



Potentiel évolutif et adaptation des populations de l'agent du mildiou de la laitue, *Bremia lactucae*, face aux pressions de sélection de la plante hôte, *Lactuca sativa*

Romain R. Valade

► To cite this version:

Romain R. Valade. Potentiel évolutif et adaptation des populations de l'agent du mildiou de la laitue, *Bremia lactucae*, face aux pressions de sélection de la plante hôte, *Lactuca sativa*. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Paris Sud - Paris 11, 2012. Français. NNT : . tel-02809932

HAL Id: tel-02809932

<https://hal.inrae.fr/tel-02809932>

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.



UNIVERSITE PARIS-SUD — UFR des Sciences
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VÉGÉTAL

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS SUD

Discipline : Phytopathologie

Par

Romain VALADE

**Potentiel évolutif et adaptation des populations de
l'agent du mildiou de la laitue, *Bremia lactucae*, face aux
pressions de sélection de la plante hôte, *Lactuca sativa***

Soutenue le 11 juin 2012, devant le jury d'examen :

M. Bruno Le Cam
M. Manuel Plantegenest
M. François Delmotte
M. Frédéric Moquet
M^{me} Jacqui Shykoff
M^{me} Claire NEEMA

DR2 INRA, INRA Angers
MC, HDR, Agrocampus Ouest
CR INRA, INRA Bordeaux
Gautier semences
DR CNRS, ESE Paris 11, Orsay
PR AgroParisTech, UR BIOGER-CPP

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse



UNIVERSITE PARIS-SUD — UFR des Sciences
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VÉGÉTAL

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS SUD

Discipline : Phytopathologie

Par

Romain VALADE

**Potentiel évolutif et adaptation des populations de
l'agent du mildiou de la laitue, *Bremia lactucae*, face aux
pressions de sélection de la plante hôte, *Lactuca sativa***

Soutenue le 11 juin 2012, devant le jury d'examen :

M. Bruno Le Cam
M. Manuel Plantegenest
M. François Delmotte
M. Frédéric Moquet
M^{me} Jacqui Shykoff
M^{me} Claire NEEMA

DR2 INRA, INRA Angers
MC, HDR, Agrocampus Ouest
CR INRA, INRA Bordeaux
Gautier semences
DR CNRS, ESE Paris 11, Orsay
PR AgroParisTech, UR BIOGER-CPP

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Remerciements

J'ai réalisé cette thèse dans deux laboratoires, Bioger-CPP (INRA Thiverval-Grignon ; Agroparitech) et GAFL (INRA Avignon). Je tiens, en premier lieu, à remercier Claire Neema, animatrice de l'équipe « pop » et Brigitte Maisonneuve, responsable « laitue », de m'avoir fait confiance pour mener à bien cette thèse. Je souhaite les remercier pour leur soutien, leur disponibilité, leurs conseils avisés et pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Cette thèse n'aurait pas pu être réalisée sans le soutien financier et technique de deux partenaires privés, RijkZwaan et Gautier Semences. Ainsi, je remercie vivement Christian Vignaud, Arnaud Thabuis, Marc Villevieille et Marie Blachier de RijkZwaan ainsi que Frédéric Moquet, Marcel Deville et Mireille Buisson de Gautier Semences.

Je remercie également Bruno Le Cam et Manuel Plantegenest d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail ainsi que François Delmotte, Jacqui Shykoff et Frédéric Moquet d'avoir répondu favorablement pour participer à ce jury. Et merci à Didier Tharreau, Christophe Lemaire, Lilian Gout et Alain Palloix pour leur participation aux comités de thèse.

Merci à tous les collègues de Bioger et du GAFL que j'ai rencontré lors de ces trois années. Merci à Aurélie Ducasse, pilier de l'équipe « pop », pour sa précieuse et indispensable aide technique et pour nos discussions (presque) toujours scientifiques et à Angélique Gautier d'avoir toujours su me trouver une place au séquenceur...Merci à Loïc Jean, Marion Lovera, Emilie Julliard, Jonathan Gaudin et Sandrine Jeuniaux qui ont travaillé avec Brigitte au GAFL pour toutes les expériences d'isolement, de multiplication, de phénotypage... sans lesquelles cette thèse n'aurait pas pu être réalisée. Merci à Guip pour son amitié, son soutien nicotinique, footballistique, et pour nos discussions (presque) jamais scientifiques...Merci aux collègues du bureau 100, Anaïs, Elisabetta et Saad, et bon courage pour la fin de votre thèse. Merci à tous ceux avec qui j'ai passé de bons moments au labo, en congrès, à la cafétéria, à la pause café ou dans les transports en commun : Bérangère, Alexis, Johann, Agnès, Juliette, Jonathan, Jessica, Sonia, Valérie, Pascal, David et tout ceux que j'oublie...

Je remercie profondément ma famille et mes amis pour tout et particulièrement mes parents qui m'ont toujours soutenu et accompagné dans mes choix. Je ne vous remercierai jamais assez.

Enfin, un immense MERCI à Emilie pour sa patience, son soutien permanent surtout dans les moments difficiles des six derniers mois. C'est grâce à toi que je suis arrivé au bout et les mots ne sont pas suffisants pour t'exprimer ma gratitude.

À ceux qui nous manquent

SOMMAIRE

SOMMAIRE

CHAPITRE 17

INTRODUCTION ET PRESENTATION DU PROJET DE THESE

1.	PRESENTATION DU PROJET DE THESE	8
2.	LES PARASITES : CAS DES AGENTS PHYTOPATHOGENES, ECOLOGIE ET STRUCTURE GENETIQUE DES POPULATIONS.....	11
2.1.	<i>Emergence des agents pathogènes dans les agro-écosystèmes.....</i>	11
2.2.	<i>Principes et bases de la génétique des populations</i>	15
2.3.	<i>Histoires de vie des agents pathogènes et des hôtes</i>	21
3.	ADAPTATION DE L'AGENT PATHOGENE A LA RESISTANCE DE L'HOTE.....	26
3.1.	<i>Le modèle gène-pour-gène</i>	27
3.2.	<i>Mécanismes de reconnaissance hôte-agent pathogène</i>	28
3.3.	<i>Dynamique évolutive et variabilité génétique de la résistance et de la virulence</i>	33
4.	LE POTENTIEL EVOLUTIF DES AGENTS PATHOGENES, LA DURABILITE DE LA RESISTANCE ET LES STRATEGIES DE LUTTE.....	35
4.1.	<i>Durabilité des résistances</i>	36
4.2.	<i>Potentiel évolutif des agents pathogènes et stratégies de déploiement des résistances</i>	37
5.	LE MODELE : LACTUCA SATIVA-BREMIA LACTUCAE	41
5.1.	<i>La laitue cultivée : Lactuca sativa</i>	41
5.2.	<i>Les laitues sauvages.....</i>	47
5.3.	<i>Maladies et Méthodes de lutte.....</i>	48
5.4.	<i>Bremia lactucae</i>	51

CHAPITRE 262

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.	DEVELOPPEMENT ET MISE AU POINT DE MARQUEURS MOLECULAIRES.....	63
2.	ECHANTILLONNAGE DES ISOLATS DE B. LACTUCAE.....	65
2.1.	<i>Prélèvements de B. lactucae sur les variétés cultivées.....</i>	65
2.2.	<i>Echantillonnage de souches aériennes de B. lactucae</i>	66
3.	PHENOTYPES DE VIRULENCE.....	66
4.	INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES	66
4.1.	<i>Isolement monospore.....</i>	66
4.2.	<i>Analyses complémentaires</i>	67

CHAPITRE 368

DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE *BREMIA LACTUCAE* EN EUROPE ET STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS FRANÇAISES

1.	INTRODUCTION	69
2.	RESULTATS ET DISCUSSION : ARTICLE 1.....	69

CHAPITRE 496

EFFET DE LA PRESSION DE SÉLECTION DES GÈNES DE RÉSISTANCE DE LA PLANTE HÔTE SUR LA STRUCTURE DES POPULATIONS DE *BREMIA LACTUCAE* EN FRANCE

1.	INTRODUCTION	97
2.	RESULTATS ET DISCUSSION : ARTICLE 2.....	97

CHAPITRE 5120

VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE D'EFFECTEURS CANDIDATS (RxLR) DANS DES POPULATIONS FRANÇAISES DE *BREMIA LACTUCAE*

1.	INTRODUCTION.....	121
2.	MATERIEL ET METHODES.....	123
2.1.	Choix des effecteurs candidats étudiés.....	123
2.2.	Populations de <i>B. lactucae</i>	124
2.3.	Méthodes d'analyses du polymorphisme des séquences RxLR.....	125
3.	RESULTATS.....	129
3.1.	Polymorphisme des effecteurs candidats.....	129
3.2.	Polymorphisme des effecteurs candidats RxLR dans les populations françaises de <i>B. lactucae</i>	130
3.3.	Polymorphisme du gène de la bêta-tubuline.....	142
4.	DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	142
4.1.	Polymorphisme des 17 effecteurs candidats RxLR.....	142
4.2.	Identification de sélection positive dans les séquences des effecteurs candidats RxLR.....	143
4.3.	Evolution du polymorphisme des effecteurs RxLR7 et RxLR9 à l'échelle populationnelle.....	145

CHAPITRE 6148

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE.....159

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

ET

PRÉSENTATION DU PROJET DE THÈSE

1. Présentation du projet de thèse

Depuis l'apparition de la vie sur Terre, il y a environ 3,5 à 3,8 milliards d'années, la sélection naturelle a permis la diversification et la complexification des organismes vivants. Cette diversification a engendré une multiplication des interactions entre les membres de la biocénose à chaque niveau d'organisation du vivant, des gènes aux écosystèmes. Le monde vivant peut ainsi être considéré comme un vaste réseau d'interactions entre organismes. Ces interactions peuvent varier, non exclusivement en fonction des organismes impliqués, mais également en fonction de leur environnement.

Ces interactions sont classées en fonction de leurs caractères bénéfiques, néfastes ou neutres pour l'un ou l'autre des partenaires. Ainsi, on différencie des interactions bénéfiques et réciproques (mutualisme), des interactions bénéfiques pour l'un des partenaires et neutres pour l'autre (commensalisme, phorésie) et des interactions bénéfiques pour l'un et néfastes pour l'autre (prédation, parasitisme).

