

INTERPOPGER Interactions entre peupleraies naturelles et cultivées et pressions évolutives liées à leurs modes de gestion. Bilan scientifique 2005-2008

Catherine Bastien, Jose-Luis Almeida Falcon, Nicolas Chenault, Arnaud A. Dowkiw, Vanina Guérin, Véronique V. Jorge, Mary Juteau, Patrick Poursat, Romain R. Valade, Marc M. Villar, et al.

▶ **To cite this version:**

Catherine Bastien, Jose-Luis Almeida Falcon, Nicolas Chenault, Arnaud A. Dowkiw, Vanina Guérin, et al.. INTERPOPGER Interactions entre peupleraies naturelles et cultivées et pressions évolutives liées à leurs modes de gestion. Bilan scientifique 2005-2008. 2008. hal-02824228

HAL Id: hal-02824228
https://hal.inrae.fr/hal-02824228

Submitted on 6 Jun 2020

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.



INTERPOPGER

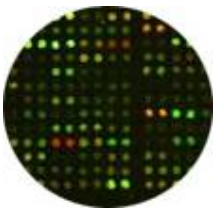
Interactions entre peupleraies naturelles et cultivées et pressions évolutives liées à leurs modes de gestion



Bilan scientifique 2005-2008







INRA, UR 588, Amélioration, Génétique et Physiologie forestières, Orléans
Catherine BASTIEN, José ALMEIDA, Nicolas CHENAULT, Arnaud DOWKIW, Vanina GUERIN, Véronique JORGE, Marie JUTEAU, Patrick POURSAT, Romain VALADE, Marc VILLAR

UMR INRA/UHP IAM 1136 Equipe pathologie, Nancy
Pascal FREY, Benoit BARRES, Constance XHAARD, Bénédicte FABRE, Fabien HALKETT

UMR INRA/UHP IAM 1136 Equipe microbiologie forestière, Nancy
Sébastien DUPLESSIS, Cécile RINALDI, Annegret KOHLER, Benjamen PETRE, Emilie TISSERANT, Christine DELARUELLE, Francis MARTIN

URGV, Génomique végétale, Evry
Patricia FAIVRE-RAMPANT, Aloïs BRESSON, Isabella PAOLUCCI

UMR INRA/Univ-Bordeaux-I,Biogeco, Pierroton
Christophe PLOMION, Céline LALANNE

INRA, UR Biométrie, Avignon
Etienne KLEIN, Denis ALLARD



Projet financé dans le cadre du programme ECOGER



Sommaire

I- RAPPELS DES OBJECTIFS ET TACHES DU PROJET 3

II- FLUX DE POLLEN CHEZ LE PEUPLIER DEPUIS LES COMPARTIMENTS CULTIVES VERS LE COMPARTIMENT SAUVAGE 3

21- Développement de marqueurs neutres spécifiques du compartiment cultivé de peuplier 4

22- Quantification des flux de pollen depuis le peuplier d'Italie vers les peupleraies naturelles et études de déterminants biologiques des flux de pollen 4

23- Estimation de la dispersion du pollen et identification de déterminants physiques et biologiques importants par modélisation : développement théorique et application au site de St Ay 10

24- Flux de gènes depuis les plantations populicoles vers les peupleraies sauvages : choix du site expérimental de Bonny-sur-Loire 11

III- FLUX DE GENES ENTRE COMPARTIMENTS CULTIVES ET SAUVAGES CHEZ L'AGENT PATHOGENE *MELAMPSORA LARICI-POPULINA* 12

31- Développement de nouveaux marqueurs microsatellites à partir de la séquence du génome de *Mlp* 13

32- Développement de marqueurs non neutres chez *Mlp* 14

33- Mise en évidence de deux épidémies de *Mlp* dans les peupleraies sauvages et cultivées de la vallée de la Durance. 15

IV- INTERACTIONS PEUPLIER-*MLP* : DETERMINISME GENETIQUE ET CONSEQUENCES EVOLUTIVES 18

41- Identification chez le peuplier de gènes impliqués dans l'interaction peuplier-Mlp et analyse de leur polymorphisme dans les compartiments sauvages et cultivés 18

411- Identification de gènes impliqués dans les résistances qualitatives à *Mlp* 19

412- Vers une définition des bases moléculaires de R_{US}, facteur de résistance quantitative à *Mlp,* par des approches combinées de transcriptomique et protéomique 19

413- Identification de gènes candidats impliqués dans le facteur de résistance R_{US} par une approche de clonage positionnel 24

414- Recherche au sein de gènes de résistance de polymorphisme nucléotidique spécifique du compartiment cultivé 25

42- Impact évolutif et fonctionnel des interactions sauvage – cultivé analysé à l'aide de marqueurs phénotypiques 26

421- pressions de sélection exercées par les cultivars de peuplier sur les populations de *Mlp* 26

422- Niveaux de résistance de populations naturelles de peuplier noir vis-à-vis d'isolats de *Mlp* représentant les compartiments sauvages et cultivés 28

V- PERSPECTIVES DE RECHERCHE OUVERTES PAR LES RESULTATS ACQUIS AU COURS DU PROJET. 28

VI- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES CITEES 29

VII- ANIMATIONS CONDUITES AU COURS DU PROJET..... 31

INTERPOPGER: Interactions entre peupleraies naturelles et cultivées et pressions évolutives liées à leurs modes de gestion

Bilan des activités de recherche : 2005-2008

I- Rappels des objectifs et tâches du projet

Les peupliers occupent dans le paysage français trois compartiments caractérisés par des ressources biologiques, des modes de gestion et des perceptions sociétales différentes : (1) les **peupleraies** " **naturelles** " à peuplier noir (*P. nigra* L.), aujourd'hui menacées par l'anthropisation des ripisylves ; (2) les **peupleraies d'alignement** le plus souvent plantées à partir d'un clone mâle particulièrement fastigié de peuplier noir (cv 'San Giorgio') ; (3) les **plantations populicoles** à la productivité élevée, présentes sous forme de parcelles monoclonales d'hybrides interspécifiques associant le plus souvent l'espèce *P. deltoides*, originaire de l'est du continent Nord-américain à deux autres espèces : - *P. trichocarpa* originaire de l'ouest américain et *P. nigra* indigène en Europe.

Ces peupleraies subissent depuis plus de 15 ans des pertes économiques majeures liées aux attaques de rouilles foliaires à *Melampsora larici-populina* (*Mlp*), agent pathogène endémique en Eurasie. L'interaction peuplier - *Mlp* offre un modèle d'étude intéressant du fait du contraste important observé entre peupleraies cultivées et sauvages dans leurs relations aux populations pathogènes.

Le projet présenté vise à mieux connaître l'impact de la structuration spatiale et des modes de gestion de ces trois compartiments sur les ressources biologiques du peuplier noir et sur la dynamique de l'agent pathogène *Mlp*. Les connaissances acquises devraient permettre de valider les modalités de conservation *in situ* et *ex situ* des ressources naturelles de peuplier noir et de préciser de nouvelles règles de gestion durable des résistances du peuplier aux ravageurs.

La compréhension des processus mis en jeu a été engagée à travers deux actions de recherche à valeurs tant spécifiques, que génériques dans le cadre du programme ECOGER. La première a permis une première quantification et caractérisation des **flux de gènes intra et inter-compartiments** chez le peuplier et chez l'agent pathogène *Mlp*. La deuxième s'est attachée à préciser les **bases génétiques et moléculaires de l'interaction peuplier-*Mlp*** avant de s'intéresser aux conséquences évolutives des pressions de sélection exercées par les deux partenaires. Toutes deux sont le fruit de travail collaboratif entre chercheurs issus de différentes disciplines présentes au sein du département EFPA : génétique des populations, biologie et physiologie moléculaires, interactions arbre-microorganisme, et modélisation. Pour la majorité des équipes impliquées, le projet INTERPOPGER a permis pour la première fois d'aborder l'analyse de la diversité génétique et des interactions arbre-agent pathogène à l'échelle du groupe de parcelles ou du paysage.

II- Flux de pollen chez le peuplier depuis les compartiments cultivés vers le compartiment sauvage

L'existence, chez le peuplier, d'une mosaïque paysagère hétérogène depuis plusieurs décennies nous a conduits à focaliser nos recherches sur les points suivants :

(1) **quantification des flux de pollen** du compartiment cultivé vers le compartiment sauvage dans un site d'étude particulièrement propice à ces échanges. Cette étude a nécessité le développement préalable de marqueurs neutres spécifiques du compartiment cultivé.

(2) identification dans ce même site d'étude des **facteurs biologiques et physiques** qui conditionnent **l'efficacité des flux de pollen** grâce à une approche de modélisation. Cette étape est un préalable indispensable pour initier une approche expérimentale à l'échelle du paysage et valider des modèles de prédiction de flux pour des mosaïques de parcelles très différentes dans leur composition, leur taille et leur répartition spatiale.

21- Développement de marqueurs neutres spécifiques du compartiment cultivé de peuplier

Dans une première approche s'intéressant aux flux de pollen depuis le compartiment cultivé vers le compartiment sauvage, l'objectif était d'identifier des allèles spécifiques du compartiment cultivé à des loci neutres. Deux sources de pollen « cultivées » ont été considérées: celle correspondant au génotype quasi-unique du cv '*Italica'* et celles correspondant aux cultivars mâles (hybrides interspécifiques) utilisés fréquemment en plantation.

Le peuplier d'Italie appartenant à l'espèce *P. nigra*, la stratégie de « **fingerprint** » a été choisie pour identifier des hybrides F1. Le cultivar '*Italica'* de référence, 'San Giorgio', a été génotypé à l'aide de 12 marqueurs microsatellites déjà utilisés pour la caractérisation de la diversité génétique neutre présente au sein de populations naturelles françaises et d'une collection nationale de référence *ex-situ* de peuplier noir, soit plus de 1700 individus *P. nigra*. Le génotype '*Italica'*, 'San Giorgio', ne présente aucun allèle privé pour aucun des marqueurs analysés. Toutefois, l'utilisation d'un groupe de 10 marqueurs ne présentant pas d'allèles nuls permet d'identifier des individus hybrides F1 issus d'une pollinisation avec '*Italica'* avec un risque d'erreur particulièrement faible (<0.005 dans le site d'étude de Saint-Ay présenté ci-après).

Pour le suivi des flux de pollen depuis les plantations populicoles vers les ripisylves naturelles, deux niveaux de spécificité des marqueurs peuvent être retenus :

- Des **allèles spécifiques des espèces *P. trichocarpa* et *P. deltoides***, le plus souvent représentées par des hybrides interspécifiques (associant ou non *P.nigra*) dans les plantations de production. Dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Laval (Québec), nous avons testé un set de 34 SNP espèces-spécifiques (12 *P. trichocarpa*, 11 *P. deltoides*, 11 *P. nigra*) développés par ce laboratoire dans des gènes pour la plupart non liés entre eux. Un test de validation sur 70 génotypes issus de collections *P.nigra* de référence et de croisements contrôlés intra- et inter-spécifiques montre que la spécificité des 11 marqueurs *P.nigra* reste à fiabiliser avec un échantillon de référence plus large que celui utilisé par nos collègues canadiens. Si les hybrides F1 sont facilement isolés, les hybrides issus de générations plus avancées restent plus difficilement identifiables. Un nombre de marqueurs SNP plus important permettrait d'être plus informatif. Dans l'objectif de construire un tel set de marqueurs 'diagnostic', nous avons profité de l'étude du polymorphisme nucléotidique au sein de gènes de résistance pour identifier 168 SNP discriminant les espèces *P. trichocarpa* et *P. nigra*. Il reste à valider ces marqueurs sur des collections de référence des deux espèces de taille suffisante.

- Des **allèles spécifiques des cultivars**, nous permettant de mieux différencier les sources de pollen à l'origine des flux. Nous avons pu génotyper 20 des 21 cultivars mâles du catalogue national des variétés à l'aide des mêmes 12 marqueurs microsatellites cités ci-dessus. En analysant l'occurrence des allèles des cultivars dans le set de 1700 génotypes *P. nigra*, nous avons identifié 3 marqueurs microsatellites permettant de discriminer 17 des 20 cultivars des *P. nigra*. Pour ces 17 cultivars de type botanique variable (*P. deltoides*, *P. x interamericana*, *P. x euramericana*), trois marqueurs suffisent pour définir des génotypes « diagnostic ». Les cultivars qui ne se distinguent pas de *P. nigra* sont 'Veerecken', 'Robusta' et 'Blanc du Poitou'. Le premier est un cultivar issu d'hybridation intra-spécifique au sein de l'espèce *P. nigra*; les deux autres sont des cultivars très anciens de type *P. deltoides x P.nigra,* probablement issus d'hybridation naturelle et sélectionnés en peuplements naturels du fait de leur forte vigueur. Plantés en France dès 1875-1895, ils pourraient être à l'origine de plusieurs évènements d'introgression sur 2 voire 3 générations. La collection de référence de peuplier noir français ne datant que de 1971, il convient également de vérifier les niveaux d'apparentement des individus de cette collection avec ces deux cultivars et de revisiter les niveaux d'apparentement possibles entre cultivars et collectes au sein de peuplements naturels en tenant compte de l'historique des récoltes et de la diffusion des cultivars.

22- Quantification des flux de pollen depuis le peuplier d'Italie vers les peupleraies naturelles et études de déterminants biologiques des flux de pollen

221. Quantification au sein de collections de peuplier noir : Le génotypage, à l'aide du set de 10 marqueurs microsatellites présenté au § 11, de 310 individus de peuplier noir constituant la collection nationale de référence pour l'espèce *P.nigra* et de 230 individus récoltés dans 5 ripisylves

naturelles françaises (Figure 1), révèle des taux d'individus pouvant être considérés comme des hybrides F1 issus de la variété '*Italica*', respectivement de **6%** et **4,3%.**

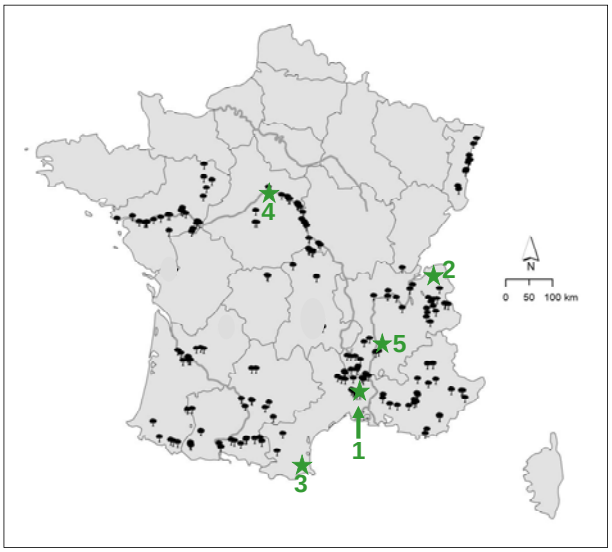


Figure 1 : Répartition géographique des individus constituant d'une part la collection nationale de référence de peuplier noir (n=310, arbres noirs), et d'autre part les ré-échantillonnages réalisés dans 5 réserves naturelles (étoiles vertes) : 1 : Ardèche ; 2 : Dranse ; 3 : Nohèdes : ; 4 : St-Pryvé – St-Mesmin ; 5 : Ramières).

222. Quantification des flux de pollen 2006 sur le site de Saint-Ay et prise en compte de déterminants biologiques: L'étude de l'introgression depuis les peupliers cultivés vers les peupliers noirs sauvages suppose la connaissance préalable des déterminants biologiques et physiques qui conditionnent les flux de pollen efficaces chez le peuplier noir, première étape du phénomène d'introgression jusqu'ici peu étudiée.

Préalablement à toute expérimentation, nous avons donc fait un inventaire des différents paramètres physiques et biologiques qui pouvaient *a priori* avoir une influence sur ces flux :

Physiques	Distances entre individus
	Topographie
	Force et direction des vents
Biologiques	Densité de pollinisateurs potentiels
	Précocité et synchronisme de floraison
	Taille de la source de pollen
	Phénomène de compétition (voire incompatibilité) pollinique

La méthodologie retenue pour ce projet consistait à :
- **choisir** un site expérimental avec juxtaposition des compartiments cultivé et sauvage et à l'intérieur duquel un inventaire exhaustif des arbres pollinisateurs pouvait être envisagé
- **évaluer**, *in situ*, les paramètres cités ci-dessus sur une population naturelle de peupliers noirs et des peupliers cultivés d'origine connue
- **évaluer**, *ex situ*, la variabilité génétique pour plusieurs paramètres biologiques tels que les phénomènes de compétition pollinique
- **élucider** les flux de pollen sur ce site par récolte de descendances maternelles (graines) sur des peupliers noirs femelles et analyses de paternité

- **modéliser** les flux de pollen à l'aide des paramètres cités précédemment afin de quantifier leur contribution à l'explication des flux.

