in autumn and their evolution in the
85 following spring using metabarcoding analysis, ii. Relate the fungal taxa present to the presence of *H. frax-*
86 *ineus*, iii. Characterize the environmental parameters influencing the fungal community and its interaction
87 with *H. fraxineus*.

88 2 Method

89 2.1 Plot selection and characterization

Table 1: Location of sampling plots in Grand Est region in France (WGS84, DMS).

Plot	Town	Ash density	Longitude	Latitude
Plot 1	Sélestat	high	7°27'41" E	48°12'35" N
Plot 2	Sélestat	low	7°28'39" E	48°13'30" N
Plot 3	Languimberg	high	6°53'22" E	48°43'20" N
Plot 4	Languimberg	low	6°53'3" E	48°43'28" N
Plot 5	Champenoux	high	6°19'7" E	48°44'32" N
Plot 6	Champenoux	low	6°19'11" E	48°45'13" N
Plot 7	Thionville	high	6°5'31" E	49°23'17" N
Plot 8	Thionville	low	6°5'47" E	49°23'9" N

90 The experiment was set-up in November 2019 in eight ash stands distributed over four sites in north-
91 eastern France (Table 1). In each site, two plots were chosen according to their ash density (low and high
92 density). The plots were characterized for the ash basal area, the total basal area, the tree and understory
93 diversity, the soil pH and the humus typology. The basal area was measured within three concentric circular
94 sub-plots; we measured all trees with a diameter at breast height (DBH) > 7.5 cm. In the smallest circle
95 (radius 7m), all trees with DBH > 22.5 cm in the second circle (16 m radius), and all trees with DBH >
96 47.5 cm in the last circle (radius 21m). The total basal area was computed as the sum of DBH of all trees
97 measured weighted by the sampling area while for the ash basal, only ash trees were considered. The tree
98 diversity was estimated by Shannon index using the value of basal area of each tree species. The ash health
99 status of the stands (healthy, symptomatic, declining and heavily declining) was defined according to the
100 mean crown decline of ash trees. The crown decline was categorized in 4 class depending on branch mortality
101 percent: 0.05 (0-10%, healthy), 0.35 (10-50%, symptomatic), 0.625 (50-75%, declining) and 0.825, (>75%,
102 heavily declining). The species richness of the understory present in radius of the basal area assessment
103 was determined as the number of species observed (shrubs with diameter < 7.5 cm and herbaceous species)
104 in May 2020. Within the large measurement circle, three sub-plots were set-up near the bases of ash trees
105 (at least 20m between the plots). On each sub plot, the humus typology was determined according the
106 determination key (Brethes et al., 1995; Jabiol et al., 2007) and a 20 cm deep soil core (x diameter) was
107 taken. The soil composition was analysed by an external laboratory (Soil Analysis Laboratory, LAS Arras

108 France) from three core per plot in order to measure the pH and the concentration on carbon and nitrogen
109 to calculate the C/N ratio.

110 2.2 Sampling and processing of the rachises

111 In November 2019, seventy-five just-fallen leaves were collected in each plot (25 at each of the 3 sub-plots).
112 Their leaflets were removed to keep only their rachises. They were randomly divided in two groups. The first
113 group was represented by thirty rachises that were brought back directly to the laboratory for processing
114 (hereafter called “autumn rachises”). These thirty rachises were dried at 55°C for 48 H and then individually
115 processed. Each rachis was cut into 0.5 cm long pieces and placed in 2 ml cryogenic tubes with two tungsten
116 beads. The tubes were placed for 20 minutes in a liquid nitrogen bath and grounded twice at a speed of 5.5
117 m.s-1 for 50 s with a Fastprep engine (MpBIO). Three 20 mg subsamples of the powder was retrieved for
118 each rachis and stored at -20°C for a DNA extraction. The second group of rachises (45 remaining rachises)
119 was placed in three mesh bags (fifteen rachises per bag) and left until the next spring in the litter at each of
120 the three sub plots directly on the soil after removing the humus layer(hereafter called “spring rachises”). In
121 May 2020, the mesh bags were collected for processing in the laboratory. 3x10 rachises were then processed
122 as described for the autumn rachises while 3x5 other were placed in humid chamber to evaluate their ability
123 to produce apothecia.

124 2.3 Characterisation of *Hymenoscyphus fraxineus* infection

125 The level of *H. fraxineus* colonization of the rachis was determined both at the plot and at individual rachis
126 scale. The plot scale assessment was performed from the fifteen rachises collected in spring and assessed for
127 their ability to produce apothecia. At the end of the assessment, the rachises were sorted according to their
128 colonization status. During its colonization of rachis tissues, *H. fraxineus* developed a pseudosclerotial plates
129 with characteristic black appearance. The part of rachises covered with this pseudosclerotial plate, considered
130 to be colonized by *H. fraxineus*, were separated from the part without pseudosclerotial plate. Both samples
131 were dried 48h at 50°C and weighed. The colonization rate was computed as the dry mass of colonized
132 rachis divided by the total mass. The rachis scale assessment was performed by qPCR. A subsample of 20
133 mg powder was retrieved from each individually grounded rachis (480 rachis, 30 per plots in both autumn
134 and spring for each of the eight plot). DNA extraction was performed for each sub-sample with the DNeasy
135 plant minikit provided by Qiagen with some adjustments: 15 mg of PVPP were added for lysis phase and
136 200 µl of Guanidine thiocyanate were added for DNA precipitation phase to eliminate eventual inhibitors of
137 polymerase, adapted from Luis et al. (2004) (Luis et al., 2004). The final elution volume of 200 µl was
138 stored at -20°C. The qPCR method developed by Ioos et al. 2009 (Ioos et al., 2009) was used to determine
139 the level of colonization by *H. fraxineus*. The qPCR was realized in three replicates with samples diluted
140 to the tenth with H₂O. The reaction mixture volume was 15 µl and contained 1x Brilliant II qPCR master
141 mix, 0.03 µM ref dye supplied by Agilent Technologies, 0.01 U.µl-1 of UDG (New England BioLabs), 0.03
142 µM Primers specific to *H. fraxineus* (Cfrax-F, 5'-ATTATATTGTTGCTTTAGCAGGTC-3' and Cfrax-R, 5'-

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

143 TCCTCTAGCAGGCACAGTC-3'), 0.1 μ M Cfrax-probes (Cfrax-P, 5'-FAM-CTCTGGGCGTCGGCCTCG-
144 BHQ1-3') and 2 μ l template DNA. The qPCR reaction performed in a Quantstudio 6 thermocycler (Applied
145 Biosystem) was initiated by first pre-cycling step at 37°C for 10 min for UDG activation and the initial
146 denaturation step at 95°C for 15 min followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec and hybridization
147 /elongation at 65°C for 55 sec. The curve calibration to quantify the *H. fraxineus* DNA was obtained from
148 a serie of cascade diluted in H₂O by a factor of ten from 1.64 ng. μ l⁻¹ of DNA to 1.64x10⁻⁷ ng. μ l⁻¹.

149 2.4 Sequencing

150 The fungal communities present on rachises collected in autumn or spring were determined by sequencing
151 of the ITS1 region from the DNA extracted in the previous step. The region was amplified with the primer
152 ITS1-F (5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3') and ITS86-R (5' CTGAATCATCGAATCTTTGAA 3').
153 The PCR mixture with a volume of 25 μ l contained 1x of Taq PCR Master Mix (Qiagen), 0.2 μ M of each
154 primer and 2.5 μ l of template DNA. PCR reaction was realized on BIORAD with the following program: 3
155 min of initial denaturation at 94°C followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, hybridization at
156 58°C for 30 sec and elongation at 72°C for 60 sec and finally a final elongation step at 72°C for 10 min. PCR
157 was performed twice, once with the samples and once with the sample diluted to the tenth and the result
158 of the two qPCR was pooled after the reaction. The tagging and sequencing were realized by the platform
159 PGTB (Univ. Bordeaux, INRAE, BIOGECO, F-33610 Cestas, France). Raw sequences were processed using
160 the Version 4.0.1 of FROGS Escudié et al., 2018; Bernard et al., 2021 running on Galaxy (version 22.01).
161 The parameters used for the R1 and R2 merging step were a maximum read size (R1 and R2) of 250 bp
162 and an expected amplicon size (resulting from the merge) between 200 and 490 bp. The clustering step was
163 performed with the parameters recommended by the FROGS designer, i.e aggregation swarn with a distance
164 value of 1 followed by chimera removing. Then, the filtering step allowed to clean the sequencing removing
165 the OTUs present in less than 5 observations in all the rachis DNA extract and the OTUs with less than 100
166 reads over all analysed rachises. Before the OTUs identification, the conserved region of ITS were removed
167 from all the reads to keep only the highly variable ITS subregion (ITSx software include in FROGS). The
168 reads obtained were identified by comparison with the Unite Fungi database (8.02); the minimum coverage
169 used was 0.8. The OTUs identified as the same species where grouped, but not those only identified to the
170 genus level. Functional guilds of fungi were assigned from the database Fungaltraits (Pölme et al., 2020) to
171 the OTUs identified up to at least the genus rank. The OTUs selected for analysis had to have a reading
172 frequency in at least one rachis DNA extract greater than 1% of the sample's readings.

173 2.5 Statistical analysis

174 The relationship between stand composition (ash density and tree diversity) and ash dieback severity as well
175 as the level of colonization of spring rachises (left in the litter in mesh bags until spring) was evaluated with
176 generalized linear model using a beta distribution and a logit link function (library betareg R software).
177 Then, the quantification of *H. fraxineus* DNA on rachis and the richness of OTUs detected per rachis were

CHAPITRE 4. DESCRIPTION DE LA COMMUNAUTÉ FONGIQUE DE LA LITIÈRE DE FRÊNE : RÉGULATRICE POTENTIELLE DE LA PRODUCTION D'INOCULUM

178 compared between seasons and plots by a global linearized mixed model using a gamma distribution for DNA
179 quantification and a negative binomial distribution for OTUs richness with a log link function for both (library
180 glmmTMB R software). The sequencing depth was added as covariable for the OTUs richness analysis. The
181 effect of environmental parameters (Ash density, crown decline, spring rachises colonization rate, basal area,
182 tree diversity, understory richness, soil pH and C/N ratio) on OTUs richness and *H. fraxineus* quantification
183 were modelled with the same methods adding the plots as random effect. The presence of an effect of
184 plots on sequencing depth was checked. The different measurements of *H. fraxineus* presence in the rachises
185 (colonization rate, DNA quantification by qPCR and reads frequency in the NGS data) were compared with
186 glmmTMB from the log of their average by plot and season excepted the colonization rate which was a plot
187 measurement. The fungal community found on each rachis and their structure could be compared between
188 season by 2 multivariate methods, PERMANOVA and ordinated principal coordinate analyses (PCoA). In
189 the same way, the fungal community structure in rachises in spring was compared to the same variables used
190 to estimate the effect of environment on OTUs richness and *H. fraxineus* quantification. These environmental
191 data were standardised. The abundance table was Hellinger- transformed and a matrix dissimilarity was
192 computed by the Bray-Curtis method. The reads assigned to *H. fraxineus* were excluded from the analyses.
193 The log transformation of the sequencing depth and the plot effect were used for the PERMANOVA analysis.
194 The correlation of environmental variables with significant effect on fungal community structure with the
195 PCoA axes was estimated with the envfit function of the vegan package. The relationship between *H.*
196 *fraxineus* presence in the rachis tissues and the abundance of the other fungi was evaluated with a Threshold
197 Indicator Taxa Analysis, running with the R library TITAN2 (Baker and King 2013). This analysis allows
198 assessing if changes in the occurrence frequency and relative abundance of taxa along an environmental
199 gradient are significant by combining two methods. First, a change point analysis method, detect for each
200 taxa the environmental threshold where the taxon distribution changes either in mean and in variance.
201 Second, the analysis of indicator species gives an individual value for each taxon (zscore) indicating the
202 level of correlation between the OTU distribution and the environmental gradient. This analysis was run
203 with the OTUs frequency data per rachis. The individual *H. fraxineus* DNA quantification was used as the
204 environmental gradient to highlight the OTUs in interaction with the pathogen. The evolution between the
205 two seasons of each OTU identified by the TITAN 2 analysis as having a significant correlation with the
206 presence of *H. fraxineus* was performed with the lme4 library of the R software and the function glmer and
207 binomial law. This analysis of differential detection was performed on OTU abundance with the sequencing
208 depth as covariable and plot effect as random effect. In order to assess how OTUs identified as correlated
209 with *H. fraxineus* colonization may be associated together, the abundance of OTUs identified by the TITAN
210 analysis was ordinated by a principal component analysis (PCA) using the sum of reads per plots for rachis
211 collected in spring. The stand variables used in the previous analysis were added to the ordination as
212 supplementary variables to understand how stand features interacted with these fungal associations.

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN
RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

213 **3 Results**

Table 2: Description of ash stand, ash dieback situation found in the studied plots selected. Characterization of stand with tree cover and mixture composition, litter description, plant diversity and the fungal richness of ash tree rachis of the study plots.

Localisation	Sélestat		Langumberg		Champenoux		Thionville	
Plot ID	Plot 1	Plot 2	Plot 3	Plot 4	Plot 5	Plot 6	Plot 7	Plot 8
Ash density	high	low	high	low	high	low	high	low
Ash basal area (m ² .ha ⁻¹)	11.6	1.5	7.5	1.6	18.3	1.1	17.6	5.6
Crown decline (%)±CI (number of individuals)	55 ±17 (9)	17 ±25 (2)	60 ±20 (6)	5 (1)	42 ±15 (16)	30 (1)	71 ±8 (18)	17 ±14 (4)
Basal area (m ² .ha ⁻¹)	24.8	19.4	10.4	17.1	19.8	36.7	17.6	27.3
Accompanying tree species (with basal area)	<i>Ap</i> (8.1)	<i>Tc</i> (9.7) <i>Ap</i> (4.2)	<i>Cb</i> (1.2) <i>Qu</i> (0.9)	<i>Qu</i> (8.5) <i>Cb</i> (5.2)	<i>Ca</i> (1.1)	<i>Cb</i> (20.5) <i>Qu</i> (14.3)	-	<i>Cb</i> (11.1) <i>Qu</i> (8.2)
Ecto rate (%)	6.7	63.1	20.3	89.4	5.3	94.7	0	70.4
Tree diversity	1.3	1.5	0.9	1.2	0.3	0.9	0.00	1.3
Undergrowth richness	11	10	21	16	10	13	19	17
Soil pH	6.7±1.3	6.3±0.4	5.5±1.4	4.7±0.3	7.1±0.2	5.8±3.9	6.7±1.2	5.8±1.6
C/N ratio	10.8±1.1	10.6±1.5	13.5±2.2	14.2±1.8	11.8±0.2	13.8±1.5	12.4±0.7	12.7±0.8
Humus	Eumull	Eumull	Mesomull	Oligomull	Eumull	Oligomull	Eumull	Mesomull
OTUs richness in Autumn	52.5 ±5.9 ^{ac}	39.8 ±6.1 ^b	48.3 ±5.5 ^{ab}	43.9 ±5.7 ^b	55.1 ±4.5 ^c	42.3 ±5.4 ^{ab}	50.0 ±7.3 ^{abc}	57.1 ±4.7 ^c
Sequencing depth (Autumn)	33812 ±3239 ^a	29346 ±3974 ^a	31552 ±3512 ^a	34730 ±4123 ^a	31954 ±3714 ^a	30865 ±5380 ^a	35639 ±4420 ^a	30894 ±4409 ^a
OTUs richness in Spring	26.4 ±3.3 ^a	29.4 ±4.5 ^{ab}	36.2 ±4.5 ^b	42.0 ±2.9 ^{bc}	27.1 ±4.4 ^a	29.5 ±3.7 ^{ab}	47.8 ±6.3 ^c	29.2 ±2.7 ^{ab}
Sequencing depth (Spring)	32854 ±4073 ^a	33292 ±2551 ^a	33675 ±3744 ^a	36300 ±3330 ^a	34826 ±4472 ^a	31703 ±2596 ^a	38459 ±3755 ^a	34512 ±2349 ^a

Table 3: The companion species designated by *Ap* are *Acer pseudoplatanus*, *Tc* *Tillia cordata*, *Cb* *Carpinus betulus*, *Qu* (*Q. robur* / *Q. petraea*) and *Ca* *Corylus arvelana*. Tree diversity is the Shannon index value. Understorey richness is the number of plant species observed under the canopy. OTUs richness is the average number of OTUs detected per rachis and sequencing depth is the average number of reads per rachis.

214 **3.1 Relationship between stand features and ash dieback severity or rachises**
215 **colonization by *H. fraxineus***

216 The eight selected plots were heterogeneous for ash density (from 1 to 18 m². ha-1 of ash) and severity of
217 dieback symptoms from 5 to 71%, Table 2). At each of the 4 selected locations, the plots with low ash density
218 had an ash basal area <7m².ha-1 while those with high ash density had a basal area >7m².ha-1. The total
219 tree cover varied between 10.4 and 36.7 m². ha-1. Tree diversity was variable between plots with a Shannon
220 index of 0 for the pure ash stand in Thionville (plot 7) and reaching 1.5 for the mixed stand of Sélestat (plot
221 2). The association of species encountered was mainly a mix of *Carpinus betulus* and *Quercus spp* (either *Q.*
222 *petrae* or *Q. robur*). The stands with a mixture of ash, oak and hornbeam had a slower degrading humus
223 (Mesomull or Oligmull), a more acid soil and a higher C/N ratio. The humus typology of the stand was
224 related to the soil pH (pvalue<0.001) and C/N ratio(pvalue<0.001).

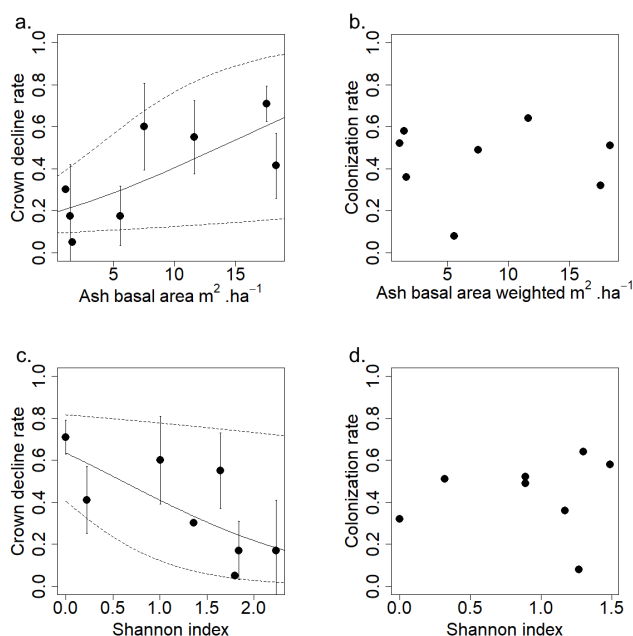


Figure 1: Relationship between ash dieback severity or colonization of rachis left in the litter in mesh bags until spring by *H. fraxineus* and ash density (a, b) or tree diversity (c, d)

225 The ash dieback severity was affected by the composition of stand. The crown decline index strongly
226 increased with the ash tree density (pvalue = 0.004) and decreased with the tree diversity (pvalue<0.007,
227 Fig. 1). It was particularly severe in stands with an ash density greater than 7m².ha-1, with an average
228 branch mortality of 57.3% (confidence interval, CI [49.6, 65.0]), while in stands with an ash density less
229 than 7m².ha-1, the average branch mortality was 17.5% (CI [8.3, 26.7]). However, the rate of colonization
230 by *H. fraxineus* of the spring rachis was independent of both the ash density (pvalue = 0.25) and the tree
231 diversity (pvalue = 0.88 of Fig. 1) whereas it significantly increased with crown damage (coef 0.95; std.error
232 0.15; pvalue <0.001) (Fig. 1c). The *H. fraxineus* DNA quantity within the rachis measured by qPCR was

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

233 correlated with neither ash density nor crown decline for both autumn rachises (pvalue>0.05) and spring
 234 rachises (pvalue pvalue>0.05, Table 4). Nevertheless, the amount of *H. fraxineus* DNA in the spring rachis
 235 was strongly related to their colonization rate (pvalue <0.001). Also, the quantity of *H. fraxineus* DNA
 236 in the autumn rachises was significantly related to the colonization rate of spring rachis, (pvalue <0.001).
 237 Furthermore, no significant relation was found between the quantities of *H. fraxineus* DNA in the autumn
 238 rachises or spring rachises and the soil pH of C/N ratio (pvalue>0.05, 4).

Table 4: Effect of environmental parameters on OTUs richness observed and amount of *H. fraxineus* DNA.

OTUs Richness							<i>H. fraxineus</i> DNA					
Variables	Estimate	Std. Error	pvalue	Estimate	Std. Error	pvalue	Estimate	Std. Error	pvalue	Estimate	Std. Error	pvalue
Intercept	-0.76	0.49	0.121	-5.38	0.88	<0.001						
Season	-0.40	0.03	<0.001				0.10	0.38	0.800			
	Autumn			Spring			Autumn			Spring		
Variables	Est.	Std. Er- ror	pvalue	Est.	Std. Er- ror	pvalue	Est.	Std. Er- ror	pvalue	Est.	Std. Er- ror	pvalue
Intercept	-0.21	0.57	0.713	-2.70	0.86	<0.01	-5.24	0.72	<0.001	-5.73	1.27	<0.001
log(Depth sequencing)	0.39	0.06	<0.001	0.59	0.08	<0.001	-	-	-	-	-	-
Ash density	0.07	0.04	<0.05	0	0.06	0.993	-0.64	0.70	0.359	-0.13	1.27	0.915
Crown decline	0.03	0.04	0.461	0.04	0.06	0.563	0.28	0.76	0.714	0.81	1.25	0.513
Colonization rate	-0.05	0.04	0.188	-0.06	0.06	0.322	2.06	0.44	<0.001	3.16	0.60	<0.001
Basal area	0.01	0.04	0.783	-0.09	0.06	0.139	0.24	0.75	0.748	-0.73	1.27	0.562
Tree diversity	-0.03	0.04	0.475	-0.07	0.06	0.248	0.30	0.75	0.692	-0.11	1.27	0.933
Understory richness	0.01	0.04	0.846	0.14	0.04	<0.01	-0.68	0.73	0.349	-1.06	1.21	0.380
Soil pH	0.05	0.04	0.207	-0.08	0.06	0.152	-0.12	0.76	0.871	0.07	1.28	0.956
C/N ratio	-0.02	0.04	0.691	0.10	0.05	0.065	0.03	0.75	0.964	-0.26	1.26	0.836

239 3.2 Fungal communities present on the studied rachises

240 The sequencing dataset consisted of a total number of reads of 15,784,997 from 460 rachises (20 rachises with
 241 a sequencing depth of less than 5000 reads were eliminated). After concatenation of OTUs assigned to the
 242 same species, 1108 OTUs were identified. The OTUs with a reads number lower than 10 in an individual
 243 sample were considered as contamination trace and not taken in account (retaining 99.1% of initial reads).
 244 Very rare OTUs whose maximum frequency among all samples analysed was less than 1%, were eliminated
 245 of dataset leaving 328 OTUs for the analysis. The 780 OTUs eliminated represented less than 1.8% of the
 246 total number of readings. A total of 217 OTUs were detected on autumn rachis and 255 on spring rachis.