Le parasitisme, résultant des interactions entre les plantes et les microorganismes, fait parti du type d'interactions très étudié et probablement des plus anciens, du fait de l'importance de l'agriculture dans la civilisation humaine. La phytopathologie, discipline qui traite des maladies des plantes, existe depuis l'émergence de l'agriculture, il y a environ 10000 ans. Elle est née du besoin de limiter les impacts des maladies affectant les cultures. Les anciennes civilisations (Grecs, Hindous, Chinois ou Aztèques) avaient déjà conscience de l'existence de maladies chez les plantes cultivées. Cependant, ces phénomènes étaient attribués à des causes divines. La première observation microscopique d'un champignon phytopathogène a été faite par Hooke en 1665. Ce n'est qu'au début du XIX^{ème} siècle que la phytopathologie est décrétée discipline scientifique notamment grâce aux travaux de Berkeley, De Bary et d'autres qui établirent les prémices de la théorie des germes de Pasteur (Cooke 2007 ; Large 1940). En 1845 et 1846, le mildiou de la pomme de terre a provoqué, en Irlande, une famine qui fera des milliers de victimes et l'émigration de millions d'Irlandais vers les Etats-Unis. En 1846, Berkeley montre que l'agent causal du mildiou est un champignon parasite et ce n'est qu'en 1863 que De Bary confirme de façon indiscutable que l'agent du mildiou de la pomme de terre est le champignon *Phytophthora infestans* (classé depuis chez les oomycètes).

Les recherches scientifiques, depuis plus d'un siècle, ont permis des avancées significatives dans la connaissance des causes des maladies et le développement de moyens de lutte. Cependant, les défis posés par les agents pathogènes sont toujours importants.

Les parasites des plantes génèrent des pertes économiques importantes, estimées entre 10 à 30% du potentiel mondial de production agricole selon les cultures et les continents considérés (Agrios 1997). Ainsi, la recherche de méthodes de lutte est un enjeu majeur pour l'Homme. Ces méthodes de lutte doivent intégrer le concept de développement durable, c'est à dire la gestion rationnelle des ressources humaines, naturelles et économiques, qui vise à satisfaire les besoins fondamentaux de l'humanité. Le développement durable implique plusieurs conditions : la conservation de l'équilibre général, le respect de l'environnement, la prévention de l'épuisement des ressources naturelles, la diminution de la production des déchets et enfin la rationalisation de la production et de la consommation d'énergie. Dans ce contexte, l'usage de molécules chimiques pour lutter contre les maladies des plantes doit être diminué. Par conséquent, l'utilisation de résistances génétiques variétales présente l'avantage d'être plus respectueuse de l'environnement. Cependant, cette méthode de lutte est très souvent limitée temporellement. Les capacités des agents pathogènes à contourner les résistances de leur hôte ont été régulièrement observées (*Puccinia hordei*, *Bremia lactucae*, *P. infestans*...). Dans la nature, il y a une constante « course à l'armement » entre le parasite qui attaque et l'hôte qui se défend, s'insérant dans une coévolution pour les deux partenaires. Ainsi, à l'échelle de l'évolution, toute résistance est transitoire et sera contournée à un instant. Les scientifiques recherchent des méthodes pour augmenter la durabilité des résistances dans le but de limiter l'impact des maladies sur les cultures et donc sur la production mondiale qui doit rester à un niveau soutenu pour subvenir aux besoins humains. Ainsi, en 1979, Johnson a défini la notion de résistance durable comme une résistance qui reste efficace tout en étant extensivement utilisée en agriculture pendant une longue période dans un environnement favorable à la maladie.

Cette thèse traite de la durabilité des résistances et du potentiel évolutif des agents pathogènes face à ces résistances. Le potentiel évolutif d'un agent pathogène peut être évalué par la structure génétique des populations pathogènes (McDonald *et al.* 2002) : structure définie comme le taux et la répartition de la variabilité génétique au sein et entre les populations. La structure génétique est la conséquence des interactions entre les quatre forces évolutives qui influencent l'évolution des populations : la mutation, la dérive génétique, la

sélection naturelle et la migration. Cette durabilité est étudiée dans ce travail sur le modèle *Bremia lactucae*-*Lactuca sativa*.

L'agent du mildiou de la laitue (*Bremia lactucae* Regel) est présent dans toutes les zones de culture de la laitue des pays tempérés. Les pertes en culture en France sont estimées, en moyenne, à 10-12% de la production. La lutte chimique n'a qu'une efficacité préventive et doit être arrêtée en début de pomaison des laitues pour limiter les risques de résidus de pesticides. De plus, des souches résistantes aux fongicides sont apparues (Brown *et al.* 2004 ; Crute 1987) et le nombre de matières actives autorisées a diminué depuis quelques années sous l'influence des pouvoirs publics (ex : Grenelle de l'environnement avec le plan Écophyto 2018). La méthode de lutte privilégiée est donc la lutte génétique, associée à des mesures prophylactiques. Cependant, la lutte génétique a également montré des limites. Ainsi, depuis 50 ans en Europe, la sélection de laitues résistantes s'est heurtée à une adaptation remarquable du *Bremia* qui lui a permis de contourner les gènes de résistance introduits dans les variétés cultivées de laitue. La majorité de ces gènes de résistance répond à la théorie gène pour gène (Flor 1956).

A l'heure actuelle, les connaissances sur *B. lactucae* sont insuffisantes pour identifier les mécanismes impliqués dans le contournement de la résistance et donc prédire l'évolution des virulences. Ainsi, l'objectif de la thèse est d'apporter des informations nouvelles sur les stratégies évolutives utilisées par *B. lactucae* pour contourner les gènes de résistance de la plante hôte, en vue d'améliorer la durabilité des résistances. Pour ce faire, j'ai étudié la diversité génétique des populations de *Bremia* dans les principaux bassins de production de laitue en France. Cette étude a nécessité le développement de marqueurs moléculaires neutres. J'ai également initié une analyse de la dynamique évolutive d'effecteurs candidats du *Bremia* dans des populations pathogènes soumises aux pressions de sélection des variétés de laitue résistantes.

Ces études devraient permettre d'appréhender le potentiel évolutif du *Bremia*, d'observer l'impact de l'utilisation de gènes majeurs de résistance sur l'évolution des populations pathogènes et de documenter les théories sur l'évolution des agents pathogènes des agro-écosystèmes.

2. Les parasites : cas des agents phytopathogènes, écologie et structure génétique des populations.

Un parasite est défini comme un organisme, intimement associé à son hôte, qui va diminuer la valeur sélective (« fitness ») de l'hôte tout en augmentant sa propre « fitness ». Les parasites représentent une part significative de la biodiversité décrite (De Meeûs et Renaud 2002). Les estimations de l'importance des parasites varient de 50% (Tim et Clauson 1988) à 70% (Price 1980) des espèces existantes. Parmi les espèces connues, 30% des ~2 millions d'espèces eucaryotes seraient des parasites (De Meeûs et Renaud 2002). L'impact du parasitisme sur les écosystèmes et la société humaine est très important d'un point de vue évolutif, médical, agronomique et économique. Parmi les parasites, l'évolution rapide des agents phytopathogènes dans les agro-écosystèmes est un atout majeur pour étudier les interactions hôtes-parasites afin de limiter les dégâts mais aussi de comprendre les mécanismes impliqués dans l'émergence des parasites et l'évolution des interactions hôtes-parasites.

Dans un premier temps, nous développerons les différents mécanismes impliqués dans l'émergence des agents pathogènes. Dans une seconde partie, nous présenterons les principes de la génétique des populations. Enfin, nous exposerons l'influence des traits d'histoire de vie des agents pathogènes et de leur hôte sur la structure génétique des populations pathogènes.

2.1. Emergence des agents pathogènes dans les agro-écosystèmes

Contrairement aux interactions plantes-pathogènes dans les écosystèmes naturels, l'agriculture et la domestication des espèces et des agents pathogènes associés sont apparues seulement récemment, principalement dans les 10000 dernières années (Balter 2007). Le développement de l'agriculture et les changements dans les pratiques culturales ont conduit, simultanément, à l'émergence de nouveaux agents pathogènes et à des changements significatifs dans les populations pathogènes préexistant sur les espèces sauvages ancestrales des espèces cultivées.

Cette émergence de nouveaux agents pathogènes peut survenir par spéciation sympatrique¹ ou allopatrique². La spéciation sympatrique représente la divergence génétique

¹Spéciation sympatrique : La formation de deux ou plusieurs espèces descendantes d'une seule espèce ancestrale, toutes occupant la même zone géographique.

²Spéciation allopatrique : La formation de deux ou plusieurs espèces descendantes d'une seule espèce ancestrale en adéquation avec l'isolement géographique des sous-populations.

de populations localisées dans la même région géographique alors que la spéciation allopatrique se produit entre des populations géographiquement séparées (Mayr 1982).

La spéciation sympatrique n'est possible que si la sélection maintient la séparation entre ces populations et cette séparation sera maintenue si les hybrides entre les deux populations présentent une fitness plus faible que les descendants de chaque population (Stukenbrock et McDonald 2008).

La spéciation allopatrique peut résulter de l'introduction de nouvelles cultures ou d'agents pathogènes dans un environnement différent de leur zone d'origine. Ces introductions engendrent de nouvelles interactions hôtes-pathogènes pouvant conduire à une spéciation. La présence d'un nouvel agent pathogène dans une population d'hôte « naïf », non adaptée à cet agent infectieux, peut causer des pertes économiques très importantes.

Stukenbrock et McDonald (2008) ont défini quatre principaux scénarios pouvant conduire à l'émergence d'agents pathogènes, par l'un des deux types de spéciation évoqués ci-dessus, ce sont :

- **Le suivi d'hôte ou « Host-tracking »**¹

Les auteurs nomment ce scénario « host-tracking » par analogie avec un processus similaire à la coévolution se produisant sur une longue période dans des écosystèmes naturels. Sous ce scénario, l'hôte et le pathogène coévoluent pendant le processus de la domestication de l'hôte et le développement de la spécificité culturelle de l'hôte comme le cycle de culture, la biologie de la plante (une culture de laitue sera différente d'une culture de riz et évolue dans le temps avec l'acquisition de nouvelles connaissances pour améliorer le rendement, par exemple). Dans ce cas, le centre d'origine de l'agent pathogène devrait correspondre au centre d'origine de l'hôte. Plusieurs exemples de « domestication » de l'agent pathogène, à travers une coévolution en « Host-tracking », existent dans la littérature notamment dans le cas de la pyriculariose du riz (Couch *et al.* 2005), de l'agent du mildiou de la pomme de Terre dans les Andes (Gomez-Alpizar *et al.* 2007 ; Spooner *et al.* 2005) ou de la tavelure du pommier (Gladieux *et al.* 2010).