Un site naturel situé à St Ay (Loiret) a été identifié comme intéressant du fait de la présence d'une population importante de peupliers noirs sauvages à quelques dizaines de mètres d'un alignement de peupliers d'Italie. Nous avons également fait l'hypothèse que le phénomène d'introgression depuis le peuplier d'Italie est d'autant plus probable que ce cultivar appartient à l'espèce peuplier noir. L'étude des flux inter-compartiments débuterait donc par ce cas particulier jugé particulièrement favorable (situation intraspécifique, distances entre compartiments).

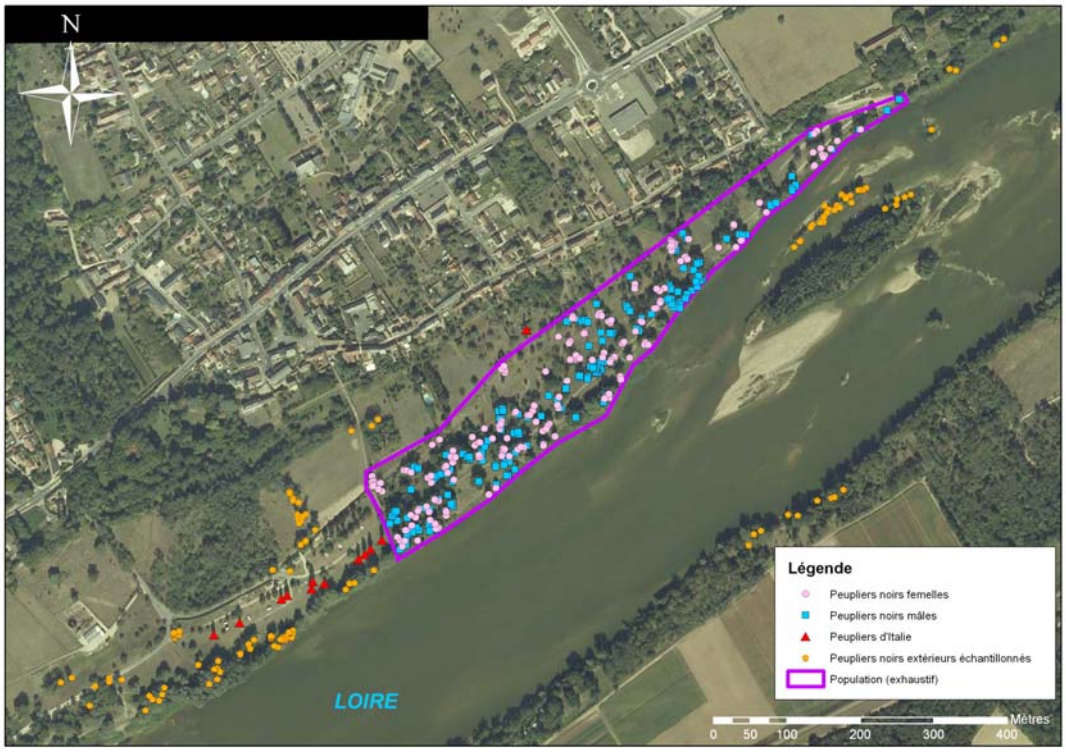


Figure 2 : Photo aérienne du site expérimental de St-Ay (Loiret) sur lequel ont été analysés les flux de pollen entre peupliers d'Italie et peupliers noirs sauvages. La peupleraie sauvage étudiée exhaustivement est délimitée en violet sur la photo.

Ce site est typique d'un peuplement de ripisylve tel qu'il en subsiste encore en bord de Loire. Ses dimensions (environ 1500 m dans sa plus grande dimension) nous semblaient également adaptées à ce que nous connaissions du potentiel de dispersion du pollen chez le peuplier. Ce site est également inclus dans 'l'intensive study plot' (ISS-PopLoire) du réseau d'excellence EVOLTREE, qui représente un observatoire à long terme de la biodiversité présente en ripisylve. Après l'inventaire réalisé au printemps 2006, ce site peut se résumer en trois composantes (Figure 2):

- C1, une population florifère de 413 peupliers noirs sauvages (214 mâles, 199 femelles) occupant une superficie de 6,8 ha circonscrite par la Loire, le bourg de St Ay et un terrain de camping.
- C2, des peupliers d'Italie plantés en alignement sur le terrain de camping (11 individus) et sous forme isolée à l'intérieur de la zone précédente (2 individus groupés, identifiés au cours des premières prospections).
- C3, des peupliers noirs sauvages disséminés dans le paysage sous forme de peuplements de densités et d'âge variables (forte densité sur les îles de Loire, plus faible sur les berges).

La caractérisation du site expérimental et le relevé *in situ* des différents paramètres physiques et biologiques d'intérêt correspond à un investissement sans précédent par la diversité et la quantité de

données recueillies (Tableau 1). Pour organiser ces données, une base de données géoréférencée a été créée en 2006 à l'occasion d'un stage de M2 Géomatique (Stage Mary Juteau).

Cette même année, l'ensemble des 413 arbres de la population florifère de peuplier noir et les 13 individus de peupliers d'Italie présents sur le site ont fait l'objet de récolte de feuilles pour génotypage à l'aide du set de 10 marqueurs microsatellites sélectionnés. Parallèlement, des récoltes de descendances maternelles ont été réalisées sur 75 arbres femelles répartis sur le site et représentatifs de la gamme de précocité de floraison observée (25 femelles précoces, 25 intermédiaires et 25 femelles tardives) soit un total de 12 000 graines isolées et réparties individuellement en plaques de 96 puits avant extraction d'ADN et génotypage.

Au printemps 2007, un nouveau suivi de phénologie de floraison a été réalisé sur 90 individus afin d'étudier la stabilité du classement de précocité établi en 2006.

			2006	2007	2008
Données terrain	**Géographiques**		Géolocalisation* Topographie		Géolocalisation**
	Physiques		Météorologie Direction et force des vents		
	Biologiques		Nb brins, Sexe* Phénologie florale* (7 dates)	Phénologie florale* (échant 93 arbres)	Hauteur* Circonférence*
Récoltes	**Adultes (feuilles)**	Population (exhaustif)	293 peupliers noirs sauvages (214♂ et 79♀)	120 ♀ complémentaires	
		Extérieur (non exhaustif)	67 peupliers noirs sauvages (41♂ et 26♀) et 13 'Italica'	2 ♀ complémentaires	63 peupliers noirs sauvages (sexes indéterminés)
	Descendants (graines)		75 ♀ : 96 à 384 graines par ♀		
Données moléculaires	**Microsatellites nucléaires**	Adultes	Population + individus extérieurs (10 loci)	♀ complémentaires (10 loci)	63 individus extérieurs
		Descendants		**4** descendances (96 graines / mère, 10 loci) **20** descendances (48 graines / mère, 10 loci)	**7** descendances (48 à 96 graines/mère, 10 loci)

* sur l'ensemble des peupliers adultes échantillonnés en 2006 et 2007
** sur les individus échantillonnés en 2008

Tableau 1 : description des échantillonnages et observations réalisées sur le site expérimental de St Ay afin de modéliser les flux de pollen entre compartiments cultivés et sauvages de peuplier.

L'étude exhaustive de la diversité génétique et de la **structuration spatiale de la population parentale C1** a été réalisée en 2007 dans le cadre d'un stage M2 Technique Biologiques Industrielles (stage Nicolas Chenault). Les indices de diversité neutre, calculés sur la population adulte avec le logiciel Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.* 2006), ont révélé un niveau de diversité génétique élevé, cohérent avec les estimations intrapopulation déjà disponibles dans la littérature (Nombre d'allèles moyen = 11.7 ± 5.6 ; H_o = 0.73 ± 0.15 ; H_e = 0.74 ± 0.14). Cinq individus adultes (2 mâles et 3 femelles) se révèlent être des hybrides F1 avec le cultivar '*Italica'*.

Un léger écart à l'équilibre d'Hardy-Weinberg (F_{IS} = 0.015, P-val < 0.05) est observé. L'estimation du coefficient d'apparentement de Loiselle à partir des données moléculaires, calculé avec le logiciel SPAGeDi 1.2 (Hardy & Vekemans 2002), révèle l'existence d'une structuration spatiale des individus jusqu'à une distance d'environ 30 mètres. Pour expliquer cette structuration génétique à courte distance, l'hypothèse d'une part importante de la multiplication végétative comme mode de reproduction des individus sur ce site a été posée. Un test d'identité, effectué grâce au logiciel Cervus 3.0.3 (Marshall *et al.* 1998), a révélé seulement 202 génotypes uniques sur les 413 arbres échantillonnés (probabilité d'identité $P_{ID\ /\ sib}$ = 0.0001). En plus des 124 arbres non-dupliqués, 78 taches clonales (40 ♂, 38 ♀) de 2 à 18 individus par tâche ont été identifiées. Celles-ci sont définies comme des groupes d'arbres de même génotype et leur assignation est confortée par le sexe identique et le synchronisme de floraison des arbres d'un même groupe. Les taches clonales de moins de 5 arbres représentent près de 90% de l'ensemble des taches et on observe une grande variabilité dans les dimensions des taches même à faible nombre d'arbres (1 à 30 m). La clonalité mise en évidence sur le site de St-Ay peut avoir différentes origines (bouturage, drageonnage); il est cependant difficile de séparer la clonalité naturelle de celle induite par l'activité humaine.

Pour ce qui est de la variabilité des paramètres biologiques étudiés, on peut observer une grande variabilité dans la taille des arbres (d'environ 5 à 30 m de haut), indépendante du sexe et probablement dûe à une combinaison d'un effet âge fortement variable entre individus et d'effets

environnementaux locaux. Les observations de la phénologie de floraison ont montré un synchronisme ♂ / ♀ important dans les périodes d'émission / réceptivité de pollen d'où une homogamie (assortative mating en Anglais) pour les individus extrêmes (très précoces ou très tardifs) (Figure 3). Il faut noter que le nombre de pollinisateurs potentiels par femelle *P.nigra* peut varier de 5 à 100 en fonction de la date à laquelle on se place. Les 13 individus du cultivar '*Italica*' étaient au stade maximum d'émission du pollen au deux premières dates d'observation (04 et 10 Avril 2006) lorsque les premiers peupliers noirs sauvages et les cinq adultes hybrides F1 étaient également en pleine floraison. Les observations réalisées au printemps 2007 ont permis de confirmer les niveaux de précocité des différents individus ($r_{Spearman}$ = 0.926, n=93). Une fois la clonalité prise en compte, aucune structuration spatiale pour le sexe ou la précocité de floraison n'a été mise en évidence sur le site.

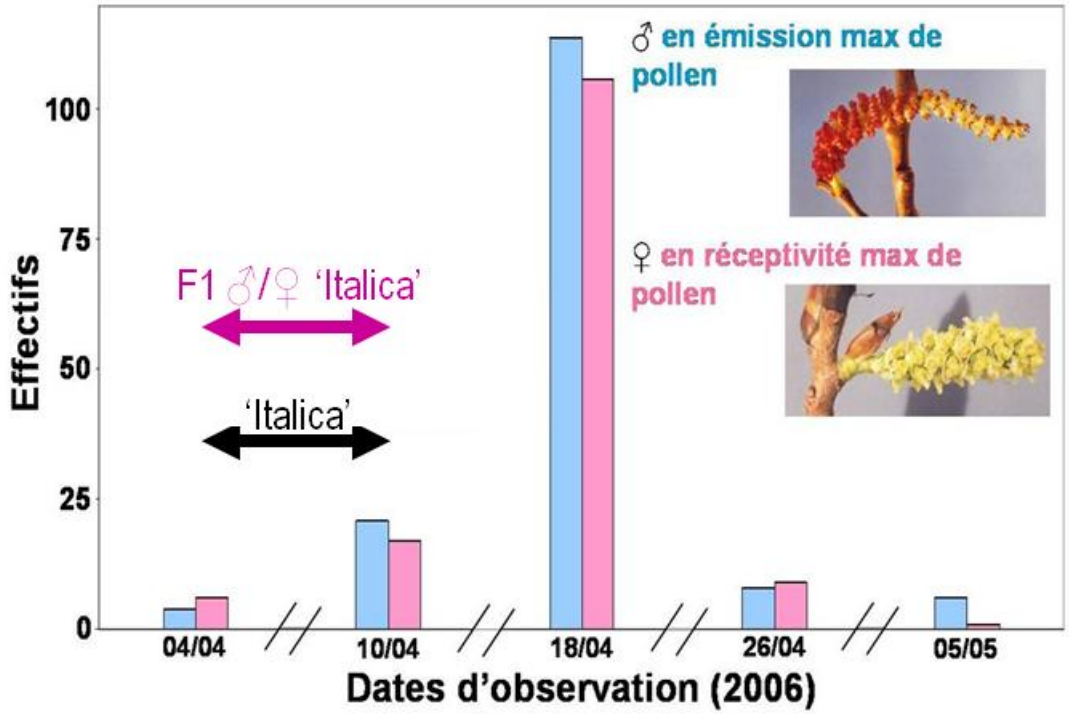


Figure 3 : Synchronisme des floraisons mâle et femelle observées en 2006 sur les peupliers noirs du site expérimental de St Ay.

Les quelques essais d'évaluation *in situ* de la taille de la source de pollen par quantification de la production de fleurs de chaque arbre se sont révélés infructueux du fait d'une très grande variabilité de la forme des houppiers de peupliers noirs souvent constitués de plusieurs brins.

L'analyse *ex situ* de différents facteurs biologiques potentiellement impliqués dans les flux de pollen efficaces couvrait les 3 objectifs suivants :

- estimer les **tailles des sources de pollen** en s'intéressant aux échelles « arbre » et « inflorescence » et comparer les productions de pollen entre compartiments sauvage et cultivé
- étudier l'hypothèse d'une **compétition pollinique** entre mâles sauvages et cultivés
- identifier le stade de floraison où une inflorescence femelle est à **réceptivité maximale** afin de mieux définir les situations de synchronisme de floraison mâle-femelle (le stade d'émission de pollen maximum est quant à lui parfaitement identifiable chez les mâles).

Taille des sources de pollen : Afin d'estimer l'ordre de grandeur de la différence de floribondité entre cultivars de peupliers et peupliers noirs sauvages, des comptages de bourgeons floraux ont été réalisés en 2006 sur 3 individus adultes après abattage : un peuplier d'Italie (14m de haut, 902mm de circonférence à 1.30m), un cultivar euraméricain 'I45-51' (20m de haut, 1160mm de circonférence à 1.30m), un cultivar interaméricain 'Unal' (20m de haut, 1180mm de circonférence à 1.30m). Ces premiers comptages d'inflorescences mâles mettent en évidence une floribondité du cultivar '*Italica*'

7 fois plus élevée que celles des cultivars hybrides. Il serait toutefois nécessaire de valider ces observations pour un plus grand nombre d'arbres représentatifs (en taille et âge) des cultivars testés et pour un plus grand nombre de cultivars.

Les expérimentations visant à comparer les quantités de pollen produites par inflorescence mâle pour différents cultivars et peupliers noirs sauvages ont échoué en 2006, 2007 et 2008 pour différentes raisons : (1) les conditions climatiques d'une part (gel tardif en 2007), (2) les difficultés de mise au point des conditions expérimentales en serre permettant une libération de pollen optimale à partir de rameaux coupés et forcés, (3) les contraintes techniques liées à la récolte de rameaux en pleine floraison à plus de 10m du sol souvent pénalisantes.

Compétition pollinique. En 2006, des croisements en conditions contrôlées ont été réalisés en pollinisant en serre des rameaux florifères de quatre femelles *P. nigra* récoltés à St Ay avec un mélange de pollen d''Italica' et de trois mâles *P. nigra* sauvages de St Ay. Chaque descendance maternelle a été répartie en deux lots dont un a été semé. Afin d'élucider leur parenté, 903 graines et semis ont été génotypés à l'aide des 10 marqueurs microsatellites de cette étude afin d'élucider leur paternité. L'analyse comparative graines / semis permet de tester l'hypothèse de filtres éventuels entre ces deux stades de développement. La comparaison des contributions paternelles attendues et observées a révélé trois résultats majeurs :

- l'absence de filtres sélectifs entre les stades graines et semis
- l'absence d'interactions spécifiques mâle x femelle (les proportions de contributions paternelles étaient les mêmes pour les 4 femelles étudiées)
- deux peupliers noirs mâles, dont 'Italica', expriment une compétitivité particulièrement faible par rapport aux deux autres (Figure 4).