CHAPITRE 4. DESCRIPTION DE LA COMMUNAUTÉ FONGIQUE DE LA LITIÈRE DE FRÊNE : RÉGULATRICE POTENTIELLE DE LA PRODUCTION D'INOCULUM

247 The global mean number of OTUs detected per rachis was 41.1 (± 1.5) for a mean sequencing depth of 33
248 386 (± 958). They were no significant differences in sequencing depth between the season (pvalue = 0.169)
249 and an effect of season was detected on the richness of OTUs per rachis (pvalue<0.001). The average number
250 of OTUs for the autumn rachises was 48.5 (± 2.1) and decreased to an average of 33.6 (± 1.7) for spring
251 rachises. In addition, OTU richness in autumn rachis depended on ash density and OTU richness in spring
252 rachis depended on the understory richness (Table 4). It should be noted that the soil pH and C/N ratio,
253 variables linked to humus typology had no effect on OTUs richness detected on spring rachis.

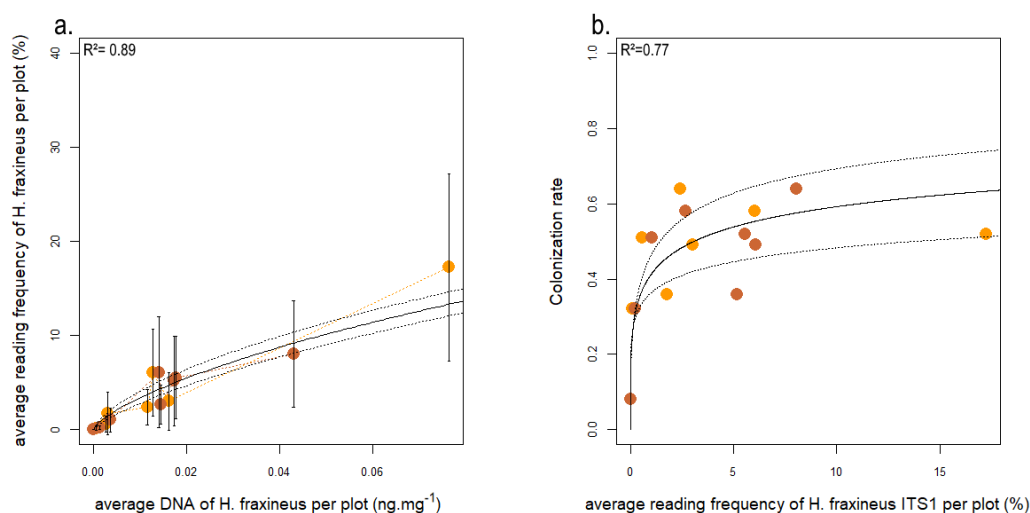


Figure 2: Correlation between the different quantifications of the presence of *H. fraxineus* in rachis tissues: reading frequency as a function of qPCR quantification (a); colonization rate as a function of reading frequency (b) with autumn samples in yellow and spring samples in brown.

254 *H. fraxineus* was detected in all sites in autumn rachises with a mean read frequency in the plot ranging
255 from <0.01 (CI $2e^{-5}$) % in plot 8 in spring to 7.6 (CI 5.7) % in plot 6. Unlike for qPCR data, a significant
256 difference in the frequency of *H. fraxineus* was observed between the two seasons. The proportion of *H.*
257 *fraxineus* reads increased significantly in spring compared to autumn (coef 0.23 st.error 0.1 pvalue=0.02).
258 Despite this, the read frequencies were strongly correlated with the quantification of *H. fraxineus* DNA with
259 the qPCR method (pvalue= $<2e^{-16}$, Fig. 2a) and the visual identification of colonization rate of rachis
260 (pvalue= $1.11e^{-09}$, Fig. 2b), thus validating the observations. The mean *H. fraxineus* detection frequency per
261 plot in autumn rachises (either qPCR and NGS reads) were good predictors of the colonization rate of rachis
262 in spring (Fig. 2).

263 3.3 Evolution of the fungal community between autumn and spring

264 The fungal community detected on the rachis showed a change in diversity (Table 5). The average of OTUs
265 richness detected per rachis in spring is significantly lower than autumn, whereas the shannon index stayed
266 equivalent (Table 5). In terms of fungal class, the autumn rachises had a number of classes and Shannon

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN
RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

267 index higher than in the spring (Table 5). Likewise, the richness of fungal guild was higher in autumn without
268 any significant change in the Shannon index (Table 5).

Table 5: Fungal diversity evolution of rachises between the season.

	Autumn	Spring	Estimator	std error	pvalue
OTUs richness	48.54 ±2.11	33.63 ±1.73	-0.40	0.03	<0.001
Shannon Index OTUs	1.75 ±0.1	1.7 ±0.09	-0.05	0.05	0.29
Class richness	9.9 ±0.3	6.1 ±0.2	-0.50	0.03	<0.001
Shannon Index Class	1.7 ±0.1	1.0 ±0.1	-0.51	0.04	<0.001
Guild richness	10.0 ±0.1	6.53 ±0.2	-0.34	0.05	<0.001
Shannon Index Guild	0.37 ±0.06	0.98 ±0.06	-0.05	0.07	0.50

CHAPITRE 4. DESCRIPTION DE LA COMMUNAUTÉ FONGIQUE DE LA LITIÈRE DE FRÊNE : RÉGULATRICE POTENTIELLE DE LA PRODUCTION D'INOCULUM

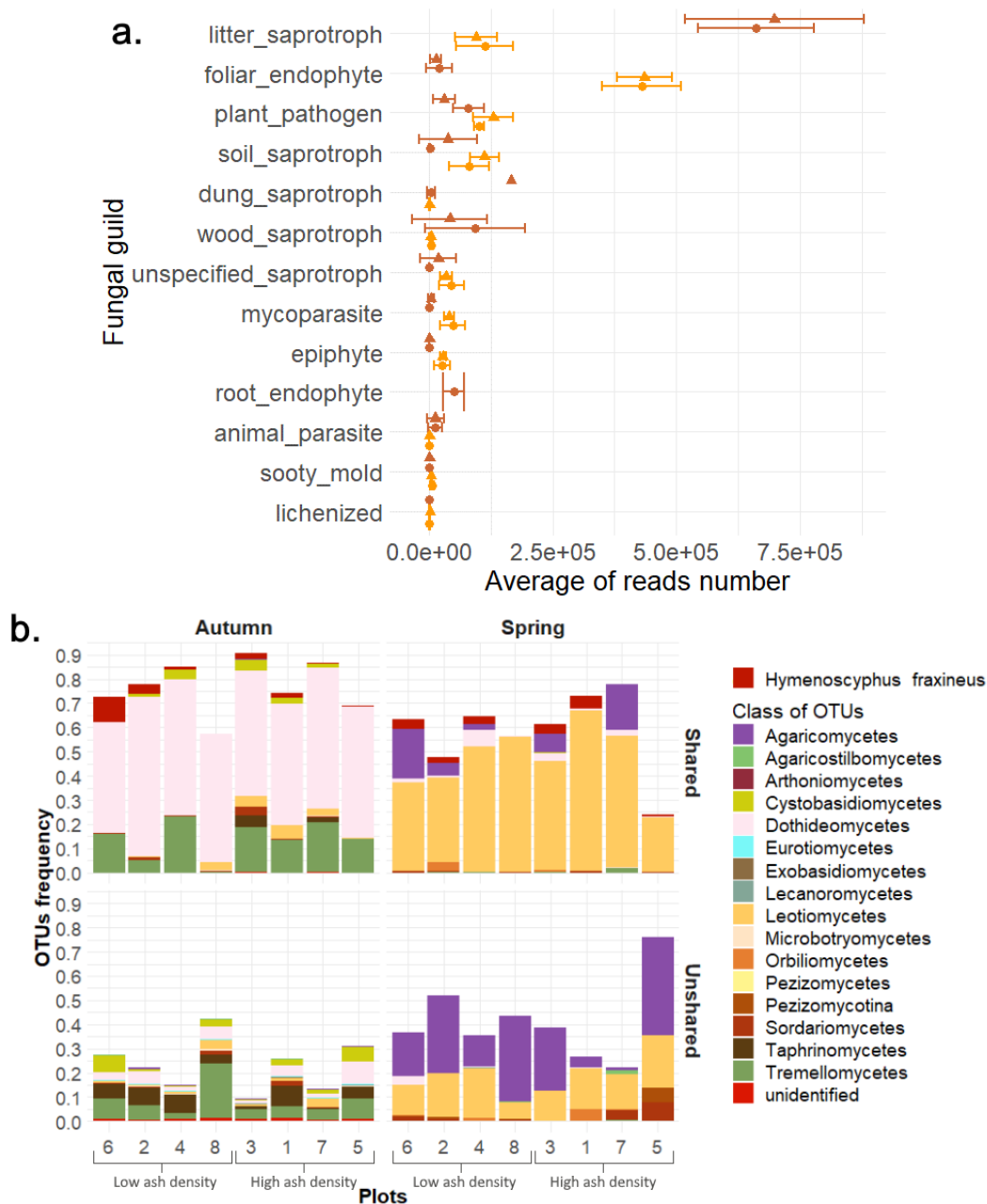


Figure 3: The evolution of communities during rachis degradation, a. The different fungal guilds detected in Autumn (yellow) and spring (brown) in term of reads number mean with the ash density of origin plot of collect (triangle > 7m².ha⁻¹, circle < 7m².ha⁻¹)., b. Frequencies of OTU classes detected in the two seasons on each plots by distinguishing the frequencies of OTUs shared between the season (shared) and those detected in a single season (unshared). The plots are ordered according to their ash density

269 The decrease in diversity was accompanied by an in-depth change in the composition of OTUs between
 270 the two seasons both in presence and in abundance (PERMANOVA R² 0.36 pvalue<0.001, Fig. 4). Indeed,
 271 the autumn rachises and spring shared only 24.4% of the OTUs while 43.8% were detected only in the autumn

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

272 rachises and 31.8% only in the spring rachises (Fig. 3b). However, the OTUs shared between the two seasons
273 represented 76.6 ± 9 % of reads for autumn rachises, and 58.3 ± 14.1 % of reads for spring rachises (Fig.
274 3b). The dominant classes detected in the autumn rachises were the *Dothideomycetes* and *Tremellomycetes*
275 with respective frequencies of 58.4 ± 4.8 % and 21.4 ± 3.3 % whereas in spring these classes had almost
276 disappeared (respectively 2.7 ± 1.7 % and less than 0.01%) The spring rachises had communities dominated
277 by *Leotiomyces* (61.4 ± 9.1 % and *Agaricomycetes* (28.2 ± 9.1 % (Fig. 3b), present at low frequencies in
278 autumn less than 1% for *Agaricomycetes* and less than 5% for *Leotiomyces*. The communities on autumn
279 rachis were more similar between the plots than communities from the spring rachises (average Bray-Curtis
280 distance between plots of 0.54 SD=0.12 in autumn and 0.71 SD=0.14 in spring, fig. 4).

281 The fungal guilds composition was different between the two seasons (PERMANOVA $R^2=0.47$ pvalue<0.001,
282 Fig. 3a). The autumn rachises had a higher richness of fungal guilds than spring rachises (average number
283 of guilds per rachis of 9 ± 0.1 and 5.5 ± 0.2 respectively, pvalue<0.01). In autumn, the dominant guild were
284 foliar endophytes (average of $47.7 \pm 3.9\%$ of reads per rachis), plant pathogens (average of $12.1 \pm 1.7\%$ of
285 reads per rachis) and litter and soil saprotrophs (respectively $12.6 \pm 2\%$ and $9.4 \pm 1.6\%$ of reads per rachis). In
286 spring, the dominant guilds became litter saprotrophs ($69.2 \pm 3.3\%$ reads per rachis) and wood saprotrophs
287 ($12.9 \pm 4.5\%$). The foliar endophyte became rare in spring ($1.6 \pm 0.6\%$ of reads per rachis). Moreover, an
288 effect of ash density was detected on the guild distribution in spring (PERMANOVA $R^2=0.03$ pvalue<0.001)
289 but not in Autumn (PERMANOVA $R^2=0.01$ pvalue=0.05). The soil saprotroph and dung saprotroph were
290 more abundant at high ash density and the plant pathogen and root endophyte were more abundant at low
291 ash density. However, the OTUs diversity within each guild was heterogenous. Litter saprotrophs and plant
292 pathogens were the most diverse guilds. The litter saprotroph guild comprised 10.4 ± 0.5 OTUs per rachis
293 in autumn and 15.3 ± 0.8 in spring while plant pathogen was represented by 8.3 ± 0.4 OTUs per rachis
294 in Autumn and 4.3 ± 0.3 OTUs in Spring. The endophyte guild had a very poor OTUs richness and was
295 represented in Autumn only by one species, *Fraxinicola fraxini* (Tab S1).

296 The structure analysis was performed separately on autumn and spring community (Table 6). The
297 communities of autumn rachises specifically showed a strong locality effect ($R^2=0.14$, pvalue=0.001) but a
298 low effect of plot ($R^2= 0.05$, pvalue=0.001) with fungal communities distributed according to basal area,
299 understory plant richness, rachis density in the litter and soil pH (Table 6). The communities of spring
300 rachises showed a similar level of differentiation between the different localities ($R^2= 0.17$, pvalue=0.001) but
301 plot structuring seemed to increase ($R^2= 0.14$, pvalue=0.001) with an effect of the following environmental
302 parameters understory richness, basal area and soil pH (Table 6). In addition, the level of colonization by
303 *H. fraxineus* appeared to be a significant structuring factor for the two seasons (Table 6).

304 3.4 Relation between OTU frequency and *H. fraxineus* DNA concentration

305 The threshold indicator taxon analysis highlighted the interconnection of 106 OTUs among the 328 detected
306 with abundance of *H. fraxineus* quantified by qPCR both in autumn and spring (supp data). Fifty-nine
307 of those OTUs had their presence correlated to *H. fraxineus* DNA concentration in autumn rachises (47
308 negative correlation and 12 positive correlation)(Table 7). Fifty-three of the 271 analyzed OTUs had their

CHAPITRE 4. DESCRIPTION DE LA COMMUNAUTÉ FONGIQUE DE LA LITIÈRE DE FRÊNE : RÉGULATRICE POTENTIELLE DE LA PRODUCTION D'INOCULUM

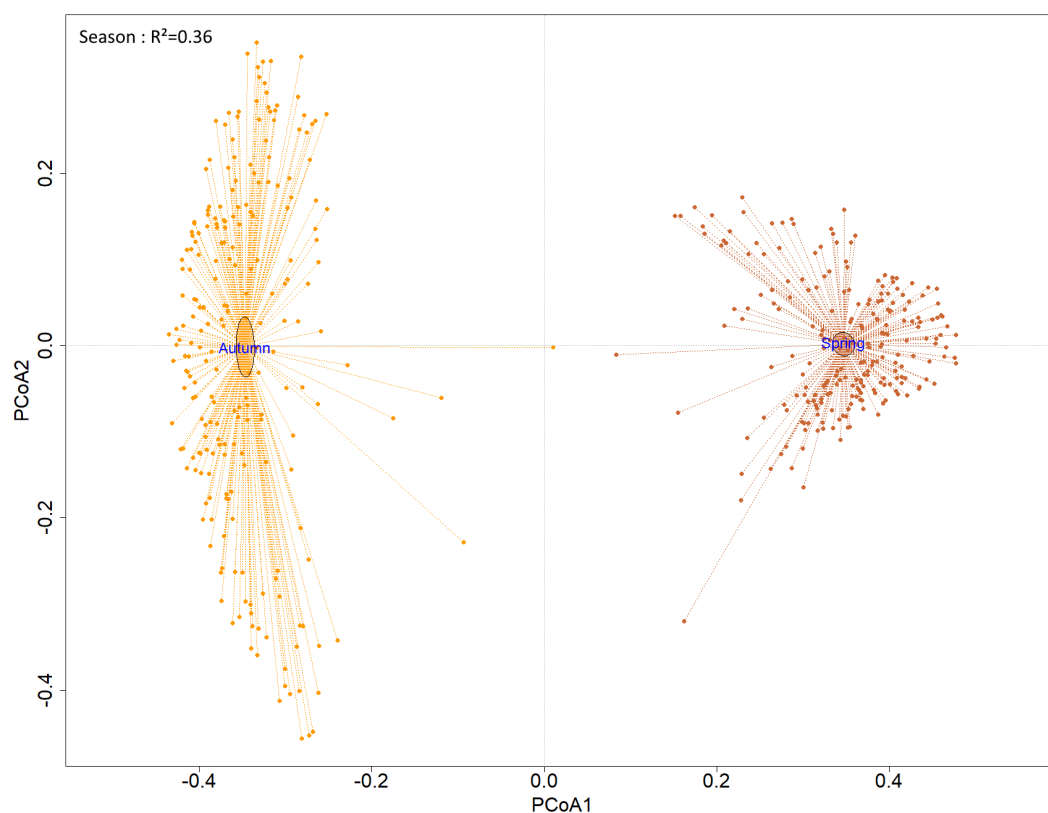


Figure 4: Principal coordinate analysis (PCoA) based on the Bray-Curtis dissimilarity index highlighting the effect of season as a structuring element of the fungal communities present on the rachis. The sample collected in autumn is represented in yellow and the sample collected in spring in brown. The result of PERMANOVA is given by the R^2 .

Table 6: Environmental variables structuring the fungal communities present on the rachis in autumn and spring (Result of PERMANOVA analysis)

Variables	Autumn		Spring	
	R^2	pvalue	R^2	pvalue
log(Depth)	0.02	0.001	0.01	0.001
Locality	0.14	0.001	0.17	0.001
Plot	0.05	0.001	0.14	0.001
Colonization rate	0.01	0.006	0.03	0.001
Ash density	0.01	0.001	0.04	0.001
Soil pH	0.01	0.004	0.03	0.001
Understorey richness	0.02	0.001	0.04	0.001

309 presence correlated to *H. fraxineus* DNA concentration in spring rachises (23 negative correlation and 30
310 positive). Six of them were significantly correlated with the abundance of *H. fraxineus* in the two seasons
311 (Table 7). Among the 59 OTUs identified as having a significant relationship with *H. fraxineus* in autumn, 32
312 decreased significantly in frequency in spring compared to autumn and 23 disappear in spring (Table 7). In
313 particular, the plant pathogen *Taphrina carpini* (zscore -5.08) and the mycoparasite *Papiliotrema flavescens*
314 (zscore -5.82) were widely represented on the rachis in autumn with an average reading frequency of 4.6 % and

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

2.8 % respectively and where almost absent in spring (Table 7). Only one species was negatively associated with *H. fraxineus* in both seasons and showed an increase in frequency in spring compared to autumn: the litter saprotrophs *Hymenoscyphus caudatus* (zscore in autumn -8.87 and frequency <0.01%) maintained its negative association with presence of *H. fraxineus* in spring (zscores: -5.18 and frequency 2.4%). In spring, 22 negative correlations with the presence of *H. fraxineus* that did not occur in autumn were significant (Table 7). Among the OTUs concerned, 9 had a significantly higher detection frequency in spring and 13 were only detected in spring. The most abundant were the litter saprotrophs *Tubaria praestans* (7.6% zscore -7.99), *Tetracladium maxilliforme* (3.1 % zscore -4.12), *Cyathicula fraxinophila* (2.1% zscore -3.3) and the plant pathogen *Neofabraea vagabunda* (2.5% zscore -8.49)(Table 7).

Table 7a. The analysis of threshold indicator taxa (TITAN method) of OTUs related to the presence of *H. fraxineus* (quantified by qPCR) and their difference in OTU detection as a function of season. The zscore indicates the level of relationship between OTU frequencies and *H. fraxineus* DNA quantification (zscore <0= negative relationship, zscore>0 = positive relationship, NS= no significant relationship), the occurrence correspond to number of rachis on which the OTU was detected. The estimator is the coefficient of difference in detection between seasons (negative= detection in autumn> spring; positive detection in autumn < spring). Mean frequencies are given in percent, in bold highlight the significant higher value observed between seasons. Appear only the OTUs with a significant negative zscore.