¹Suivi d'hôte : la coévolution d'un pathogène avec son hôte. Par suivi d'hôte, le pathogène peut être plus jeune que l'hôte contrairement à la cospéciation où l'agent pathogène et l'hôte ont divergé simultanément.

- **Le changement d'hôte et le saut d'hôte**

Un nouvel agent pathogène peut émerger après adaptation à un nouvel hôte, consécutif à un changement ou un saut d'hôte. Dans le cas d'un changement d'hôte, l'hôte alternatif est étroitement lié à l'hôte originel alors qu'un saut d'hôte implique un nouvel hôte phylogénétiquement distant de l'hôte originel. Sous ce processus, le centre d'origine de l'hôte ne correspond pas nécessairement à l'origine géographique de l'agent pathogène.

Un agent pathogène émergent peut provenir soit d'une population d'un hôte sauvage soit d'une autre espèce cultivée. Ainsi, les plantes sauvages se développant près des cultures peuvent être des sources de nouveaux agents pathogènes comme ce fut probablement le cas pour la maladie des tâches brunes de l'orge (*Rhynchosporium secalis*) provenant vraisemblablement d'un changement d'hôte du parasite suite à l'introduction de l'orge dans le nord de l'Europe (Zaffarano *et al.* 2008). Le transport de plantes infectées vers des zones non affectées (naïves) par le parasite et la mise en place de nouvelles cultures dans des zones sauvages augmentent également la probabilité de l'émergence de nouveaux agents pathogènes. Par exemple, la maladie de Moko sur la banane (genre *Musa*), causée par la bactérie *Ralstonia solanacearum*, qui a évolué sur des espèces d'*Heliconia* en Amérique centrale, est devenue endémique dans certaines parties de l'Australie après son introduction à travers l'importation de fruits et de plants de bananes (Anderson *et al.* 2004 ; Woods 1984).

- **Le transfert horizontal de gène (THG)**

Le THG est l'échange de gènes spécifiques ou de régions génomiques entre des espèces qui sont normalement reproductivement isolées. Sous ce processus, un agent pathogène avirulent ou peu agressif peut devenir virulent ou plus agressif grâce à l'acquisition de gènes, d'une autre espèce, impliqués dans le pouvoir pathogène. L'implication de ce mécanisme dans l'adaptation des bactéries est assez bien connue (de la Cruz *et al.* 2000) alors que pour les eucaryotes, l'importance de ces transferts de gènes est plus discutée (Andersson *et al.* 2005 ; Keeling *et al.* 2008 ; Kidwell 1993). Plusieurs cas de THG ont tout de même été décrits chez les champignons et, selon plusieurs auteurs, le THG serait un important mécanisme pour l'évolution des champignons (Sanders 2006 ; Van der Does and Rep 2007). Par exemple, Friesen *et al.* (2006) ont proposé que *Pyrenopeziza tritici-repentis* (agent de l'helminthosporiose du blé) ait récemment acquis, d'un autre champignon *Stagonospora nodorum* (agent pathogène du blé), un gène impliqué dans la production de toxine conférant la virulence vis-à-vis du gène de résistance *Tsn1* chez le blé. Ce transfert de gène serait la

cause de l'émergence rapide de *P. tritici-repentis* dans les cultures de blé dans le monde entier (Friesen *et al.* 2006).

- **L'hybridation**

L'hybridation entre souches pathogènes est un mécanisme impliquant l'intégralité du génome et peut conduire à des changements dans le nombre de chromosomes, à des niveaux différents de ploïdie ou à des réarrangements génomiques (Schardl *et al.* 2003). L'hybridation peut créer des lignées avec des propriétés très différentes des parents. Elle peut permettre l'acquisition de nouvelles virulences mais aussi l'acquisition d'une plus grande agressivité envers l'hôte d'origine. Un hybride pourrait ainsi émerger et se développer sur l'hôte d'origine mais aussi sur un nouvel hôte. Ce type de phénomène a été démontré pour *Phytophthora alni ssp. alni* qui résulterait de l'hybridation de deux sous-espèces de *P. alni ssp.* entraînant l'augmentation de l'agressivité de l'agent pathogène sur l'aulne et favorisant son émergence (Ioos *et al.* 2006).

Ces quatre processus qui contribuent à l'émergence de nouveaux agents pathogènes sont facilités par différents facteurs environnementaux. Les changements environnementaux anthropogéniques tels que les introductions, les techniques agricoles et la perturbation de l'habitat sont des catalyseurs importants dans l'émergence des agents pathogènes. Les introductions seraient le principal moteur de l'émergence des agents phytopathogènes (Anderson *et al.* 2004). Ces introductions proviennent d'un commerce international important couplé avec des moyens de détection ou des systèmes de quarantaine peu efficaces. D'autres facteurs environnementaux comme le changement climatique global ou les changements dans les pratiques agricoles (intensification, globalisation) peuvent aussi avoir des effets sur l'émergence des agents phytopathogènes. Par exemple, le changement climatique global pourrait changer la distribution et l'abondance des vecteurs d'une maladie (Anderson *et al.* 2004) ou modifier directement (positivement ou négativement) les conditions environnementales favorables à un agent pathogène.

Les agro-écosystèmes sont généralement caractérisés par une densité importante et l'uniformité génétique des peuplements végétaux, facteurs qui peuvent faciliter la transmission de l'agent pathogène entre les plantes infectées et non infectées et créer un environnement plus propice à la spécialisation à l'hôte en comparaison avec les écosystèmes naturels (Stukenbrock et McDonald 2008). En effet, l'uniformité de l'environnement agricole caractérisé par le labour, l'irrigation, la fertilisation, est moins soumis aux fluctuations

environnementales qui peuvent conduire à la réduction de la taille des populations pathogènes ou même à des épisodes d'extinction. Ainsi, des moyens de lutte peuvent être élaborés pour limiter les maladies émergentes notamment par la mise en place d'une plus grande hétérogénéité dans les systèmes agricoles, une rotation complexifiée des cultures et des systèmes de surveillance des maladies améliorés.

Par ailleurs, la connaissance des différents facteurs génétiques, biologiques et évolutifs impliqués dans les interactions entre l'hôte et son agent pathogène est primordiale pour pouvoir limiter l'impact des maladies sur les cultures. A cause de leur petite taille, leur localisation dans l'hôte et leur biologie, les agents pathogènes sont généralement difficiles à étudier et l'étude directe des populations est presque impossible (De Meeûs *et al.* 2007). Ainsi, l'écologie, les modes et stratégies de reproduction ou la dispersion, peuvent principalement être évalués par des méthodes indirectes (De Meeûs *et al.* 2002 ; Slatkin 1985) utilisant des marqueurs génétiques polymorphes. Le postulat de base est que la distribution de la variabilité génétique doit refléter les paramètres écologiques des populations pathogènes. Ainsi, depuis le début du 20^{ème} siècle, des études ont été entreprises pour comprendre la relation entre la variabilité génétique et la biologie des organismes, donnant naissance à une discipline appelée la génétique des populations.

2.2. Principes et bases de la génétique des populations

La génétique des populations est née dans les années 1930 à la suite de la redécouverte des travaux de Mendel du début du vingtième siècle. Le but de la génétique des populations est de formaliser l'évolution des fréquences alléliques et génotypiques au sein d'une population ou d'un ensemble de populations interdépendantes, en fonction de différentes forces évolutives et sous l'effet des régimes de reproduction (Olivieri 2009).

La population peut être définie comme un ensemble d'individus dont on pense qu'il fonctionne comme une unité du point de vue évolutif et écologique (Roughgarden 1979).

Après une présentation du modèle général de Hardy-Weinberg, nous présenterons les forces évolutives conduisant à la déviation de ce modèle puis les indices construits pour étudier la structure des populations.

2.2.1. Le modèle Hardy-Weinberg (HW)

Les premières formalisations autour de la génétique des populations ont commencé avec le modèle de Hardy-Weinberg (1908). Hardy (1908), un mathématicien britannique, et Weinberg (1908), un physicien allemand, ont décrit indépendamment ce modèle la même année. Ce modèle est la base théorique pour la plupart des analyses en génétique des populations. Les hypothèses du modèle sont les suivantes :

- La population étudiée est de taille infinie
- Il n'y a pas de mutation
- Il n'y a pas de migration (la population est isolée)
- Il n'y a pas de sélection
- La reproduction est sexuée et il y a panmixie (les zygotes sont produits par l'association au hasard des gamètes).

Sous ces hypothèses, la structure génétique des populations reste stable d'une génération à l'autre. Ce modèle correspond à un équilibre des fréquences génotypiques attendues dans une descendance en fonction des fréquences alléliques parentales.

Il est évident qu'en situation naturelle toutes ces conditions sont rarement remplies. Cependant, ce modèle permet d'établir un état de référence. Ainsi, si un écart est constaté, c'est que l'une au moins des conditions n'est pas respectée. La recherche des conditions non respectées permet de comprendre l'influence des différentes forces évolutives sur la structure et l'évolution des populations.

2.2.2. Déviation des hypothèses du modèle HW

➤ Dérive génétique

La dérive génétique décrit le processus par lequel les fréquences alléliques changent d'une génération à l'autre suite à l'échantillonnage au hasard d'individus (zygotes ou gamètes qui forment des zygotes ou des adultes) qui survivent pour former la génération suivante dans une population de taille finie. Ce processus conduit à une perte de diversité génétique dans la population. A condition qu'aucune autre force n'agisse sur la population, toutes les populations de taille finie devraient tendre vers la fixation d'un allèle à chaque locus. Plus la population est de petite taille et plus la dérive génétique a un rôle important.

➤ **Mutation**

La mutation est la première source de variabilité génétique ; elle génère directement des changements dans les séquences des gènes créant ainsi de nouveaux allèles dans les populations. Le taux de mutation varie d'une espèce à l'autre, d'un locus à l'autre et, sans doute aussi, d'un individu à l'autre (Baer *et al.* 2007). Ce taux varie également en fonction de l'environnement ; il est déterminé par l'efficacité avec laquelle l'information génétique mal recopiée est réparée. Trois modèles de mutations ont été définis, appelés le KAM, le IAM et le SMM.

Dans le KAM, pour « K allele models », la mutation transforme aléatoirement un allèle existant en l'une des K alternatives possibles. Ainsi, dans le cas d'une paire de base, il y a seulement quatre états alléliques possibles (A, T, G ou C) ; ainsi, deux individus peuvent partager le même allèle sans avoir d'ancêtre commun. C'est le phénomène d'homoplasie.