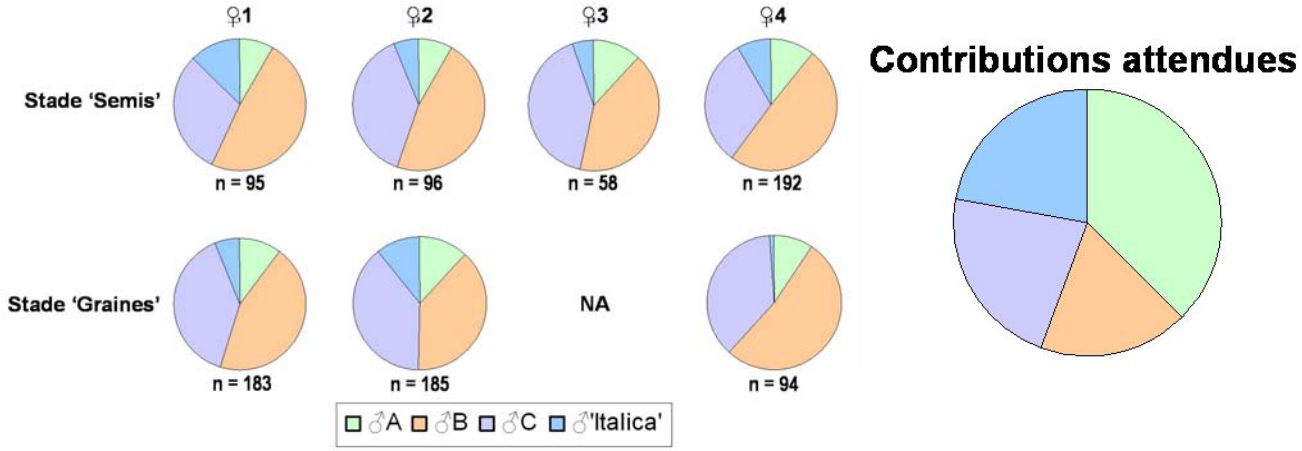


Figure 4 : Contributions polliniques attendues et observées après pollinisation de 4 femelles de peuplier noir avec un mélange pollinique composé de 3 peupliers noirs sauvages et du peuplier d'Italie. n est le nombre d'individus génotypés à l'aide de marqueurs microsatellites.

Stade de réceptivité des inflorescences femelles. Afin de préciser le synchronisme des floraisons mâle-femelle dans les flux de pollen efficaces, il était important de mieux apprécier par notation visuelle le niveau de réceptivité maximale chez les peupliers noirs femelles. Une première expérimentation, reposant sur des pollinisations successives d'une même inflorescence avec une succession de pollens différents a donc été conduite en 2008 sur deux femelles différentes. Les graines obtenues ont été stockées à -80°C avant leur génotypage et analyse de parenté prévus en 2009.

Les analyses de paternité, initiées en 2007, se sont poursuivies en 2008 dans le cadre de la thèse de Nicolas Chenault. Elles ont été conduites pour l'instant sur 24 descendances maternelles (48 à 96 graines par descendance, 1350 graines au total) et révèlent un taux d'hybridation depuis '*Italica*' de **1,9%** au minimum (25 graines de type « F_1 issu d'Italica »).

23- Estimation de la dispersion du pollen et identification de déterminants physiques et biologiques importants par modélisation : développement théorique et application au site de St Ay

En attendant les premières données issues des analyses génétiques des individus et graines prélevés sur le site expérimental d'étude de la dispersion de pollen de peuplier (St Ay), nous nous sommes principalement attachés à des développements méthodologiques généraux liés à l'estimation de la fonction de dispersion du pollen à partir de données de marqueurs microsatellites.

Le stage de master 2 de Florence Carpentier a été l'occasion pour elle de s'approprier les méthodes classiques d'estimation de la fonction de dispersion du pollen. Elle a au cours de son stage formalisé mathématiquement la méthode *TwoGener* (Austerlitz et Smouse 2001). Cette méthode permet d'estimer la fonction de dispersion du pollen à partir de données génétiques de graines prélevées sur un échantillon d'arbres mères en étudiant la différenciation entre les nuages polliniques de chaque couple de mères et sa relation avec la distance physique séparant les mères. Elle ne nécessite pas la connaissance des génotypes et positions des arbres émetteurs de pollen dans la zone expérimentale, mais fait l'hypothèse que l'ensemble de ces arbres est distribué suivant un processus ponctuel poissonien, hypothèse qui souvent n'est pas vérifiée. Nous avons montré au cours de ce stage que (i) cette méthode est valide pour des espèces ne présentant pas d'autofécondation, contrairement à ce qui est dit dans la littérature et (ii) la fonction de dispersion estimée par *TwoGener* est une fonction Backward (position du père relativement à la mère) qui a une forme et une échelle différente de la fonction de dispersion Forward (position de la mère relativement au père), estimée plus classiquement par les méthodes qui utilisent toute l'information sur les parents potentiels (Burczyk *et al.* 2002, Oddou-Muratorio *et al.* 2006) . Ces deux résultats soulèvent un problème particulier dans le cas d'une faible densité d'individus qui disparaît quand la densité tend vers l'infini. Ce stage a permis également de poser les bases d'une nouvelle approche, intermédiaire entre l'approche *TwoGener* et l'approche plus classique des modèles d'appariements. Cette approche, basée sur les méthodes ABC (Approximate Bayesian Computation, Beaumont 2002) est encore en cours de développement et sera appliquée aux données microsatellites de St-Ay courant 2009. D'autre part, nous avons travaillé au développement d'une analyse bayésienne des modèles d'appariements qui permet d'estimer simultanément la fonction de dispersion et la variance de fertilité mâle des individus pères potentiels d'une zone expérimentale (Klein *et al.* 2008).

Par ailleurs, l'important investissement réalisé en matière d'échantillonnage et de localisation des différentes sources de pollen présentes sur le site de St Ay permet d'utiliser les méthodes directes de mesure de dispersion du pollen, reposant sur l'assignation de parenté (Burczyk *et al.* 2002, Oddou-Muratorio *et al.* 2006). La maximisation de la vraisemblance des génotypes des graines échantillonnées, connaissant la position et les génotypes de tous les pères potentiels du site, a permis d'obtenir simultanément, des estimations de la dispersion du pollen et des fertilités des pères potentiels inventoriés. Certains modèles permettent de tester l'effet de covariables biologiques pouvant modifier la quantité de pollen efficace produite par chaque pollinisateur (fertilité). Parmi elles, nous nous sommes intéressés au décalage phénologique, aux dimensions des arbres pollinisateurs, à leur position topographique sur le site et au contraste '*Italica*'/'population naturelle'.

L'analyse comparative des différents modèles testés permet de formuler les premières conclusions suivantes :

1) La fonction de **dispersion du pollen** conduisant au meilleur ajustement des données est une fonction de type exponentielle puissance avec une queue relativement lourde témoignant de l'existence d'évènements de dispersion à très longue distance. La distance de dispersion moyenne estimée est de 860m avec un intervalle de confiance de [550, >5000].

2) Le **taux d'immigration** estimé est important (51%). Il diminue régulièrement de la bordure Ouest à la limite Est du site. Il n'intègre cependant pas les informations génétiques caractérisant les peupliers situés en dehors du site et échantillonnés en 2008.

3) Un **modèle anisotrope** de dispersion se révèle significativement meilleur. Il semble cependant indépendant de l'orientation des vents dominants relevés durant la période de floraison dans un site distant d'une dizaine de kilomètres et pourrait s'expliquer par une dynamique des flux d'air propre aux bordures de fleuves.

4) Une **variance significative des fertilités mâles** est mise en évidence. Cette hétérogénéité est partiellement expliquée par plusieurs covariables différentes :

- l'une d'entre elle associe les dimensions des pollinisateurs potentiels (hauteur, diamètre, nombre de brins) et la position topographique des arbres. Il est cependant impossible de dissocier ici l'implication de paramètres physiques tels que la hauteur du point de libération du pollen, de paramètres biologiques mesurant la taille de la source de pollen (floribondité au niveau arbre et production de pollen par inflorescence).

- la plus importante décrit le synchronisme des floraisons mâle et femelle (homogamie). Les échanges de gènes ont lieu préférentiellement entre individus mâles et femelles synchrones et sont significativement plus limités chez les individus les plus précoces et les plus tardifs de la population (Figure 5). Ainsi, la faible contribution au nuage pollinique du cultivar '*Italica*' pourrait s'expliquer en partie par sa relative précocité qui ne lui permettrait de polliniser que les femelles *P. nigra* sauvages les plus précoces.

- il semble pertinent d'introduire dans le modèle, un effet supplémentaire spécifique du cultivar '*Italica*'. La fertilité relative de ce cultivar est ainsi estimée à une valeur 2,7 fois plus faible que celle des différents pollinisateurs *P. nigra* sauvages étudiés sur le site. Ce résultat est cohérent avec la plus faible compétitivité du pollen d' '*Italica*' mise en évidence dans les croisements contrôlés (§ I-12).

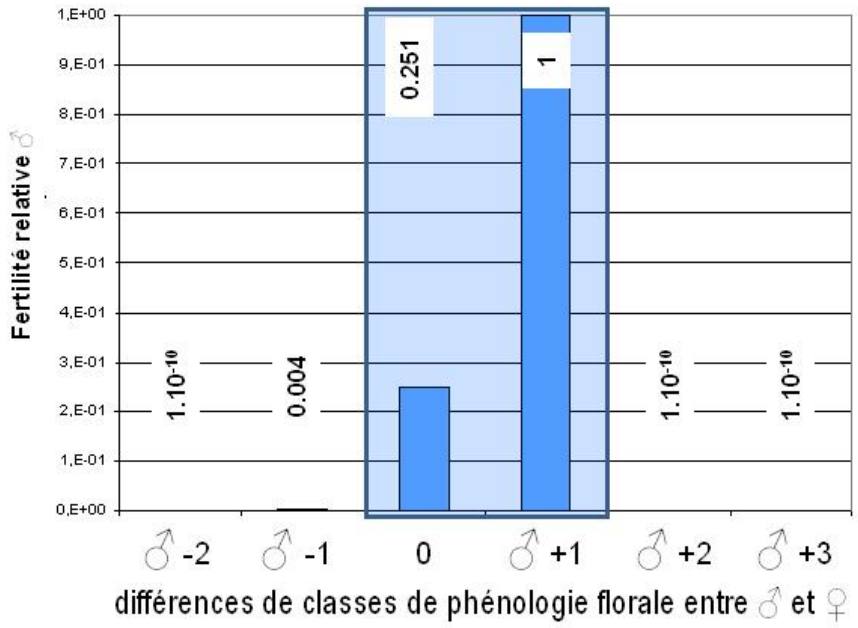


Figure 5 : Relation entre les fertilités relatives mâles estimées par le modèle et le synchronisme des floraisons mâles et femelles sur le site de St Ay.

A court terme, une révision du modèle de dispersion sera réalisée en complétant le jeu de données initial avec les données de génotypage relatives à 63 peupliers noirs échantillonnés à proximité mais à l'extérieur du site d'étude et à celles de 7 descendances maternelles complémentaires récoltées en 2006.

24- Flux de gènes depuis les plantations populicoles vers les peupleraies sauvages : choix du site expérimental de Bonny-sur-Loire

Une recherche de site expérimental plus particulièrement adapté au suivi de l'introgression depuis des plantations populicoles a été engagée en 2007. La méthodologie retenue pour cette deuxième partie du projet consistait à :

- **choisir** un site expérimental avec juxtaposition des compartiments cultivé et sauvage sans toutefois investir dans un inventaire exhaustif de la population de pollinisateurs sauvages. Nous comptions utiliser sur ce site, des méthodes indirectes d'estimation de dispersion du pollen du type *TwoGener* (§I-13).

- **privilégier**, autant que possible, des situations où les cultivars mâles du compartiment cultivé portaient des gènes de résistance à *Mlp* différenciables facilement en tests pathologiques. Les cultivars interaméricains se révélaient à ce titre de meilleurs candidats.
- **privilégier** des sites où il serait possible de compléter les études de flux de pollen par une première estimation du niveau d'hybridation dans des semis naturels.
- **évaluer**, *in situ et ex situ*, la variabilité génétique pour plusieurs paramètres biologiques identifiés comme importants sur le site de St Ay : phénologie florale, taille de la source de pollen et compétition pollinique
- **élucider** les flux de pollen sur ce site par récolte de descendances maternelles (graines) sur des peupliers noirs femelles et analyse de la différenciation des nuages polliniques des arbres-mères étudiées.

Le site expérimental retenu est situé à Bonny-sur-Loire (Loiret), il correspond au meilleur compromis trouvé pour les critères énoncés ci-dessus (Figure 6). Il combine une peupleraie naturelle en bord de fleuve et une peupleraie adulte d'un peu plus de 7 ha établie à partir de trois cultivars euraméricains : une femelle 'I-214' et deux mâles plus récemment utilisés en populiculture, 'I45/51' et 'Dorskamp'. Une dynamique naturelle de régénération avec des cohortes d'âge différent est nettement visible. Le set de 12 marqueurs microsatellites développé au § I-11 et quelques marqueurs SNP développés dans des gènes de résistance (§II-313) permettront de distinguer sans ambiguité des descendants éventuels de ces deux cultivars. Au printemps 2007, 18 peupliers noirs femelles de précocité de floraison comparable à celle des deux cultivars mâles ont été échantillonnés sur les 600m de ripisylve bordant la peupleraie cultivée. Respectivement, 11 et 16 d'entre elles ont pu faire l'objet de récoltes de descendances maternelles en 2007 et en 2008 (96 graines par femelle et récolte). Malheureusement, aucune récolte de graines n'a pu être réalisée sur le cultivar femelle 'I-214', du fait d'une fructification quasi-inexistante ces deux mêmes années.

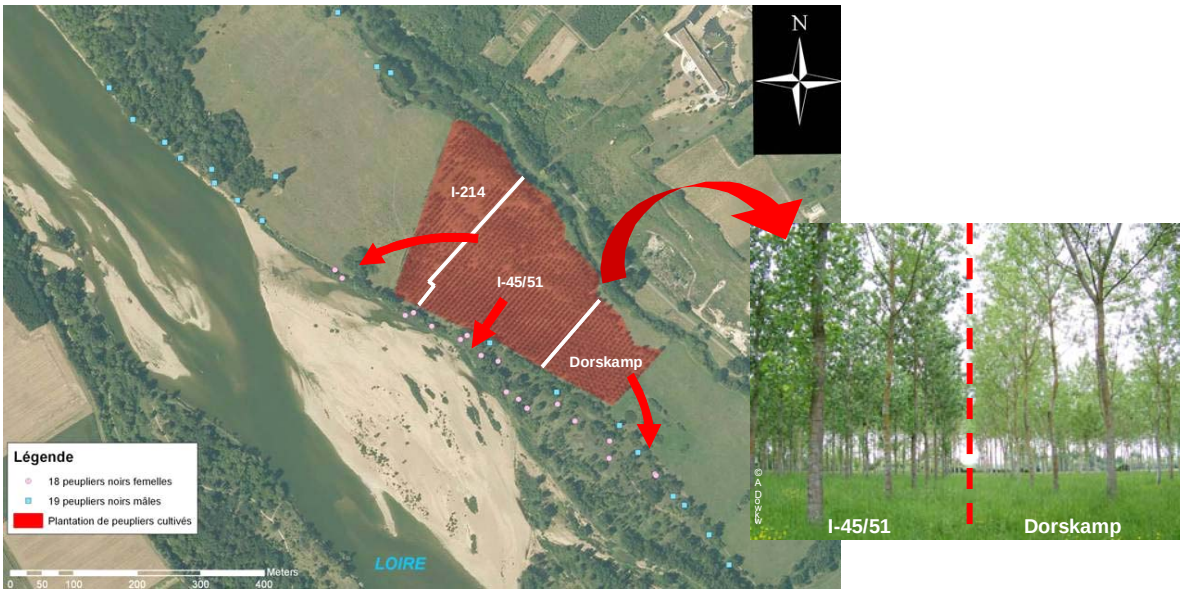


Figure 6 : Photo aérienne du site expérimental de Bonny-sur-Loire (Loiret).

La quantification, sur ce site, des flux de pollen entre compartiments cultivés et sauvages sera réalisée en 2009 dans le cadre de la thèse de Nicolas Chenault.

III- Flux de gènes entre compartiments cultivés et sauvages chez l'agent pathogène *Melampsora larici-populina*

Chez *Mlp*, la dynamique spatio-temporelle de plusieurs épidémies annuelles a fait l'objet d'études dans la vallée de la Durance où la peupleraie d'amont, strictement sauvage est en zone de

sympatrie avec le mélèze, hôte alternant obligatoire. Des migrations de populations pathogènes depuis quelques peupleraies cultivées de petites tailles ont pu être détectées dans la partie aval de la vallée.