Primary lifestyle	Secondary lifestyle	Class	OTU names	OTU rank	Average frequency in Autumn	Average frequency in Spring	Total number of reads	Seasonal differences of detection			TITAN2			
								Estimator	Std. Error	p_value	Occurrence in rachis in Autumn	zscore Autumn	Occurrence in rachis in Spring	zscore Spring
litter saprotroph	litter saprotroph	Agaricomycetes	s_Tubaria_praestans_82	species	-	7,6	544941	-	-	-	0/230	-	47/230	-7,99
	litter saprotroph	Leotiomycetes	s_Tetracladium_maxilliforme_190	species	-	3,1	279963	-	-	-	0/230	-	189/230	-4,12
	plant pathogen	Leotiomycetes	s_Hymenoscyphus_caudatus_76	species	<0,1	2,4	222648	4,9	0,02	<0,001	22/230	-8,87	138/230	-5,18
	litter saprotroph	Leotiomycetes	s_Cyathicula_fraxinophila_24	species	-	2,1	166373	-	-	-	0/230	-	111/230	-3,29
	plant pathogen	Leotiomycetes	s_Hymenoscyphus_scutula_157	species	<0,1	0,9	83126	5,5	0,05	<0,001	13/230	NS	119/230	-5,96
	litter saprotroph	Leotiomycetes	s_Cyathicula_coronata_25	species	-	0,4	31973	-	-	-	0/230	-	62/230	-4,22
	litter saprotroph	Leotiomycetes	g_Mycoarthritis_829	genus	-	0,3	27632	-	-	-	0/230	-	164/230	-5,59
	litter saprotroph	Agaricomycetes	g_Sistotrema_773	genus	-	0,3	18744	-	-	-	0/230	-	15/230	-4,48
	litter saprotroph	Agaricomycetes	g_Sistotrema_932	genus	-	0,3	16307	-	-	-	0/230	-	11/230	-6,14
	litter saprotroph	Leotiomycetes	s_Flagellospora_curvula_14	species	-	0,2	16273	-	-	-	0/230	-	47/230	-4,84
plant pathogen	plant pathogen	Leotiomycetes	s_Neofabraea_vagabunda_16	species	1,2	2,5	296553	0,9	0	<0,001	97/230	NS	178/230	-8,49
	litter saprotroph	Agaricomycetes	s_Typhula_erythropus_51	species	-	0,4	42002	-	-	-	0/230	-	32/230	-3,86
unidentified	unidentified	Leotiomycetes	o_Helotiales_509	order	-	0,5	39702	-	-	-	0/230	-	97/230	-3,85
	unidentified	Leotiomycetes	o_Helotiales_630	order	-	0,2	11740	-	-	-	0/230	-	19/230	-10,56
dung saprotroph	litter saprotroph	Agaricomycetes	s_Bolbitius_titubans_231	species	-	1,5	128475	-	-	-	0/230	-	12/230	-8,06

CHAPITRE 4. DESCRIPTION DE LA COMMUNAUTÉ FONGIQUE DE LA LITIÈRE DE FRÊNE : RÉGULATRICE POTENTIELLE DE LA PRODUCTION D'INOCULUM

Table 7b. The analysis of threshold indicator taxa (TITAN method) of OTUs related to the presence of *H. fraxineus* (quantified by qPCR) and their difference in OTU detection as a function of season. The zscore indicates the level of relationship between OTU frequencies and *H. fraxineus* DNA quantification (zscore <0= negative relationship, zscore>0 = positive relationship, NS= no significant relationship), the occurrence correspond to number of rachis on which the OTU was detected. The estimator is the coefficient of difference in detection between seasons (negative= detection in autumn> spring; positive detection in autumn < spring). Mean frequencies are given in percent, in bold highlight the significant higher value observed between seasons. Appear only the OTUs with a significant positive zscore in spring.

Primary lifestyle	Secondary lifestyle	Class	OTU names	OTU rank	Average frequency in Autumn	Average frequency in Spring	Total number of reads	Seasonal differences of detection			TITAN2			
								Estimator	Std. Error	p_value	Occurrence in rachis in Autumn	zscore Autumn	Occurrence in rachis in Spring	zscore Spring
litter saprotroph	plant pathogen	Leotiomycetes	s_ <i>Hymenoscyphus fraxineus</i> _26	species	4,1	3,7	383236	-0,1	0	<0,001	74/230	25,62	108/230	20,38
	litter saprotroph	Tremellomycetes	s_ <i>Dioszegia dumuzii</i> _98	species	2	<0,1	143026	-5,5	0,04	<0,001	179/230	NS	21/230	6,72
	litter saprotroph	Leotiomycetes	g_ <i>Tetracladium</i> _810	genus	-	0,9	84030	-	-	-	0/230	-	127/230	4,91
	plant pathogen	Dothideomycetes	s_ <i>Cladosporium allicinum</i> _163	species	1,1	<0,1	81562	-4,8	0,04	<0,001	221/230	-5,39	33/230	3,32
	litter saprotroph	Agaricomycetes	g_ <i>Efibulobasidium</i> _444	genus	-	1	75130	-	-	-	0/230	-	81/230	7,48
	litter saprotroph	Dothideomycetes	s_ <i>Cladosporium cladosporioides</i> _123	species	0,9	<0,1	67313	-3,1	0,02	<0,001	221/230	NS	83/230	6,73
	litter saprotroph	Leotiomycetes	s_ <i>Alatospora acuminata</i> _67	species	-	0,8	61544	-	-	-	0/230	-	196/230	5,91
	litter saprotroph	Dothideomycetes	s_ <i>Calloria urticae</i> _181	species	0,4	<0,1	29412	-3,4	0,03	<0,001	19/230	5,92	24/230	7,69
	litter saprotroph	Dothideomycetes	s_ <i>Paracurcubaria comi</i> _128	species	0,2	<0,1	17762	-2,2	0,03	<0,001	85/230	NS	39/230	2,72
	litter saprotroph	Leotiomycetes	g_ <i>Alatospora</i> _701	genus	-	0,2	17429	-	-	-	0/230	-	151/230	5,8
unidentified	unidentified	Leotiomycetes	f_ <i>Dermataleaceae</i> _947	family	<0,1	2,7	242220	4,9	0,02	<0,001	48/230	NS	192/230	3,85
	unidentified	Sordariomycetes	f_ <i>Nectriaceae</i> _454	family	0,3	<0,1	21135	-2,1	0,02	<0,001	122/230	NS	45/230	7,55
soil saprotroph	soil saprotroph	Tremellomycetes	s_ <i>Vishniacozyma victoriae</i> _131	species	1	<0,1	96561	-4	0,02	<0,001	204/230	-2,39	53/230	4,31
	soil saprotroph	Tremellomycetes	s_ <i>Vishniacozyma heimaeyensis</i> _133	species	1	<0,1	66754	-3,3	0,02	<0,001	137/230	3,31	38/230	14,04
	soil saprotroph	Tremellomycetes	g_ <i>Vishniacozyma</i> _529	genus	0,4	<0,1	28025	-3,8	0,04	<0,001	173/230	NS	21/230	4,86
wood saprotroph	litter saprotroph	Agaricomycetes	s_ <i>Psathyrella corrugis</i> _199	species	-	3,9	267551	-	-	-	0/230	-	19/230	5,22
root endophyte	soil saprotroph	Agaricomycetes	g_ <i>Serendipita</i> _659	genus	-	1,1	92338	-	-	-	0/230	-	34/230	4,5
animal parasite	wood saprotroph	Orbiliomycetes	g_ <i>Dactylaria</i> _650	genus	-	1,3	96304	-	-	-	0/230	-	140/230	7,63

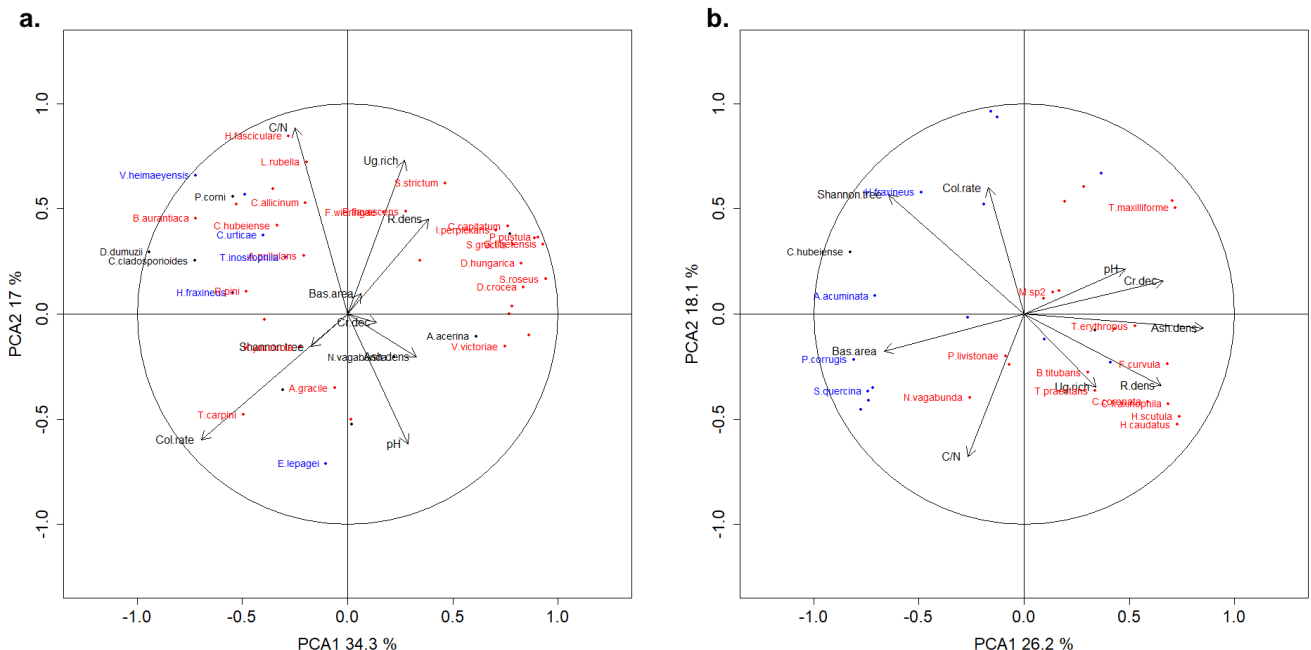


Figure 5: Principal component analysis (PCA) with the abundance of OTUs in plot on autumn rachises (a.) and spring rachises (b.) (red: negatively correlated with *H. fraxineus* DNA quantification, blue: positively correlated and black: no correlated). Only the name of OTUs identified as species appear on the graph, other OTUs are represented by dots. The environmental variables were added as supplementary variables (Ash.dens: ash density, R.dens: rachis density, Cr.dec: crown decline, Col.rate: colonization rate, Bas. area: Shannon.tree: tree diversity, Ugr.rich: understory richness, pH: soil pH and C/N: ratio C/N).

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

324 The axes of species distribution on PCA showed a correlation with the colonization rate, understory
325 richness, C/N ratio and soil pH for autumn (Fig. 5a) and Shannon tree, basal area, ash density, colonization
326 rate and C/N ratio for spring (Fig. 5b). In autumn, the distribution of species correlated with the presence
327 of *H. fraxineus* (negatively and positively) was dispersed. The species *Genolevuria tibetensis*, *Sarocladium*
328 *strictum*, *Vishniacozyma victoriae*, *Dioszegia crocea* and *Dioszegia hungarica* belong to association species
329 correlated with understory richness and rachises density and anti-correlated with the colonization rate of
330 litter rachis. In spring, the distribution on PCA of OTUs negatively or positively correlated with *H. frax-*
331 *ineus* DNA was discriminated by axis 1 (Fig. 5b). This axis was correlated with the basal area, the ash
332 density, the rachis density, the crown decline and the understory richness. The association of some species
333 negatively correlated with *H. fraxineus*, including *Hymenoscyphus scutula*, *Hymenoscyphus caudatus*, *Flag-*
334 *ellospora curvula*, *Cyathicula fraxinipholia*, *Cyathicula coronata* and *Tubaria prestans*, was related to rachis
335 density (Fig. 5b).

336 4 Discussion

337 This study describes the evolution of the fungal community on ash rachises between leaf fall and the end of
338 spring as a function of the presence of the pathogen *H. fraxineus* and the characteristics of the ash stand.
339 Firstly, the description of the impact of ash dieback on the ash population has revealed that high-density ash
340 populations exhibited severe dieback, but this was not correlated with the level of rachises colonization by
341 *H. fraxineus*. Secondly, the richness of communities present on rachises and detected by ITS 1 are only affected
342 by the ash density had in autumn and understory richness had a significant effect on community richness
343 in spring whereas none variable choosen had an effect on *H. fraxineus* presence. The winter development of
344 *H. fraxineus* takes place within fungal communities in evolution. Fungal communities on the rachises change
345 from season to season, with some OTUs disappearing in favour of others corresponding to the succession
346 of fungal guilds from senescent leaves (a mixture of endophytic and saprotrophic) to debris in the litter
347 (mainly saprotrophic). Some OTUs were identified as having antagonist presence with *H. fraxineus*. The
348 fungi *Tubaria prestans*, *Tetracladium maxiliforme*, *Cyathicula fraxinophila* and *Neofabrae vagabunda* could
349 be antagonist to *H. fraxineus*.

350 4.1 Relationship between stand features and ash dieback severity or rachises 351 colonization by *H. fraxineus*.

352 The health status of ash tree measured in the stand of the device was an evidence of epidemic severity in the
353 past. The crown decline estimation was more important in stand with high density of ash tree, that is demon-
354 strated by other studies (Grosdidier et al., 2020). However, the present situation of *H. fraxineus* population
355 was determined by the different measures of rachis infection (colonization rate, DNA quantification and
356 ITS frequency) was independent of ash density or tree diversity. With the example of plot 7 in Thionville,
357 being one of the higher ashes densities with a severe decline had a colonization rate among the lower. But,
358 the density effect on epidemic severity was explain by an increase of transmission rate, so an increase of foliar

359 infection rate and consequently an increase of colonization rate of rachis in the litter (Grosdidier et al., 2020).
360 We can assume that the no relationship between ash density and infection rate in the study stand was due to
361 the end of epidemic wave. The ash dieback was detected in this region in 2009, at the beginning of epidemic,
362 the foliar infection and the ash dieback symptom were more important in stands with high ashes density.
363 The host density effect was explained by the increase of transmission rate cause of colonized rachis density
364 higher (Grosdidier et al., 2020). This disconnection between host density and *H. fraxineus* colonization rate
365 could be explained by the crown decline during the epidemic phase limiting the rachis production in the ash
366 stand after the epidemic wave.

367 ITS1 reads from *H. fraxineus* gave similar results to qPCR DNA quantification and colonisation rate, and
368 contrary to expectations, *H. fraxineus* reads were not over-represented compared to other fungi. Moreover,
369 the *H. fraxineus* DNA quantification in autumn is a good method to predict the colonization rate in spring.
370 However, the evolution of the quantification of *H. fraxineus* between seasons differed between methods. Quan-
371 tification by qPCR showed no significant difference, expression of abundance by relative frequency showed a
372 significant increase and in terms of number of reads a significant decrease (consideration of sequencing depth
373 as a covariate). The quantification by qPCR was in accordance with the study by Kosawang et al 2023. They
374 observed no change between October and June in the quantity of *H. fraxineus* DNA determined by qPCR.
375 Given the winter development of *H. fraxineus*, we assumed that *H. fraxineus* frequencies would increase
376 between autumn and spring. The development of other fungus and the higher sequencing depth for spring
377 sample (coef 0.1 pvalue =0.004) may explain the difference between the expression in relative frequency and
378 number of reads. It should be noted that in the plot 6, five autumn samples out of 30 had a number of reads
379 higher than 10000 (whereas the highest values for the other plots were around 7000) leading to a sharp de-
380 crease in the frequency of *H. fraxineus* reads between autumn and spring in plot 6 ($17.5 \pm 10.1\%$ to $5.7 \pm 4.6\%$)
381 resulted in a lower overall average in spring compared to autumn, whereas *H. fraxineus* significantly increased
382 in the other plots (coef=0.42, pvalue<0.001).

383 4.2 Fungal communities present on the studied rachises

384 The fungal richness detected by sequencing of ITS 1 region reached an average of 48 OTUs per rachis in
385 autumn and 33 OTUs per rachis in spring. Decaying rachis are a place of strong mutation of the fungal
386 community. Immediately after leaf fall, the community is richer than in spring and is a senescent leaf com-
387 munity. During the collect, the rachises were relatively fresh with leaflet, sometime green and on the soil
388 surface. The community is a mixture of leaf endophytes, pathogens and early litter saprotrophs. The fo-
389 liar endophytes and pathogens found in autumn rachis have already been described in previous studies of
390 the endophytic community in living ash leaves (*Fraxinipholia fraxini*, *Taphrina carpini*, *Aurebasidium pullu-*
391 *lans*, *Cladosporium cladosporioides*) (Davydenko et al., 2013; Cross et al., 2017; Schlegel et al., 2016; Schlegel
392 et al., 2018). The reads frequency of class of Dothideomycetes were declined between autumn and spring, in
393 parallel the Leotiomycetes (ascomycete) and Agaricomycetes (basidiomycete) increased in frequency. This
394 fungal succession dynamic is common in the degradation of deciduous leaves, where ascomycete leaf endo-
395 phytes shift to primary saprotrophs for which resources are immediately available and easy to metabolise

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

396 (Kosawang et al., 2023; Frankland, 1998). They are then gradually replaced by basidiomycetes capable
397 of decomposing more complex elements (Promputtha et al., 2005; Voříšková & Baldrian, 2013; Viveló &
398 Bhatnagar, 2019). *Fraxinipholia fraxini* is considered as an inhibitor of *H. fraxineus* ascospore germination
399 (Schlegel et al., 2016) but no correlation was identified between the presence of *Fraxinipholia fraxini* and
400 *H. fraxineus* in autumn rachises (sup data).

401 In spring, the rachises were fragmented and mesh bags were integrated in the forest floor into the soil.
402 This process is accompanied by the installation of fungi specialised in the decomposition of organic matter.
403 The communities found on these rachises were dominated by the litter saprotrophs and wood saprotrophs.
404 Some of the litter saprotrophs dominant in spring litter were already present in autumn at low frequency as
405 *Mycarthris* spp, *Chalara aurea*, *Hymenoscyphus caudatus* and *Hymenoscyphus scutula* (sup data). The two
406 other species of *Hymenoscyphus* had a presence negatively correlated with the presence of *H. fraxineus*. In
407 dual culture, Kowalski et al. (2021) (Kowalski & Bilański, 2021) reported that *H. caudatus* and *H. scutula*
408 had a direct contact interaction with *H. fraxineus* with a reduction in growth rate classed between 26% and 50%
409 . Among the fungi detected only in spring, *Cyathicula fraxinophila* and *Cyathicula coronata* were negatively
410 correlated with *H. fraxineus* (respective zscore -3.29 and -4.22). The dual culture showed an inhibition
411 zone with the culture of *H. fraxineus* and a reduction rate corresponding to the zscore value hierarchy,
412 lower than 25% for *Cyathicula fraxinophila* and higher than 50% for *Cyathicula coronata*. These fungal
413 species could be considered as competitors for rachis colonisation during the winter, limiting the spread of
414 *H. fraxineus* within the rachis tissues, which would have an impact on inoculum production. In fact, the
415 struggle to colonise the rachis reduces the space occupied by *H. fraxineus*. A lower spatial representation
416 would reduce the probability of mating (by projection of conidia acting as spermatia (Gross et al., 2012)).
417 The pseudosclerotial plate synthesized by *H. fraxineus* is thought to protect against other saprotrophs (Gross
418 et al., 2012) but, according to our results, it had no apparent impact on the richness of OTUs present on the
419 rachis. Kowalski and Bilański, 2022, described fungi growing on pseudosclerotial plates and apothecia involved
420 in their decomposition. Among the OTUs identified in our dataset, none appears in the list established by
421 these authors. Certainly because in this study, the rachises were analyzed before the appearance of apothecia.

422 These possible antagonisms constitute a pathway for the progressive integration of *H. fraxineus* into the
423 ash litter fungal community. The increase in competitive interactions during winter development would lead to
424 regulation of the pathogen by limiting inoculum production. During the early years of the epidemic, the spread
425 of the pathogen depended on its ability to produce large quantities of ascospores to infect hosts. Regulation
426 of inoculum production by fungal communities in the litter would be the start of a slow naturalization of the
427 ash dieback agent.

References

Agan, Ahto et al. (Feb. 2023). "Traces of *Hymenoscyphus fraxineus* in Northeastern Europe Extend Further
Back in History than Expected". In: *Plant Disease* 107.2, pp. 344–349. ISSN: 0191-2917. DOI: 10.1094/
PDIS-04-22-0807-RE.

CHAPITRE 4. DESCRIPTION DE LA COMMUNAUTÉ FONGIQUE DE LA LITIÈRE DE FRÊNE : RÉGULATRICE POTENTIELLE DE LA PRODUCTION D'INOCULUM

- Arnold, A. Elizabeth et al. (2003). “Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.26, pp. 15649–15654. ISSN: 0027-8424, 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.2533483100.
- Bernard, Maria et al. (2021). “FROGS: a powerful tool to analyse the diversity of fungi with special management of internal transcribed spacers”. In: *Briefings in Bioinformatics* 22.6, bbab318. ISSN: 1477-4054. DOI: 10.1093/bib/bbab318.
- Brethes, A. et al. (1995). “Classification of forest humus forms: a French proposal”. In: *Annales des Sciences Forestières* 52.6, pp. 535–546. ISSN: 0003-4312, 1878-6545. DOI: 10.1051/forest:19950602.
- Busby, Posy E., Mary Ridout, and George Newcombe (2016). “Fungal endophytes: modifiers of plant disease”. In: *Plant Molecular Biology* 90.6, pp. 645–655. ISSN: 0167-4412, 1573-5028. DOI: 10.1007/s11103-015-0412-0.
- Coker, Tim L. R. et al. (2019). “Estimating mortality rates of European ash (*Fraxinus excelsior*) under the ash dieback (*Hymenoscyphus fraxineus*) epidemic”. In: *PLANTS, PEOPLE, PLANET* 1.1, pp. 48–58. ISSN: 2572-2611. DOI: 10.1002/ppp3.11.
- Colautti, Robert I. et al. (2004). “Is invasion success explained by the enemy release hypothesis?” In: *Ecology Letters* 7.8, pp. 721–733. ISSN: 1461-0248. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2004.00616.x.
- Cross, Hugh et al. (2017). “Fungal diversity and seasonal succession in ash leaves infected by the invasive ascomycete *Hymenoscyphus fraxineus*”. In: *New Phytologist* 213.3, pp. 1405–1417. ISSN: 1469-8137. DOI: 10.1111/nph.14204.
- Davis, Mark A., J. Philip Grime, and Ken Thompson (2000). “Fluctuating resources in plant communities: a general theory of invasibility”. In: *Journal of Ecology* 88.3, pp. 528–534. ISSN: 0022-0477, 1365-2745. DOI: 10.1046/j.1365-2745.2000.00473.x.
- Davydenko, K. et al. (2013). “Fungi in foliage and shoots of *Fraxinus excelsior* in eastern Ukraine: a first report on *Hymenoscyphus pseudoalbidus*”. In: *Forest Pathology* 43.6. Ed. by S. Woodward, pp. 462–467. ISSN: 14374781. DOI: 10.1111/efp.12055.
- Elton, C.S. (1958). *Elton, C.S. 1958: The ecology of invasions by animals and plants. London: Methuen - ProQuest*. URL: <https://www.proquest.com/openview/29a4f761436b49f530822de89d624302/1?pq-origsite=gscholar&cbl=37139>.
- Escudié, Frédéric et al. (2018). “FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution”. In: *Bioinformatics* 34.8, pp. 1287–1294. ISSN: 1367-4803. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx791.
- Frankland, Juliet C. (1998). “Fungal succession — unravelling the unpredictable”. In: *Mycological Research* 102.1, pp. 1–15. ISSN: 09537562. DOI: 10.1017/S0953756297005364.
- Gajera, Harsukh et al. (2013). “Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system – a review”. In: *Current Research in Microbiology and Biotechnology* 1, pp. 133–142.
- Ghelardini, Luisa et al. (2017). “Ecology of invasive forest pathogens”. In: *Biological Invasions* 19. DOI: 10.1007/s10530-017-1487-0.
- Gonthier, Paolo, Massimo Gennaro, and Giovanni Nicolotti (2005). “Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*”. In: *Fungal Diversity* 21.