Dans l'IAM, pour « infinite allele model », chaque mutation transforme un allèle existant en un nouvel allèle qui n'est pas déjà présent dans la population. Ce modèle est très utile pour les théories en génétique des populations car il permet de s'affranchir de l'homoplasie. En effet, dans ce cas, tous les allèles identiques proviennent du même ancêtre commun.

Le SMM, pour « stepwise mutation model » (Kimura et Ohta 1978), a été développé pour les loci microsatellites et microsatellite-like. Dans ce modèle, la mutation correspond à l'addition ou la délétion d'une seule répétition du motif répété élémentaire. L'homoplasie est commune mais la différence dans le nombre de répétitions entre deux allèles peut être utilisée pour déterminer les liens de parenté.

Cette force évolutive n'est pas très efficace car les taux de mutation sont souvent faibles. Cependant, elle reste la base de toute variation génétique et, si elle est associée à la dérive génétique et à la migration, elle représente la clef de l'évolution (De Meeûs *et al.* 2007).

➤ **Migration**

Les populations naturelles sont rarement totalement isolées les unes des autres et échangent des propagules¹ entre elles. Les flux de gènes tendent à homogénéiser les

¹Organes de dispersion et de reproduction

fréquences alléliques à tous les loci entre les populations connectées. La migration est une force évolutive majeure dans l'évolution des populations.

Au sein d'une population, la dérive génétique entraîne la perte de polymorphisme, tandis que la mutation crée de la diversité génétique. La migration apporte aussi potentiellement de nouveaux allèles. Un équilibre peut ainsi s'établir entre ces trois forces évolutives.

➤ Sélection

La sélection est une force évolutive majeure. Elle peut affecter très fortement les fréquences alléliques et génotypiques. Cependant, elle va affecter seulement certains loci sélectionnés. Il existe différents types de sélection naturelle, selon la relation entre le phénotype et la valeur sélective. La valeur sélective est définie sur un cycle de zygote à zygote (Gillepsie 1998) ou d'adulte à adulte (Rousset 2004). Un individu sera sélectivement avantage s'il porte un caractère présentant une variation lui procurant une plus grande longévité (lui permettant notamment d'atteindre l'âge de la reproduction) ou une plus grande capacité de reproduction. La valeur sélective correspond donc à la capacité d'un individu à transmettre ses propres allèles à la génération suivante.

La sélection naturelle ne crée pas de variabilité mais opère un « tri » parmi la variabilité existante. Cette sélection naturelle peut être de différentes formes.

- La sélection est stabilisante lorsque les individus présentant un phénotype moyen possèdent la plus grande valeur sélective. Dans ce cas, la distribution des phénotypes au cours des générations reste stable.

- La sélection est directionnelle si le même phénotype est toujours favorisé. Au cours des générations, le caractère avec une plus grande valeur sélective sera sélectionné. Un des plus célèbres exemples de sélection directionnelle est celui de la phalène du bouleau (Kettlewell 1955), sélectionnée pour sa couleur en fonction de l'environnement (claire dans les milieux non pollués pour se fondre avec l'écorce claire du bouleau ou foncée dans les milieux pollués là où l'écorce du bouleau s'est assombrie).

- La sélection est disruptive lorsque les individus présentant des phénotypes extrêmes possèdent les plus grandes valeurs sélectives. Au cours des générations, deux sous-populations vont se différencier à partir de ces phénotypes extrêmes.

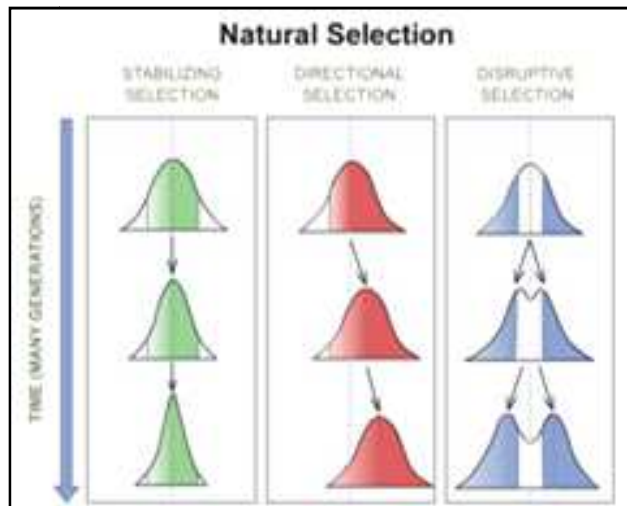


Figure I.1 : Schématisation de l'action des trois forces de sélection (stabilisante, directionnelle et disruptive) sur la valeur d'un trait sélectionné.

Chaque couleur représente un trait sélectionné et sa fréquence dans la population.

➤ **Panmixie**

La panmixie n'est pas le processus le plus fréquent dans les populations naturelles. Plusieurs mécanismes peuvent affecter la manière dont les gamètes vont se rencontrer comme dans le cas d'organismes à reproduction asexuée ou d'organismes autogames. Ces modes de reproduction vont affecter la distribution des loci dans les populations différemment de la panmixie. Dans le cas de l'autogamie, l'hétérozygotie observée sera plus faible que celle attendue sous l'hypothèse de panmixie alors que dans le cas de la reproduction asexuée, en synergie avec la dérive génétique et la mutation, l'hétérozygotie observée sera plus importante que l'hétérozygotie attendue à tous les loci (Balloux *et al.* 2003 ; de Meeûs *et al.* 2007).

Les déviations du modèle Hardy-Weinberg sont communes dans les populations et vont modifier la composition génétique de la population. Ainsi, les théoriciens en génétique des populations ont développé des indices pour mesurer ces déviations du modèle et pour comparer les populations entre elles.

2.2.3. Structure des populations

La plupart des populations ne sont pas distribuées de façon homogène, elles sont subdivisées en sous-populations de petites tailles. Ainsi, en 1951, Wright a construit le modèle en îles (the infinite island model). Dans ce modèle, la population est composée d'une

infinité de sous-populations de taille finie identique. A partir de ce modèle, trois indices sont définis (*F*-statistique) (Wright 1965):

- **le F_{IS}** , indice de fixation locale aussi nommé indice de consanguinité, mesure la consanguinité des individus résultant de la fusion non aléatoire des gamètes dans chaque sous-population. Cet indice permet de mesurer la déviation à la panmixie d'une population. Si les gamètes ne fusionnent pas aléatoirement, alors le F_{IS} correspond à la proportion d'hétérozygotes qui sont perdus ou gagnés et équitablement redistribués comme homozygotes. Wright a démontré que la valeur du F_{IS} est égal à zéro sous l'hypothèse de panmixie, alors qu'une valeur négative correspond à un excès d'hétérozygotes et qu'une valeur positive correspond à un déficit.

- **Le F_{ST}** reflète la consanguinité résultant de la subdivision de la population en sous-populations de taille limitée sans échange libre de migrants. C'est donc une mesure de l'effet Wahlund¹ (1928) accompagné par une mesure de la différenciation génétique entre les sous-populations. Le F_{ST} varie entre les valeurs extrêmes zéro et un ; un F_{ST} de 0 signifie que l'empreinte génétique entre les individus est indépendante de la sous-population dans laquelle ils se trouvent (pas de différenciation génétique) ; un F_{ST} de 1 signifie que tous les individus d'une sous-population sont identiques mais différents des individus des autres sous-populations.

- **Le F_{IT}** correspond à la consanguinité des individus dans la population totale.

D'autres modèles, alternatifs aux modèles en îles, ont également été développés pour étudier la structure génétique des populations car les hypothèses du modèle HW sont très fortes et peuvent amener à des estimations biaisées des indices selon les populations étudiées et le but de l'étude, notamment pour l'étude de la migration. Ainsi, certains modèles intègrent des distances géographiques comme les modèles d'isolement par la distance (Leblois *et al.* 2004 ; Malécot 1950 ; Rousset 2000), les modèles de population en treillis (Kimura 1953) et les modèles de méta-populations (Couvét *et al.* 1985 ; Gill 1978) qui tiennent aussi compte de la dynamique des populations (extinction-recolonisation, taille des populations...).

¹Effet Wahlund : Déficit relatif en hétérozygotes par rapport à la valeur théorique attendue sous l'équilibre de Hardy-Weinberg, quand la population observée, considérée dans son ensemble, est en réalité divisée en sous-populations entre lesquelles existe une divergence des fréquences alléliques.

2.3. Histoires de vie des agents pathogènes et des hôtes

Il existe une grande diversité d'histoires de vie (transmissions de l'agent pathogène, stratégies et traits d'histoire de vie, structures spatiales) chez les espèces pathogènes et leurs hôtes qui vont influencer la variabilité génétique et la dynamique des populations pathogènes (Barrett *et al.* 2008a).

2.3.1. La spécificité d'hôte

Des espèces sont opportunistes ou peuvent attaquer plusieurs hôtes (ex : *Botrytis cinerea*) alors que d'autres sont spécialisées à un hôte et biotrophes (ex : *Bremia lactucae*). La démographie et la dynamique évolutive des espèces pathogènes sur une large gamme d'hôtes sont généralement différentes de celles des agents pathogènes inféodés à un seul hôte.

Par exemple, les spécialistes seront vraisemblablement plus adaptés localement à leurs hôtes que les généralistes (Lajeunesse 2002). Par contre, les spécialistes obligatoires seront théoriquement soumis plus souvent à des événements d'extinctions locales et de recolonisation que les généralistes, surtout dans des populations hôtes sauvages, petites et fragmentées (Thrall *et al.* 2001). Ainsi, dans des populations fragmentées et de petites tailles de parasites spécifiques d'un hôte, la perte de la diversité génétique, sous l'effet de la dérive génétique, devrait être favorisée et générer une forte différenciation génétique entre les populations. Cette dynamique épidémique a été observée dans de nombreux pathosystèmes dont l'agent pathogène de la rouille du lin, *Melampsora lini* (Barrett *et al.* 2008b).

A l'inverse, les généralistes et les parasites facultatifs sont moins soumis à des niveaux extrêmes de stochasticité d'extinctions-recolonisations des populations. Ainsi, la variabilité génétique au sein de ces populations sera supérieure, par comparaison avec le modèle précédent (Barrett *et al.* 2008a). Par exemple, l'agent de la septoriose du blé *Mycosphaerella graminicola* peut survivre de façon saprophytique sur les débris de plantes entre les épidémies. Les populations sont génétiquement stables au cours du temps et des études à l'échelle mondiale montrent une très faible différenciation génétique entre les populations (Zhan *et al.* 2003), maintenue également par la migration.