31- Développement de nouveaux marqueurs microsatellites à partir de la séquence du génome de Mlp

Une première série de 15 marqueurs microsatellites, développés par la méthode des banques génomiques enrichies (Barrès *et al.* 2006), s'est révélée très performante pour évaluer les flux de gènes à différentes échelles, notamment aux échelles continentale et intercontinentale (Barrès *et al.* 2008). Cependant, dans le cas de l'évaluation des flux de gènes entre populations de *Mlp* issues de peupleraies sauvages et cultivées dans la Vallée de la Durance, cette première série de marqueurs ne nous a pas permis de faire des tests d'assignation individus –centrés. C'est pourquoi nous avons décidé de tirer parti de la séquence du génome de *Mlp* pour développer une nouvelle série de marqueurs microsatellites. Le génome de *Mlp* a été séquencé par le Joint Genome Institute du Département de l'Energie Américain (JGI-DoE) en 2007 et il est librement accessible depuis Novembre 2008 (http://genome.jgi-psf.org/Mellp1/Mellp1.home.html). L'annotation du génome par un consortium international piloté par F. Martin et S. Duplessis (UMR IAM, INRA Nancy) est en cours.

A l'aide du logiciel Magellan (http://www.medfac.usyd.edu.au/people/academics/profiles/dcarter.php), nous avons recherché des loci microsatellites *in silico* dans le génome de *Mlp* (2ème assemblage, Janvier 2008, 102 Mb organisé en 462 scaffolds). Nous avons identifié 7293 loci microsatellites avec les options par défaut de Magellan (min. 6 répétitions pour tous les motifs). Avec des critères de sélection stringeants (min. 10 répétitions pour les motifs di-nucléotidiques et 8 répétitions pour les motifs tri-nucléotidiques), nous avons identifié 654 loci microsatellites intéressants. Sur les 462 scaffolds, seuls 111 contiennent des loci microsatellites, et la plupart des petits scaffolds n'en contiennent pas. Les loci microsatellites semblent relativement bien répartis sur le génome (Figure 7) et leur densité moyenne est de 6,5 microsatellites par Mb.

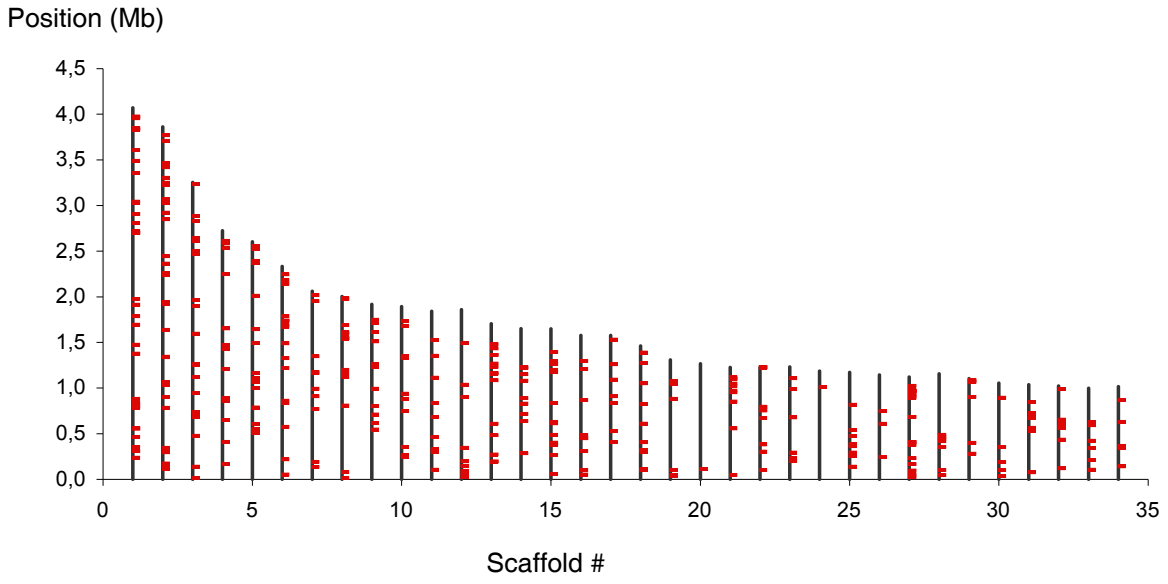


Figure 7: Distribution des loci microsatellites sur les 34 premiers scaffolds de la séquence du génome de *Mlp*.

Nous avons ensuite défini des couples d'amorce pour les 654 loci à l'aide du logiciel Primer3, puis validé in vitro les 58 loci qui nous paraissaient les plus intéressants. Sur ces 58 loci, 43 ont été correctement amplifiés (74% d'amplification). Le polymorphisme de ces 43 loci a été évalué sur deux populations sexuées de *Mlp* de 40 individus (Tableau 2). Finalement, **30 loci** ont été retenus pour une utilisation en routine, organisés en fonction de leur taille d'allèles en deux panels multiplex de 14 et 16 loci.

Locus ID	Motif	Expected size	No alleles	Observed size range
Mlp_40	(AAAACA)24	467	22	331-553
Mlp_41	(GAACAA)24	285	30	168-540
Mlp_42	(TTGTGA)19	344	15	244-412
Mlp_43	(ACAATG)15	227	34	244-520
Mlp_48	(TCAA)18	209	15	212-292
Mlp_49	(CAT)19	340	12	368-425
Mlp_50	(TCT)16	279	9	279-312
Mlp_54	(CAT)14	142	6	137-155
Mlp_55	(TGA)14	153	7	170-218
Mlp_56	(AAC)13	292	8	291-318
Mlp_57	(TTG)13	169	6	172-202
Mlp_58	(AAG)13	251	7	258-276
Mlp_59	(ATC)13	322	9	328-355
Mlp_60	(ATG)13	164	5	162-186
Mlp_61	(ATG)13	248	4	264-279
Mlp_62	(ATATAA)13	466	12	411-513
Mlp_64	(CAA)12	401	8	400-427
Mlp_65	(TGT)12	500	9	413-570
Mlp_66	(GAT)12	195	6	205-223
Mlp_68	(AATC)12	411	3	434-445
Mlp_70	(AT)14	362	4	378-386
Mlp_71	(TC)14	369	7	385-397
Mlp_73	(GT)14	434	8	442-470
Mlp_74	(AT)13	377	4	394-408
Mlp_75	(AG)12	370	3	369-393
Mlp_77	(AT)11	437	3	456-460
Mlp_80	(TCA)11	404	2	417-426
Mlp_81	(GTA)10	146	3	160-169
Mlp_82	(TAC)10	149	6	163-202
Mlp_83	(ATG)10	159	5	169-181
Mlp_84	(TGA)10	345	1	364
Mlp_85	(TCC)10 (TCA)6	346	5	365-383
Mlp_86	(TCA)10	348	1	371
Mlp_87	(CAA)10	350	4	365-392
Mlp_88	(ACT)10	443	4	436-451
Mlp_89	(TGG)9	376	2	394-397
Mlp_91	(CAA)11	137	2	151-154
Mlp_92	(TTG)11	336	4	353-368
Mlp_93	(AAC)11	145	4	146-164
Mlp_94	(TTC)11	454	4	482-491
Mlp_95	(TGT)9	450	4	465-480
Mlp_96	(CCA)9	415	3	422-435
Mlp_97	(CAAT)9	406	5	404-428

Tableau 2 : Caractéristiques des 43 loci microsatellites développés chez *Mlp*.

Une publication sur le développement de ces loci microsatellites a été soumise à la revue *Molecular Ecology Resources*. De plus, la totalité des 654 loci microsatellites est en cours de criblage pour détecter ceux qui sont hétérozygotes dans la souche 98AG31 de *Mlp* qui a été séquencée, afin de construire une carte génétique de *Mlp*.

32- Développement de marqueurs non neutres chez Mlp

Afin de générer des marqueurs non neutres chez *M. larici-populina* il est essentiel de mettre à jour les gènes codant des déterminants génétiques du champignon potentiellement impliqués dans le pouvoir pathogène. Afin d'identifier de tels gènes nous avons procédé au séquençage à très haut débit de tissus foliaires de peuplier infectés par la souche 98AG61 de *Mlp* par la technique de pyroséquençage. La séquence génomique de cette souche a été obtenue par le Joint Genome Institute (JGI).

Des feuilles du cultivar 'Beaupré', inoculées par la souche 98AG31 ont fait l'objet de prélèvement d'échantillons à 4 et 7 j-pi. Les stades de prélèvement retenus nous permettent de viser les transcrits exprimés dans les structures haustoriales qui sont présentes en très grand nombre à 4 j-pi, ainsi qu'au niveau des urédies, site de production des urédospores à 7 j-pi. Les transcrits ont été extraits des tissus foliaires infectés et des ADNc ont été synthétisés par reverse transcription. Environ 185 000 séquences exprimées (ESTs, Expressed Sequence Tags) ont été obtenues par pyroséquençage à l'aide de la technologie 454 (Roche). La disponibilité des deux génomes de l'hôte et de l'agent pathogène, nous a permis de trier les transcrits fongiques des transcrits de la plante. Après assemblage à l'aide du programme MIRA et comparaison aux deux génomes par le programme GenomeThreader, nous avons pu identifier 5 956 séquences appartenant à *Mlp*. En comparant les séquences obtenues avec celles générées à partir d'urédospores pures du champignon (JGI), nous pouvons mettre en évidence des gènes préférentiellement exprimés *in planta* qui pourraient participer à la mise en place des structures d'infection ou encore à l'agressivité chez le champignon (effecteurs fongiques). Notamment, nous identifions plus de 200 transcrits fongiques particulièrement abondants dans les tissus foliaires infectés et absents des spores, qui codent des protéines sécrétées de petites tailles et

spécifiques de *Mlp* (non retrouvés chez les autres champignons basidiomycètes ou chez *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, un autre Pucciniale responsable de la rouille du blé). Des études récentes indiquent que le sécrétome des champignons pathogènes pourrait contenir de nombreux effecteurs fongiques directement impliqués dans la manipulation des systèmes de défense de l'hôte (Duplessis et Kuhn, 2008 ; van der does er Rep, 2008). Les déterminants moléculaires de *Mlp* ainsi mis à jour pourraient ainsi correspondre à des effecteurs potentiels et représentent donc des cibles d'intérêt pour générer des marqueurs non neutres directement impliqués dans le pouvoir pathogène. Il reste à déterminer si les séquences correspondantes présentent un fort polymorphisme intraspécifique chez plusieurs souches présentant des combinaisons de virulence variées.

33- Mise en évidence de deux épidémies de Mlp dans les peupleraies sauvages et cultivées de la vallée de la Durance.

L'étude des flux de gènes entre compartiments cultivés et sauvages chez *Mlp* s'est concentrée sur l'influence d'un groupe restreint de cultivars (ou clones), ceux possédant la résistance qualitative R7 héritée de l'espèce *P. deltoides*, qui exercent une pression de sélection particulière sur les populations de *Mlp* en sélectionnant les isolats portant la virulence 7 (dénommés individus Vir7). Majoritairement plantés sur le territoire français, car restés immuns pendant une quinzaine d'années, ces cultivars se sont vus infectés pour la première fois en 1994. En moins de cinq ans, de par les fortes capacités de dispersion de l'agent pathogène, quasiment tout le territoire a été envahi par des individus Vir7 (Pinon et Frey 2005).

La particularité du cycle biologique de *Mlp* est qu'il doit alterner sur une autre plante hôte, le mélèze, pour effectuer la reproduction sexuée et boucler son cycle de vie. Ceci assure un très fort brassage génétique et une homogénéisation rapide des fréquences d'allèles neutres quelle que soit la plante hôte échantillonnée autour d'un point de reproduction sexuée. Ainsi, une étude a montré qu'il n'y avait pas de différence de fréquences de pathotypes (combinaison des facteurs de virulence) et de génotypes entre populations prélevées à l'automne 2001 sur peupliers et au printemps 2002 sur des mélèzes adjacents (Gérard *et al.* 2006).

De plus cette étude a montré qu'une portion du territoire était restée exempte d'individus Vir7 en 2001. Cette zone correspond globalement à la vallée de la Durance, vallée assez encaissée et isolée des vents dominants venant du Nord-Ouest où la peupleraie cultivée est quasi inexistante, ce qui a pu expliquer qu'elle soit restée préservée. Cependant, une intensification des prospections menée en amont de ce projet, a permis de découvrir quelques plantations dans la vallée de la Durance et de l'autre coté du massif des Ecrins, dans la vallée du Drac, plantations majoritairement composées de clones portant la résistance R7 (Figure 8).

Lors du présent projet nous nous sommes donc intéressés à l'influence de ces compartiments cultivés sur l'évolution des isolats hébergés par le compartiment sauvage (ripisylve à *P. nigra*) en tentant de décortiquer la génétique d'une épidémie dans la vallée de Durance. Nous avons recherché plus particulièrement s'il y avait eu introgression totale ou partielle de la virulence 7 dans cette situation naturelle, encore préservée en 2001.

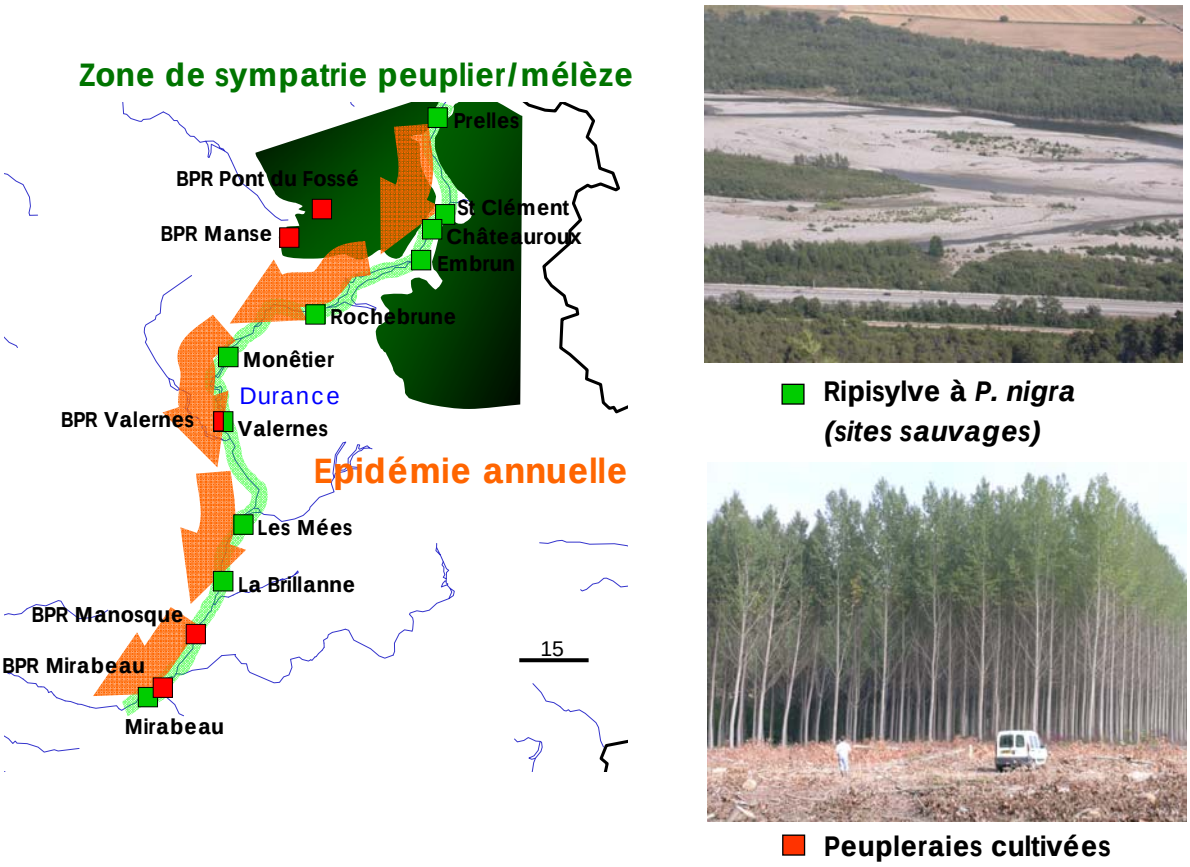


Figure 8 : représentation simplifiée du corridor écologique de la Vallée de la Durance.