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

- Grosdidier, Marie et al. (2020). "Landscape epidemiology of ash dieback". In: *journal of ecology* 108.5, pp. 1789–1799. ISSN: 0022-0477. DOI: 10.1111/1365-2745.13383.
- Gross, A. et al. (2012). "Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*". In: *Fungal Genetics and Biology* 49.12, pp. 977–986. ISSN: 1087-1845. DOI: 10.1016/j.fgb.2012.08.008.
- Gross, Andrin et al. (2014). "*Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback". In: *Molecular Plant Pathology* 15.1, pp. 5–21. ISSN: 1364-3703. DOI: 10.1111/mp.12073.
- Haňáčková, Zuzana et al. (Apr. 1, 2017). "Fungal Endophytes in Ash Shoots – Diversity and Inhibition of *Hymenoscyphus fraxineus*". In: *Baltic Forestry* 23, pp. 89–106.
- Hubbard, Michelle, James Germida, and Vladimir Vujanovic (2012). "Fungal endophytes improve wheat seed germination under heat and drought stress". In: *Botany* 90.2, pp. 137–149. ISSN: 1916-2790. DOI: 10.1139/b11-091.
- Hui, Cang et al. (2016). "Defining invasiveness and invasibility in ecological networks". In: *Biological Invasions* 18.4, pp. 971–983. ISSN: 1387-3547, 1573-1464. DOI: 10.1007/s10530-016-1076-7.
- Ioos, Renaud et al. (2009). "Rapid in planta detection of *Chalara fraxinea* by a real-time PCR assay using a dual-labelled probe". In: *European Journal of Plant Pathology* 125.2, pp. 329–335. ISSN: 1573-8469. DOI: 10.1007/s10658-009-9471-x.
- Jabiol, Bernard et al. (2007). *L'humus sous toutes ses formes, deuxième édition*. ENGREF.
- Kosawang, Chatchai et al. (2023). "Fungal succession in decomposing ash leaves colonized by the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* or its harmless relative *Hymenoscyphus albidus*". In: *Frontiers in microbiology* 14, p. 1154344. ISSN: 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1154344.
- Kowalski, T. (2006). "*Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland". In: *Forest Pathology* 36.4, pp. 264–270. ISSN: 1439-0329. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x.
- Kowalski, Tadeusz and Piotr Bilanski (2022). "Fungicolous Fungi on Pseudosclerotial Plates and Apothecia of *Hymenoscyphus fraxineus* and Their Biocontrol Potential". In: *Microorganisms* 10.11, p. 2250. ISSN: 2076-2607. DOI: 10.3390/microorganisms10112250.
- Kowalski, Tadeusz and Piotr Bilański (2021). "Fungi Detected in the Previous Year's Leaf Petioles of *Fraxinus excelsior* and Their Antagonistic Potential against *Hymenoscyphus fraxineus*". In: *Forests* 12.10, p. 1412. DOI: 10.3390/f12101412.
- Lonsdale, W M (1999). "Global patterns of plant invasions and the concept of invasibility". In: 80.5.
- Luis, Patricia et al. (2004). "Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil". In: *Soil Biology and Biochemistry* 36.7, pp. 1025–1036. ISSN: 0038-0717. DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.02.017.
- Mannaa, Mohamed and Young-Su Seo (2021). "Plants under the Attack of Allies: Moving towards the Plant Pathobiome Paradigm". In: *Plants* 10.1, p. 125. ISSN: 2223-7747. DOI: 10.3390/plants10010125.
- Milenković, I. et al. (2017). "First report of *Hymenoscyphus fraxineus* on *Fraxinus excelsior* in Montenegro". In: *Forest Pathology* 47.5, e12359. ISSN: 1439-0329. DOI: 10.1111/efp.12359.
- Mitchell, Charles E. and Alison G. Power (2003). "Release of invasive plants from fungal and viral pathogens". In: *Nature* 421.6923, pp. 625–627. ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/nature01317.

CHAPITRE 4. DESCRIPTION DE LA COMMUNAUTÉ FONGIQUE DE LA LITIÈRE DE FRÊNE : RÉGULATRICE POTENTIELLE DE LA PRODUCTION D'INOCULUM

- Naeem, Shahid et al. (2000). “Plant diversity increases resistance to invasion in the absence of covarying extrinsic factors”. In: *Oikos* 91.1, pp. 97–108. ISSN: 00301299. DOI: 10.1034/j.1600-0706.2000.910108.x.
- Oliva, Jonàs et al. (2021). “Competitive exclusion amongst endophytes determines shoot blight severity on pine”. In: *Functional Ecology* 35.1, pp. 239–254. ISSN: 1365-2435. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13692>.
- Pauvert, Charlie et al. (2020). *Microbial association networks give relevant insights into plant pathobiomes*. preprint. Ecology.
- Põlme, Sergei et al. (2020). “FungalTraits: a user-friendly traits database of fungi and fungus-like stramenopiles”. In: *Fungal Diversity* 105.1, pp. 1–16. ISSN: 1878-9129. DOI: 10.1007/s13225-020-00466-2.
- Prior, Kirsten M. et al. (May 2015). “Insights from community ecology into the role of enemy release in causing invasion success: the importance of native enemy effects”. In: *Biological Invasions* 17.5, pp. 1283–1297. ISSN: 1387-3547, 1573-1464. DOI: 10.1007/s10530-014-0800-4.
- Promputtha, Itthayakorn et al. (2005). “Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (Magnoliaceae)”. In: *Fungal Diversity* 20.
- Qiu, Zhiguang et al. (2022). “Response of the plant core microbiome to *Fusarium oxysporum* infection and identification of the pathobiome”. In: *Environmental Microbiology* 24. DOI: 10.1111/1462-2920.16194.
- Richardson, David M. and Petr Pyšek (2006). “Plant invasions: merging the concepts of species invasiveness and community invasibility”. In: *Progress in Physical Geography: Earth and Environment* 30.3. Publisher: SAGE Publications Ltd, pp. 409–431. ISSN: 0309-1333. DOI: 10.1191/0309133306pp490pr.
- Schlegel, Markus, Valentin Queloz, and Thomas N. Sieber (2018). “The Endophytic Mycobiome of European Ash and Sycamore Maple Leaves – Geographic Patterns, Host Specificity and Influence of Ash Dieback”. In: *Frontiers in Microbiology* 9. Publisher: Frontiers. ISSN: 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02345.
- Schlegel, Markus et al. (2016). “Effects of endophytic fungi on the ash dieback pathogen”. In: *FEMS Microbiology Ecology* 92.9. ISSN: 0168-6496. DOI: 10.1093/femsec/fiw142.
- Schulz, B. et al. (2015). “Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms”. In: *Current Science* 109.1, pp. 39–45. ISSN: 0011-3891.
- Schulz, Barbara Joan, Laura Rabsch, and Corina Junker (2019). “Chemical Warfare in the Plant Microbiome Leads to a Balance of Antagonisms and a Healthy Plant”. In: *Seed Endophytes: Biology and Biotechnology*. Ed. by Satish Kumar Verma and Jr White James Francis. Cham: Springer International Publishing, pp. 171–189. ISBN: 978-3-030-10504-4. DOI: 10.1007/978-3-030-10504-4_9.
- Shamsi, Wajeeha et al. (2022). “Novel RNA viruses from the native range of *Hymenoscyphus fraxineus*, the causal fungal agent of ash dieback”. In: *Virus Research* 320, p. 198901. ISSN: 0168-1702. DOI: 10.1016/j.virusres.2022.198901.
- Shamsi, Wajeeha et al. (2023). *Possible biological control of ash dieback using the parasitic *Hymenoscyphus fraxineus* mitovirus 2*.
- Short, Ian and Jerry Hawe (2018). “Ash dieback in Ireland”. In: *Irish Forestry* 75.1, pp. 44–72. ISSN: 0021-1192.

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

- Stroheker, S., V. Queloz, and M. Nemesio-Gorriz (2021). “First report of *Hymenoscyphus fraxineus* causing ash dieback in Spain”. In: *New Disease Reports* 44.2. ISSN: 2044-0588, 2044-0588. DOI: 10.1002/ndr2.12054.
- Unterseher, Martin (2011). “Diversity of Fungal Endophytes in Temperate Forest Trees”. In: *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*. Ed. by Anna Maria Pirttilä and A. Carolin Frank. Forestry Sciences. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 31–46. ISBN: 978-94-007-1599-8.
- Unterseher, Martin et al. (2007). “Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy”. In: *Mycological Progress* 6.3, pp. 201–212. ISSN: 1861-8952. DOI: 10.1007/s11557-007-0541-1.
- Vayssier-Taussat, Muriel et al. (2014). “Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics”. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4. ISSN: 2235-2988. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00029.
- Vivelo, Sasha and Jennifer M. Bhatnagar (Oct. 1, 2019). “An evolutionary signal to fungal succession during plant litter decay”. In: *FEMS microbiology ecology* 95.10, fiz145. ISSN: 1574-6941. DOI: 10.1093/femsec/fiz145.
- Voříšková, Jana and Petr Baldrian (2013). “Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes”. In: *The ISME Journal* 7.3, pp. 477–486. ISSN: 1751-7370. DOI: 10.1038/ismej.2012.116.
- Zhang, Naili et al. (2020). “Community and neighbourhood tree species richness effects on fungal species in leaf litter”. In: *Fungal Ecology* 47, p. 100961. ISSN: 1754-5048. DOI: 10.1016/j.funeco.2020.100961.
- Zhao, Yan-Jie et al. (2013). “*Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan”. In: *Mycotaxon* 122.1, pp. 25–41. ISSN: 00934666, 21548889. DOI: 10.5248/122.25.

CHAPITRE 4. DESCRIPTION DE LA COMMUNAUTÉ FONGIQUE DE LA LITIÈRE DE FRÊNE : RÉGULATRICE POTENTIELLE DE LA PRODUCTION D'INOCULUM

Supplemental data

Table S1 (part1). Complete analysis of threshold indicator taxa (TITAN method) of OTUs related to the presence of *H. fraxineus* (quantified by qPCR) and their difference in OTU detection as a function of season. The zscore indicates the level of relationship between OTU frequencies and *H. fraxineus* DNA quantification (zscore <0= negative relationship, zscore>0 = positive relationship, NS= no significant relationship), the occurrence correspond to number of rachis on which the OTU was detected. The estimator is the coefficient of difference in detection between seasons (negative= detection in autumn> spring; positive detection in autumn < spring). Mean frequencies are given in percent, in bold highlight the significant higher value observed between seasons.

Primary lifestyle	Secondary lifestyle	Class	OTU names	OTU rank	Average frequency in Autumn	Average frequency in Spring	Total number of reads	Seasonal differences of detection			TITAN2				
								Estimator	Std. Error	P_value	Occurrence in rachis in Autumn	zscore Autumn	Occurrence in rachis in Spring	zscore Spring	
litter_saprotroph	plant_pathogen	Leotiomycetes	s__Chalara_aurea_18	species	<0.1	21.5	1708790	6.9	0.02	<0.001	64/230	NS	225/230	NS	
	litter_saprotroph	Leotiomycetes	g__Mycosphaeria_1071	genus	<0.1	10.4	879071	7.7	0.04	<0.001	31/230	-4.56	228/230	NS	
	litter_saprotroph	Agancomycetes	s__Tubania_praestans_82	species	-	7.6	544941	-	-	-	0/230	-	47/230	-7.99	
	wood_saprotroph	Agancomycetes	g__Macrotiphula_943	genus	-	5.8	388261	-	-	-	0/230	-	44/230	NS	
	plant_pathogen	Leotiomycetes	s__Hymenoscyphus_fraxineus_26	species	4.1	3.7	383236	-0.1	0	<0.001	74/230	25.62	106/230	20.38	
	litter_saprotroph	Leotiomycetes	s__Tetradadium_maxilliforme_190	species	-	3.1	279963	-	-	-	0/230	-	189/230	-4.12	
	litter_saprotroph	Leotiomycetes	g__Tetradadium_745	genus	-	2.9	252959	-	-	-	0/230	-	201/230	NS	
	plant_pathogen	Leotiomycetes	s__Hymenoscyphus_caudatus_76	species	<0.1	2.4	222648	4.9	0.02	<0.001	22/230	-	8.87	138/230	-5.18
	litter_saprotroph	Leotiomycetes	s__Cyathocula_fraxinophila_24	species	-	2.1	166373	-	-	-	0/230	-	111/230	-3.29	
	litter_saprotroph	Tremellomycetes	s__Dioszegia_dumuzi_98	species	2	<0.1	143026	-5.5	0.04	<0.001	179/230	NS	21/230	6.72	
	litter_saprotroph	Leotiomycetes	g__Tetradadium_810	genus	-	0.9	84030	-	-	-	0/230	-	127/230	4.91	
	litter_saprotroph	Leotiomycetes	s__Tetradadium_maxilliforme_83	species	-	1	83600	-	-	-	0/230	-	161/230	NS	
	plant_pathogen	Leotiomycetes	s__Hymenoscyphus_scutula_157	species	<0.1	0.9	83126	5.5	0.05	<0.001	13/230	NS	119/230	-5.96	
	plant_pathogen	Dothideomycetes	s__Cladosporium_allycium_163	species	1.1	<0.1	81562	-4.8	0.04	<0.001	221/230	-	-5.39	33/230	3.32
	litter_saprotroph	Agancomycetes	g__Efibulobasidium_444	genus	-	1	75130	-	-	-	0/230	-	81/230	7.48	
	plant_pathogen	Dothideomycetes	s__Sphaerulina_pseudovirgaureae_276	species	1.1	<0.1	73268	-5.7	0.06	<0.001	120/230	NS	0/230	-	
	plant_pathogen	Dothideomycetes	s__Cladosporium_cladosporioides_123	species	0.9	<0.1	67313	-3.1	0.02	<0.001	221/230	NS	83/230	6.73	
	litter_saprotroph	Leotiomycetes	s__Alatospora_acuminata_67	species	-	0.8	61544	-	-	-	0/230	-	196/230	5.91	
	litter_saprotroph	Tremellomycetes	s__Dioszegia_crocea_146	species	0.5	-	47039	-	-	-	151/230	-4.31	0/230	-	
	litter_saprotroph	Dothideomycetes	s__Rachidadosporium_pini_106	species	0.4	<0.1	35338	-2.5	0.02	<0.001	92/230	-3.75	24/230	NS	
	litter_saprotroph	Leotiomycetes	s__Cyathocula_coronata_25	species	-	0.4	31973	-	-	-	0/230	-	62/230	-4.22	
	litter_saprotroph	Leotiomycetes	s__Calloria_urticae_181	species	0.4	<0.1	29412	-3.4	0.03	<0.001	19/230	-	5.92	24/230	7.69
	litter_saprotroph	Leotiomycetes	g__Mycosphaeria_829	genus	-	0.3	27632	-	-	-	0/230	-	164/230	-5.59	
	litter_saprotroph	Dothideomycetes	g__Phaeosphaeria_525	genus	0.3	-	25807	-	-	-	69/230	NS	0/230	-	
	plant_pathogen	Dothideomycetes	s__Sclerostagonospora_rosae_61	species	0.3	-	25503	-	-	-	107/230	NS	0/230	-	
	litter_saprotroph	Leotiomycetes	g__Tetradadium_977	genus	-	0.3	24337	-	-	-	0/230	-	62/230	NS	
	litter_saprotroph	Tremellomycetes	s__Dioszegia_hungarica_93	species	0.2	-	19058	-	-	-	161/230	-7.05	0/230	-	
	litter_saprotroph	Agancomycetes	g__Sistotrema_773	genus	-	0.3	18744	-	-	-	0/230	-	15/230	-4.48	
	litter_saprotroph	Dothideomycetes	s__Paracourbitaria_corni_128	species	0.2	<0.1	17762	-2.2	0.03	<0.001	85/230	NS	39/230	2.72	
	litter_saprotroph	Leotiomycetes	g__Alatospora_701	genus	-	0.2	17429	-	-	-	0/230	-	151/230	5.6	
	litter_saprotroph	Agancomycetes	g__Sistotrema_932	genus	-	0.3	16307	-	-	-	0/230	-	11/230	-6.14	
	litter_saprotroph	Leotiomycetes	s__Flagellospora_curvula_14	species	-	0.2	16273	-	-	-	0/230	-	47/230	-4.84	
	litter_saprotroph	Agancomycetes	g__Efibulobasidium_747	genus	-	0.2	13791	-	-	-	0/230	-	67/230	NS	
	foliar_endophyte	litter_saprotroph	Dothideomycetes	s__Fraxinicola_fraxini_4	species	47.7	1.6	3595324	-4	0	<0.001	230/230	NS	218/230	NS
	plant_pathogen	plant_pathogen	Taphinomycetes	s__Taphrina_carpini_103	species	4.6	-	379781	-	-	-	227/230	-5.08	0/230	-
		plant_pathogen	Leotiomycetes	s__Neofabraea_vagabunda_16	species	1.2	2.5	296553	0.9	0	<0.001	97/230	NS	178/230	-8.49
litter_saprotroph		Dothideomycetes	s__Alternaria_infectoria_59	species	1.5	0.1	119001	-3.2	0.02	<0.001	212/230	NS	65/230	NS	
plant_pathogen		Dothideomycetes	g__Cercospora_994	genus	1.1	-	79722	-	-	-	132/230	NS	0/230	-	
foliar_endophyte		Leotiomycetes	s__Coleophoma_paracylindrospora_70	species	0.4	0.7	74439	1.1	0.01	<0.001	30/230	NS	103/230	NS	
litter_saprotroph		Agancomycetes	g__Tygervalleyomyces_739	genus	-	0.8	66383	-	-	-	0/230	-	55/230	NS	
litter_saprotroph		Dothideomycetes	s__Alternaria_434	genus	0.8	0.1	62842	-1.6	0.01	<0.001	200/230	NS	109/230	NS	
litter_saprotroph		Sordariomycetes	s__Cylindrodendrum_hubeiense_167	species	0.2	0.2	49369	-0.2	0.01	<0.001	68/230	-	-9.38	133/230	NS
litter_saprotroph		Agancomycetes	s__Typhula_erythropus_51	species	-	0.4	42002	-	-	-	0/230	-	32/230	-3.86	
plant_pathogen		Taphinomycetes	g__Taphrina_1022	genus	0.5	-	34840	-	-	-	150/230	-3.91	0/230	-	
litter_saprotroph		Sordariomycetes	s__Sarocladium_strictum_154	species	0.2	-	21587	-	-	-	71/230	-2.77	0/230	-	
plant_pathogen		Sordariomycetes	s__Leptosilia_muelleri_182	species	0.2	-	17643	-	-	-	30/230	NS	0/230	-	
litter_saprotroph		Dothideomycetes	g__Didymella_622	genus	0.2	<0.1	17474	-3.4	0.05	<0.001	93/230	NS	24/230	NS	
litter_saprotroph		Dothideomycetes	s__Elsinoe_lepagae_328	species	0.2	-	10884	-	-	-	59/230	3.56	0/230	-	

4.1. ARTICLE 3 : FUNGAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH ASH RACHISES IN RELATION WITH *HYMENOSCYPHUS FRAXINEUS* COLONIZATION

Table S1 (part2). Complete analysis of threshold indicator taxa (TITAN method) of OTUs related to the presence of *H. fraxineus* (quantified by qPCR) and their difference in OTU detection as a function of season. The zscore indicates the level of relationship between OTU frequencies and *H. fraxineus* DNA quantification (zscore <0= negative relationship, zscore>0 = positive relationship, NS= no significant relationship), the occurrence correspond to number of rachis on which the OTU was detected. The estimator is the coefficient of difference in detection between seasons (negative= detection in autumn> spring; positive detection in autumn < spring). Mean frequencies are given in percent, in bold highlight the significant higher value observed between seasons.