2.3.2. Mode de reproduction

Le mode de reproduction est un trait complexe qui reflète l'interaction entre les facteurs environnementaux, génétiques et démographiques (Heitman 2006). La reproduction sexuée est relativement commune (Charlesworth *et al.* 1989) mais de nombreux parasites sont clonaux ou soumis à une forte consanguinité ; enfin, certains parasites déploient à la fois une reproduction clonale et une reproduction sexuée dont l'importance respective varie dans le temps et l'espace (Barrett *et al.* 2008a). Des échanges horizontaux sont également possibles. En général, les populations sous régime de reproduction sexuée montrent des niveaux de diversité génotypique plus importants que les populations strictement asexuées (Balloux *et al.* 2003, Halkett *et al.* 2005). Par exemple, Delmotte *et al.* (2002) ont montré que les populations sexuées du puceron *Rhopalosiphum padi* présentaient une plus grande diversité génotypique et génique que les populations asexuées de ce même puceron. Barrett *et al.* (2008b) ont montré le même impact de la reproduction sur la structure de l'agent pathogène *M. lini*.

La prévalence de la maladie peut aussi fortement influencer la reproduction et par conséquent la structure de la population. Par exemple, l'agent de la malaria présente une phase sexuée obligatoire qui se produit dans le moustique (vecteur) avant la transmission. Dans les régions où l'incidence de la maladie est forte, la diversité génotypique des populations est importante et il y a une faible différenciation génétique entre les populations. Dans ces zones, une fréquence élevée de la maladie indique que le vecteur est fréquemment infecté par plusieurs génotypes pouvant recombiner avant la transmission. Par contre, dans les régions où la maladie est peu fréquente, les parasites ont une plus faible probabilité de rencontrer plusieurs génotypes dans le vecteur. Ainsi, le taux de consanguinité sera plus élevé, la diversité génotypique plus faible et la différenciation génétique entre les populations plus grande.

2.3.3. Transmission et dispersion

La connaissance des modes de transmission et de dispersion des agents pathogènes est primordiale pour interpréter les patrons de diversité génétique observés dans les populations.

La transmission du parasite entre les hôtes peut être verticale, l'agent pathogène étant transmis aux descendants sans étape de dispersion. Ce mécanisme de dispersion a été montré chez de nombreux champignons mais également chez des oomycètes du genre *Albugo* (Ploch *et al.* 2011). Dans un système de transmission verticale, les hôtes sont infectés plus tôt dans leur développement et la densité de parasites devrait être plus importante (Gandon 2004), ce

qui permettrait un maintien de la variabilité génétique dans les populations (Barrett *et al.* 2008a).

Cependant la transmission est le plus souvent horizontale avec différents mécanismes comme le contact direct (ex : une feuille infectée touchant une feuille saine), la transmission par vecteur (ex : un insecte) ou la dispersion aérienne.

Dans un système de transmission horizontale, le mode de dispersion a un impact majeur sur la structure génétique des populations. Des études théoriques indiquent que l'adaptation locale est plus importante quand l'agent pathogène migre plus que son hôte (Gandon 1996 ; Thompson 1999 ; Thrall *et al.* 2002).

Dans le cas d'une transmission par un vecteur, la structure génétique de l'agent pathogène dépendra de la capacité du vecteur à migrer. Par exemple, la forte structure spatiale au niveau local observée chez le parasite responsable de la maladie du charbon des anthères du compagnon blanc (*Microbotryum violaceum*/ *Silene latifolia*) est associée à une dispersion locale de l'insecte vecteur (Giraud 2004).

Les patrons de dispersion pour les espèces avec une dispersion aérienne dépendent des conditions environnementales. La dispersion aérienne à longue distance peut se faire à l'échelle des continents pour certaines espèces (Brown *et al.* 2002). Cependant, la dispersion ne sera efficace que s'il y a des hôtes sensibles dans le nouveau site. Ainsi, des événements de dispersion à longue distance sont plus efficaces pour des espèces généralistes ou parasitant des hôtes très répandues. Les dispersions à longue distance sont également dues à l'homme, par exemple par le transport de plantes infectées. Ces événements de dispersion à longue distance peuvent engendrer des effets fondateurs, c'est-à-dire l'établissement d'une partie infime de la population d'origine, soumis à une forte dérive génétique, qui persistera encore plus longtemps dans le cas d'organismes clonaux (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, *Phytophthora infestans*). Ces populations issues d'une dispersion à longue distance auront théoriquement une diversité génétique plus faible que les populations d'origine.

Ainsi, les parasites montrant un taux important de migration devraient avoir une plus grande diversité génétique que ceux avec une dispersion limitée car le flux de gènes tend à contrecarrer l'effet de la dérive génétique et va entraîner l'homogénéisation des populations adjacentes. Cependant, les résultats théoriques sur les effets de la coévolution indiquent que la dispersion fréquente parmi les populations ne résulte pas toujours en une homogénéisation de la population.

2.3.4. Cycles de vie complexes et épidémiologie

Les espèces parasites vont présenter différentes stratégies d'infection et histoires de vie qui vont influencer la fitness de l'hôte et la structure des populations du parasite. Les organismes parasites peuvent effectuer leur cycle sur un seul hôte ou alterner le parasitisme et des phases libres ; certaines espèces présentent plusieurs phases sur différentes espèces hôtes.

Pour les espèces parasites obligatoires avec des cycles multiples, la sélection exercée par les hôtes sur les différents génotypes va varier selon l'hôte. Il est donc attendu un maintien du polymorphisme génétique en raison de la sélection disruptive ou fluctuante favorisant différents allèles dans les différents hôtes obligatoires (Gower *et al.* 2004).

La disponibilité d'hôtes alternatifs peut favoriser les croisements et la transmission (Rauch *et al.* 2005). Elle pourrait ainsi augmenter la stabilité de la population et donc réduire la sévérité des effets fondateurs, entraînant une diminution de la dérive génétique et générant ainsi une importante variabilité génétique chez les organismes à cycle complexe (Barrett *et al.* 2008a).

Les traits de l'agent pathogène sous sélection vont également varier selon les différentes étapes du cycle épidémiologique. Pendant la transmission et l'établissement, la sélection sera plus forte pour la capacité à rencontrer son hôte et infecter une large gamme d'hôtes. Pendant la croissance exponentielle de la population, la reproduction peut devenir le facteur sélectionné. Ensuite, quand la population décroît, la sélection pourrait favoriser les traits impliqués dans la survie en hors saison (Burdon 1992). Les variations dans l'intensité de la sélection, durant le cycle épidémiologique, vont influencer la diversité génétique et la structure des populations des agents pathogènes par l'effet d'une sélection diversifiante, de la compétition et de la dérive génétique (Barrett *et al.* 2008a).

Les traits d'histoire de vie des parasites ont donc un impact important sur la structure génétique des populations pathogènes. L'étude des traits d'histoire de vie de l'hôte est également essentielle pour interpréter la structure génétique d'un agent pathogène. En effet, la dépendance des organismes parasites à leurs hôtes pour une survie à long terme fait de la taille, la structure et la distribution des populations d'hôte, des facteurs importants influençant la structure génétique des populations des pathogènes. Les hôtes représentent des ressources dynamiques qui varient dans le temps et l'espace et exhibent différents niveaux et types de résistance. Ils diffèrent aussi dans leurs traits d'histoire de vie comme la longévité, la reproduction, la phénologie, qui vont influencer la dynamique des populations parasites. Il est

donc primordial de comprendre comment cette hétérogénéité affecte la structure génétique et les trajectoires évolutives des populations parasites.

2.3.5. Structure spatiale des populations d'hôte

L'impact de la structure spatiale de l'hôte sur celle de l'agent pathogène va dépendre du degré de dépendance du parasite à l'hôte. Généralement, l'augmentation de l'isolement parmi la population hôte devrait réduire la variabilité génétique dans les populations parasites et favoriser une plus grande différenciation entre les populations. Ces subdivisions vont aussi augmenter la vulnérabilité des populations à la stochasticité environnementale et favoriser des événements d'extinctions et recolonisations locales (Barrett *et al.* 2008a).

La taille de la population et le degré de subdivision seront différents entre les parasites présents sur des espèces cultivées et ceux trouvés sur les hôtes sauvages. En agriculture, les cultures sont souvent de larges étendues génétiquement uniformes. Ainsi, les ressources disponibles sont grandes pour l'agent pathogène et vont permettre une augmentation de la taille efficace des populations pathogènes. Au contraire, les populations sauvages sont souvent des populations de petite taille et isolées. Cette distribution diminue le flux de gènes entre les populations pathogènes et augmente la dérive génétique. Ainsi, la différenciation génétique sera plus importante pour des agents pathogènes d'espèces sauvages que pour des espèces parasites de plantes cultivées.

2.3.6. Longévité et phénologie de l'hôte

Si les hôtes ont une courte durée de vie, les agents pathogènes seront soumis à plus d'événements d'extinction-recolonisation. A l'inverse, si les hôtes sont des organismes pérennes, les populations pathogènes seront plus stables. Les variations temporelles de certains traits vont aussi avoir un impact sur l'épidémiologie de la maladie. Par exemple, la disponibilité en feuille implique que les agents pathogènes foliaires d'arbres auront le même type de dynamique que les parasites d'hôtes non pérennes (Mopper *et al.* 2000 ; Roslin *et al.* 2007 ; Van Putten 2007).

Ainsi, la longévité de l'hôte et sa disponibilité affectent le temps de disposition de la ressource pour le parasite et, par conséquent, affectent la taille des populations, l'adaptation aux conditions locales et les flux de gènes entre les populations (Barrett *et al.* 2008a).

2.3.7. Résistance de l'hôte

Les mécanismes de résistance des hôtes sont très divers et vont avoir un impact très important sur la variabilité génétique des populations pathogènes. La sélection par l'hôte est probablement la force évolutive majeure influençant la structure des agents pathogènes (Mc Donald *et al.* 2002). Les résistances quantitatives auront un effet différent des résistances qualitatives sur la variabilité génétique des parasites. Les résistances qualitatives peuvent entraîner une dynamique particulière, les cycles nommés « Boom and Bust » (Johnson, 1992 ; Mc Donald *et al.* 2002), surtout dans les agro-écosystèmes. Dans la majorité de ces cas, un seul gène de résistance est largement distribué sur une zone géographique importante du fait de son efficacité contre un agent pathogène. Une telle homogénéité des populations hôtes exerce alors une forte pression de sélection et entraîne une augmentation de la fréquence des souches virulentes.