Méthodologie *:*

Afin d'appréhender les flux de gènes entre populations de *Mlp* des peupleraies sauvages et cultivées et déterminer leur influence relative sur le déroulement de l'épidémie, nous avons échantillonné en fin d'épidémie (à l'automne 2004) des populations de *Mlp* dans les deux compartiments, sur un transect de 200 km. Lorsque cela était possible une quarantaine d'individus ont été typés par site (isolement à partir d'une seule lésion par feuille infectée) sur un total de 10 sites. Les isolats ont été analysés à l'aide de marqueurs microsatellites développés au cours de ce projet (§II-21) et de marqueurs de virulence, résultat d'un test phénotypique sur la capacité des isolats à infecter ou non un cultivar portant la résistance R7.

Résultats :

Marqueurs phénotypiques de virulence : Tous les isolats prélevés en peupleraies cultivées portent la virulence 7 (résultat sans surprise puisque sinon ils seraient dans l'incapacité d'infecter les peupliers R7). En revanche, et contrairement à l'étude d'échantillonnages 2001 (Gérard *et al.* 2006), une proportion non négligeable d'individus de *Mlp* prélevés sur les sites « sauvages » portent la virulence 7, alors qu'elle n'est pas nécessaire pour infecter *P. nigra*. De plus ces proportions sont inégalement réparties selon l'emplacement du site le long du transect. Il n'y a pas ou très peu (moins de 5%) d'individus porteurs de la Vir7 (individus Vir7) en amont dans la zone de sympatrie peuplier - mélèze là où s'effectue la reproduction sexuée, alors que la proportion d'individus Vir7 est bien plus importante dans la partie aval de la vallée (en moyenne 25%).

L'absence d'individus Vir7 dans la partie amont laisserait présager que la virulence 7 n'a pas encore été introgressée dans le fond génétique des individus sauvages. Sa présence en aval trahirait l'existence des individus migrant du compartiment cultivé vers le compartiment sauvage. Ces derniers restent néanmoins sans contribution à la génération suivante puisqu'ils migrent vers des sites sans reproduction sexuée. Dans un deuxième temps nous avons cherché à valider ces hypothèses à l'aide des marqueurs neutres.

Apport des marqueurs microsatellites : Dans le jeu de données rassemblant les informations individuelles aux marqueurs neutres, nous avons recherché des traces de structuration génétique. Les premiers tests de structuration ont été menés sur un jeu de données qui combinait 11 des 15 marqueurs développés à l'aide de la banque enrichie (Barrès *et al.* 2006, §II-21). Ces premiers résultats ont montré que les populations prélevées sur les sites sauvages diffèrent effectivement des populations prélevées dans les peupleraies cultivées (Fct = 0.49, P<0.01). Cette différentiation est encore accrue si on distingue au sein des populations sauvages des sous-populations portant la Vir7 et ne portant pas la Vir7 (Avr7) (Fct = 0.5, P<0.001). Dans ce cas les sous-populations constituées des individus Vir7 viennent se greffer sur un cladogramme près des populations cultivées (données non présentées), ce qui renforce l'hypothèse d'individus migrant entre compartiments.

Pour cette analyse nous avons criblé les individus sur une base phénotypique avant de tester l'existence d'une différentiation génétique. Il aurait été plus approprié d'utiliser une méthode sans *a priori* pour regrouper les individus selon leur proximité génétique, à l'aide de l'algorithme développé dans le logiciel STRUCTURE par exemple. Malheureusement, ces 11 marqueurs ne se sont pas montrés assez résolutifs pour utiliser avec un bon niveau de stringence ces techniques d'assignation individus centrés. Afin d'augmenter la puissance de notre jeu de données nous avons décidé de développer de nouveaux marqueurs (§II-21) puis nous avons sélectionné une vingtaine de ces nouveaux locus que nous avons amplifiés pour les individus prélevés dans la Durance.

Nous avons ensuite conduit des tests d'assignations sur le jeu de données complet (30 microsatellites, Figure 9) pour deux entités génétiques attendues que nous avons nommées, respectivement « cultivé » et « sauvage ». A une exception près, tous les individus prélevés en peupleraies cultivées sont indubitablement assignés à l'entité « cultivée ». Les résultats sont moins tranchés pour les individus prélevés dans le compartiment sauvage. Si les individus Vir7 sont majoritairement assignés à l'entité « cultivé », validant ainsi l'hypothèse de migration entre compartiments, quelques individus Vir7 présentent nettement des caractéristiques alléliques de l'entité « sauvage », notamment les individus Vir7 prélevés à Embrun, assignés indubitablement à l'entité « sauvage ». Il pourrait s'agir de traces d'introgression de la virulence 7 dans le fond génétique sauvage (où l'on savait qu'elle ne préexistait pas). Ce constat renforce l'intérêt d'avoir utilisé des tests d'assignation individus centrés. Le fond génétique des individus non porteurs de la Vir7 prélevés sur les sites sauvages semble plus homogène ; néanmoins quelques individus pourraient être assignés à l'entité génétique « cultivée ». Il est difficile de déterminer si ces individus sont des migrants ayant perdu la virulence 7 ou s'ils sont issus de la reproduction sexuée, auquel cas ils attesteraient également de flux de gènes (effectifs) entre compartiments cultivé et sauvage.

En conclusion, deux épidémies, globalement disjointes, sont initiées par des compartiments cultivés et sauvages dans la zone de sympatrie peuplier - mélèze. La barrière géographique formée par la chaîne des Ecrins garantit certainement l'isolement reproducteur de ces deux entités génétiques. Les événements de migration du compartiment « cultivé » vers le compartiment « sauvage », plus fréquent en aval de la zone de sympatrie peuplier - mélèze, ont globalement peu de conséquences sur les flux de gènes. Néanmoins les échanges génétiques entre compartiments ne peuvent être écartés, et nous avons quelques signes d'introgression de la virulence 7 dans le compartiment sauvage. Ces résultats fraîchement acquis vont conduire à la rédaction d'un article dont la soumission est prévue début 2009.

En perspective, il nous semblerait intéressant pour mieux quantifier ces niveaux d'introgression d'effectuer une analyse détaillée des populations de *Mlp* dans la zone de sympatrie peuplier - mélèze, de part et d'autre du massif des Ecrins ; notamment pour quantifier la fréquence de la virulence 7 et les profils d'assignation d'individus prélevés sur peupliers sauvages dans la vallée du Drac.

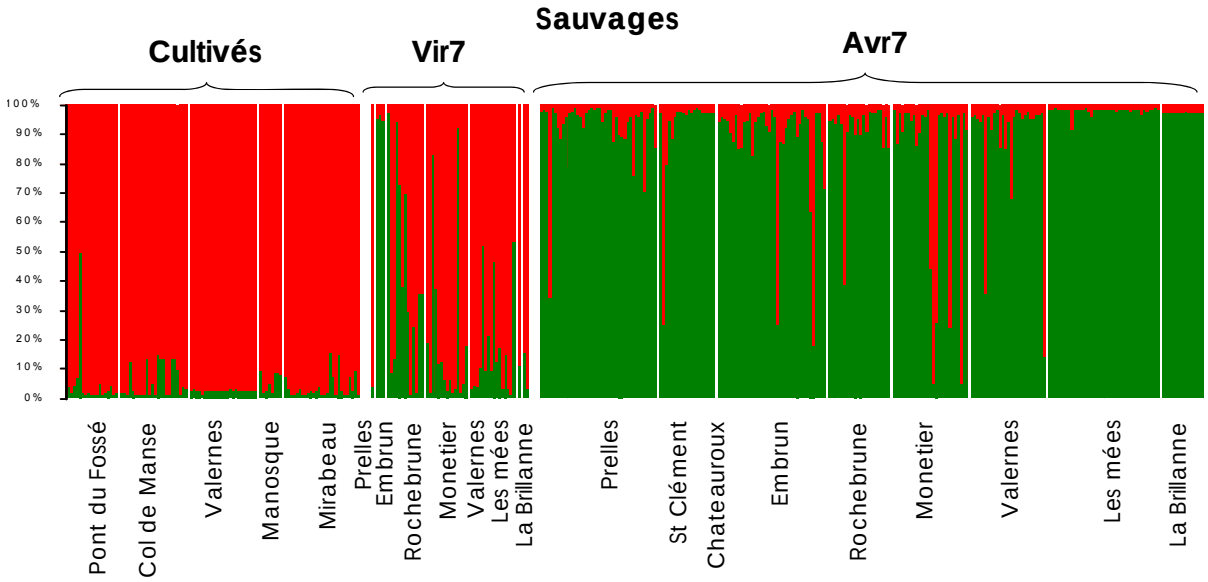


Figure 9 : Profil d'assignation génétique des individus de *Mlp* collectés le long de la Durance en 2004.

IV-Interactions peuplier-*Mlp* : déterminisme génétique et conséquences évolutives

Les stratégies de sélection du peuplier développées en Europe depuis 30 ans ont été majoritairement orientées vers la création d'hybrides interspécifiques et la valorisation de résistances qualitatives apportées par une espèce parente (*P. deltoides*) n'ayant jamais subi la pression de *Mlp* dans son aire d'origine. Plusieurs contournements de ces résistances qualitatives aux conséquences économiques majeures sont les témoins d'une évolution rapide et marquée des populations de l'agent pathogène en réponse aux déploiements variétaux peu diversifiés des zones cultivées. Les populations de *Mlp* récoltées en zone populicole se caractérisent en effet par une diversité de pathotypes plus grande et par des pathotypes plus complexes que ceux observés en peupleraie naturelle (Frey *et al.* 2005). Ainsi, le déploiement dans le paysage de résistances qualitatives pourrait être à l'origine d'un bouleversement des relations co-évolutives que l'espèce *P.nigra* entretient avec *Mlp*.

41- Identification chez le peuplier de gènes impliqués dans l'interaction peuplier-Mlp et analyse de leur polymorphisme dans les compartiments sauvages et cultivés

Les premières estimations de flux de gènes entre compartiment cultivé et compartiment sauvage des deux organismes en interaction, le peuplier et *Mlp*, reposent sur l'utilisation de marqueurs neutres ou de marqueurs phénotypiques (Vir7). Un des objectifs de ce projet multidisciplinaire était d'identifier des marqueurs moléculaires à valeur adaptative permettant d'évaluer l'impact évolutif des introgressions en provenance du compartiment cultivé sur les populations naturelles de peuplier et de *Mlp*.

La méthodologie retenue pour cette partie du projet consistait à :

- **identifier** une liste de gènes candidats impliqués dans les résistances qualitatives uniquement héritées de l'espèce *P. deltoides* et donc spécifiques du compartiment cultivé,

- **identifier** une liste de gènes candidats impliqués dans la résistance quantitative R_{US} limitant le niveau de sporulation de nombreuses souches de *Mlp* et héritée du parent *P.trichocarpa (*donc spécifique du compartiment cultivé) en utilisant en parallèle des approches de transcriptomique, de protéomique et de clonage positionnel,

- **évaluer,** dans les populations naturelles de *P.nigra* et pour les cultivars les plus utilisés, le niveau de polymorphisme nucléotidique dans plusieurs fragments de ces gènes de résistance afin de développer un set de marqueurs moléculaires révélant la présence d'allèles à forte valeur adaptative.

411- Identification de gènes impliqués dans les résistances qualitatives à *Mlp*

Au début du présent projet, la recherche de déterminants moléculaires du peuplier impliqués dans les mécanismes de résistance à *Mlp* portait plus particulièrement sur les étapes de reconnaissance (gènes R) et de mise en place des réactions de défense dans le cadre d'une **résistance qualitative** contournée par la virulence 7, spécifique du compartiment cultivé de l'agent pathogène. Des analyses comparatives d'expression ont été réalisées en situation d'interaction incompatible (expression de la résistance qualitative) et compatible (développement de la maladie) à partir d'inoculations contrôlées du cultivar interaméricain 'Beaupré' par des souches avirulente et virulente de *Mlp*. A travers l'utilisation de divers outils de transcriptomique (puces génome entier à oligonucléotides, cDNA micro- et macro-arrays, banque SSH, RT-qPCR) nous avons pu mettre à jour un catalogue des fonctions exprimées différentiellement par la plante à 48 h post-inoculation (h-pi) dans le cadre de l'interaction incompatible (Rinaldi *et al.* 2007). Parmi un ensemble de plusieurs centaines de gènes marqueurs, nous avons pu montrer une très forte accumulation de nombreux transcrits déjà identifiés chez des plantes annuelles pour leur rôle dans la réponse à des attaques de champignons pathogènes biotrophes, notamment des **pathogenesis-related proteins (protéines PR)** dont certaines ont des activités anti-microbienne démontrées. Nous avons aussi détecté la stimulation de l'expression de certains **gènes non rapportés** auparavant tel que **l'inositol-3-phosphate synthase** et qui pourrait indiquer un rôle plus spécifique dans l'interaction entre le peuplier et l'agent de la rouille. Enfin, nous avons aussi pu mettre en évidence la très forte induction d'un gène orphelin du peuplier codant une protéine sécrétée de petite taille et de fonction inconnue que nous avons nommé **RISP** pour **Rust-Induced Secreted Protein**. Ces travaux ont aussi montré l'absence de réponse précoce lors de l'infection dans le cadre d'une interaction compatible (Rinaldi *et al*. 2007).

Au sein de l'International Populus Genome Consortium, nous avons entrepris l'analyse exhaustive du contenu en gènes de résistance (R) de la séquence du génome du peuplier *P. trichocarpa* Nisqually-1 séquencé par le Joint Genome Institute du Departement de l'Energie américain (Tuskan *et al.* 2006). Nous nous sommes plus précisément focalisés sur les gènes de la catégorie des NBS-LRR (motif Nucleotide-Binding Site et Leucine-Rich-Repeat) qui est la plus large catégorie de gènes R chez les plantes et qui ont notamment été décrits pour leur rôle dans la réponse aux champignons pathogènes chez des plantes modèles telle que l'arabette ou le riz. Nous avons pu identifier plus de 400 gènes de cette catégorie dans le génome de l'arbre, soit le double de gènes présents au sein du génome d'*Arabidopsis thaliana* (Kohler *et al.* 2008). Parmi les différentes classes de gènes R identifiés, nous montrons la présence d'une **nouvelle classe de protéines dite BNL** (pour Bed-finger-NBS-LRR) fortement représentée chez l'arbre et quasiment absente des plantes annuelles séquencées jusqu'à présent. Ces BNL pourraient jouer un rôle plus spécifique dans les relations entre l'arbre et les micro-organismes de son environnement. Nous mettons aussi en évidence l'existence de **larges clusters de gènes R de type NBS-LRR** au sein du génome et plus particulièrement au niveau du chromosome XIX à proximité du locus Mer impliqué dans la résistance qualitative portée par le cultivar 'Beaupré' et de QTLs liés à des composantes quantitatives de la résistance à *Mlp* identifiés à l'aide de pedigrees de cartographie génétique. Enfin, nous avons pu détecter pour 5 gènes de la classe des TNL, un signal d'adressage nucléaire et nous avons démontré la fonction d'adressage par construction génétique chez le tabac (Kohler *et al*. 2008).

412- Vers une définition des bases moléculaires de R_{US}, facteur de résistance quantitative à *Mlp*, par des approches combinées de transcriptomique et protéomique

Du fait de la réorientation actuelle des stratégies de sélection en faveur de résistances durables à *Mlp*, il s'agissait ici de compléter les études précédentes par une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires mis en place dans les **résistances quantitatives** à *Mlp* et conduisant à une réduction significative du développement de la maladie. Nous avons choisi de conduire des approches combinées d'expression du transcriptome et du protéome sur un facteur de résistance limitant significativement la sporulation de l'agent pathogène en conditions naturelles et contrôlées, et hérité de l'espèce *P. trichocarpa*, caractéristique du compartiment cultivé. Ce facteur de résistance, appelé R_{US} (US pour Uredinia Size) ségrége dans le pedigree de cartographie génétique, étudié à l'INRA d'Orléans (Dowkiw et Bastien 2004, Jorge *et al.* 2005).