Primary lifestyle	Secondary lifestyle	Class	OTU names	OTU rank	Average frequency in Autumn	Average frequency in Spring	Total number of reads	Seasonal differences of detection			TITAN2					
								Estimator	Std. Error	p_value	Occurrence in rachis in Autumn	zscore Autumn	Occurrence in rachis in Spring	zscore Spring		
unidentified	unidentified	Leotiomycetes	f_Dermateaceae_947	family	<0.1	2.7	242220	4.9	0.02	<0.001	46/230	NS	192/230	3.85		
	unidentified	Leotiomycetes	o_Helotiales_558	order	-	0.8	74270	-	-	-	0/230	-	95/230	NS		
	unidentified	Dothideomycetes	s_Paracucurbitana_corni_322	species	0.8	0.1	73725	-2.6	0.01	<0.001	109/230	NS	41/230	NS		
	unidentified	Tremellomycetes	o_Tremellales_690	order	0.8	-	68462	-	-	-	176/230	-3.09	0/230	-		
	unidentified	Leotiomycetes	f_Pseudeurotiaceae_715	family	0.6	-	51635	-	-	-	193/230	-5.73	0/230	-		
	unidentified	Dothideomycetes	o_Myriangiales_848	order	0.7	-	51620	-	-	-	113/230	-5.84	0/230	-		
	unidentified	Leotiomycetes	f_Pseudeurotiaceae_504	family	0.6	-	45897	-	-	-	124/230	-5.01	0/230	-		
	unidentified	Leotiomycetes	o_Helotiales_509	order	-	0.5	39702	-	-	-	0/230	-	97/230	-3.85		
	unidentified	Agaricomycetes	o_Auriculariales_1029	order	-	0.4	32175	-	-	-	0/230	-	12/230	NS		
	unidentified	Leotiomycetes	o_Helotiales_724	order	-	0.3	28686	-	-	-	0/230	-	54/230	NS		
	unidentified	Dothideomycetes	f_Elsinoaceae_467	family	0.4	-	28488	-	-	-	151/230	NS	0/230	-		
	unidentified	Tremellomycetes	o_Tremellales_1061	order	0.3	-	24139	-	-	-	148/230	NS	0/230	-		
	unidentified	Agaricomycetes	f_Sebacinaceae_412	family	-	0.3	21653	-	-	-	0/230	-	26/230	NS		
	unidentified	Sordariomycetes	f_Nectriaceae_454	family	0.3	<0.1	21135	-2.1	0.02	<0.001	122/230	NS	45/230	7.55		
	unidentified	Leotiomycetes	f_Dermateaceae_564	family	<0.1	0.2	19122	2.8	0.03	<0.001	42/230	NS	128/230	NS		
	unidentified	Dothideomycetes	o_Pleosporales_819	order	-	0.2	17844	-	-	-	0/230	-	14/230	NS		
	unidentified	Agaricomycetes	f_Chionosphaeraceae_455	family	-	0.2	16115	-	-	-	0/230	-	29/230	NS		
	unidentified	Leotiomycetes	o_Helotiales_802	order	-	0.2	16108	-	-	-	0/230	-	71/230	NS		
	unidentified	Agaricomycetes	c_Agaricomycetes_921	class	-	0.2	14461	-	-	-	0/230	-	12/230	NS		
	unidentified	unidentified	p_Ascomycota_623	phylum	-	0.2	14138	-	-	-	104/230	NS	0/230	-		
	unidentified	Dothideomycetes	f_Venturiaceae_494	family	-	0.2	12816	-	-	-	0/230	-	146/230	NS		
	unidentified	unidentified	p_Ascomycota_825	phylum	-	0.2	12130	-	-	-	79/230	-	4.45	0/230	-	
	unidentified	Leotiomycetes	o_Helotiales_630	order	-	0.2	11740	-	-	-	0/230	-	19/230	-10.56		
	soil_saprotroph	soil_saprotroph	Tremellomycetes	s_Vishniacozyma_carnescens_45	species	6	<0.1	500468	-8.9	0.05	<0.001	223/230	NS	22/230	NS	
		soil_saprotroph	Tremellomycetes	s_Vishniacozyma_victoriae_131	species	1	<0.1	96561	-4	0.02	<0.001	204/230	-	2.59	53/230	4.31
		soil_saprotroph	Agaricomycetes	s_Coprinopsis_lagopus_184	species	-	0.9	89849	-	-	-	0/230	-	21/230	NS	
soil_saprotroph		Tremellomycetes	s_Vishniacozyma_heimaeyensis_133	species	1	<0.1	66754	-3.3	0.02	<0.001	137/230	-	3.31	38/230	14.04	
soil_saprotroph		Tremellomycetes	g_Vishniacozyma_529	genus	0.4	<0.1	28025	-3.8	0.04	<0.001	173/230	NS	21/230	4.86		
soil_saprotroph		Tremellomycetes	s_Vishniacozyma_dimennae_12	species	0.3	-	24185	-	-	-	141/230	NS	0/230	-		
soil_saprotroph		Tremellomycetes	s_Apiotrichum_gracile_38	species	0.3	-	22007	-	-	-	177/230	-	4.06	0/230	-	
soil_saprotroph		Tremellomycetes	s_Pskurozyma_filicatus_214	species	-	0.2	19361	-	-	-	0/230	-	30/230	NS		
soil_saprotroph	Tremellomycetes	s_Mrakiella_aqualica_74	species	0.3	<0.1	18230	-2.9	0.03	<0.001	69/230	NS	23/230	NS			
wood_saprotroph	litter_saprotroph	Agaricomycetes	s_Psathyrella_corrugis_199	species	-	3.9	297551	-	-	-	0/230	-	19/230	5.22		
	wood_saprotroph	Peizizomycotina	s_Chaetopsis_grisea_150	species	-	0.9	73390	-	-	-	0/230	-	72/230	NS		
	wood_saprotroph	Agaricomycetes	s_Subulicystidium_perlongisporium_60	species	-	1.1	71361	-	-	-	0/230	-	30/230	NS		
	wood_saprotroph	Dothideomycetes	s_Praetiumplia_obducens_135	species	0.2	-	17242	-	-	-	72/230	NS	0/230	-		
mycoparasite	fungal_decomposer	Tremellomycetes	s_Papilotrema_flavescens_173	species	2.8	<0.1	233919	-6	0.04	<0.001	200/230	-	5.82	24/230	NS	
	fungal_decomposer	Cystobasidiomycetes	s_Erythrobasidium_yunnanense_84	species	1.2	-	93358	-	-	-	220/230	NS	0/230	-		
unspecified_saprotroph	unspecified_saprotroph	Tremellomycetes	s_Filobasidium_weringae_243	species	2	-	157866	-	-	-	210/230	-	5.93	0/230	-	
	epiphyte	Tremellomycetes	s_Genolevnia_tibetensis_170	species	0.5	-	44714	-	-	-	95/230	-	6.98	0/230	-	
	foliar_endophyte	Tremellomycetes	g_Cryptococcus_893	genus	0.6	<0.1	43564	-7.2	0.19	<0.001	135/230	-	5.37	0/230	-	
epiphyte	epiphyte	Tremellomycetes	s_Genolevnia_amylytica_318	species	0.4	-	33357	-	-	-	176/230	NS	0/230	-		
	litter_saprotroph	Cystobasidiomycetes	s_Bucklezyma_aurantiaca_86	species	2.3	<0.1	185522	-5.7	0.04	<0.001	225/230	-	4.62	32/230	NS	
litter_saprotroph	Cystobasidiomycetes	s_Symmetrospora_gracilis_39	species	0.3	-	28836	-	-	-	159/230	-	7.04	0/230	-		
dung_saprotroph	litter_saprotroph	Agaricomycetes	s_Bolbitis_tibetans_231	species	-	1.5	128475	-	-	-	0/230	-	12/230	-8.06		
	dung_saprotroph	Sordariomycetes	s_Apodus_deciduus_162	species	-	0.3	20745	-	-	-	0/230	-	38/230	NS		
root_endophyte	soil_saprotroph	Agaricomycetes	g_Serendipita_659	genus	-	1.1	92338	-	-	-	0/230	-	34/230	4.5		
animal_parasite	wood_saprotroph	Orbiliomycetes	g_Dactylaria_650	genus	-	1.3	96304	-	-	-	0/230	-	140/230	7.63		
sooty_mold	litter_saprotroph	Dothideomycetes	s_Aureobasidium_pululans_217	species	0.5	-	40783	-	-	-	193/230	-	5.92	0/230	-	

Chapitre 5

Discussion générale

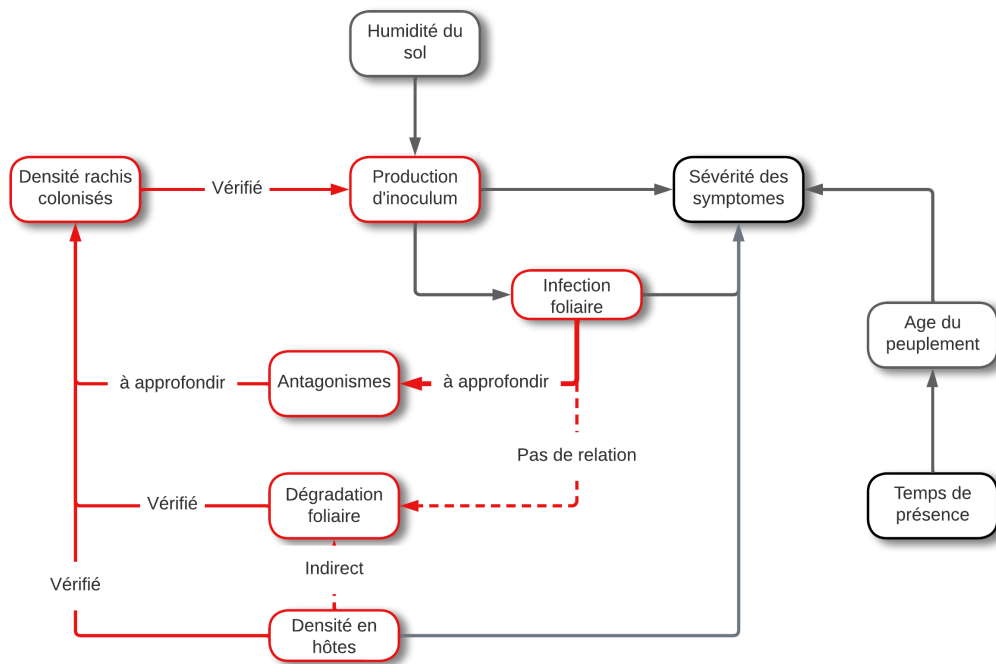


FIGURE. 5.1 – Bilan des relations des facteurs déterminants pour la production d'inoculum

Les études réalisées durant cette thèse ont permis de mettre en lumière les facteurs agissant sur la production d'inoculum dans la litière. Ainsi, trois facteurs de régulation du niveau de production d'inoculum, modulant potentiellement l'impact de la chalarose sur les frênes, ont été caractérisés : i) la relation entre densité d'hôtes et densité de rachis colonisés, ii) la persistance de ces derniers dans la litière et iii) le développement de la communauté fongique au sein de cette litière (fig. 5.1).

La sévérité des symptômes étant étroitement liée au niveau de production d'inoculum, la régulation de celui-ci serait en mesure de réduire le taux d'infection foliaire et la sévérité du dépérissement. L'apparition de facteurs de régulation de la production d'inoculum associée à l'adaptation de l'hôte pourraient à long terme mener à l'atténuation de la maladie (BURDON & THRALL, 2009).

5.1 Une production d'inoculum densité dépendante

Le premier facteur densité en hôtes - densité en rachis colonisés et production d'inoculum, distingue d'une part une capacité de production d'apothécies réduite pour des densités de rachis colonisés dans la litière inférieure au seuil Allee et d'autre part une relation entre densité d'hôtes et taux d'infection foliaire nécessaire pour fournir une densité de rachis colonisés suffisante pour franchir le seuil Allee.

5.1.1 Dépendance à la densité de rachis colonisés

La mise en évidence d'un effet Allee sur la capacité de production d'apothécies implique une production d'inoculum réduite aux faibles densités et suggère la présence d'un effet Allee démographique. Cela dépend en pratique de la force de la densité dépendance négative liée à la compétition, un effet Allee sur une composante de la fitness pouvant ne pas résulter en un effet Allee démographique si celle-ci est trop importante (STEPHENS et al., 1999). Pour la chalarose, on voit mal comment la compétition entre isolats de *H. fraxineus* pourrait réduire la fitness du champignon pour les faibles densités de populations concernées. Le taux de croissance serait alors réduit aux faibles densités de population de *H. fraxineus*. La présence d'un effet Allee chez une espèce invasive réduit la capacité d'établissement d'une population par rapport à un organisme pour lequel la croissance est indépendante à la densité de population (TAYLOR & HASTINGS, 2005; ZHOU & WANG, 2004). Ceci implique qu'en absence de populations sources capables de fournir une pression de propagules suffisante, l'établissement d'une nouvelle population est fortement diminué voire voué à l'échec (TOBIN et al., 2011) ou que sa dispersion peut être réduite (phénomène de "pinning" KEITT et al., 2001). La présence de ce phénomène dans la dynamique de population d'un invasif peut être mis à profit pour faciliter la gestion d'éradication de foyer ou de confinement de maladie. Il est souvent difficile d'éliminer entièrement l'organisme introduit, or dans ce contexte une diminution de la population sous le seuil Allee suffirait à endiguer l'établissement (TAYLOR & HASTINGS, 2005). Dans le cas de la chalarose, la capacité de dispersion du pathogène réduit les chances de réussite de l'éradication car beaucoup de

nouveaux foyers sont générés par un apport extérieur d'inoculum. Malgré une diminution brutale de la charge de spores dans l'air dans les 50 premiers mètres d'une source d'inoculum, la distance moyenne de dispersion de l'inoculum est de l'ordre du kilomètre, (GROSDIDIER et al., 2018a). Les frênes isolés à proximité d'un peuplement conspécifique plus dense et fortement infecté présentent également un taux d'infection foliaire significatif sans pour autant avoir des symptômes sévères (GROSDIDIER et al., 2020). Une tentative d'éradication a été menée en Irlande, justifiée par le fait que les foyers étaient suffisamment isolés. Cette tentative s'est soldée par un échec car la persistance dans la litière a mal été prise en compte (BAXTER et al., 2023).

En revanche la présence de l'effet Allee explique probablement que la plantation de frênes contaminés n'ait joué qu'un rôle mineur dans la dispersion de la chalarose en France (GROSDIDIER, 2017). En effet, ce phénomène peut expliquer que l'on puisse observer une latence significative entre arrivée du pathogène et détections de symptômes significatifs (TAYLOR & HASTINGS, 2005). Pour la chalarose, la première détection en Grande Bretagne a par exemple été réalisée en 2012 alors que l'analyse *a posteriori* indique que *H. fraxineus* était présent dans certaines plantations de frênes dès 2004 ou 2005 (WYLDER et al., 2018). Le rapport entre le temps de latence observé d'environ une dizaine d'années et la vitesse de colonisation de 70 km/an, suggère que la colonisation par dissémination naturelle sera plus rapide que le développement d'un nouveau foyer suite à un transfert de plant.

5.1.2 Densité en hôte, facteur de vulnérabilité à la chalarose

Avant l'arrivée de la chalarose, les peuplements purs de frênes étaient présents dans des milieux frais et humides, optimales pour la croissance du frêne mais également très favorables à la production d'inoculum (GROSDIDIER et al., 2020; HAVRDOVÁ et al., 2017). Les plantations avaient été faites de sorte que le frêne soit en conditions optimales. La conjugaison de la forte densité en frêne et de conditions stationnelles favorables rendent ces peuplements particulièrement vulnérables à l'installation *H. fraxineus* et au développement de la maladie (SKOVSGAARD et al., 2017).

Les estimations du taux d'infection foliaire nécessaire pour fournir une densité de rachis colonisés permettant de franchir le seuil Allee en fonction de la densité de frênes que nous avons réalisées, ont permis de montrer pourquoi les peuplements denses sont plus vulnérables à la chalarose. Dans les peuplements de frênes présentant une forte densité d'hôtes, le taux d'infection correspondant au seuil Allee sera plus bas que dans un peuplement avec peu de frênes. Ainsi, pour les frênes en très faible densité, l'établissement d'une population d'*H. fraxineus* nécessitera un taux d'infection foliaire nettement plus important pour s'affranchir de l'effet Allee. Cette réduction de la production d'inoculum aux faibles densités d'hôtes génère alors des symptômes moins sévères. Dans les données de l'IFN, dans plus de 50% des peuplements où le frêne est présent, il est à une densité de moins de 5 m².ha⁻¹, ce qui représente environ 25% de frênes. Ainsi, les frênes présents spontanément dans ces peuplements hétérogènes devraient être nettement moins impactés par la chalarose et peuvent être conservés lors de la gestion sylvicole. De même, il peut être envisageable lors des plantations d'inclure quelques plants de frênes à faible densité

afin de diversifier le peuplement et de ne pas prendre un risque trop important.

5.2 Dégradation de la litière de frêne et persistance d'*H. fraxineus*

Le deuxième facteur est la persistance de *H. fraxineus* dans la litière et sa capacité à produire de l'inoculum lors de sa phase saprophytique. Cet agent pathogène se maintient dans la litière sous forme de rachis pseudosclérotiaux qui sont analogues à des sclérotés. Il conserve alors sa capacité à produire des apothécies durant plusieurs années. L'accumulation de rachis colonisés constitue alors un réservoir d'inoculum au sein de la litière.

5.2.1 Cinétique de dégradation de la litière de frêne

Dans notre étude, il a été démontré que les rachis de frêne dans leur ensemble persistaient plusieurs années de suite dans la litière. Seuls les rachis subsistent, les folioles ayant disparues dès le printemps suivant la chute. Nous pouvons supposer que par leur structure, la composition des rachis serait potentiellement plus riche en lignine que les folioles. Nous avons vu que les humus rencontrés dans les différents peuplements du dispositif sont de la famille des mulls dont la dégradation est rapide avec cependant certaines nuances. Selon les essences accompagnatrices et les conditions pédo-climatiques, le type d'humus dans lequel se dégrade la litière de frêne varie, affectant la dégradation des rachis. Dans les peuplements à dominante en frêne, érable ou tilleul dont les feuilles ont un C/N faible, les stations sur laquelle ces peuplements sont installés ont un sol neutre à faiblement acide et frais, les humus rencontrés sont alors de types eumull a dégradation rapide résultant de l'activité des macroinvertébrés (JABIOL et al., 2007). Dans les peuplements dominés par le chêne ou le charme, les feuilles ont un C/N plus élevé. Les stations ont un sol plus acide et moins humides. Les humus sont alors de types mésomull ou oligomull dont la dégradation, assurée par les champignons saprophytes est plus lente (JABIOL et al., 2007). Dans les peuplements mélangés avec le chêne ou le charme, la dégradation de la litière de frêne tend à être plus lente.

La cinétique de dégradation des rachis colonisés par d'*H. fraxineus* n'apparaît pas significativement différente des rachis non colonisés et ceci malgré la présence d'une plaque pseudosclérotiale par le pathogène. La persistance d'*H. fraxineus* est alors principalement due à la vitesse de dégradation de son substrat. De plus, le temps de présence du rachis colonisé n'affecte pas la capacité d'*H. fraxineus* à produire des apothécies. Des rachis colonisés présents dans la litière depuis plus de 3 ans ont le même potentiel de fructification que les rachis les plus récents. Cela permet alors au pathogène de se maintenir dans la litière. Les essences composants le peuplement, les facteurs stationnels associés et le type d'humus présent impactent donc la persistance d'*H. fraxineus* dans la litière. HAVRDOVÁ et al. (2017) ont observé que l'association du frêne avec le chêne avait un effet positif sur la sévérité des symptômes et un effet négatif lors d'une association avec l'érable. Cette observation pourrait indiquer que la persistance plus longue des rachis colonisés par *H. fraxineus* dans un humus sous des chênes, à la dégradation moins effi-

cace, pourrait être un facteur aggravant de la maladie. Ceci pourrait être étudié en utilisant les données collectées par l'inventaire forestier de l'IGN sur leurs placettes d'observation. En effet, ils relèvent à la fois la composition des peuplements, l'état sanitaire des frênes (arbres morts, mortalité de branches) et le type d'humus, ce qui devrait permettre de tester cette hypothèse.

5.2.2 La litière de frêne comme réservoir d'inoculum

La source d'inoculum présente dans la litière est composée de plusieurs cohortes de rachis colonisés. Ceci peut stabiliser la présence du champignon. Les différentes cohortes de rachis colonisés présentes dans la litière résultent d'années présentant des taux d'infection foliaire variables selon les conditions météorologiques. Ainsi les rachis issus d'une année favorable à l'infection foliaire peuvent compenser les années défavorables.

D'autre part, durant la phase d'établissement l'accumulation des rachis colonisés augmente progressivement la densité de population du pathogène dans la litière. Ce maintien sous forme de rachis pseudoclérotiaux peut alors permettre au pathogène de s'affranchir progressivement de l'effet Allee si besoin. Ceci pourrait expliquer une évolution observée fréquemment dans les milieux ouverts peu favorable à la chalarose : de nombreuses haies restent visiblement saines malgré la présence de *H. fraxineus*, puis dépérissent très brutalement en une ou deux saisons. On peut faire l'hypothèse que la production locale d'inoculum était limitée par une densité trop faible de rachis pseudosclérotiaux au sol et que les feuilles étaient majoritairement infectées par un inoculum venant du voisinage. Cet avantage s'est progressivement réduit par l'accumulation de rachis pseudosclérotiaux persistant dans la litière.

Les facteurs permettant de réduire le réservoir d'inoculum peuvent être une solution pour réduire la production d'ascospores et limiter les dégâts de la chalarose. Ainsi, l'étude du suivi de la cinétique de dégradation des rachis peut être étendue à d'autres milieux ou à d'autres associations afin de mieux définir dans quel contexte le pathogène est en mesure de persister plus longtemps dans la litière.

5.3 Communauté fongique de la litière de frêne

Ce dernier axe avait pour but de décrire l'évolution de la présence d'*H. fraxineus* dans les tissus des rachis depuis la chute des feuilles jusqu'à la période de fructification d'*H. fraxineus* dans la litière ainsi que la communauté fongique associée. L'étude menée étant juste corrélative ne pouvait pas démontrer que certaines espèces agissent en tant qu'antagonistes, mais visait à repérer de potentielles espèces régulatrices.

5.3.1 Identification d'espèces au potentiel régulateur

La description de la communauté fongique se développant sur les rachis a mis en évidence des espèces ayant une corrélation négative ou positive avec le développement d'*H. fraxineus*. Les espèces *Hymenoscyphus caudatus*, *Hymenoscyphus scutula*, *Cyathicula fraxinophila* et *Cyathicula coronata* sont particulièrement intéressantes car leur occurrence est négativement corrélée

à celle d'*H. fraxineus* au printemps. KOWALSKI et BILAŃSKI (2021) ont mis en évidence une inhibition de la croissance du mycélium d'*H. fraxineus* lorsque celui-ci est mis en confrontation en boîte de Pétri avec chacune de ces quatre espèces fongiques. Selon ces deux observations, ces espèces autochtones pourraient avoir un rôle de régulateur pour la colonisation par d'*H. fraxineus* des rachis dans la litière. L'étude de leur biologie et écologie permettrait de mieux connaître leur répartition, leur habitat et les conditions optimales à leur développement. Pour cela, une campagne d'échantillonnage dans peuplements de frêne à la composition, au milieu et au degrés de déperissement différents devra être réalisée. Une quantification spatio-temporelle peut être réalisée par qPCR à l'aide d'outils moléculaires telles que des amorces et sondes spécifiques aux espèces retenues. La confrontation de leur dynamique de population avec celle d'*H. fraxineus* permettrait de mieux appréhender si ces espèces ont bien un rôle d'antagoniste face au pathogène.

De plus, les compétiteurs identifiés appartiennent majoritairement à la guildes fongique des saprotrophes de litière dont le rôle est de dégrader spécifiquement les feuilles ce qui pourrait impacter la persistance des rachis. Cette structure et la composition de la communauté fongique sont amenées à évoluer durant la décomposition de la litière (VOŘÍŠKOVÁ & BALDRIAN, 2013) ce qui impliquerait des études à plus long terme. La succession des communautés fongiques pourrait alors être mis en relation avec la persistance des rachis et les facteurs impactant leur dégradation tels que le pH ou la composition du peuplement. Dans d'autres composantes de la matière organique forestière, l'étude de la succession des espèces fongiques au cours de la décomposition du bois a révélé que certaines espèces, initialement décrites comme endophytes, pouvaient rester plusieurs années dans certains compartiments du bois mort (i.e. duramen) sous forme saprophytique et même devenir le groupe dominant (VIOTTI et al., 2021). La description par metabarcoding de la communauté fongique réalisée durant cette thèse peut être répétée à différents pas de temps et mise en relation avec la cinétique de dégradation des rachis en fonction du peuplement et/ou du type d'humus dans le but d'expliquer les effets du peuplements ou de la station sur la persistance des rachis colonisés par *H. fraxineus*.