3. Adaptation de l'agent pathogène à la résistance de l'hôte

Comme nous l'avons vu précédemment, la sélection par l'hôte est la force évolutive majeure dans les interactions hôtes-parasites. A la fois dans la nature et l'agriculture, les parasites limitent la croissance de l'hôte, altèrent son développement et réduisent la production des graines. Cette importante pression de sélection des parasites sur la plante, et réciproquement des plantes sur les parasites, conduit à la coévolution des gènes impliqués dans ces interactions. Les fréquences géniques dans une espèce vont déterminer la fitness des génotypes de l'autre espèce, favorisant ainsi une diversité dans les défenses de l'hôte et « l'armement » des parasites. Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans l'évolution de la virulence et de la résistance, dans l'adaptation des populations pathogènes aux résistances de l'hôte, est primordiale pour proposer des stratégies d'amélioration de la durabilité des résistances.

Le concept de relation gène-pour-gène (Flor 1956) a permis de formaliser les bases génétiques de l'interaction hôte-parasite et, ainsi, d'obtenir des avancées rapides dans la compréhension des interactions hôte-pathogène. De plus, les principes généraux qui émergent du système gène-pour-gène sont applicables à un grand nombre d'autres types d'interactions hôtes-parasites (Brown *et al.* 2011) et ont permis d'élaborer des modèles de coévolution des

interactions et de l'adaptation des populations pathogènes aux populations des plantes hôtes dans les agro-écosystèmes.

3.1. Le modèle gène-pour-gène

Biffen (1905) a mis en évidence que la résistance du blé à la rouille *Puccinia striiformis* était déterminée par un seul gène dominant. Flor est le premier à avoir conceptualisé la relation gène-pour-gène (GFG) dans laquelle une interaction incompatible, correspondant en général à un phénotype de résistance, résulte de la présence simultanée d'un gène de résistance chez la plante hôte et d'un gène d'avirulence associé chez l'agent pathogène (Flor 1956; Tableau I.1). Dans notre compréhension actuelle du modèle GFG, les agents pathogènes produisent des molécules effectrices (les produits des gènes d'avirulence) qui sont reconnues par des récepteurs spécifiques (produits des gènes de résistance) dans la plante. Quand une cellule de la plante reconnaît une molécule effectrice, une réaction d'hypersensibilité est déclenchée ; cette réaction active la mort cellulaire de la cellule infectée et donc de l'agent pathogène (sauf dans le cas d'agent pathogène nécrotrophe).

Tableau I.1 : La relation gène-pour-gène dans le cas d'un agent pathogène diploïde (d'après Flor 1971).

		Plante	
		Rr ou RR	rr
Agent pathogène	AA ou Aa	I	C
	aa	C	C

I : interaction incompatible (en général, phénotype de résistance), *C* : interaction compatible ; *A/a* : couple d'allèles du gène d'avirulence de l'agent pathogène ; *R/r* : couple d'allèle du gène de résistance de la plante hôte. Les allèles *A* et *R* sont dominants respectivement sur les allèles *a* et *r*.

3.2. Mécanismes de reconnaissance hôte-agent pathogène

3.2.1 Le modèle « Zig-Zag-Zig »

Les maladies des plantes limitent la production des cultures mais les mécanismes de défense constitutifs et induits rendent la plupart des plantes non-hôtes. Les maladies sont donc plus une exception qu'une règle. La connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance devrait rendre possible le développement de nouvelles stratégies de protection des cultures, basées sur les interférences de la compatibilité pour prévenir les maladies.

Tous les types d'agents pathogènes (bactéries, nématodes, virus, oomycètes, champignons) sécrètent des facteurs de virulence dans la cellule de la plante. Deux voies dans la résistance innée de la plante ont été identifiées à ce jour (Jones et Dangl 2006).

La première voie passe par une reconnaissance, grâce à des récepteurs transmembranaires (PRRs : Pattern Recognition Receptors), de molécules membranaires associées aux agents pathogènes (PAMPs ou MAMPs : Pathogen ou Microbial-Associated Molecular Patterns).

La seconde voie se déroule à l'intérieur de la cellule, par l'intermédiaire des protéines polymorphes NB-LRR codées par la majorité des gènes de résistance. Ces protéines sont composées de domaine de fixation nucléotidique (NB : nucleotide binding) et de domaine riche en leucine (LRR : Leucine Rich Repeat). Les effecteurs des différents types d'agents pathogènes sont reconnus par les protéines NB-LRR et activent les réponses de défense de la plante.

L'immunité innée des plantes peut ainsi être présentée comme un modèle en zig-zag-zig en quatre phases (Jones et Dangl 2006) schématisées dans la figure I.2.

Dans la première phase, les PAMPs (ou MAMPs) secrétées ou déployées à la surface des microorganismes sont reconnues par les PRRs. Cette reconnaissance engendre le déclenchement d'une immunité associée (PTI : PAMP-triggered immunity) qui peut arrêter la colonisation de l'agent pathogène. L'immunité associée aux PAMPs constitue donc la première ligne de défense de la plante. Les PAMPs, éliciteurs microbiens conservés, sont typiquement des composés essentiels pour les agents pathogènes comme la flagelline bactérienne ou la chitine fongique. La PTI est généralement efficace contre les agents pathogènes et correspond à la résistance nommée non-hôte.

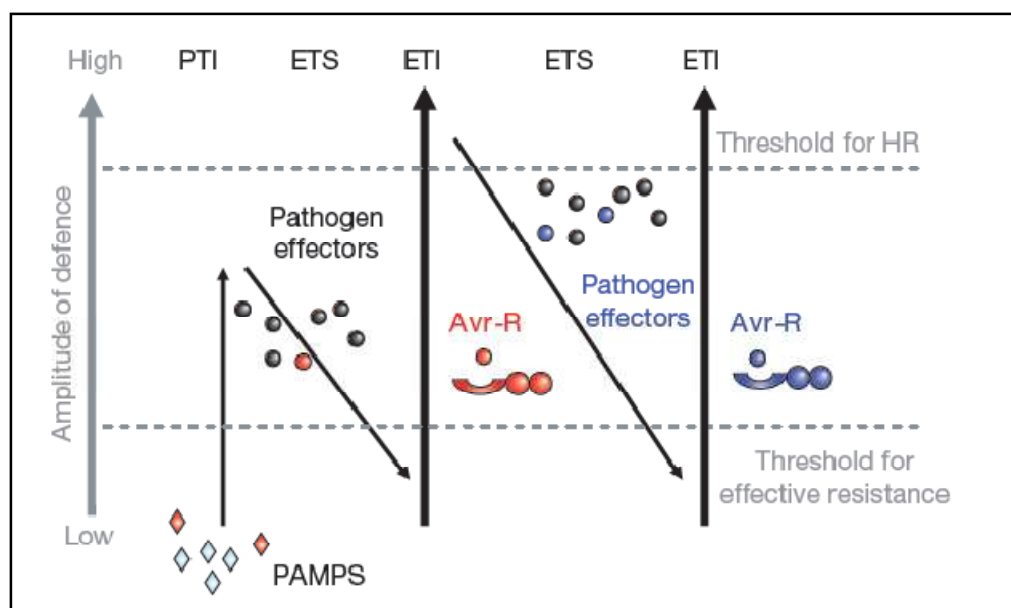


Figure I.2 : Schématisation du modèle « Zig-Zag-Zig ». Extrait de Jones et Dangl (2006). Dans la première phase, la plante détecte les molécules membranaires associées aux agents pathogènes (PAMPS, losanges rouges) grâce à des récepteurs transmembranaires (PPR, non présentés sur le schéma) déclenchant la PTI (l'immunité associée). Dans la deuxième phase, l'agent pathogène sécrète des effecteurs (ronds noirs et rouges) supprimant la PTI, correspondant à la phase ETS (Effector-Triggered Susceptibility). La phase 3, l'ETI (effector-triggered immunity), est déclenchée par la reconnaissance d'un effecteur (rond rouge) par des protéines NB-LRR (R). L'ETI peut passer le seuil d'induction de la réponse d'hypersensibilité (HR, ligne pointillée supérieure). Les phases suivantes correspondent à la coévolution des interactions. Elle peut entraîner la sélection d'agents pathogènes qui ne possèdent pas l'effecteur rouge (perdu et gains de nouveaux effecteurs) permettant de supprimer l'ETI puis la sélection de nouvelles protéines NB-LRR reconnaissant les nouveaux effecteurs et déclenchant l'ETI.

Dans la deuxième phase, les agents pathogènes capables de contourner cette première voie de résistance sécrètent des effecteurs contribuant au pouvoir pathogène. Ces effecteurs agissant à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule peuvent supprimer ou manipuler la PTI. Cette phase nommée ETS (« Effector-Triggered Susceptibility ») représente le premier niveau auquel la coévolution moléculaire entre l'hôte et le parasite intervient (Hein *et al.* 2009).

Dans la troisième phase, un effecteur donné est spécifiquement reconnu par une des protéines NB-LRR de la plante hôte ce qui va déclencher une nouvelle réponse (ETI : Effector-Triggered Immunity). L'ETI provoque la résistance de la plante, généralement par une réponse d'hypersensibilité entraînant la mort de la cellule infectée. La reconnaissance des effecteurs, alors nommés protéines d'avirulence, par les protéines de résistance peut être indirecte ou directe. Ce mode de reconnaissance conduit à un deuxième niveau de dynamique coévolutive entre la plante et l'agent pathogène (Hein *et al.* 2009 ; Jones et Dangl 2006). Cette dynamique évolutive sera différente de la première car les effecteurs des agents

pathogènes sont très variables et peuvent être dispensables (Dodds *et al.* 2010). L'extrême diversité des récepteurs intervenant dans l'ETI et des effecteurs des agents pathogènes à la fois entre et au sein des espèces est la règle alors que certaines fonctions des PRRs sont conservées entre des familles de plantes (Dodds *et al.* 2010).

Dans la quatrième phase, la sélection naturelle conduit les agents pathogènes à éviter la réponse ETI par la perte ou la diversification du gène effecteur reconnu, ou par l'acquisition de nouveaux effecteurs qui vont supprimer cette réponse.