Plan expérimental : La stratégie expérimentale retenue repose sur la comparaison de deux mélanges de génotypes plein-frères (bulks) se différenciant uniquement par la présence ou non du facteur de résistance R_{US}. Il s'agit ici d'identifier les effets propres de ce locus, difficilement séparables d'effets d'interaction avec le fond génétique lorsque les études d'expression sont réalisées sur un génotype particulier. L'étude a été réalisée sur deux groupes de 10 génotypes plein-frères, respectivement porteurs ('bulk R_{US}') ou non porteurs ('bulk r_{US}') du facteur de résistance R_{US} sélectionnés parmi les 1409 individus phénotypés du pedigree de cartographie. Pour chacun des génotypes sélectionnés, ont été récoltées des feuilles d'indices foliaires (LPI) identiques sur des plants élevés en serre. Des disques foliaires de 3cm de diamètre, prélevés à l'emporte-pièce, ont été placés en survie dans l'eau dans des boites à puits avant inoculation contrôlée et simultanée de l'ensemble du matériel. Au temps T-0, nous avons procédé à l'inoculation des disques foliaires avec des spores de la souche virulente 98AG69 de *M. larici-populina* par vaporisation homogène (20 000 spores/ml). Un traitement témoin correspondant à une inoculation des disques avec de l'eau a aussi été réalisé. Le matériel a été conservé en chambre de culture pendant les 8 jours d'expérience en conditions contrôlées de température (17°C), d'humidité (80%) et de lumière pour assurer un développement optimum du champignon *in planta*. Aux temps 2, 4 et 8j-pi et pour chacune des deux bulks, respectivement deux et un disque foliaire de chacun des 10 génotypes, inoculés avec des spores ou avec de l'eau ont été prélevés pour les analyses de protéomique et de transcriptomique. Trois réplicats biologiques ont été réalisés pour chaque point d'expérience. Le plan expérimental se définit donc de la façon suivante :

Bulk ($2=R_{US}/r_{US}$) x Traitement (3=eau/*Mlp* 98AG69) x Temps (3= 2/4/8 j-pi) x Réplicat biologique (3). Soit un total de 36 points d'expérience et 2 points supplémentaires correspondant au temps T-0 (pour le bulk Rus et le bulk rus). L'ensemble du matériel récolté à chaque point a été immédiatement congelé dans l'azote liquide puis transféré sur le centre INRA de Pierroton pour les analyses de protéomique et sur le centre INRA de Nancy pour les analyses de transcriptomique et de RT-qPCR. Devant le nombre de points et le coût des analyses d'expression de transcrits ou de protéines, nous avons choisi de restreindre le nombre de points à analyser par les approches globales. Nous savons des travaux antérieurs que les gènes de défense ne sont pas exprimés à 2 j-pi dans le cadre d'une interaction compatible alors qu'ils le sont à 4 j-pi, nous avons donc retenu ces deux points post-inoculation pour les approches non ciblées et décidé de considérer l'ensemble des points (0, 2, 4, 8) uniquement pour la validation des données obtenues par RT-qPCR.

Recherche de gènes candidats par l'approche transcriptomique

Lors de la définition du projet, le génome du peuplier avait été récemment séquencé et l'accès aux puces NimbleGen génome entier était encore très coûteux. Nous avons donc choisi de conduire les analyses avec des microréseaux d'ADNc sur lames de verre (Populus cDNA microarrays) disponibles auprès de la société PICME. Ces lames de verre comportent plus de 23 000 ADNc provenant de différents tissus de peuplier (bois, feuilles, racines) et correspondant à environ 10 000 modèles de gènes de peuplier. Leur utilisation pour l'analyse de la résistance qualitative avait montré une bonne concordance avec les résultats obtenus sur des puces NimbleGen (Rinaldi *et al.* 2007).

Les transcrits ont été extraits des tissus sélectionnés et ont servi de matrice pour la synthèse d'ADNc marqués par les fluorochromes Cy3 et Cy5. Des hybridations compétitives entre les différents traitements ont ainsi pu être conduites sur les lames PICME. Les signaux d'hybridation sur les lames ont été acquis sur un scanner GenePix (Axon) et ont été exportés après normalisation pour l'analyse statistique des profils d'expression sur le site dédié Cyber-T. Le choix d'une stratégie de mélanges de génotypes pourrait en partie expliquer que peu de gènes présentaient de fortes différences d'expression pour les combinaisons bulks x temps comparées (Tableau 3).

A 2 j-pi et pour les deux mélanges de génotypes étudiés, un très faible nombre de gènes sont marqués par une accumulation de transcrits. En effet si peu de gènes sont affectés pour le bulk R_{US} (moins de 50 gènes), un nombre plus important de fonctions sont modulées pour le bulk r_{US}. Ce mélange de génotypes sans résistance quantitative est marqué par une diminution précoce d'un nombre important de fonctions impliquées dans la signalisation ou le métabolisme secondaire, alors que la stimulation d'un certain nombre de fonctions indique une modification possible de la composition membranaire et pariétale des cellules infectées.

	Bulk r_{US}		Bulk R_{US}	
Temps post-inoculation	**2 j-pi**	**4 j-pi**	**2 j-pi**	**4 j-pi**
Nombre total de gènes régulés (nombre de cDNA correspondant)	202 (207)	125 (147)	46 (48)	615 (1015)
Niveau de stimulation > 10 X	3	1	-	56
Niveau de stimulation > 2 X	20	12	16	288
Niveau de répression < - 2 X	169	105	26	321
Niveau de répression < - 10 X	1	-	2	1

Tableau 3 : Nombre de gènes de peuplier significativement régulés lors de l'infection par *M. larici-populina* détectés pour les bulks d'individus r_{US} et R_{US} à 2 jours et 4-jours post-inoculation (Cyber-t test, PPDE lnP-value < 0,05). Pour chacune des combinaisons bulk x temps les niveaux de régulation représentent les niveaux des transcrits dans le traitement disque foliaire inoculé par la souche 98AG69 de *M. larici-populina* rapportés au traitement inoculation par de l'eau (témoin).

Le résultat le plus marquant est la très nette distinction du profil général du bulk R_{US} à 4 j-pi pour lequel nous constatons qu'un nombre important de transcrits montrent une accumulation différentielle notable. La redondance, sur la lame, d'ADNc correspondants à un même modèle de gène de peuplier conforte les résultats obtenus. Le détail des fonctions des gènes affectés dans leur expression lors de l'infection par le pathogène dans les différentes combinaisons testées est très contrasté. En effet, à 4 j-pi, nous retrouvons parmi les gènes régulés dans le bulk R_{US} une majorité des gènes marqueurs de la résistance qualitative établis chez 'Beaupré'. Nous observons donc ici un profil typique de mise en place de réactions de défense avec toutefois un délai de 2 jours par rapport à l'expression de cette même réaction chez 'Beaupré' (Rinaldi *et al.* 2007). Parmi les fonctions dont le niveau des transcrits est accumulé, nous retrouvons un très large nombre de **protéines PR** (PR-1, PR-2, PR-3, PR-5, PR-8, PR-10, …), des éléments des **voies de signalisation** (MAP kinase, voie de l'éthylène) et du **métabolisme Redox** (Glutathione-S-transferase, peroxidases) ainsi que de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme secondaire et plus particulièrement la **voie des phénylpropanoides** pour la formation des lignines. Parmi les fonctions dont le nombre des transcrits diminue par rapport au traitement témoin, nous retrouvons un très large nombre de gènes codant diverses **enzymes de la photosynthèse** (petite sous-unité de la Rubisco, chlorophylle a/b-binding proteins, Light Harvesting Complex I & II associated proteins, …) ainsi que des enzymes impliquées dans la **synthèse d'amidon et de saccharose** (starch synthase, sucrose synthase). Nous notons aussi de manière intéressante la régulation de plusieurs gènes codant des **éléments du cytosquelette** (diminution des transcrits de l'alpha-tubuline et d'extensines et accumulation des transcrits d'un actin-depolymerizing factor).

Enfin, parmi l'ensemble des gènes significativement régulés, moins d'une dizaine sont retrouvés entre chacun des bulks aux deux temps. Les profils sont donc très marqués et spécifiques de chacune des combinaisons bulk x temps indiquant que l'interaction entre le peuplier et l'agent pathogène est très dynamique.

Recherches de gènes candidats par l'approche protéomique

L'étude de protéomique conduite doit permettre de répertorier les protéines différentiellement régulées et d'identifier par recherche d'homologies dans les bases de données les gènes candidats correspondants. Au cours du projet, nous avons pu optimiser l'extraction et la séparation électrophorétique des protéines solubles de 8 tissus du peuplier. Disposant de la séquence complète du génome et d'une base de données regroupant 260 000 séquences d'EST de peuplier, nous avons pu établir une carte du protéome du peuplier en identifiant une cinquantaine de protéines par tissu par spectrométrie de masse en tandem (nano ESI LC MS/MS) ce qui fait un total de 400 protéines séquencées (Plomion *et al.* 2006). L'ensemble des résultats ont été stockés dans une base de données appelée Proticdb à l'adresse url suivante : http://cbi.labri.fr/outils/Protic/public/PublicPopulus.php.

L'étude protéomique s'est intéressée aux deux bulk R_{US} et r_{US} aux temps 2 et 4 j-pi, en considérant les disques foliaires inoculés par la souche 98AG69 de *M. larici-populina* des 3 réplicats biologiques et en réalisant deux réplicats techniques, soit un total de 24 points. Les protéines totales ont été extraites selon le protocole décrit par Damerval *et al* (1986). Les extraits protéiques de chaque échantillon ont été dosés par une méthode de bradford modifiée. La technique de 2 D-PAGE a été utilisée pour séparer les protéines sur le système IPGphor de GE Healthcare pour l'IEF et la cuve 2D d'Amersham pour la SDS-PAGE. Après coloration au bleu colloïdal, les gels ont été scannés et utilisés pour le prélèvement des spots d'intérêt. Les gels ont été scannés en utilisant le scanner Image Scanner (Amersham) et le logiciel LabScan (Amersham). L'analyse d'images a été réalisée par le logiciel Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics Group). L'ensemble des gels ont été placés dans un seul groupe et le gel de référence a été choisi parmi les 24 gels et nous avons alignés toutes les images de l'expérience sur ce gel de référence à l'aide du module « Alignement automatique des images » du logiciel. La détection automatique des spots, permet de détecter exactement le même de nombre de spot avec le même identifiant dans chacun des gels. Après validation manuelle de certains spots (ajout, suppression, ou découpage de spots) nous avons pu obtenir le volume normalisé de chacun des spots de tous les gels et tester l'effet des différents facteurs par analyse de variance.

Les spots protéiques colorés ont été excisés manuellement des gels, rincés, déshydratés puis séchés. Les spots sont réhydratés et incubés dans une solution de trypsine. Le mélange peptidique issu de la digestion trypsique est analysé par chromatographie liquide (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) couplée à un spectromètre de masse en tandem LCQ (ThermoFinnigan, San José, CA, USA). Les peptides ont été identifiés avec SEQUEST contre la base de données TIGR Populus Gene index constituée de 44736 Contigs avec des filtres appropriés.

A l'issue de l'analyse statistique, un total de **2174 spots** ont été analysés et 141 ont été éliminés du fait d'un effet fort lié aux répétitions biologiques. Sur les 2033 spots restant, **63 spots** montraient un effet Génotype (R_{US} *vs* r_{US}) seul et **6** un effet interaction génotype/temps. Parmi les spots d'intérêts, 51 spots bien définis ont pu être excisés sur gel et 50 spots ont pu être identifiés par spectrométrie de masse. Concernant l'annotation des spots, certains contenaient une protéine unique, toutefois le cas le plus fréquent correspondait à la présence d'un mélange de plusieurs protéines. Dans ce cas, plusieurs protéines sont réellement associées à un seul spot ou bien il y a contamination par un spot adjacent lors de l'excision sur gel. Cependant, un certain nombre de paramètres comme le nombre de peptides identifiés (2 à 20) pour chaque protéine du mélange, l'abondance relative de chaque protéine au sein du mélange ainsi que la compatibilité entre le pI observé et le pI théorique nous permettent de prendre une décision quant à l'identification du spot.

Une classification hiérarchique à l'aide du programme Epclust a permis d'isoler 2 groupes principaux de protéines, l'un correspondant à des spots sous-exprimés dans le génotype R_{US} et l'autre composé de spots sur-exprimés dans le génotype R_{US} (Figure 10).

62% des spots protéiques montrant un effet mélange de génotypes significatif présentent une sur-expression pour le bulk R_{US}, surexpression particulièrement marquée 4 jours après inoculation. Nous identifions parmi les protéines de cette catégorie, des fonctions typiques des réactions de défense du peuplier à *M. larici-populina* (résistance qualitative) telles que la thaumatin (PR-5), une Glutathione-S-transferase, une wound-responsive protein Gwin3, une heat-shock protein HSP70. Parmi les autres fonctions, nous pouvons noter plusieurs enzymes du métabolisme primaire ou impliquées dans les réactions photosynthétiques. Il est à noter qu'une dizaine de protéines dont la thaumatin correspondant au spot 231 est spécifique de cette combinaison R_{US} x 4j-pi**.** Parmi les quelques protéines qui présentent une abondance plus forte dans le bulk rus par rapport au bulk Rus, nous pouvons noter la présence de plusieurs peroxidases dont le niveau est plus fort à 4j-pi et plusieurs protéines impliquées dans les processus photosynthétiques.

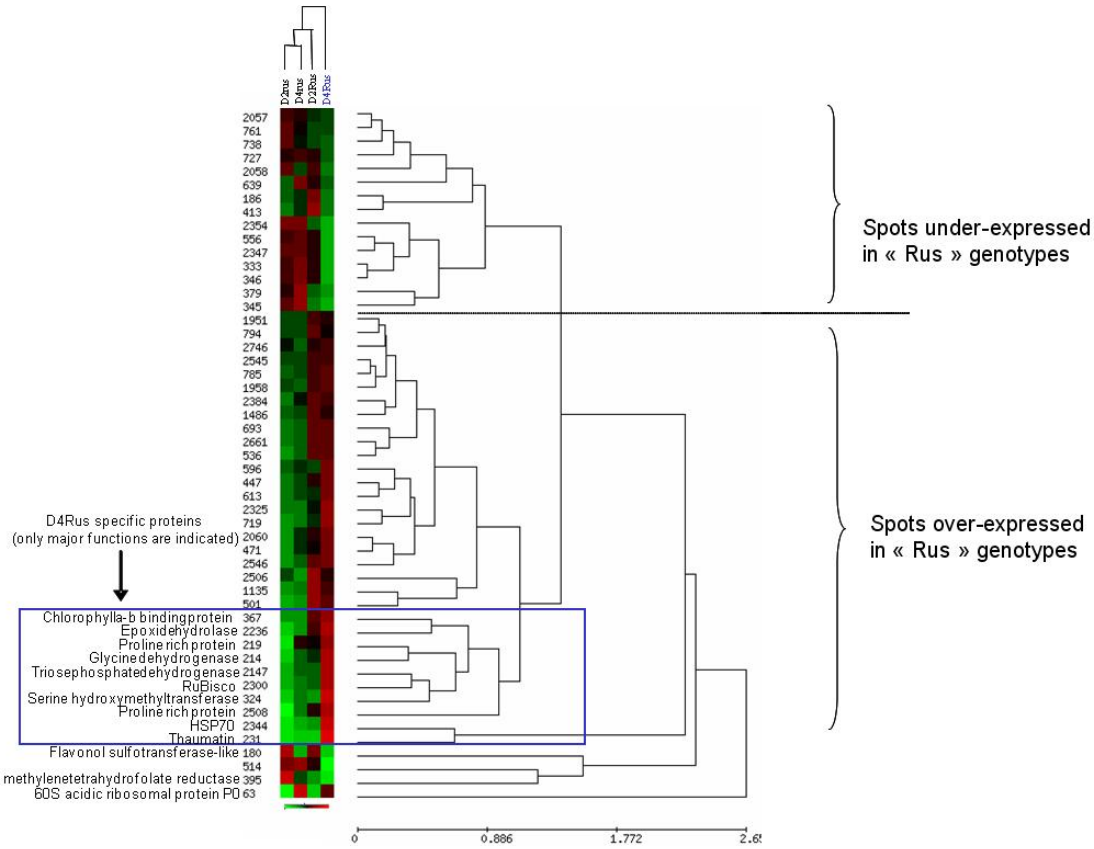


Figure 10 : Regroupement des spots protéiques identifiés par classification hiérarchique (distance euclidienne) montrant la similarité entre les mélanges de génotypes ‘r_{US}’ et ‘R_{US}’ aux temps 2j et 4j après inoculation par *Mlp* 98AG69.

Validation de gènes candidats identifiés par les approches globales

Les approches de protéomique et de transcriptomique nous ont permis de mettre en évidence un large nombre de fonctions potentiellement impliquées dans la mise en place d’une réponse spécifique à *M. larici-populina* chez des génotypes de peuplier porteur ou non d’une résistance partielle au pathogène. Parmi l’ensemble des fonctions dont les profils d’expression étaient altérés, nous avons sélectionné plusieurs gènes candidats et définis des amorces pour réaliser leur amplification spécifique par RT-qPCR et suivre ainsi leur expression dans les différentes conditions et aux différents temps du plan expérimental défini. Les gènes sélectionnés correspondent aux protéines PR-1, PR-2, PR-5, PR-10, l’inositol-3-phosphate synthase, la protéine RISP, les facteurs de transcription NPR1 et TGA2 et enfin une dirigent-protein. Les profils d’expression ont tous été normalisés par rapport au profil d’un gène de référence qui ne présente pas de variation d’expression au cours des cinétiques d’interaction.