5.4 Avenir du frêne en France

Une crise sanitaire telle que celle générée par la chalarose s'achève à long terme par un retour à un équilibre proche de l'originel ou à la mise en place d'un nouvel équilibre avec un densité d'hôtes plus faible (**brunier_guide_nodate**). Tout un ensemble de mécanismes peuvent déterminer l'issue d'une crise provoquée par l'introduction d'un pathogène invasif (BURDON et al., 2013). Ces mécanismes peuvent jouer sur des horizons temporels différents selon qu'il s'agit de baisse de la densité des populations hôtes, d'une évolution du microbiote dans lequel le parasite évolue ou d'une adaptation de la population de l'hôte (résistance) ou du parasite (virulence) (fig. 5.2). De manière conjointe, on peut aussi avoir un changement des conditions climatiques devenant moins favorables, comme dans le contexte actuel.

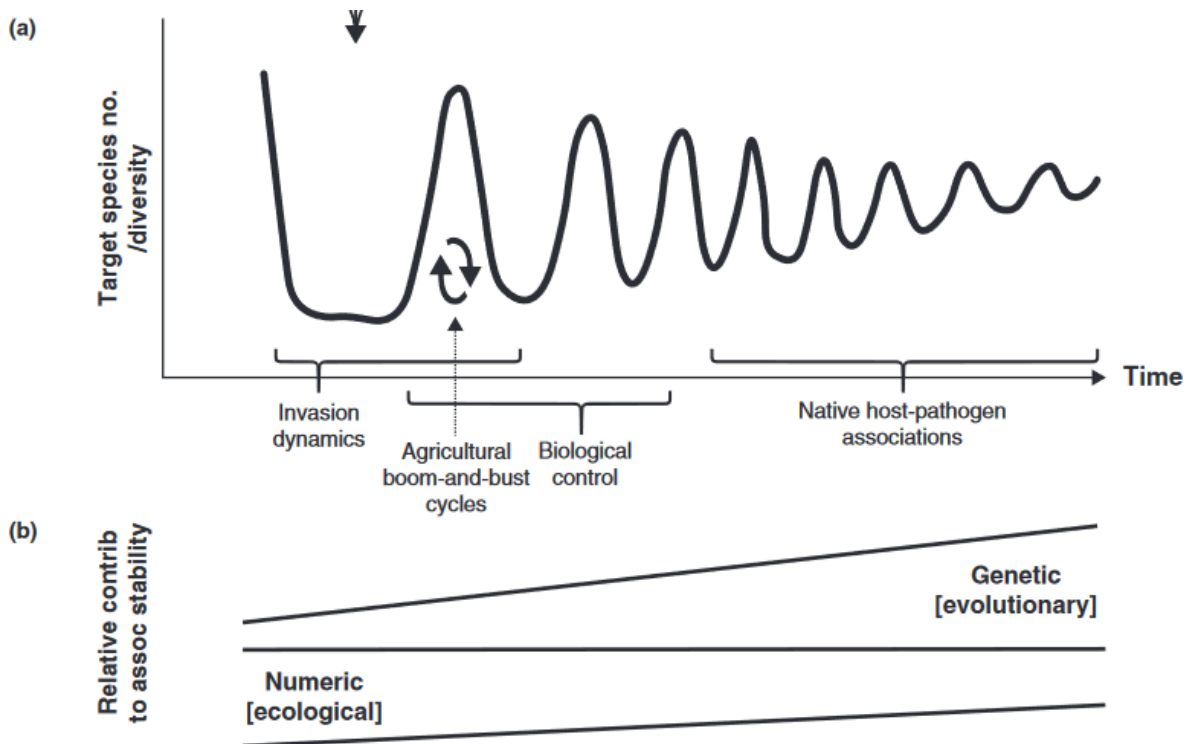


FIGURE. 5.2 — Évolution temporelle de la relation hôte/pathogène suite à l'introduction de ce dernier (BURDON et al., 2013)

Dans certains cas, comme ceux de la graphiose de l'Orme ou du chancre du châtaignier à *Cryphonectria parasitica* aux USA, on observe, à moyen à long terme (de l'ordre de quelques dizaines d'années), une évolution largement dominée par l'effondrement de la population hôte. Mais, on peut également observer un retour à une situation plus proche de l'équilibre initial (DESPREZ-LOUSTAU et al., 2019), comme par exemple dans le cas de l'oïdium du chêne. Pourtant la description de la situation par les forestiers du début du siècle est similaire à celle décrite pour la chalarose.

Pour la crise de la chalarose, nous avons maintenant plus de dix ans de présence de la maladie en France. Il a été constaté que le développement de la maladie progressait rapidement

les premières années. Les premiers symptômes significatifs apparaissent après plus de deux ans de présence du pathogène et les premières mortalités au delà de quatre ans, avant d'augmenter progressivement avec le temps de présence de la maladie. Cependant après dix ans d'épidémie, les dépérissements de houppiers atteignent un plateau et le taux de mortalité semble diminuer (fig. 5.3).

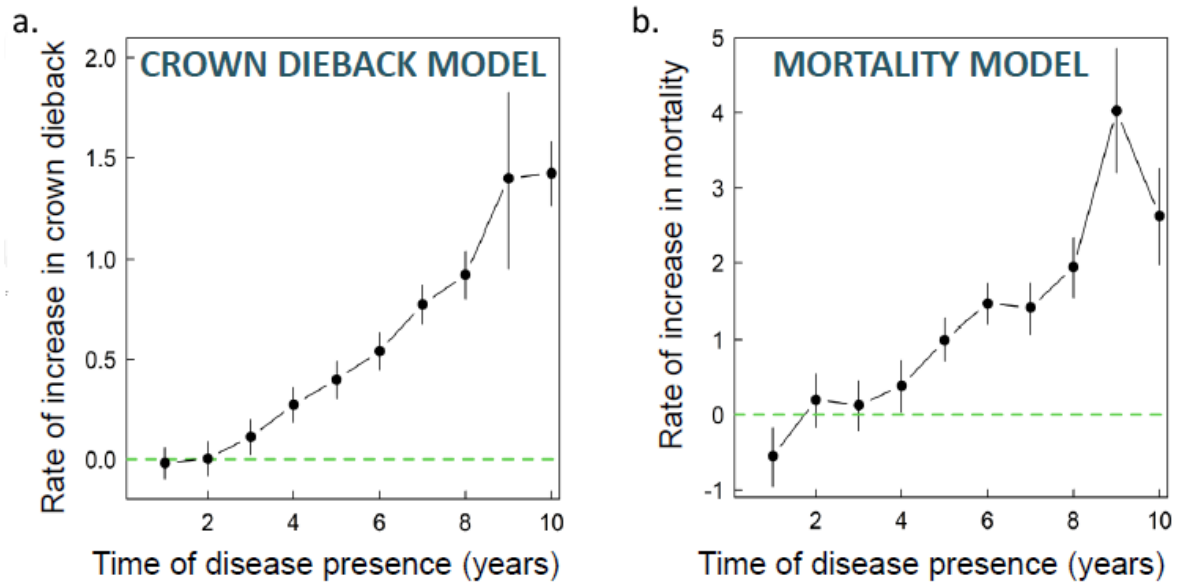


FIGURE. 5.3 — Conséquence de la chalarose sur les frênes en fonction du temps de présence de la maladie avec en a) le taux de dépérissement de houppier et en b) le taux de mortalité des frênes (Gomez-Gallego in prep)

Un autre constat fait durant cette thèse est que le taux de colonisation des rachis a diminué comparativement aux années précédentes (fig. 5.4). De même, une comparaison du taux de colonisation des rachis en fonction de la région montre un effet du temps de présence du pathogène sur l'infection foliaire. Dans les régions nouvellement colonisées par le pathogène, le taux d'infection des rachis est très élevé (deux fois plus que dans celles colonisées depuis plus de 10 ans, Stage M2 de A. Giraudel). Étant donné le lien existant entre le taux d'infection foliaire et le niveau de production d'inoculum, cette diminution de la densité de rachis colonisés dans la litière devrait affecter la production d'inoculum, réduire le taux d'infection foliaire et donc la densité de rachis colonisés l'année suivante, impactant par la suite la sévérité de la maladie.

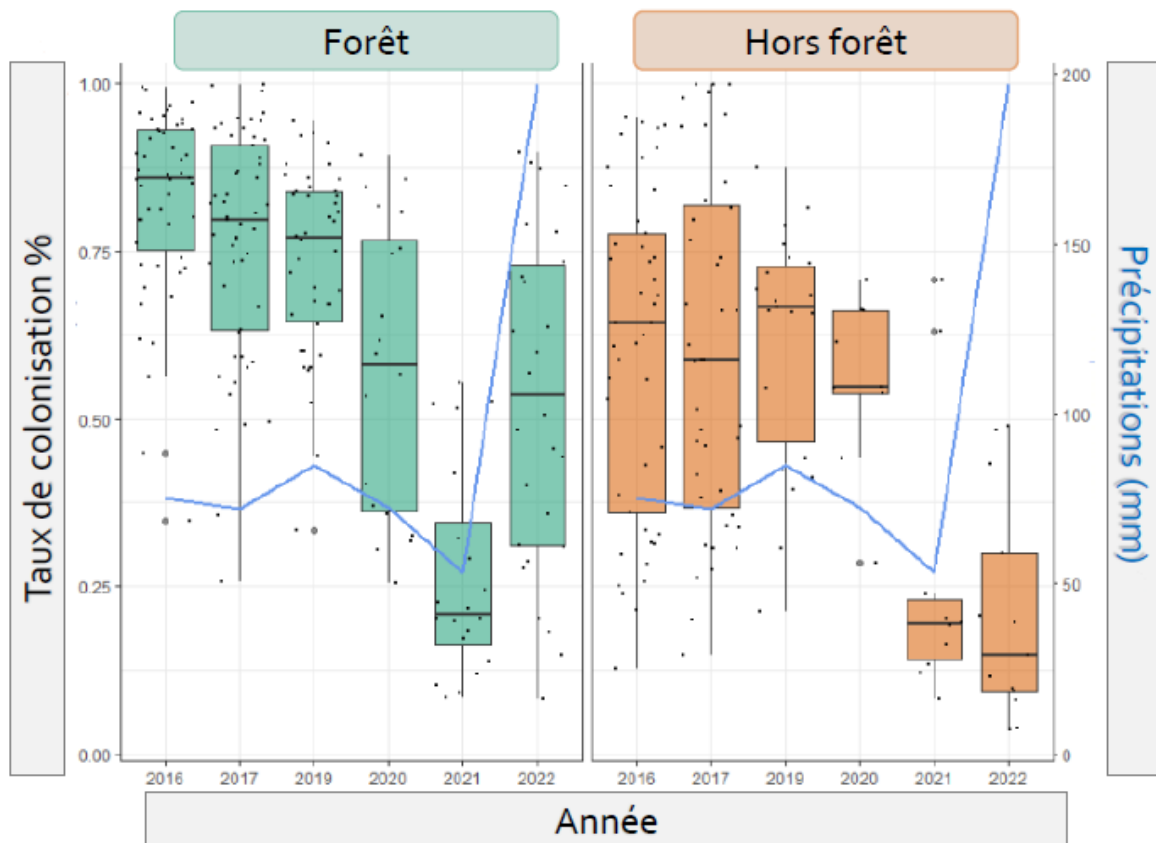


FIGURE. 5.4 — Évolution de la proportion de rachis colonisés par *H. fraxineus* dans la litière au cours de dernières années dans la région de Nancy (stage M2 de Arnaud Giraudel, les données acquises durant cette thèse sont utilisées pour produire ce résultat)

Ces observations pourraient être des signes optimistes pour l'avenir du frêne et présager d'un début de sortie de crise. Il peut être envisageable qu'en fonction du temps de présence du pathogène et des mécanismes d'atténuation qui se mettent progressivement en place, une naturalisation du pathogène soit envisageable. Ces mécanismes peuvent être une diminution de la densité d'hôte en lien avec l'augmentation de leur dépérissement, la dégradation progressive du réservoir d'inoculum ou encore l'apparition d'antagonistes au sein de la communauté fongique (fig. 5.5).

Par ailleurs et conjointement à ces phénomènes, la sélection naturelle d'hôtes tolérants (MCKINNEY et al., 2014; SEMIZER-CUMING et al., 2019) mais également l'évolution des conditions en lien avec le changement climatique sont des facteurs amenés à réduire la sévérité de la maladie.

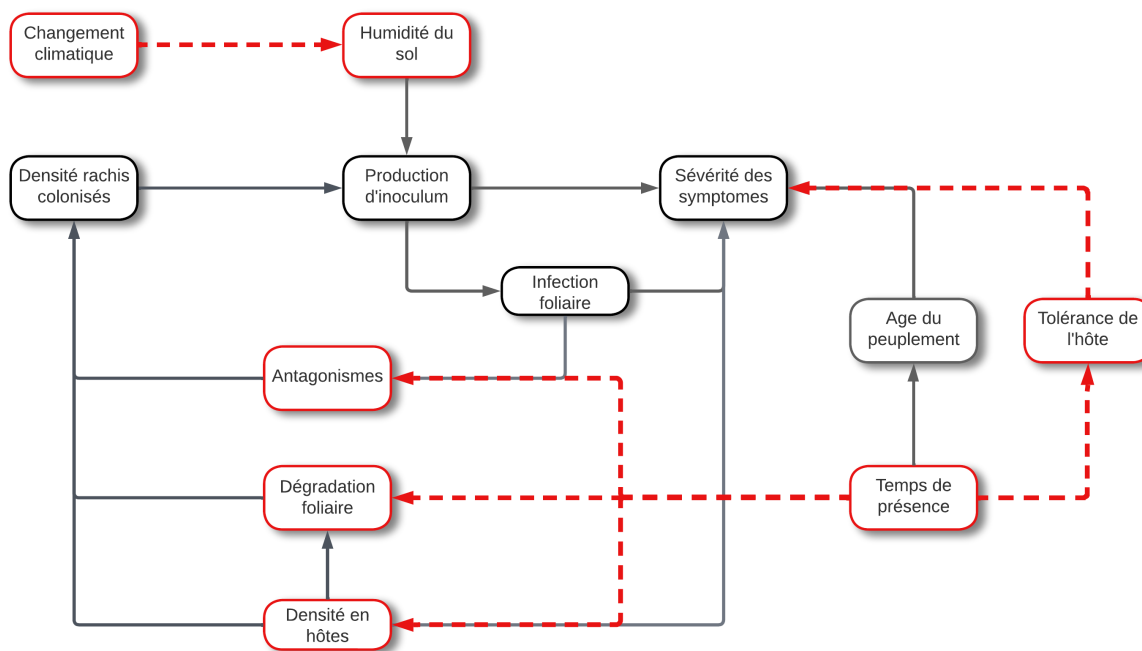


FIGURE. 5.5 – Facteurs pouvant mener à l'atténuation de l'épidémie de charalose

5.4.1 Vers la naturalisation du pathogène ?

Nous avons pu voir que la dynamique de population d'*H. fraxineus* est étroitement liée à celle de son hôte. Il est alors possible que l'interaction hôte-pathogène suive une dynamique de modèles SIR (ANDERSON & MAY, 1997) : après dix années de présence dans les peuplements denses, les houppiers sont fortement dépérissants. La première hypothèse est alors qu'en considérant que la densité d'hôte est reliée à la surface foliaire, l'augmentation du taux de mortalité des branches diminue, ainsi la quantité de feuilles disponibles et nécessaires au pathogène pour débuter son cycle et l'apport annuel de rachis colonisés tendraient alors à décroître (fig. 5.5).

Il a été observé également qu'à niveau d'atteinte du houppier équivalent, le taux de colonisation des rachis est plus élevé dans les peuplements récemment contaminés (fig. 5.6). La deuxième hypothèse suppose que dans les régions nouvellement contaminées le réservoir d'inoculum s'accroît annuellement par l'apport de rachis fortement colonisés et que la persistance des rachis colonisés les années précédentes compense la diminution de feuilles par dépérissement des houppiers. Dans les peuplements où la présence du pathogène est plus ancienne, les houppiers sont fortement dégradés et fournissent peu de feuilles, le réservoir d'inoculum est de moins en moins alimenté par de nouveaux rachis colonisés et se tarie progressivement par la dégradation des rachis colonisés les plus anciens (fig. 5.5).

Afin de vérifier ces hypothèses, il est possible de mesurer, dans des peuplements à densité en

frêne équivalente, la production annuelle de feuilles, par exemple en utilisant des bacs à litière, en fonction du temps de présence de la chararose et de l'état sanitaire des houppiers puis de comparer la densité de rachis colonisés présents dans la litière.

La diminution de l'apport annuel de rachis colonisés et la disparition progressive du réservoir d'inoculum aurait pour conséquence la réduction de la densité de rachis dans la litière limitant alors la production d'inoculum, en particulier si la densité de population d'*H. fraxineus* devient inférieure au seuil Allee.

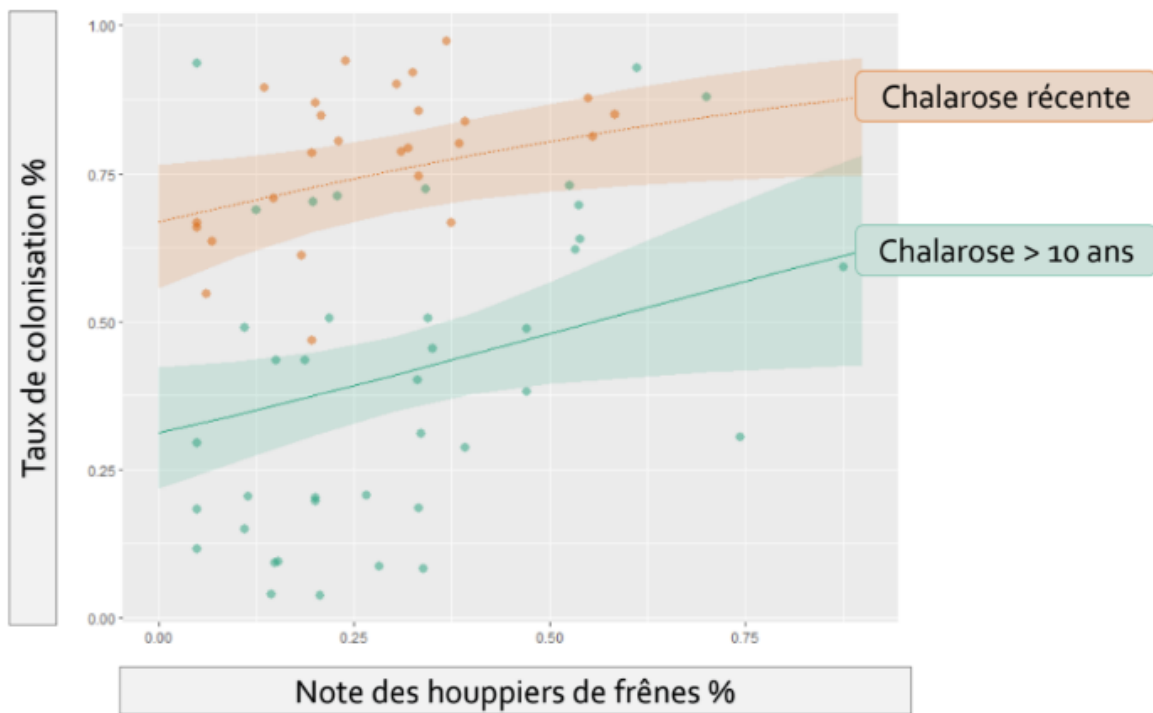


FIGURE 5.6 — Évolution du taux de colonisation en fonction du taux de dégradation des houppiers et du temps de présence de la chararose (Stage M2 de A. Giraudel)

Une troisième hypothèse impliquerait la communauté fongique de la litière de frêne et l'interaction de certaines espèces la constituant avec *H. fraxineus*. Une analyse temporelle doit permettre de suivre l'évolution de ces potentielles interactions en fonction du temps de présence du pathogène invasif. Dans cette thèse mais aussi dans les autres études portant sur la communauté fongique de la litière de frêne (KOSAWANG et al., 2023; KOWALSKI & BILAŃSKI, 2021, 2022), les analyses ont été réalisées dans des peuplements de frênes dont la présence de la chararose est supérieure à 10 ans. Des interactions négatives ou des signes d'inhibitions du pathogène ont pu être mis en évidence dans ces études. Il serait alors intéressant de comparer la communauté fongique en fonction temps de présence du pathogène ainsi que le réseau d'interaction existant au sein de la litière.

Une présence ancienne de la chararose peut également avoir fait évoluer la population de frêne

vers une augmentation de la fréquence d'individus tolérants (MCKINNEY et al., 2011). La pression de sélection exercée par le niveau de production d'inoculum sur la régénération du frêne tend à faire augmenter la valeur sélective des individus tolérants. SEMIZER-CUMING et al. (2021) montrent, par une recherche de parentalité des semis, que les adultes les plus sains étaient sur-représentés. Les individus sont définis comme tolérants lorsqu'ils présentent peu de symptômes sévères dans le houppier. Il semblerait toutefois que les individus restant sains dans le paysage se comportent comme des porteurs sains (MARÇAIS et al., 2023), étant infectés au niveau foliaire et produisant des rachis colonisés permettant la production d'inoculum. Si leur proportion augmente, cela pourrait permettre de maintenir le pool d'inoculum dans la litière puisqu'ils ne dépérissent pas ou peu, tout en gardant l'intégrité de leur feuillage. On ne sait toutefois pas si les rachis produits par ces individus tolérants produisent autant d'inoculum que ceux des individus non tolérants. Enfin, le développement d'*H. fraxineus* est dépendant des conditions climatiques. Les températures supérieures à 35°C limitent le développement du pathogène au sein des tissus des arbres. La pluviométrie estivale agit positivement sur la formation des apothécies et l'infection foliaire. Il est d'ailleurs possible qu'une bonne partie de la baisse de colonisation des rachis de la litière observée dans les régions de l'est et du nord-est de la France soit imputable à la séquence climatique très sèche des dernières années (canicules des années 2018-21, et 2022). Les épisodes de sécheresses et/ou de canicules devenant de plus en plus réguliers ces dernières années, ces événements apparaissent comme l'une des causes principales de la réduction d'infection foliaire observée ces dernières années.