3.2.2 Interactions entre les effecteurs de l'agent pathogène et les protéines de résistance de la plante et impact sur la variabilité génétique

Les protéines NB-LRR impliquées dans l'ETI peuvent reconnaître les effecteurs des agents pathogènes soit directement par association physique ou indirectement à travers une protéine secondaire intégrée dans un complexe protéique NB-LRR (Fig. I. 3).

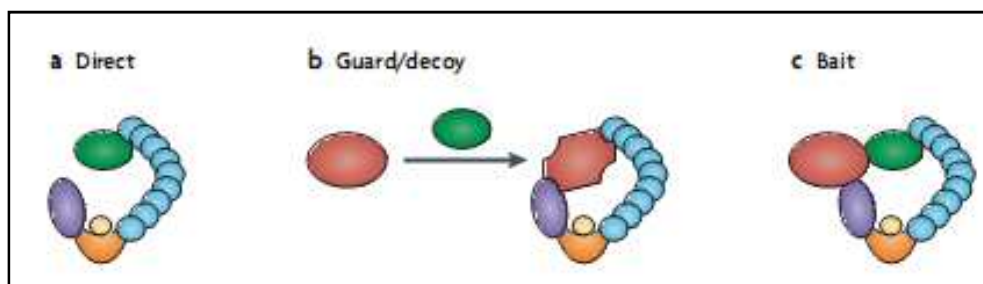


Figure I.3 : Schématisation des modèles indirects et directs d'interaction entre les effecteurs pathogènes et les protéines de résistance de la plante. Extrait de Dodds et Rathjen (2010).

a : interaction directe, l'effecteur, en vert, déclenche la réponse de défense de la plante en se fixant directement à la protéine de résistance (violet, orange, jaune et bleu). Modèle « récepteur-ligand ». **b :** interaction indirecte, l'effecteur modifie une protéine auxiliaire (rouge) de la plante qui peut être la cible de l'effecteur (modèle de garde) ou une protéine mimant la cible des effecteurs (modèle du leurre). La protéine auxiliaire modifiée est reconnue par la protéine de résistance. **c :** interaction indirecte, le modèle de l'appât, l'effecteur interagit avec une protéine auxiliaire qui va faciliter la reconnaissance directe de l'effecteur par la protéine de résistance de la plante.

L'interaction directe entre la protéine de résistance et l'effecteur correspondant réfère à un modèle nommé « récepteur-ligand » (Fig. I.3a). Ce type d'interaction directe a été montré entre la protéine de résistance (Pi-ta) du riz et l'effecteur associé (Avr-Pita₁₇₆) de *Magnaporthe grisea* (Jia *et al.* 2000) mais également chez la rouille du lin pour tous les

effecteurs étudiés (Dodds *et al.* 2006). Ce modèle implique que les plantes disposent d'un grand nombre de protéines de résistance pour pouvoir reconnaître tous les effecteurs d'un organisme pathogène. D'ailleurs, dans l'interaction entre *Melampsora lini* et le lin, une forte sélection diversifiante sur les protéines effectrices et réceptrices a été mise en évidence. Elle est caractérisée par des niveaux importants de polymorphisme entre les allèles aussi bien chez l'hôte que chez l'agent pathogène avec différentes spécificités de reconnaissance entre les variants alléliques (Dodds et Rathjen 2010). Dans ce type d'interaction directe, de nouveaux phénotypes virulents peuvent apparaître rapidement par l'altération de la structure de la protéine d'avirulence (par l'intermédiaire de mutations par exemple) sans affecter le rôle de l'effecteur dans la virulence (Van der Hoorn *et al.* 2002).

Dans l'interaction indirecte, l'interaction avec l'effecteur est réalisée par une protéine auxiliaire de la plante qui est une cible de l'effecteur de l'agent pathogène ou qui a une structure semblable à une cible (Van der Hoorn 2008). Les effecteurs induisent un changement sur la protéine auxiliaire qui va permettre sa reconnaissance par les protéines NB-LRR. Cette stratégie permet de contourner l'avantage évolutif des agents pathogènes car l'hôte prend avantage de la stratégie de virulence du parasite pour impulser la reconnaissance. A l'heure actuelle, trois modèles conceptuels, basés sur des exemples limités non complètement déterminés, ont été proposés pour décrire ces mécanismes d'interaction indirecte dans lesquels l'évolution de la variabilité génétique sera différente (Fig. I.3 b et c):

- Modèle de garde

Ce modèle postule que la protéine NB-LRR (« le gardien ») surveille une protéine auxiliaire qui est ciblée et modifiée par les effecteurs pathogènes (Van der Biezen and Jones 1998). Ainsi, il implique que l'effecteur de l'agent pathogène joue un rôle important dans le pouvoir pathogène en se fixant à une cible spécifique dans un hôte sensible. Une interaction entre l'effecteur et la cible supprime les défenses de l'hôte ou conduit à une libération de nutriments, augmentant la fitness de l'agent pathogène. Dans un hôte résistant, l'immunité est induite quand l'effecteur pathogène se fixe sur la protéine auxiliaire qui va être reconnue par la protéine de garde. Ce modèle explique comment plusieurs effecteurs peuvent être reconnus par une seule protéine de résistance, permettant ainsi un répertoire de gènes de résistance relativement faible pour cibler une large diversité d'agents pathogènes (Dangl and Jones 2001).

Cependant, ce modèle pose un problème évolutif car il implique des pressions de sélection opposées sur la protéine auxiliaire. Dans le cas de l'absence de la protéine de

résistance, une sélection diversifiante devrait agir sur la protéine auxiliaire pour éviter une fixation avec l'effecteur. Inversement, dans le cas de la présence de la protéine de résistance, la sélection va favoriser la fixation entre la protéine auxiliaire et l'effecteur conduisant à une sélection balancée de la protéine auxiliaire.

- Modèle du leurre (the decoy model)

Afin de résoudre l'ambiguïté évolutive apportée par le modèle de garde, le modèle du leurre a été proposé (Van der Hoorn et Kamoun 2008). Ce modèle suggère la présence de protéines dans l'hôte, « les leures », qui miment les cibles des effecteurs et qui sont spécialisées dans la reconnaissance des effecteurs pathogènes. Ces protéines pourraient évoluer à partir des cibles des effecteurs par une duplication de ces gènes suivie d'une évolution ultérieure ou évoluer indépendamment en imitant les cibles effectrices. Ce modèle implique que la cible de l'effecteur surveillé par la protéine de résistance est un leurre qui mime la cible opérationnelle mais seules les fonctions de la perception sont conservées. Ainsi, contrairement à la cible effective, la fixation sur « le leurre » n'augmente pas la fitness de l'agent pathogène même si la protéine de résistance n'est pas présente. Dans ce modèle, chaque acteur est soumis à des forces de sélection pour l'adaptation. La cible opérationnelle est sous sélection pour éviter la manipulation par l'effecteur. L'effecteur est sous sélection pour cibler la cible effective tout en évitant les interactions avec le leurre. Le leurre est sous sélection pour s'adapter aux effecteurs et prévenir toutes réponses auto-immunes. Enfin, la protéine de résistance est sous sélection pour s'adapter à de nouveaux complexes « leurre-effecteur », tout en évitant des réponses auto-immunes (Van der Hoorn et Kamoun 2008).

Différentes études (Mucyn *et al.* 2006 ; Shabab *et al.* 2008 ; Zhou et Chai 2008) soutiendraient cette théorie, mais aucune étude de génétique des populations n'a été effectuée pour analyser la diversité génétique de ces leures (Stukenbrock *et al.* 2009). Différents processus évolutifs peuvent être imaginés. Les leures peuvent être sous sélection diversifiante pour maintenir la capacité à reconnaître des effecteurs variables ou sous sélection purifiante pour reconnaître des effecteurs invariables. Les leures engendreraient aussi une pression de sélection importante sur les effecteurs en maintenant ou augmentant la variabilité dans les effecteurs pathogènes dans le but d'éviter la fixation des effecteurs sur les leures (Stukenbrock *et al.* 2009).

- Modèle de l'appât "The bait-and-switch model"

Ce modèle décrit par Collier et Moffet (2009) envisage deux événements de reconnaissance. Premièrement, un effecteur pathogène interagit avec la protéine auxiliaire (l'appât) associée à une protéine de résistance (NB-LRR). Ensuite, une deuxième reconnaissance survient entre l'effecteur et la protéine NB-LRR pour déclencher les défenses de l'hôte. Ainsi, la protéine de résistance interagit avec la cible de l'effecteur (l'appât) pour faciliter la reconnaissance directe de l'effecteur pathogène plutôt que de reconnaître une cible modifiée comme dans le modèle de garde.

La grande diversité dans la biologie des effecteurs et des récepteurs suggère l'existence de nombreuses variations possibles dans ces types d'interaction et probablement l'existence de nouveaux types de reconnaissance non décrits à l'heure actuelle (Dodds *et al.* 2011). Par exemple, certaines études ont démontrés que deux gènes NB-LRR différents sont nécessaires pour la reconnaissance de protéines effectrices spécifiques (Narusaka *et al.* 2009 ; Takken *et al.* 2009).

3.3. Dynamique évolutive et variabilité génétique de la résistance et de la virulence

Selon les modèles théoriques, l'évolution de la variabilité génétique au sein des populations pathogènes et hôtes sera différente. Dans ces modèles, les fréquences des résistances et des virulences dans une population fluctuent en cycle, appelé parfois « the Boom-and-Bust cycle » à cause des chutes et des augmentations importantes successives de l'efficacité des gènes de résistance contre les populations pathogènes en agriculture.

Ce cycle est composé de quatre étapes. Tout d'abord, il y a sélection d'une résistance hôte quand la virulence est rare. Puis, il y a sélection de la virulence entraînée par la pression de sélection exercée par la résistance hôte. Ensuite, il y a un déclin de la fréquence de résistance quand la virulence est commune et que la résistance ne confère plus d'avantages. Enfin, il y a un déclin de la fréquence de la virulence quand la résistance devient rare.

Dans les deux dernières phases, le déclin des fréquences d'une part de la résistance et d'autre part de la virulence est expliqué par l'existence de coûts respectivement pour la résistance (Tian *et al.* 2003) et pour la virulence (Thrall *et al.* 2003). En général, les modèles

considèrent l'existence de quatre coûts dans un modèle de coévolution GFG (Brown *et al.* 2011):

- coût de la résistance sur la fitness de l'hôte
- coût de la virulence sur la fitness de l'agent pathogène
- coût pour la plante d'être attaquée
- coût pour le parasite avirulent d'attaquer une plante résistante.