Les profils obtenus ne montrent pas de différences significatives pour les facteurs de transcription et le gène PR-10 entre les deux bulks aux différents temps testés. Au contraire, tous les autres gènes présentent un **pic de stimulation de l’expression** à 4 j-pi pour le bulk R_{US} confirmant les données obtenues par l’approche globale. Les niveaux de transcrits diminuent à 8 j-pi mais restent plus importants qu’à 2 j-pi pour le bulk R_{US}. Dans le cas des gènes PR-1, RISP, dirigent protein et IP3, nous observons une augmentation tardive du niveau de transcrits pour le bulk r_{US}, ce qui indiquerait une expression retardée des réactions de défense vis à vis des individus du bulk R_{US} qui présentent une résistance partielle.

Conclusions : Les résultats de transcriptomique montrent que l’expression de la résistance partielle s’accompagne bien dans le bulk d’individus porteurs du facteur R_{US} d’un profil typique des réactions de défense du peuplier face à la rouille avec toutefois un décalage temporel vis à vis des réactions rapportées pour le cas d’une résistance qualitative à la maladie. L’approche protéomique conduite en parallèle rapporte l’expression de plusieurs protéines aussi détectées via l’approche transcriptomique

mais identifie aussi d'autres fonctions qui complètent le catalogue des gènes marqueurs de la résistance quantitative à *M. larici-populina*. L'ensemble des résultats suggèrent que le facteur de résistance quantitative R_{US} pourrait correspondre à un gène R avec une activation retardée de la réponse des gènes impliqués dans les réactions de défense en comparaison avec une résistance qualitative.

413- Identification de gènes candidats impliqués dans le facteur de résistance R_{US} par une approche de clonage positionnel

Le clonage positionnel permet d'identifier à partir de la position d'un gène sur le chromosome, une séquence nucléotidique conférant le phénotype d'intérêt. En 2008, plus d'une cinquantaine de gènes de résistance ont été clonés par cette stratégie principalement chez arabidopsis, le riz et les solanacées. Disposant pour le peuplier des ressources génétiques et génomiques nécessaires, nous avons choisi cette démarche pour identifier un gène majeur impliqué dans la résistance quantitative à *Mlp*.

Ressources génétiques et génomiques : (1) Une population en ségrégation de plus de 2100 individus issue du croisement *P. deltoides* (73038-62) x *P. trichocarpa* (101-74) a été créée par l'INRA d'Orléans. Cet effectif nous permet en théorie de cartographier des locus distants de 0.05 cM. Un peu plus de 1700 de ces individus ont été testés pour la résistance à la rouille foliaire en conditions contrôlées et ont pu être caractérisés pour leur niveau moyen de sporulation apprécié par la taille des urédosores. (2) L'ADN de haut poids moléculaire de l'individu '101-74' porteur du facteur R_{US}, a été partiellement digéré par l'enzyme Hind III. Les fragments de longueur variable entre 100 et 200 kb ont été sélectionnés et insérés dans le vecteur pIndigo BAC-5 H (Epicenter, USA). L'ensemble est cloné dans la bactérie électrocompétente Escherichia coli ElectroMAX DH10B (Invitrogen, USA). La banque ainsi construite est constituée de 52 224 clones, la taille moyenne des inserts est de 150 kb. La banque représente 14 fois la taille du génome diploïde.

Plusieurs approches successives ont été utilisées pour se rapprocher du locus R_{US} par cartographie génétique et physique (Figure 11):

(1) Grâce aux marqueurs microsatellites développés à partir de la séquence du génome (Tuskan *et al.* 2004) nous avons pu, dans le cadre de ce projet, localiser le locus R_{US} sur le chromosome XIX au niveau de la partie distale. Cent quatorze nouvelles combinaisons d'amorces AFLP EcorI+3/MseI+3 testées ont été testées sur cinq mélanges ou bulks 'R_{US}' et 'r_{US}', composés de génotypes au phénotype extrême. Elles ont révélé plus de 3000 bandes parmi lesquelles 7 discriminant les bulks ont été validées par analyse individuelle des mélanges et permettent de se rapprocher à 2,7cM de R_{US}.

(2) La région génomique identifiée contient de nombreux gènes de résistance de type NBS-LRR arrangés en super-cluster (Kohler *et al.* 2008). Malgré la complexité génomique des clusters de gènes de résistance, un assemblage de séquence peu fiable et la présence de nombreux trous de séquençage, 3 marqueurs de type CAPS ou dCAPS (TIR13, LRR_LTNL35_1, Perf 58) ont été générés et cartographiés à proximité de R_{US}.

(3) A partir de marqueurs proches de R_{US}, des clones BAC ont été isolés. Les extrémités de ces BAC ont été séquencées. De façon itérative, l'analyse des séquences permet l'élaboration de nouveaux marqueurs qui sont à la fois cartographiés génétiquement et utilisés pour rechercher de nouveaux clones BAC chevauchants les premiers BACs détectés. L'ensemble des procédures a permis de localiser **R_{US}** dans un i**ntervalle de 0.9 cM** entre le marqueur issu de la séquence d'une extrémité du BAC 14N8-T7 et le marqueur E1M4.1 issu de l'analyse des ségrégations en mélange. Les 2100 descendants du pedigree ont été génotypés pour les 14 marqueurs les plus proches de R_{US} : 21 individus recombinants permettent de valider la position de R_{US} et préciser les clones BAC porteurs du locus (Figure 12). Les marqueurs TIR 13 et POP 1 qui coségrégent avec R_{US} sont localisés sur le même BAC 4J18. Le marqueur flanquant L29_1, situé à 0.5 cM de Rus est localisé sur le BAC 97F12. Les BAC 4J18 (110 kb) et 97F12 (130 kb) sont chevauchants. Ces deux BAC ont été entièrement séquencés au Centre National de Séquençage/CEA. Nous avons obtenu une séquence de bonne qualité d'une longueur totale de 180 kb. Une première analyse automatique avec le logiciel EuGene nous permet d'identifier **7 gènes de résistance potentiels** de type NBS-LRR dont deux montrent un site d'adressage nucléaire. L'annotation expertisée est en cours.

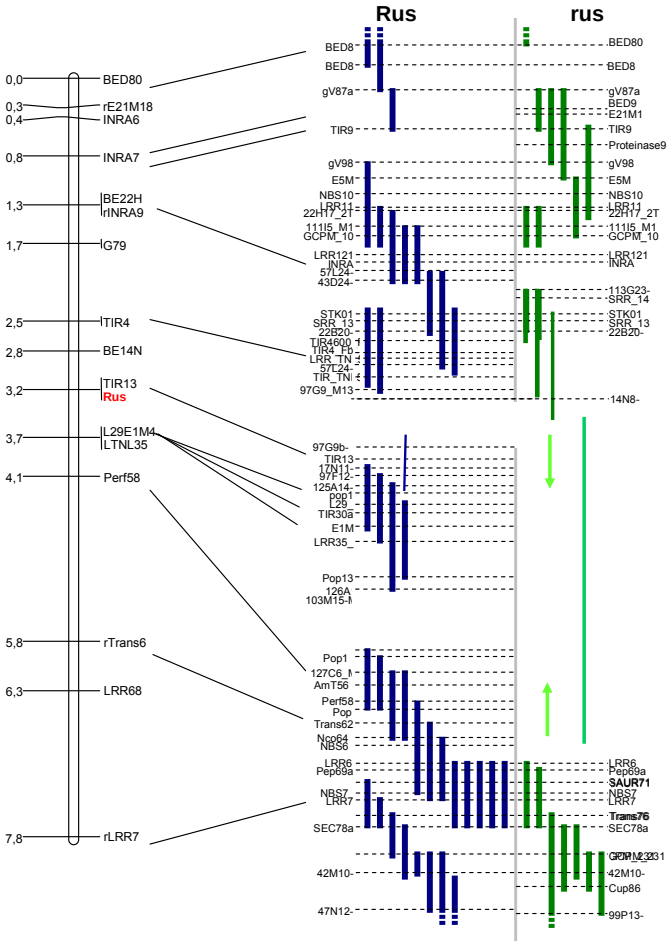


Figure 11 : Cartes physiques des haplotypes R_{US} et r_{US} et ancrage sur la carte génétique établie à partir de 1393 individus. Les chiffres à gauche représentent les distances en cM. . Les flèches indiquent que le travail de contigage de l'haplotype r_{US} est en cours d'achèvement

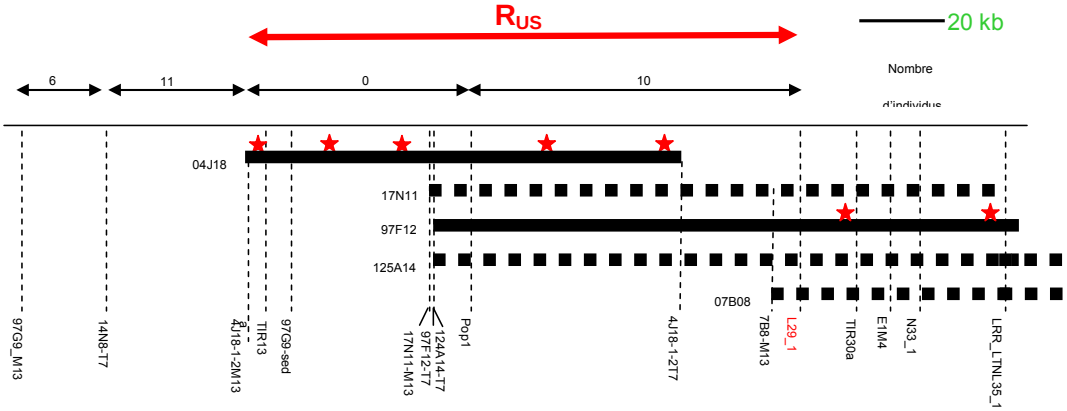


Figure 12 : Détail de l'assemblage des 4 clones BAC potentiellement porteur de R_{US}. Les BAC 4J18 et 97F12 ont été entièrement séquencés, les étoiles indiquent l'emplacement de gènes de résistance

414- Recherche au sein de gènes de résistance de polymorphisme nucléotidique spécifique du compartiment cultivé

L'Eco-TILLING consiste en la recherche systématique de polymorphisme au sein de populations naturelles dans des régions génomiques ciblées (Comai *et al.* 2004). Gilchrist *et al.* (2006) ont montré que la technique Eco-TILLING, est adaptée à la détection de points polymorphes le long de gènes cibles chez le peuplier. Chez les plantes hétérozygotes comme le peuplier, deux expériences sont réalisées en parallèle, l'une correspond à l'amplification d'un mélange d'ADN, constitué d'une

séquence de référence, dont la séquence nucléotidique est connue et d'un ADN à génotyper, la seconde correspond à l'amplification de l'ADN d'un individu unique. La première expérience permet de localiser les points de mutation par rapport à la séquence de référence, la seconde expérience permet d'identifier si l'individu est homozygote ou hétérozygote aux loci étudiés.

Nous avons utilisé cette approche pour dresser une empreinte génétique de quelques cultivars mâles pour quelques gènes de résistance pertinents vis-à-vis du pathosystème peuplier/*Mlp*. Pour notre étude nous avons apporté quelques modifications au protocole original (Faivre Rampant *et al.* 2008). L'ADN de référence est un allèle isolé à partir de la banque BAC disponible pour *P. trichocarpa* '101-74'.

Les gènes de résistance utilisés pour cette étude sont des **gènes candidats positionnels** identifiés après alignement des cartes génétiques sur la séquence disponible. Groupés en clusters, ils sont localisés à une extrémité du chromosome XIX et sur le scaffold 117. Des produits de digestion sont observés pour les 6 fragments de gènes. Les points de mutation repérés manuellement avec les deux fluorochromes ont été répertoriés et utilisés pour dresser une carte d'identité de chaque cultivar (Tableau 4).

Aucun point de mutation à l'état homozygote au sein du compartiment cultivé ne permet à lui seul d'identifier des évènements d'hybridation de première génération avec le compartiment sauvage. Il faut toutefois noter l'intérêt de certaines combinaisons de SNPs (ex : GV98) qui permettent de caractériser des hybrides de première génération entre *P. deltoides* et *P. nigra*.

Nous avons montré pu montrer que l' Eco-TILLING est adapté à la détection de polymorphisme dans des gènes complexes comme les gènes de résistance, ce qui n'est pas le cas du séquençage direct de produits PCR pour ces mêmes gènes (Paolucci, URGV communication personnelle). Cette technologie est cependant une technologie à faible voir moyen débit : l'utilisation de gel LICOR est un frein à son développement, son adaptation en électrophorèse capillaire est indispensable pour améliorer le débit et la capture des résultats.

		TIR92					GV98					NBS102			NBS73		GV87			BED83		
Espèce	**Clone**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**A**	**B**	**C**	**G**	**D**	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**A**	**B**	**C**	**D**	**C**	**B**
P.deltoides	73028-62	2		2	1									2		2				1		
P.deltoides	Lena	2		2			1		1		1	2	2			2	2			1		1
P.deltoides	Alcinde				2		1		1		1				2	2						1
P.deltoides	Dvina				2		1		1		1											1
P.deltoides	Soligo				2		1		1		1				2							1
P.deltoides	Taro				1		1		1					2		2						1
P.deltoides	Lambro				1		1		1		1					2						1
P.nigra	SRZ (Sarazin)																	2				
P.nigra	Vereecken						1	1			1							2		2		2
P.trichocarpa	101-74					2								2					1			
P.trichocarpa x P.deltoides	Unal						2		2		2			2	2							2
P.deltoides x P.nigra	Blanc du Poitou				1		1	2	2	1	1					1						1
P.deltoides x P.nigra	Flevo		1		1		1	2	2	1	1											
P.deltoides x P.nigra	Triplo	2					1	2	2	1	1	2	1			2					1	1
P.deltoides x P.nigra	Muur				1		1	2	2	1	1			1	2							1
P.deltoides x P.nigra	Koster						1	2	2	1	1			1		1						1
P.deltoides x P.nigra	I45/51						1	2	2	1	1	2				1					1	
P.deltoides x P.nigra	Ghoy						1	2	2	1	1											1
P.deltoides x P.nigra	Gaver		1		1	1	1	2	2	1	1											1
P.deltoides x P.nigra	Kopecky						1	2	2	1	1											1
P.deltoides x P.nigra	Robusta						1	2	2	1	1					1						
P.deltoides x P.nigra	Tardif de Champagne	2			2		1	2	2	1	1					1						
P.deltoides x P.nigra	Dorskamp		1		1		1	2	2	1	1											

Tableau 4 : Points de mutations observés par Eco-TILLING dans 6 fragments de gènes de résistance pour 21 cultivars mâles de peuplier et deux génotypes de référence (73028-62, 101-74). 1 : point de mutation à l'état hétérozygote, 2 : point de mutation à l'état homozygote. Les espèces des cultivars sont celles attribuées par Fossati *et al* (2005).

42- Impact évolutif et fonctionnel des interactions sauvage – cultivé analysé à l'aide de marqueurs phénotypiques

421- pressions de sélection exercées par les cultivars de peuplier sur les populations de *Mlp*

La lutte contre *Mlp* est basée essentiellement sur l'utilisation de cultivars portant des résistances, principalement qualitatives. La quasi-totalité des résistances qualitatives déployées a été contournée par l'apparition de nouvelles virulences (plusieurs cas bien documentés ces dernières décennies) ou la

sélection de virulences déjà existantes. Nous avons montré que la plantation massive dans les années 1980-2000 de cultivars de peuplier portant la résistance R7 (tels que 'Beaupré', qui totalise à lui seul jusqu'à 80% des surfaces plantées dans les années 1990 en Picardie) avait fortement sélectionné des populations de *Mlp* portant la virulence 7, suite au contournement de la résistance R7 en 1994 (Gérard et al. 2006).

L'objectif était de tester l'hypothèse d'une éventuelle augmentation de l'agressivité des isolats de *Mlp* apparus suite au contournement du gène de résistance R7, qui se traduirait par une diminution de la latence. La latence est définie comme la durée entre l'inoculation et l'apparition de 50% des urédies (lésions sporulantes). Pour cela, nous avons étudié une collection historique d'isolats de *Mlp*, constituée de 47 isolats Vir7, collectés entre 1994 et 2003. Le choix des isolats visait à maximiser les origines géographiques (France, Belgique), les cultivars d'origine et les pathotypes (combinaisons de facteurs de virulence). Chaque isolat a été inoculé par pulvérisation d'une suspension d'urédospores sur trois disques foliaires du cultivar 'Beaupré', et l'apparition des urédies a été notée journellement entre le 6^{e} et le 14^{e} jour après inoculation. La cinétique d'apparition des urédies a été ajustée selon une fonction probit (Shaner 1980) pour définir la latence correspondant à 50% des urédies apparues.