5.5 Conclusion

Cette thèse apporte de nouveaux éléments sur les principaux facteurs agissant sur la production d'inoculum de l'agent pathogène de la chalarose. La prise en compte de ces facteurs favorise la compréhension de la diffusion de l'épidémie et de l'impact de la crise sanitaire qu'elle a engendré. L'établissement du pathogène facilité dans les peuplements ayant une forte densité en frêne, le niveau d'inoculum produit et la persistance du pathogène dans ce type de peuplement expliquent le fort impact sur les frênaies pures de production provoquant une forte perte de capitale sur pied.

En revanche, le niveau d'inoculum plus faible au niveau des frênes isolés ou le potentiel antagonisme observé par certaines espèces saprophytes au sein de la communauté fongique de la litière sont des signaux optimistes pour l'avenir du frêne dans les écosystèmes européens.

Bibliographie

- AGAN A. et al. (2023). Traces of *Hymenoscyphus fraxineus* in Northeastern Europe Extend Further Back in History than Expected. *Plant Disease* **107**, 344-349. DOI : 10.1094/PDIS-04-22-0807-RE.
- ALLEE W. C. (1931). Co-Operation Among Animals. *American Journal of Sociology* **37**, 386-398. DOI : 10.1086/215731.
- (1938). *The social life of animals*. The social life of animals. New York, NY, US : W W Norton & Co. DOI : 10.5962/bhl.title.7226.
- ANDERSON P. K. et al. (2004). Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **19**, 535-544. DOI : 10.1016/j.tree.2004.07.021.
- ANDERSON R. M. et MAY R. M. (1997). The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* **291**, 451-524. DOI : 10.1098/rstb.1981.0005.
- ARNOLD A. E. et al. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 15649-15654. DOI : 10.1073/pnas.2533483100.
- BARAL H.-O., QUELOZ V. et HOSOYA T. (2014). *Hymenoscyphus fraxineus*, the correct scientific name for the fungus causing ash dieback in Europe. *IMA Fungus* **5**, 79-80. DOI : 10.5598/imafungus.2014.05.01.09.
- BARWELL L. J. et al. (2020). Evolutionary trait-based approaches for predicting future global impacts of plant pathogens in the genus *Phytophthora*. *Journal of Applied Ecology*, 1365-2664.13820. DOI : 10.1111/1365-2664.13820.
- BAXTER E. et al. (2023). The introduction of *Hymenoscyphus fraxineus* to Northern Ireland and the subsequent development of ash dieback. *Forest Pathology*. DOI : 10.1111/efp.12789.
- BECKER R. et al. (2020). Analyzing Ash Leaf-Colonizing Fungal Communities for Their Biological Control of *Hymenoscyphus fraxineus*. *Frontiers in Microbiology* **11**. DOI : 10.3389/fmicb.2020.590944.
- BELLARD C. et al. (2013). Will climate change promote future invasions? *Global Change Biology* **19**, 3740-3748. DOI : 10.1111/gcb.12344.
- BLACKBURN T. M. et al. (2011). A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **26**, 333-339. DOI : 10.1016/j.tree.2011.03.023.

BIBLIOGRAPHIE

- BOCK D. G. et al. (2015). What we still don't know about invasion genetics. *Molecular Ecology* **24**, 2277-2297. DOI : [10.1111/mec.13032](https://doi.org/10.1111/mec.13032).
- BRADER G. et al. (2017). Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annual Review of Phytopathology* **55**, 61-83. DOI : [10.1146/annurev-phyto-080516-035641](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035641).
- BRADSHAW R. E. et al. (2019). Reduced Virulence of an Introduced Forest Pathogen over 50 Years. *Microorganisms* **7**, 420. DOI : [10.3390/microorganisms7100420](https://doi.org/10.3390/microorganisms7100420).
- BRANCO S. et al. (2023). Eradication programs against non-native pests and pathogens of woody plants in Europe: which factors influence their success or failure? *NeoBiota* **84**, 281-317. DOI : [10.3897/neobiota.84.95687](https://doi.org/10.3897/neobiota.84.95687).
- BRASIER C. M. (1991). *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia* **115**, 151-161. DOI : [10.1007/BF00462219](https://doi.org/10.1007/BF00462219).
- BRASIER C. M., COOKE D. E. L. et DUNCAN J. M. (1999). Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. en. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 5878-5883. DOI : [10.1073/pnas.96.10.5878](https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5878).
- BRASIER C. M. et WEBBER J. F. (2019). Is there evidence for post-epidemic attenuation in the Dutch elm disease pathogen *Ophiostoma novo-ulmi*? *Plant Pathology* **68**, 921-929. DOI : [10.1111/ppa.13022](https://doi.org/10.1111/ppa.13022).
- BURDON J. J. et CHILVERS G. A. (1982). Host Density as a Factor in Plant Disease Ecology. *Annual Review of Phytopathology* **20**, 143-166. DOI : [10.1146/annurev.py.20.090182.001043](https://doi.org/10.1146/annurev.py.20.090182.001043).
- BURDON J. J. et THRALL P. H. (2009). Coevolution of plants and their pathogens in natural habitats. *Science (New York, N.Y.)* **324**, 755-756. DOI : [10.1126/science.1171663](https://doi.org/10.1126/science.1171663).
- BURDON J., THRALL P. et ERICSON L. (2013). Genes, communities & invasive species: understanding the ecological and evolutionary dynamics of host-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 400-405. DOI : [10.1016/j.pbi.2013.05.003](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.05.003).
- BUSBY P. E., PEAY K. G. et NEWCOMBE G. (2016). Common foliar fungi of *Populus trichocarpa* modify *Melampsora* rust disease severity. *New Phytologist* **209**, 1681-1692. DOI : <https://doi.org/10.1111/nph.13742>.
- CECH T. L. (2005). 2. Auffallende Schadfaktoren an Waldbäumen im Jahr 2005.
- CHANDELIER A. et al. (2014). Detection and quantification of airborne inoculum of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* using real-time PCR assays. *Plant Pathology* **63**, 1296-1305. DOI : [10.1111/ppa.12218](https://doi.org/10.1111/ppa.12218).
- CHANDELIER A. et al. (2016). Temporal evolution of collar lesions associated with ash dieback and the occurrence of *Armillaria* in Belgian forests. *Forest Pathology* **46**, 289-297. DOI : [10.1111/efp.12258](https://doi.org/10.1111/efp.12258).
- CHUMANOVÁ E. et al. (2019). Predicting ash dieback severity and environmental suitability for the disease in forest stands. *Scandinavian Journal of Forest Research* **34**, 254-266. DOI : [10.1080/02827581.2019.1584638](https://doi.org/10.1080/02827581.2019.1584638).

- CLEARY M. R., DANIEL G. et STENLID J. (2013). Light and scanning electron microscopy studies of the early infection stages of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology* **62**, 1294-1301. DOI : 10.1111/ppa.12048.
- COKER T. L. R. et al. (2019). Estimating mortality rates of European ash (*Fraxinus excelsior*) under the ash dieback (*Hymenoscyphus fraxineus*) epidemic. *Plants, People, Planet* **1**, 48-58. DOI : 10.1002/ppp3.11.
- COLAUTTI R. I. et al. (2004). Is invasion success explained by the enemy release hypothesis? *Ecology Letters* **7**, 721-733. DOI : 10.1111/j.1461-0248.2004.00616.x.
- CROSS H. et al. (2017). Fungal diversity and seasonal succession in ash leaves infected by the invasive ascomycete *Hymenoscyphus fraxineus*. *New Phytologist* **213**, 1405-1417. DOI : 10.1111/nph.14204.
- DADACHOVA E. et CASADEVALL A. (2008). Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Current Opinion in Microbiology. Growth and Development: Eukaryotes/Prokaryotes* **11**, 525-531. DOI : 10.1016/j.mib.2008.09.013.
- DALY E. Z. et al. (2023). A synthesis of biological invasion hypotheses associated with the introduction–naturalisation–invasion continuum. *Oikos* **e09645**. DOI : 10.1111/oik.09645.
- DESPREZ-LOUSTAU M.-L., HAMELIN F. M. et MARÇAIS B. (2019). The ecological and evolutionary trajectory of oak powdery mildew in Europe. In : *Wildlife Disease Ecology*. Cambridge University Press, p. 429-457. DOI : 10.1017/9781316479964.015.
- DESPREZ-LOUSTAU M.-L. et al. (2016). An evolutionary ecology perspective to address forest pathology challenges of today and tomorrow. *Annals of Forest Science* **73**, 45-67. DOI : 10.1007/s13595-015-0487-4.
- DRENKHAN R. et HANSO M. (2010). New host species for *Chalara fraxinea*. *New Disease Reports* **22**, 16-16. DOI : 10.5197/j.2044-0588.2010.022.016.
- DUCHAUFOUR P. (1995). *Pedology. Soil, vegetation, environment*. Pedology. Soil, vegetation, environment.
- ELTON C. (1958). *Elton, C.S. 1958: The ecology of invasions by animals and plants*. London: Methuen - ProQuest.
- ENDERLE R., SANDER F. et METZLER B. (2017). Temporal development of collar necroses and butt rot in association with ash dieback. *en. iForest - Biogeosciences and Forestry* **10**, 529-536. DOI : 10.3832/ifor2407-010.
- ENDERLE R., STENLID J. et VASAITIS R. (2019). An overview of ash (*Fraxinus* spp.) and the ash dieback disease in Europe. *CAB Reviews Perspectives in Agriculture Veterinary Science Nutrition and Natural Resources* **14**. DOI : 10.1079/PAVSNNR201914025.
- ENDERLE R. et al. (2013). Temporal development of ash dieback symptoms and spatial distribution of collar rots in a provenance trial of *Fraxinus excelsior*. *European Journal of Forest Research* **132**, 865-876. DOI : 10.1007/s10342-013-0717-y.
- EPANCHIN-NIELL R. S. et LIEBHOLD A. M. (2015). Benefits of invasion prevention: Effect of time lags, spread rates, and damage persistence. *Ecological Economics* **116**, 146-153. DOI : 10.1016/j.ecolecon.2015.04.014.

BIBLIOGRAPHIE

- FABRE B. et al. (2011). Can the emergence of pine *Diplodia* shoot blight in France be explained by changes in pathogen pressure linked to climate change? *Global Change Biology* **17**, 3218-3227. DOI : 10.1111/j.1365-2486.2011.02428.x.
- FEI S. et al. (2019). Biomass losses resulting from insect and disease invasions in US forests. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 17371-17376. DOI : 10.1073/pnas.1820601116.
- FERNANDEZ C. W. et KOIDE R. T. (2013). The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecology* **6**, 479-486. DOI : 10.1016/j.funeco.2013.08.004.
- GAJERA H. et al. (2013). Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system – a review. *Current Research in Microbiology and Biotechnology* **1**, 133-142.
- GARBEVA P., VEEN J. van et ELSAS J. van (2004). Microbial diversity in soil: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 243-270. DOI : 10.1146/annurev.phyto.42.012604.135455.
- GHELARDINI L. et al. (2016). Drivers of emerging fungal diseases of forest trees. *Forest Ecology and Management* **381**, 235-246. DOI : 10.1016/j.foreco.2016.09.032.
- GHELARDINI L. et al. (2017). Ecology of invasive forest pathogens. *Biological Invasions* **19**, 3183-3200. DOI : 10.1007/s10530-017-1487-0.
- GIBBS J. N. (1978). Intercontinental Epidemiology of Dutch Elm Disease. *Annual Review of Phytopathology* **16**, 287-307. DOI : 10.1146/annurev.py.16.090178.001443.
- GIL W. et al. (2017). Ash dieback in Poland - history of the phenomenon and possibilities of its limitation. *Dieback of European Ash (Fraxinus spp.) - consequences and guidelines for sustainable management*, 176-184.
- GONTHIER P., GENNARO M. et NICOLOTTI G. (2005). Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. *Fungal Diversity* **21**.
- GROSDIDIER M. et al. (2018a). Tracking the invasion: dispersal of *Hymenoscyphus fraxineus* airborne inoculum at different scales. *FEMS Microbiology Ecology* **94**. DOI : 10.1093/femsec/fiy049.
- GROSDIDIER M., IOOS R. et MARÇAIS B. (2018b). Do higher summer temperatures restrict the dissemination of *Hymenoscyphus fraxineus* in France? *Forest Pathology* **48**, e12426. DOI : 10.1111/efp.12426.
- GROSDIDIER M. (2017). Épidémiologie de la chalarose du frêne, une maladie causée par l'agent pathogène *Hymenoscyphus fraxineus*. Thèse de doct. Université de Lorraine.
- GROSDIDIER M. et al. (2020). Landscape epidemiology of ash dieback. *Journal of Ecology* **108**, 1789-1799. DOI : 10.1111/1365-2745.13383.
- GROSS A. et HOLDENRIEDER O. (2013). On the longevity of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in petioles of *Fraxinus excelsior*. *Forest Pathology* **43**, 168-170.

- GROSS A. et SIEBER T. N. (2016). Virulence of *Hymenoscyphus albidus* and native and introduced *Hymenoscyphus fraxineus* on *Fraxinus excelsior* and *Fraxinus pennsylvanica*. *Plant Pathology* **65**, 655-663. DOI : 10.1111/ppa.12450.
- GROSS A. et al. (2012). Reproductive mode and life cycle of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Fungal Genetics and Biology* **49**, 977-986. DOI : 10.1016/j.fgb.2012.08.008.
- GROSS A., HOSOYA T. et QUELOZ V. (2014a). Population structure of the invasive forest pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus*. *Molecular Ecology* **23**, 2943-2960. DOI : 10.1111/mec.12792.
- GROSS A. et al. (2014b). *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the causal agent of European ash dieback. *Molecular Plant Pathology* **15**, 5-21. DOI : 10.1111/mpp.12073.
- GUO Q. et al. (2019). Tree diversity regulates forest pest invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 7382-7386. DOI : 10.1073/pnas.1821039116.
- HAN J.-G. et al. (2014). First Report of the Ash Dieback Pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in Korea. *Mycobiology* **42**, 391-396. DOI : 10.5941/MYCO.2014.42.4.391.
- HANÁČKOVÁ Z. et al. (2017). Fungal Endophytes in Ash Shoots – Diversity and Inhibition of *Hymenoscyphus fraxineus*. *Baltic Forestry* **23**, 89-106.
- HARRIS A. R., MULLETT M. S. et WEBBER J. F. (2018). Changes in the population structure and sporulation behaviour of *Phytophthora ramorum* associated with the epidemic on *Larix* (larch) in Britain. *Biological Invasions* **20**, 2313-2328. DOI : 10.1007/s10530-018-1702-7.
- HAUPTMAN T. et al. (2013). Temperature effect on *Chalara fraxinea*: heat treatment of saplings as a possible disease control method. *Forest Pathology* **43**, 360-370. DOI : 10.1111/efp.12038.
- HAVRDOVÁ L. et al. (2017). Environmental and Silvicultural Characteristics Influencing the Extent of Ash Dieback in Forest Stands. *Baltic Forestry* **23**, 168-181.
- HAWKSWORTH D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* **105**, 1422-1432. DOI : 10.1017/S0953756201004725.
- HIETALA A. M. et al. (2013). The invasive ash dieback pathogen *Hymenoscyphus pseudoalbidus* exerts maximal infection pressure prior to the onset of host leaf senescence. *Fungal Ecology* **6**, 302-308. DOI : 10.1016/j.funeco.2013.03.008.
- HILL L. et al. (2019). The £15 billion cost of ash dieback in Britain. *Current Biology* **29**, R315-R316. DOI : 10.1016/j.cub.2019.03.033.
- HUBBARD M., GERMIDA J. et VUJANOVIC V. (2012). Fungal endophytes improve wheat seed germination under heat and drought stress. *Botany* **90**, 137-149. DOI : 10.1139/b11-091.
- HULME P. E. (2009). Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology* **46**, 10-18. DOI : 10.1111/j.1365-2664.2008.01600.x.
- HULTBERG T. et al. (2020). Ash dieback risks an extinction cascade. *Biological Conservation* **244**, 108516. DOI : 10.1016/j.biocon.2020.108516.

BIBLIOGRAPHIE

- HUSSON C. et al. (2015). Evidence for homoploid speciation in *Phytophthora* alni supports taxonomic reclassification in this species complex. *Fungal Genetics and Biology* **77**, 12-21. DOI : 10.1016/j.fgb.2015.02.013.
- HUSSON C. et al. (2012). Occurrence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on infected ash logs. *Plant Pathology* **61**, 889-895. DOI : 10.1111/j.1365-3059.2011.02578.x.
- IGN (2021). Santé des Forêts, Analyse des principales données sanitaires. IF.
- IOOS R. et al. (2009). Rapid in planta detection of *Chalara fraxinea* by a real-time PCR assay using a dual-labelled probe. *European Journal of Plant Pathology* **125**, 329-335. DOI : 10.1007/s10658-009-9471-x.
- JABIOL B. et al. (2007). L'humus sous toutes ses formes, deuxième édition. ENGREF.
- JESCHKE J. M. (2014). General hypotheses in invasion ecology. *Diversity and Distributions* **20**, 1229-1234. DOI : 10.1111/ddi.12258.
- KEITT T. H., LEWIS M. A. et HOLT R. D. (2001). Allee Effects, Invasion Pinning, and Species' Borders. *The American Naturalist* **157**, 203-216. DOI : 10.1086/318633.
- KIRISITS T. et al. (2010). *Chalara fraxinea* associated with dieback of narrow-leafed ash (*Fraxinus angustifolia*).
- KIRISITS T. (2015). Ascocarp formation of *Hymenoscyphus fraxineus* on several-year-old pseudosclerotial leaf rachises of *Fraxinus excelsior*. Thèse de doct. DOI : 10.1111/efp.12183.
- KIRISITS T. et CECH T. L. (2009). Beobachtungen zum sexuellen Stadium des Eschentriebsterben-Erregers *Chalara fraxinea* in Österreich.
- KOPINGA J. et VRIES S. M. G. d. (2017). Ash DieBack (ADB) in amenity trees in the city of Amsterdam - development of a monitoring system and the first results of a large-scale survey in 2015. Dieback of European Ash (*Fraxinus* spp.) - consequences and guidelines for sustainable management, 249-261.
- KOSAWANG C. et al. (2018). Fungal communities associated with species of *Fraxinus* tolerant to ash dieback, and their potential for biological control. *Fungal Biology* **122**, 110-120. DOI : 10.1016/j.funbio.2017.11.002.
- KOSAWANG C. et al. (2023). Fungal succession in decomposing ash leaves colonized by the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* or its harmless relative *Hymenoscyphus albidus*. *Frontiers in microbiology* **14**, 1154344. DOI : 10.3389/fmicb.2023.1154344.
- KOWALSKI T. (2006). *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *Forest Pathology* **36**, 264-270. DOI : 10.1111/j.1439-0329.2006.00453.x.
- KOWALSKI T., BILAŃSKI P. et KRAJ W. (2017). Pathogenicity of fungi associated with ash dieback towards *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology* **66**, 1228-1238. DOI : 10.1111/ppa.12667.
- KOWALSKI T. et HOLDENRIEDER O. (2009a). Pathogenicity of *Chalara fraxinea*. *Forest pathology* **39**, 1-7. DOI : 10.1111/j.1439-0329.2008.00565.x.
- (2009b). The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. *Forest Pathology* **39**, 304-308. DOI : <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2008.00589.x>.

- KOWALSKI T. et BILAŃSKI P. (2021). Fungi Detected in the Previous Year's Leaf Petioles of *Fraxinus excelsior* and Their Antagonistic Potential against *Hymenoscyphus fraxineus*. *Forests* **12**, 1412. DOI : 10.3390/f12101412.
- (2022). Fungicolous Fungi on Pseudosclerotial Plates and Apothecia of *Hymenoscyphus fraxineus* and Their Biocontrol Potential. *Microorganisms* **10**, 2250. DOI : 10.3390/microorganisms10112250.
- KOWALSKI T., BILAŃSKI P. et HOLDENRIEDER O. (2015). Virulence of *Hymenoscyphus albidus* and *H. fraxineus* on *Fraxinus excelsior* and *F. pennsylvanica*. *PLoS ONE* **10**, e0141592. DOI : 10.1371/journal.pone.0141592.
- KOWALSKI T., KRAJ W. et BEDNARZ B. (2016). Fungi on stems and twigs in initial and advanced stages of dieback of European ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. *European Journal of Forest Research* **135**, 565-579. DOI : 10.1007/s10342-016-0955-x.
- KRAJ W., ZAREK M. et KOWALSKI T. (2012). Genetic variability of *Chalara fraxinea*, dieback cause of European ash (*Fraxinus excelsior* L.) *Mycological Progress* **11**, 37-45. DOI : 10.1007/s11557-010-0724-z.
- LANDOLT J. et al. (2016). Ash dieback due to *Hymenoscyphus fraxineus*: what can be learnt from evolutionary ecology? *Plant Pathology* **65**, 1056-1070. DOI : 10.1111/ppa.12539.
- LEVINE J. M. et D'ANTONIO C. M. (1999). Elton Revisited: A Review of Evidence Linking Diversity and Invasibility. *Oikos* **87**, 15-26. DOI : 10.2307/3546992.
- LOCKWOOD J. L., CASSEY P. et BLACKBURN T. (2005). The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 223-228. DOI : 10.1016/j.tree.2005.02.004.
- MADSEN C. L. et al. (2021). Combined progress in symptoms caused by *Hymenoscyphus fraxineus* and *Armillaria* species, and corresponding mortality in young and old ash trees. *Forest Ecology and Management* **491**, 119177. DOI : 10.1016/j.foreco.2021.119177.
- MANSFIELD J., BROWN I. et PAPP-RUPAR M. (2019). Life at the edge – the cytology and physiology of the biotroph to necrotroph transition in *Hymenoscyphus fraxineus* during lesion formation in ash. *Plant Pathology* **68**, 908-920. DOI : 10.1111/ppa.13014.
- MANSFIELD J. W., GALAMBOS N. et SAVILLE R. (2018). The use of ascospores of the dieback fungus *Hymenoscyphus fraxineus* for infection assays reveals a significant period of biotrophic interaction in penetrated ash cells. *Plant Pathology* **67**, 1354-1361. DOI : 10.1111/ppa.12844.
- MARÇAIS B. et DESPREZ-LOUSTAU M.-L. (2014). European oak powdery mildew: impact on trees, effects of environmental factors, and potential effects of climate change. *Annals of Forest Science* **71**, 633-642. DOI : 10.1007/s13595-012-0252-x.
- MARÇAIS B., GIRAUDEL A. et HUSSON C. (2023). Ability of the ash dieback pathogen to reproduce and to induce damage on its host are controlled by different environmental parameters. *PLoS Pathogens* **19**, e1010558. DOI : 10.1371/journal.ppat.1010558.
- MARÇAIS B. et al. (2016). Influence of site and stand factors on *Hymenoscyphus fraxineus*-induced basal lesions. *Plant Pathology* **65**, 1452-1461. DOI : 10.1111/ppa.12542.