Les résultats montrent une diminution progressive de la latence entre les isolats de 1994-1995 (8,3 jours en moyenne) et ceux de 2002-2003 (7,0 jours) (Figure 13). Il semble donc qu'il y ait eu une augmentation de l'agressivité de *Mlp* sur le cultivar 'Beaupré'. Ce résultat soulève d'autres questions :

- la diminution de la latence traduit-elle une adaptation à un cultivar très largement majoritaire dans le paysage ('Beaupré') ou est-elle généralisable à d'autres cultivars ?
- la latence plus longue des premiers isolats Vir7 (1994-1995) traduit-elle un coût associé à la mutation de virulence, qui serait compensé les années suivantes ?
- Peut-il y avoir un biais d'échantillonnage des isolats étudiés : effectifs inégaux par année, lien entre origine géographique et années de récolte ?

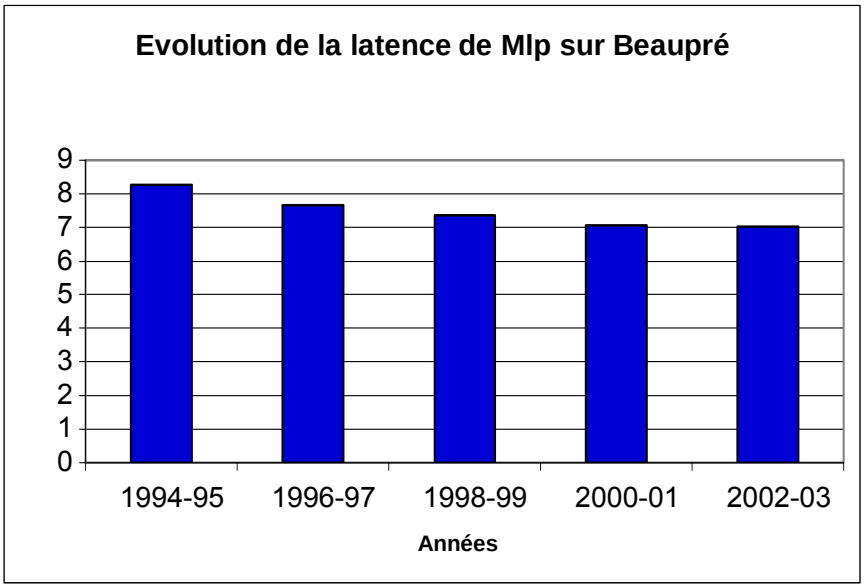


Figure 13 : Evolution de la latence sur 'Beaupré' des isolats Vir7 de *Mlp* collectés de 1994 à 2003.

Pour répondre à ces questions, nous envisageons deux perspectives à cette étude :

(i) Compléter cette étude avec 60 isolats supplémentaires collectés entre 1994 et 2007 afin de ré-équilibrer les effectifs par année et par origine géographique.

(ii) Faire une analyse rétrospective des temps de latence, notés lors du pathotypage de nombreuses populations de *Mlp* entre 1989 et 2007. Entre 5 et 10 populations, représentées chacune par 30 à 100 isolats, ont été pathotypées chaque année, sur une gamme différentielle qui compte actuellement 8 cultivars de peuplier discriminants. Au total, plusieurs dizaines de milliers de données

de temps de latence, actuellement sous forme d'archives papier, seront informatisées et analysées. L'analyse de ces très nombreuses données devrait permettre de confirmer ou d'infirmer notre hypothèse d'une augmentation de l'agressivité (diminution du temps de latence) suite au contournement de la résistance R7 en 1994. Des résultats préliminaires sur un échantillon de populations analysées semblent confirmer notre hypothèse.

422- Niveaux de résistance de populations naturelles de peuplier noir vis-à-vis d'isolats de *Mlp* représentant les compartiments sauvages et cultivés

Trois cent dix neuf génotypes de peuplier noir constituant la collection nationale de référence pour l'espèce ont été inoculés respectivement avec un isolat de pathotype simple représentatif de populations de *Mlp* présentes en peupleraie naturelle, et un isolat porteur de la virulence 7 représentatif de populations de *Mlp* développées en peupleraie cultivée. Les résultats observés révèlent une agressivité accrue de la souche issue du compartiment cultivé se traduisant par une latence infectieuse moyenne significativement réduite mais surtout une réduction de la variabilité génétique pour ce caractère au sein de la collection de peupliers noirs sauvages. Il serait nécessaire de valider cette première observation sur un sous-échantillon d'une soixantaine de génotypes *P.nigra* avec un plus grand nombre de souches récoltées dans les deux compartiments.

V- Perspectives de recherche ouvertes par les résultats acquis au cours du projet.

Le plus grand verrou scientifique rencontré durant ce projet concerne la prédiction combinée des flux de gènes chez le peuplier et *Mlp*. Pour l'agent pathogène surtout, le rapport d'échelle entre la taille des sources (spores) et l'échelle de dispersion semble difficile à gérer au travers d'approche expérimentale. De plus, les différences de ce même rapport d'échelle entre peuplier et l'agent pathogène nous contraignent, pour le moment, à dissocier les études des flux de gènes chez le peuplier et chez *Mlp*.

Prédiction des flux de gènes depuis les compartiments cultivés vers le compartiment sauvage chez le peuplier:

A court terme, les priorités d'études seront (1) d'estimer le taux d'hybridation à partir de peupleraies cultivées en valorisant l'investissement réalisé sur le site de Bonny sur Loire à l'aide d'analyse de parenté de descendances maternelles récoltées dans la peupleraie naturelle jouxtant la plantation. Les marqueurs moléculaires discriminant espèces parentes et hybrides de première génération (SNPs) seront des outils précieux pour quantifier ces taux d'hybridation à une échelle plus large en multipliant les points d'échantillonnage et en valorisant les techniques de génotypage à haut débit. Une modélisation de la dispersion du pollen nécessitera quant à elle de s'appuyer sur des marqueurs individu-spécifique et d'avoir recours à des analyse de parenté;
(2) de préciser l'importance de déterminants biologiques tel que le synchronisme de floraison dans différents sites d'étude et pour la gamme de variabilité de précocité de floraison observée au sein du compartiment cultivé ;
(3) d'essayer de quantifier par plusieurs descripteurs la taille de la source de pollen à l'échelle de l'inflorescence, de l'arbre et de la parcelle cultivée ;
(4) d'élucider le phénomène de compétition pollinique.

A moyen terme, il conviendrait d'analyser les flux de gènes à l'échelle des zones de conservation mises en place pour l'espèce *P.nigra* (réserves naturelles de l'ordre d'une dizaine d'hectares) afin d'élaborer des règles de gestion propices à un maintien de la diversité génétique existante. L'étude de la dispersion du pollen et des graines à des échelles plus grandes que celles de St-Ay et Bonny-sur-Loire sera probablement une des étapes nécessaires à une bonne compréhension de ces flux de gènes.

Prédiction des flux de gènes chez Mlp:

Il conviendrait de poursuivre la modélisation de la dispersion de *Mlp* dans un paysage hétérogène tel que la vallée de la Durance dans lequel les compartiments cultivés de petite taille constituent des

sources de taille plus facilement contrôlable et où il est particulièrement opportun de mesurer les évènements d'introgression du fait de la présence du Mélèze dans la zone en amont des épidémies annuelles. Les efforts d'études porteraient plus spécifiquement sur l'identification de barrières géographiques aux flux de gènes en comparant la structure des populations naturelles dans différentes vallées séparées par la chaîne des Ecrins.
En situation de plaine, où les surfaces de peupleraies cultivées à proximité de peupleraies naturelles sont plus importantes et où les flux entre compartiments sont plus anciens, les études devraient s'appuyer davantage sur une analyse de la structuration des populations de *Mlp* selon la géographie et la plante hôte. La structuration observée serait à mettre en relation avec différents descripteurs des peupleraies naturelles et cultivées étudiées.

Déterminisme génétique des interactions Peuplier-Mlp:

D'importants progrès de connaissance ont été acquis sur les bases génétiques et moléculaires de résistances quantitatives à *Mlp*. Les différentes approches conduites (transcriptomique, protéomique et clonage positionnel) ont fourni des listes de gènes candidats concordantes ou complémentaires. Seule la transformation génétique d'individus sensibles permettra une validation fonctionnelle de ces gènes de défense candidats. Cette transformation est en cours de mise au point et devrait être disponible prochainement.

Il conviendrait également de poursuivre ces études par des analyses de polymorphisme moléculaire d'un ensemble des gènes de défense impliqués dans les résistances qualitatives déployées dans le compartiment cultivé et des résistances quantitatives présentes dans les deux compartiments. Seules des études associant informations moléculaires et phénotype pour le niveau de résistance à *Mlp* permettront d'identifier des marqueurs adaptatifs permettant de suivre les marques d'une sélection naturelle en faveur de formes alléliques particulières. Même si la technique d'éco-TILLING s'est révélée performante pour détecter du polymorphisme au sein de gènes de résistance, elle reste de débit trop faible. D'importants programmes de séquençage sont en cours sur peuplier dans différents projets nationaux et internationaux et devraient fournir à moyen terme ces outils précieux de suivi de diversité génétique.

La mise à disposition récente de la séquence du génome de *Mlp* permet d'espérer le développement à moyen terme de marqueurs de type SNP étroitement liés aux composantes qualitative (virulences) et quantitative (agressivité) de *Mlp*.

Impacts évolutifs des interactions entre compartiments sauvages et cultivés:

Les efforts de recherche à développer pour caractériser et quantifier les impacts des interactions entre compartiments 'naturels' et 'cultivés' ont été sous-estimés dans ce projet. Si l'importance de la composition des peupleraies cultivées sur l'évolution rapide des populations de *Mlp* a pu être confirmée, les priorités de recherche devraient maintenant s'attacher à : (1) comparer la fitness de populations naturelles et de populations issues d'hybridation avec le compartiment cultivé afin de préciser la dynamique d'introgression, ceci pour les deux organismes, peuplier et *Mlp* ;

(2) vérifier si les populations de *Mlp* caractéristiques du compartiment cultivé sont capables d'exercer des pressions de sélection sur les populations naturelles de peuplier noir menaçant le maintien de la diversité génétique existante.

VI- Références bibliographiques citées

Austerlitz F., Smouse PE. 2001. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. Iii. Impact of adult population structure. Genetical Research, 78 (3) : 271-280.

Barrès B. 2006. Etude de la structuration génétique de populations de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille du peuplier, à différentes échelles spatiales. *Thèse de doctorat de l'Université Henri Poincaré*, Nancy I, 181 p.

Barrès B., Dutech C., Andrieux A., Caron H., Pinon J., Frey P. 2006. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci in the poplar rust fungus, *Melampsora larici-populina*, and cross-amplification in related species. *Molecular Ecology Notes* 6: 60-64.

Barrès B., Halkett F., Dutech C., Andrieux A., Pinon J., Frey P. 2008. Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 577-587.

Beaumont MA., Zhang W., Balding DJ. 2002. Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics* 162: 2025–2035

Burczyk J., Adams WT., Moran GF., Griffin AR. 2002. Complex patterns of mating revealed in a *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozyme markers and the neighbourhood model. *Molecular Ecology*, 11: 2379-2391.

Comai L., Young K., Till BJ., Reynolds SH., Greene EA., Codomo CA., Enns LC., Johnson JE., Burtner C., Odden AR., Henikoff S. 2004. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. *Plant Journal*, 37 (5) : 778-786

Dowkiw A., Bastien C. 2004. Characterization of two major genetic factors controlling quantitative resistance to *Melampsora larici-populina* leaf rust in hybrid poplars: strain-specificity, field expression, combined effects, and relationship with a defeated qualitative resistance gene. *Phytopathology* 94: 1358-1367.

Duplessis S. et Kuhn H. 2008. Secretomic climax in plant-fungal interactions. *New Phytologist* 179 : 907-910

Excoffier L., Heckel G. 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews Genetics*, 7 (10): 745-758.

Fossati T., Zapelli I., Bisoffi S., Micheletti A., Vietto L., Sala F., Castiglione S. 2005. Genetic relationships and clonal identity in a collection of commercially relevant poplar cultivars assessed by AFLP and SSR. *Tree Genetics and Genomes*, 1 (1): 11-20

Frey P., Gérard P., Feau N., Husson C., Pinon J. 2005. Variability and population biology of *Melampsora* rusts on poplars. *In Pei M. H., McCracken A. R., eds. Rust diseases of Willow and Poplar*. CAB International, Wallingford, UK, 63-72.

Gérard P.R., Husson C., Pinon J., Frey P. 2006. Comparison of genetic and virulence diversity of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar and influence of the alternate host. *Phytopathology* 96: 1027-1036.

Gilchrist EJ., Haughn GW., Ying CC., Otto SP., Zhuang J., Cheung D., Hamberger B., Aboutorabi F., Kalynyak T., Johnson L., Bohlmann J., Ellis B., Douglas CJ., Cronk QC. 2006. Use of Ecotilling as an efficient SNP discovery tool to survey genetic variation in wild populations of *Populus trichocarpa*. *Molecular Ecology*, 15: 1367-1378.

Hardy O., Vekemans J. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2 (4): 618-620.

Jorge V., Dowkiw A., Faivre-Rampant P., Bastien C. 2005. Genetic architecture of qualitative and quantitative *Melampsora larici-populina* leaf rust resistance in hybrid poplar: genetic mapping and QTL detection. *New Phytologist*. 167: 113-127.

Klein, E.K., Desassis, N., Oddou-Muratorio, S. 2008. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. Whole inter-individual variance of male fecundity estimated jointly with dispersal kernel. *Molecular Ecology* 17: 3323-3336

Kohler A., Rinaldi C., Duplessis S., Baucher M., Geelen D., Duchaussoy F., Meyers BC., Boerjan W., Martin F. 2008. Genome-wide identification of NBS Resistance Genes in *Populus trichocarpa*. *Plant Molecular Biology* 66: 619-636.

Marshall TC., Slate J., Kruuk LEB., Pemberton JM. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15: 65-95.

Oddou-Muratorio S., Klein E., Demesure-Musch B., Austerlitz F. 2006. Real-time patterns of pollen flow in the wild-service tree, *sorbus torminalis* (rosaceae). Iii. Mating patterns and the ecological maternal neighborhood. *American Journal of Botany*, 93 (11): 1650-1659.

Pinon J., Frey P. 2005. Interactions between poplar clones and *Melampsora* populations and their implications for breeding for durable resistance. *In Pei M. H., McCracken A. R., eds. Rust diseases of Willow and Poplar*. CAB International, Wallingford, UK, 139-154.

Plomion C., Lalanne C., Claverol S., Meddour H., Hohler A., Bogeat-Triboulot M.B., Barre A., Le Provost G., Dumazet H., Jacob D., Bastien C., Dreyer E., de Daruvar A., Guehl JM., Schmitter JM., Martin F., Bonneu M. 2006. Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. *Proteomics*, 6, 6509-6527.

Rinaldi C., Kohler A., Frey P., Duchaussoy F., Ningre N., Couloux A., Wincker P., Le Thiec D., Fluch S., Martin F., Duplessis S. 2007. Transcript profiling of poplar leaves upon infection with compatible and incompatible strains of the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Plant Physiologist* 144 : 347-366.

Shaner G. 1980. Probits for analyzing latent period data in studies of slow rusting resistance. *Phytopathology* 70:1179-1182.

Tuskan G, DiFazio S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Jansson S, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen G-L, Cooper D, Coutinho P, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroeve S, Déjardin A, dePamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehlting J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjärvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leplé J-C, Locascio P, Luo Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouzé P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai C, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D. 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray ex Brayshaw). *Science* 313:1596-1604.

Van der Does CH. et Rep M. 2007. Virulence genes and the evolution of host specificity in plant-pathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20 : 1175-1182

VII- Animations conduites au cours du projet

Réunions de travail réunissant l'ensemble des participants du projet :

Paris, 12 Décembre 2005
Paris, 20 Novembre 2006
Visioconférence- 6 Juillet 2007, Visioconférence- 6 Septembre 2007
Ivry, 16 et 17 Octobre 2008

Participation aux séminaires ECOGER :

Paris- 22 Mars 2006, Paris- 22 Octobre 2007