BIBLIOGRAPHIE

- MARÇAIS B. et al. (2017). Estimation of Ash Mortality Induced by *Hymenoscyphus fraxineus* in France and Belgium. *Baltic forestry* **23**, 159-167.
- MARÇAIS B. et al. (2022). Chapter 13 - Ash dieback. In : *Forest Microbiology*. Sous la dir. d'ASIEGBU F. O. et KOVALCHUK A. Forest Microbiology. Academic Press, p. 215-237. DOI : 10.1016/B978-0-323-85042-1.00022-7.
- MAZZOLA M. (2002). Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**, 557-564. DOI : 10.1023/A:1020557523557.
- MCKINNEY L. V. et al. (2011). Presence of natural genetic resistance in *Fraxinus excelsior* (Oleraceae) to *Chalara fraxinea* (Ascomycota): an emerging infectious disease. *Heredity* **106**, 788-797. DOI : 10.1038/hdy.2010.119.
- MCKINNEY L. V. et al. (2012). Rapid invasion by an aggressive pathogenic fungus (*Hymenoscyphus pseudoalbidus*) replaces a native decomposer (*Hymenoscyphus albidus*): a case of local cryptic extinction? *Fungal Ecology* **5**, 663-669. DOI : 10.1016/j.funeco.2012.05.004.
- MCKINNEY L. V. et al. (2014). The ash dieback crisis: genetic variation in resistance can prove a long-term solution. *Plant Pathology* **63**, 485-499. DOI : 10.1111/ppa.12196.
- MENDES R. et al. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* **332**, 1097-1100. DOI : 10.1126/science.1203980.
- MITCHELL C. E. et POWER A. G. (2003). Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. *Nature* **421**, 625-627. DOI : 10.1038/nature01317.
- MITCHELL D. J. (1978). Relationships of inoculum levels of several soilborne species of *Phytophthora* and *Pythium* to infection of several hosts. *Phytopathology* **68**, 1754-1759.
- MITCHELL R. J. et al. (2014). Ash dieback in the UK: A review of the ecological and conservation implications and potential management options. *Biological Conservation* **175**, 95-109. DOI : 10.1016/j.biocon.2014.04.019.
- MOUTOU F. et PASTORET P.-P. (2015). Defining an emerging disease. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* **34**, 41-52. DOI : 10.20506/rst.34.1.2344.
- NEMESIO-GORRIZ M. et al. (2019). Lenticel infection in *Fraxinus excelsior* shoots in the context of ash dieback. *iForest - Biogeosciences and Forestry* **12**, 160. DOI : 10.3832/ifor2897-012.
- NGUYEN D. T. et al. (2016). Analyses of the ash dieback pathogen, *Hymenoscyphus fraxineus* suggest role of tree species diversity on colonization and population structure differentiation. *Forest Pathology* **46**, 82-84. DOI : 10.1111/efp.12236.
- NIELSEN L. R. et al. (2017). The susceptibility of Asian, European and North American *Fraxinus* species to the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* reflects their phylogenetic history. *European Journal of Forest Research* **136**, 59-73. DOI : 10.1007/s10342-016-1009-0.
- NOAR R. D. et al. (2021). Early Warning Systems as a Component of Integrated Pest Management to Prevent the Introduction of Exotic Pests. *Journal of Integrated Pest Management* **12**, 16. DOI : 10.1093/jipm/pmab011.

-
- OLIVA J. et al. (2021). Competitive exclusion amongst endophytes determines shoot blight severity on pine. *Functional Ecology* **35**, 239-254. DOI : <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13692>.
- PAAP T., BURGESS T. I. et WINGFIELD M. J. (2017). Urban trees: bridge-heads for forest pest invasions and sentinels for early detection. *Biological Invasions* **19**, 3515-3526. DOI : [10.1007/s10530-017-1595-x](https://doi.org/10.1007/s10530-017-1595-x).
- PAAP T. et al. (2022). Invasion Frameworks: a Forest Pathogen Perspective. *Current Forestry Reports* **8**, 74-89. DOI : [10.1007/s40725-021-00157-4](https://doi.org/10.1007/s40725-021-00157-4).
- PARKER I. M. et GILBERT G. S. (2004). The evolutionary ecology of novel plant-pathogen interactions. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **35**, 675-700. DOI : [10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132339](https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132339).
- PAUTASSO M. et al. (2013). European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback – A conservation biology challenge. *Biological Conservation* **158**, 37-49. DOI : [10.1016/j.biocon.2012.08.026](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.08.026).
- PERSOONS A. et al. (2017). The escalatory Red Queen: Population extinction and replacement following arms race dynamics in poplar rust. *Molecular Ecology* **26**, 1902-1918. DOI : [10.1111/mec.13980](https://doi.org/10.1111/mec.13980).
- PHILIBERT A. et al. (2011). Predicting invasion success of forest pathogenic fungi from species traits. *Journal of Applied Ecology* **48**, 1381-1390. DOI : <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2011.02039.x>.
- PIMENTEL D., ZUNIGA R. et MORRISON D. (2005). Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* **52**, 273-288. DOI : [10.1016/j.ecolecon.2004.10.002](https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2004.10.002).
- PLIŪRA A. et al. (2011). Performance of Twenty Four European *Fraxinus excelsior* Populations in Three Lithuanian Progeny Trials with a Special Emphasis on Resistance to *Chalara fraxinea*. *Baltic Forestry* **17**, 17-34.
- PONGE J.-F. (2003). Humus forms in terrestrial ecosystems: a framework to biodiversity. *Soil Biology and Biochemistry* **35**, 935-945. DOI : [10.1016/S0038-0717\(03\)00149-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00149-4).
- PROSPERO S. et al. (2021). Biological control of emerging forest diseases: How can we move from dreams to reality? *Forest Ecology and Management* **496**, 119377. DOI : [10.1016/j.foreco.2021.119377](https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119377).
- PRZYBYŁ K. (2002). Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. *Forest Pathology* **32**, 387-394. DOI : [10.1046/j.1439-0329.2002.00301.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0329.2002.00301.x).
- QUELOZ V. et al. (2011). Cryptic speciation in *Hymenoscyphus albidus*. *Forest Pathology* **41**, 133-142. DOI : [10.1111/j.1439-0329.2010.00645.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2010.00645.x).
- RAFTOYANNIS Y. et DICK M. W. (2002). Effects of inoculum density, plant age and temperature on disease severity caused by pythiaceae fungi on several plants. *Phytoparasitica* **30**, 67-76. DOI : [10.1007/BF02983972](https://doi.org/10.1007/BF02983972).
- RAMEAU J.-C. et al. (2018). Flore forestière française tome 1, Plaines et collines: Nouvelle édition revue et augmentée. CNPF-IDF.

BIBLIOGRAPHIE

- RIUTTA T. et al. (2012). Experimental evidence for the interacting effects of forest edge, moisture and soil macrofauna on leaf litter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* **49**, 124-131. DOI : 10.1016/j.soilbio.2012.02.028.
- ROBIN C. et DESPREZ-LOUSTAU M.-L. (2018). Émergences de maladies chez les arbres forestiers : Définitions, concepts et recommandations. *Revue forestière française* **70**, 569-577. DOI : 10.4267/2042/70305.
- ROMERALO C. et al. (2015). Fungal endophytes reduce necrosis length produced by *Gremmeniella abietina* in *Pinus halepensis* seedlings. *Biological Control* **80**, 30-39. DOI : 10.1016/j.biocontrol.2014.09.010.
- SANTINI A. et al. (2013). Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. *New Phytologist* **197**, 238-250. DOI : 10.1111/j.1469-8137.2012.04364.x.
- SCHLEGEL M. et al. (2016). Effects of endophytic fungi on the ash dieback pathogen. *FEMS Microbiology Ecology* **92**. DOI : 10.1093/femsec/fiw142.
- SCHOEBEL C. N., ZOLLER S. et RIGLING D. (2014). Detection and genetic characterisation of a novel mycovirus in *Hymenoscyphus fraxineus*, the causal agent of ash dieback. *Infection, Genetics and Evolution* **28**, 78-86. DOI : 10.1016/j.meegid.2014.09.001.
- SCHULZ B. et al. (2015). Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Current Science* **109**, 39-45.
- SCHULZ B. J., RABSCH L. et JUNKER C. (2019). Chemical Warfare in the Plant Microbiome Leads to a Balance of Antagonisms and a Healthy Plant. In : *Seed Endophytes: Biology and Biotechnology*. Sous la dir. de VERMA S. K. et WHITE James Francis J. Cham : Springer International Publishing, p. 171-189. DOI : 10.1007/978-3-030-10504-4_9.
- SCHUMACHER J. (2011). The general situation regarding ash dieback in Germany and investigations concerning the invasion and distribution strategies of *Chalara fraxinea* in woody tissue1. *EPPO Bulletin* **41**, 7-10. DOI : 10.1111/j.1365-2338.2010.02427.x.
- SEIDL R. et al. (2018). Invasive alien pests threaten the carbon stored in Europe's forests. *Nature Communications* **9**. DOI : 10.1038/s41467-018-04096-w.
- SEMIZER-CUMING D. et al. (2019). Negative correlation between ash dieback susceptibility and reproductive success: good news for European ash forests. *Annals of Forest Science* **76**, 1-9. DOI : 10.1007/s13595-019-0799-x.
- SEMIZER-CUMING D. et al. (2021). Gene flow and reproductive success in ash (*Fraxinus excelsior* L.) in the face of ash dieback: restoration and conservation. *Annals of Forest Science* **78**, 14. DOI : 10.1007/s13595-020-01025-0.
- SHAMSI W. et al. (2023). Possible biological control of ash dieback using the parasitic *Hymenoscyphus fraxineus* mitovirus 2. Rapp. tech.
- SHURTLEFF M. C. et AVERRE C. W. I. (1997). Glossary of plant-pathological terms. Glossary of plant-pathological terms.
- SIKES B. A. et al. (2018). Import volumes and biosecurity interventions shape the arrival rate of fungal pathogens. *PLoS biology* **16**, e2006025.

-
- SINGH V. et KUMAR A. (2023). Dissemination and Survival of the Plant Pathogens. In : *Modern Approaches in Plant Pathology*, p. 231.
- SKOVSGAARD J. P. et al. (2017). Silvicultural strategies for *Fraxinus excelsior* in response to dieback caused by *Hymenoscyphus fraxineus*. *Forestry: An International Journal of Forest Research* **90**, 455-472. DOI : 10.1093/forestry/cpx012.
- SØNSTEBØ J. H. et al. (2017). Genome-wide population diversity in *Hymenoscyphus fraxineus* points to an eastern Russian origin of European Ash dieback. bioRxiv, 154492. DOI : 10.1101/154492.
- STEFFENS Christina n. L., HELFRICH M. et FLESSA H. (2012). Effects of beech (*Fagus sylvatica*), ash (*Fraxinus excelsior*) and lime (*Tilia spec.*) on soil chemical properties in a mixed deciduous forest. *Plant and Soil* **352**, 389-403. DOI : 10.1007/s11104-011-1004-7.
- STEPHENS P. A., SUTHERLAND W. J. et FRECKLETON R. P. (1999). What Is the Allee Effect? *Oikos* **87**, 185-190. DOI : 10.2307/3547011.
- STEVENS R. (1960). Plant Pathology, an Advanced Treatise. In : . In J.G. Horsfall and A.E. Dimond. T. 3. New York, NY : Academic Press, p. 357-429.
- STOCKI J. (2001). Przyczyny zamierania drzew i drzewostanów jesionowych w Polsce [1]. *Głos Lasu*, 17-19.
- SUFFERT F. (2006). Epidémiologie du cavity spot de la carotte - Perspectives d'application en protection intégrée. PhD Thesis. Agrocampus - Ecole nationale supérieure d'agronomie de rennes.
- TAYLOR C. M. et HASTINGS A. (2005). Allee effects in biological invasions. *Ecology Letters* **8**, 895-908. DOI : 10.1111/j.1461-0248.2005.00787.x.
- TIMMERMANN V. et al. (2011). Ash dieback: pathogen spread and diurnal patterns of ascospore dispersal, with special emphasis on Norway*. *EPPO Bulletin* **41**, 14-20. DOI : <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2010.02429.x>.
- TOBIN P. C., BEREK L. et LIEBHOLD A. M. (2011). Exploiting Allee effects for managing biological invasions. *Ecology Letters* **14**, 615-624. DOI : 10.1111/j.1461-0248.2011.01614.x.
- TOMA B. et THIRY E. (2003). Qu'est ce qu'une maladie émergente ? *Epidémiologie et santé animale* **44**, 1-11.
- ULRICH K. et al. (2020). A Comparative Analysis of Ash Leaf-Colonizing Bacterial Communities Identifies Putative Antagonists of *Hymenoscyphus fraxineus*. *Frontiers in Microbiology* **11**. DOI : 10.3389/fmicb.2020.00966.
- VACHER C. et al. (2010). Ecological integration of alien species into a tree-parasitic fungus network. *Biological Invasions* **12**, 3249-3259. DOI : 10.1007/s10530-010-9719-6.
- VASILIAUSKAS R. et al. (2006). Fungi associated with the decline of *Fraxinus excelsior* in the Baltic States and Sweden. Possible limitation of decline phenomena in broadleaved stands, 45-53.
-

BIBLIOGRAPHIE

- VAYSSIER-TAUSSAT M. et al. (2014). Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**. DOI : 10.3389/fcimb.2014.00029.
- VIOTTI C. et al. (2021). Sapwood and heartwood affect differentially bacterial and fungal community structure and successional dynamics during *Quercus petraea* decomposition. *Environmental Microbiology* **23**, 6177-6193. DOI : 10.1111/1462-2920.15522.
- VOŘÍŠKOVÁ J. et BALDRIAN P. (2013). Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *The ISME Journal* **7**, 477-486. DOI : 10.1038/ismej.2012.116.
- WEBBER J., MULLETT M. et BRASIER C. (2010). Dieback and mortality of plantation Japanese larch (*Larix kaempferi*) associated with infection by *Phytophthora ramorum*. *New Disease Reports* **22**, 19. DOI : 10.5197/j.2044-0588.2010.022.019.
- WELLER D. M. et al. (2002). Microbial Populations Responsible for Specific Soil Suppressiveness to Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 309-348. DOI : 10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010.
- WILLIAMSON M. (2006). Explaining and predicting the success of invading species at different stages of invasion. *Biological Invasions* **8**, 1561-1568. DOI : 10.1007/s10530-005-5849-7.
- WYLDER B. et al. (2018). Evidence from mortality dating of *Fraxinus excelsior* indicates ash dieback (*Hymenoscyphus fraxineus*) was active in England in 2004–2005. *Forestry: An International Journal of Forest Research* **91**, 434-443. DOI : 10.1093/forestry/cpx059.
- ZHAO Y.-J. et al. (2013). *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, the correct name for *Lambertella albida* reported from Japan. *Mycotaxon* **122**, 25-41. DOI : 10.5248/122.25.
- ZHDANOVA N. N. et al. (2004). Ionizing radiation attracts soil fungi. *Mycological Research* **108**, 1089-1096. DOI : 10.1017/S0953756204000966.
- ZHENG H.-D. et ZHUANG W.-Y. (2014). *Hymenoscyphus albidoides* sp. nov. and *H. pseudoalbidus* from China. *Mycological Progress* **13**, 625-638. DOI : 10.1007/s11557-013-0945-z.
- ZHOU S.-R. et WANG G. (2004). Allee-like effects in metapopulation dynamics. *Mathematical Biosciences* **189**, 103-113. DOI : 10.1016/j.mbs.2003.06.001.

Title : Determinants of inoculum production in *Hymenoscyphus fraxineus*, agent of ash dieback

Key words : Epidemiology, Population dynamics, Forest pathology, Fungal communities

Abstract : Populations of common European ash (*Fraxinus excelsior*) are currently suffering from the epidemic named Ash Dieback (ADB). The first dieback on ash was reported in the early 90s in Poland following the introduction of the pathogenic fungus *Hymenoscyphus fraxineus*, which originated in north-east Asia. By 2022, the epidemic had spread over most of the range of *F. excelsior*, causing significant mortality. The impact of the pathogen is all the greater when the infection is massive. This thesis focuses on the pathogen's source of inoculum in leaf litter debris. Its objectives are to gain a better understanding of the demographic and environmental factors that determine this inoculum production.

The first area of research is on the population dynamics of *H. fraxineus* in relation to the density of its host and the density-dependency of inoculum production. This fungus multiplies exclusively by sexual reproduction, the success of which is highly dependent on the probability of sexual partners meeting, which in turn depends on the pathogen's population density. The production of fruiting bodies (resulting from sexual reproduction) was monitored as a function of the population density of *H. fraxineus* in a network of stands following an ash density gradient. This study showed that the population density of *H. fraxineus* is closely linked to host density, and that inoculum production is limited at low population density. This density dependence at low population densities is known as the Allee effect.

The second axis estimates the persistence of the pathogen in contaminated stands and changes in its capacity to produce inoculum over time. This persistence is an essential factor to take into account in eradication, but also in understanding the population establishment mechanism. The system installed in ash stands was used to monitor the degradation kinetics of ash litter as a function of the rate of colonisation by *H. fraxineus*, as well as the potential for fruiting of the fungus as a function of the age of the litter during degradation. The persistence of litter colonised by the pathogen for at least three years and the ability of the pathogen to fructify during this period is proof that a reservoir of inoculum has been established on a long-term basis in contaminated stands. This reservoir of inoculum could play a decisive role in relaunching an epidemic after one or more unfavourable years for foliar infection.

Finally, the third axis describes the fungal communities present in the decomposing ash litter in which *H. fraxineus* continues to develop after the colonised leaves have fallen. Using fungal ITS1 metabarcoding data, the study compares the fungal communities present on the leaves at the time of their fall in autumn and the fungal communities present on the leaf residues in spring. Changes in the abundance of each species in the fungal community were compared with those of *H. fraxineus*. The species identified as having an abundance negatively correlated with the abundance of *H. fraxineus* could have an antagonistic effect on the winter development of the pathogen, thus limiting its presence the following spring and reducing its inoculum production capacity.

The work carried out during this thesis highlights the importance of considering the diversity of factors that may be involved in inoculum production. These factors can be decisive in the establishment and persistence of a population of the invasive pathogen studied within ash stands.

Titre : Facteurs déterminants de la production d'inoculum chez *Hymenoscyphus fraxineus*, agent de la chalarose du frêne

Mots clés : Épidémiologie, Dynamique de population, Pathologie forestière, Étude des communautés fongiques

Résumé : Les populations de frêne commun Européen (*Fraxinus excelsior*) sont aujourd'hui soumises à l'épidémie de chalarose. Les premiers dépérissements de frêne ont été signalés au début des années 90 en Pologne suite à l'introduction du champignon pathogène *Hymenoscyphus fraxineus* originaire du Nord Est de l'Asie. En 2022, l'épidémie s'étendait sur la majeure partie de l'aire de répartition de *F. excelsior* provoquant des mortalités importantes. L'impact du pathogène est d'autant plus élevé lorsque l'infection est massive. Cette thèse se focalise donc sur la source d'inoculum du pathogène présente sur les débris de feuilles de la litière. Elle a pour objectifs de mieux comprendre les facteurs démographiques et environnementaux qui déterminent cette production d'inoculum.

Le premier axe de recherche se focalise sur la dynamique de population d'*H. fraxineus* en lien avec la densité de son hôte et la densité dépendance de la production d'inoculum. La multiplication de ce champignon est exclusivement réalisée par reproduction sexuée dont le succès est fortement dépendant de la probabilité de rencontre des partenaires sexuels, elle-même dépendante de la densité de population du pathogène. Le suivi de la production de fructification (issue de la reproduction sexuée) en fonction de la densité de population d'*H. fraxineus* a été réalisé au sein d'un réseau de peuplement suivant un gradient de densité en frêne. Cette partie a mis en évidence, d'une part une densité de population d'*H. fraxineus* étroitement liée à la densité d'hôte, et d'autre part une production limitée de l'inoculum à faible densité de population. Cette densité dépendance à faible effectif est appelé effet Allee.

Le deuxième axe estime la persistance du pathogène dans les peuplements contaminés et l'évolution de sa capacité à produire de l'inoculum avec le temps. Cette persistance est un élément essentiel à prendre en compte dans le cadre d'une éradication mais également dans la compréhension du mécanisme d'établissement de la population. Le dispositif installé au sein de peuplements de frênes a permis de suivre la cinétique de dégradation de la litière de frêne en fonction de son taux de colonisation par *H. fraxineus* ainsi que le potentiel de fructification du champignon selon l'âge de la litière en cours de dégradation. La mise en évidence de la persistance de la litière colonisée par le pathogène pendant au moins trois ans et la capacité de ce dernier à fructifier durant cette période est une preuve qu'un réservoir d'inoculum s'installe durablement dans les peuplements contaminés. Ce réservoir d'inoculum pourrait jouer un rôle déterminant pour relancer une épidémie après une ou plusieurs années défavorables à l'infection foliaire.

Enfin, le troisième axe décrit les communautés fongiques présentes dans la litière de frêne en décomposition et au sein de laquelle *H. fraxineus* poursuit son développement après la chute des feuilles colonisées. A partir de données metabarcoding de l'ITS1 fongique, l'étude compare les communautés fongiques présentes sur les feuilles au moment de leur chute à l'automne et les communautés fongiques présentes sur les résidus foliaires au printemps. L'évolution des abondances de chaque espèce de la communauté fongique est confrontée à celle d'*H. fraxineus*. Les espèces identifiées comme ayant une abondance négativement corrélée à l'abondance d'*H. fraxineus* pourraient présenter une action antagoniste au développement hivernal du pathogène, limitant ainsi sa présence au printemps suivant et réduisant son pouvoir de production d'inoculum.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse mettent en évidence l'importance de considérer la diversité des facteurs pouvant intervenir dans la production d'inoculum. Ces derniers peuvent être déterminants pour l'établissement et la persistance d'une population du pathogène invasif étudié au sein des peuplements de frêne.