Ainsi, le coût pour une plante d'être infectée doit être plus fort que le coût de la résistance sinon il n'y aura aucun bénéfice pour la plante d'être résistante et la sensibilité serait fixée dans la population, suivie d'une fixation de la virulence chez l'agent pathogène.

Les fréquences des gènes de résistances et des gènes d'avirulences fluctuent autour d'un point d'équilibre où le polymorphisme est balancé à la fois au locus de résistance et au locus d'avirulence (Brown *et al.* 2011). Cela signifie qu'il y a un maintien du polymorphisme génétique à long terme supérieur à l'effet de la mutation seule, c'est-à-dire supérieur au polymorphisme observé sous la théorie neutraliste de Kimura (1983). Ainsi, selon la stabilité du point d'équilibre, deux scénarii évolutifs ont été décrits au niveau populationnel :

- **La course aux armements** (« arms race ») : Dans ce scénario, le point d'équilibre est instable. Les différents allèles pour la résistance se succèdent, et sont successivement contournés par la perte des allèles d'avirulence correspondants. Ainsi, le polymorphisme est transitoire, les allèles sont fixés de façon répétée au fur et à mesure que les deux espèces acquièrent de nouvelles « armes » et de nouvelles défenses (Holub 2001; Bergelson *et al.* 2001). Ainsi, en théorie, la variabilité génétique sera faible et les déséquilibres de liaison seront importants aux loci d'avirulence et de résistance étudiés dans une population d'hôtes et d'agents pathogènes (Aguileta *et al.* 2009 ; Bergelson *et al.* 2001). Ce type de polymorphisme est observé à la fois pour les gènes d'avirulence et les gènes de résistance dans la nature et dans les agro-écosystèmes. Cependant, en agriculture, la dynamique évolutive prendrait plus la forme de la course à l'armement (Brown *et al.* 2011), du fait des caractéristiques de cet écosystème (cf. paragraphe 2.1).

- **La guerre des tranchées** (« trench warfare ») : Dans ce scénario, le point d'équilibre est stable. Ce modèle explique le polymorphisme des loci de résistance et d'avirulence par l'effet d'une sélection balancée, entraînant la persistance à long terme de la variation

génétique à ces loci (Bergelson *et al.* 2001 ; Brown *et al.* 2011 ; Michelmore et Meyers 1998 ; Tellier *et al.* 2007). Ainsi, ce scénario entraîne une signature évolutive différente du modèle précédent avec une forte diversité génétique, un large nombre de variants alléliques à différentes fréquences pour les loci d'avirulence et de résistance dans les populations d'hôtes et pathogènes. Le niveau de polymorphisme élevé observé à certains loci de résistance et d'avirulence est cohérent avec ce modèle et indique qu'une variabilité génétique ancienne peut être maintenue pendant des millions d'années par la sélection balancée. Par exemple, une forte sélection balancée a été mise en évidence chez *Arabidopsis thaliana* pour les gènes de résistance *Rps2* (Michelmore et Meyers 1998) et *Rpm1* (Stahl *et al.* 1999). La sélection balancée peut être générée principalement par deux processus qui sont la sélection fréquence-dépendante¹ et la superdominance².

Tous ces modèles sont basés sur la relation gène-pour-gène mais des modèles plus complexes peuvent inclure plusieurs paires de gènes de résistance et d'avirulence (Segarra 2005 ; Tellier *et al.* 2007 ; Thrall *et al.* 2002). Il existe aussi le modèle allèle-allèle, « matching-allele model » (Brown *et al.* 2003 ; Gandon *et al.* 1996). Ce type de modèle assume qu'il y a un locus dans l'hôte avec une série d'allèles qui interagissent avec une série correspondante d'allèles à un locus de l'agent pathogène. Chaque allèle résistant confère la résistance aux agents pathogènes quand il y a appariement avec l'allèle d'avirulence correspondant. Les preuves de l'existence biologique du modèle allèle-allèle sont rares alors que le modèle GFG est très présent dans le règne végétal et a été découvert chez les invertébrés (Wilfert *et al.* 2010).

4. Le potentiel évolutif des agents pathogènes, la durabilité de la résistance et les stratégies de lutte

Le potentiel évolutif d'un agent pathogène peut être reflété par la structure génétique des populations de cet agent pathogène (McDonald *et al.* 2002). Pour les microorganismes tels que les parasites, l'analyse des variations génétiques à différents niveaux est souvent le seul moyen pour étudier des paramètres tels que le flux de gène, les stratégies de reproduction

¹ Effet d'un allèle sur la fitness dépend de sa propre fréquence ou de celles d'autres allèles

² Avantage sélectif des individus hétérozygotes, engendrant un excès d'hétérozygotes par rapport à la valeur attendue sous les hypothèses d'Hardy-Weinberg

et la taille efficace des populations (Nadler 1995). Comme nous l'avons déjà indiqué, cette structure génétique est la conséquence des interactions entre les quatre forces évolutives qui affectent l'évolution des populations : la mutation, la dérive génétique, la sélection naturelle, la migration. Nous avons déjà détaillé l'impact de ces forces évolutives et également l'impact des traits d'histoire de vie du couple hôte-parasite sur la structure génétique des populations (cf. paragraphe 2.3). L'intégration de l'ensemble de ces paramètres est essentielle pour interpréter la structure génétique des populations d'un agent pathogène et la traduire en potentiel évolutif pour améliorer la durabilité des résistances.

4.1. Durabilité des résistances

Il existe deux types de résistance chez les plantes, la résistance spécifique et la résistance non spécifique aussi nommée résistance quantitative ou partielle. La résistance spécifique ou qualitative est régie par la relation gène pour gène décrite par Flor (cf. paragraphe 3.1). La résistance quantitative est le résultat de l'effet additif de plusieurs gènes qui, individuellement, ont un effet mineur dans la résistance. Cette résistance oligogénique ou polygénique est présente à des niveaux faibles, dans la plupart des cultivars de presque toutes les cultures, pour tous les agents pathogènes importants (Parlevliet 1993). L'expression de cette résistance est le résultat de l'interaction entre l'hôte, l'agent pathogène et l'environnement (Eskes 1981). Ce type de résistance fournit rarement la résistance totale observée avec les gènes majeurs de résistance, mais elle tend à être efficace contre toutes les souches d'une population pathogène (Mc Donald *et al.* 2002) et l'adaptation de l'agent pathogène est théoriquement plus complexe quand plusieurs gènes de résistance agissent par rapport à un seul gène. La résistance quantitative est généralement moins efficace quand les conditions environnementales ou tissulaires de la plante sont favorables à la maladie (Geiger *et al.* 1989 ; Zadoks *et al.* 1993).

Des programmes et stratégies de sélection ont été développés par les sélectionneurs pour améliorer la résistance des cultivars dans un objectif de durabilité de la résistance. La durabilité d'une résistance telle qu'elle a été définie par Johnson (1979) implique qu'elle ne peut être évaluée que rétrospectivement (c'est-à-dire après l'utilisation commerciale de génotypes résistants). Ainsi, il est très difficile de prédire la durabilité d'une résistance et cette durabilité peut être très variable en agriculture variant de quelques mois (la résistance est déjà

contournée dans les dernières étapes d'un programme de sélection) à plus de 130 ans, comme par exemple, la résistance des porte-greffes de la vigne, au puceron *Phylloxera* (Pouget 1990).

La résistance quantitative est généralement considérée comme une résistance avec une meilleure capacité de durabilité que la résistance qualitative (Lindhout 2002 ; Parlevliet 2002). La résistance qualitative, généralement virulence-spécifique et conduite par un gène majeur de résistance, exerce une très forte pression de sélection sur les populations pathogènes qui s'adaptent rapidement à la résistance grâce à la sélection de nouvelles virulences (cf. paragraphe 3). Ainsi, l'utilisation successive de ces résistances variétales dans les cultures donne lieu à la répétition des cycles de sélection variétale/adaptation des populations pathogènes, les « Boom and Bust cycles » (Vanderplank 1968). Cependant, différentes études montrent que des résistances induites par des gènes majeurs de résistance peuvent être durables (Leach *et al.* 2001). À l'inverse, la résistance quantitative peut être érodée par l'augmentation de l'agressivité dans les populations pathogènes soumises pour de longues périodes à une résistance quantitative (Andrivon *et al.* 2007). Le Guen *et al.* (2007) ont montré que les populations pathogènes pouvaient s'adapter à des résistances polygéniques en contournant toute ou une partie de la résistance quantitative.

La durabilité de la résistance est liée à la réponse adaptative des populations pathogènes face à la sélection exercée par les résistances hôtes. Ainsi, les stratégies pour maximiser la durabilité doivent limiter la sélection des variants très agressifs et réduire la taille des populations pathogènes (Mundt *et al.* 2002).

4.2. Potentiel évolutif des agents pathogènes et stratégies de déploiement des résistances

La détermination de la structure génétique des populations pathogènes permet d'évaluer leur potentiel évolutif (McDonald et Linde 2002). La connaissance de ce potentiel évolutif peut aider dans le choix de la stratégie optimale pour le déploiement de variétés résistantes et le choix des résistances à utiliser. McDonald et Linde (2002) ont proposé de classer les agents pathogènes en fonction de leur potentiel évolutif en postulant que les populations pathogènes avec un fort potentiel évolutif ont une probabilité plus grande de contourner les résistances que les parasites avec un faible potentiel évolutif. La caractérisation des forces évolutives des agents pathogènes est donc primordiale pour inférer leur potentiel évolutif et proposer des stratégies de résistance selon ce potentiel évolutif.

1. La mutation peut créer des changements dans les séquences des gènes d'avirulence permettant ainsi le développement de nouvelles souches virulentes contournant les résistances induites par des gènes majeurs de résistance ou augmentant le pouvoir pathogène permettant ainsi l'érosion de la résistance quantitative. À l'échelle des populations, la mutation permettant le contournement de la résistance sera effective seulement si elle est couplée avec une sélection dirigée et une transmission efficace permettant l'augmentation de sa fréquence dans la population. Il paraît illusoire de proposer des stratégies de gestion des résistances pour diminuer le taux de mutation. Par contre, il est envisageable de diminuer les pressions de sélection exercées sur les gènes d'avirulence et d'utiliser les caractéristiques intrinsèques de certains gènes d'avirulence tel que le coût de la virulence. Flor (1958) a proposé que les gènes d'avirulence aisément mutables dans les populations pathogènes étaient probablement moins importants dans le pouvoir pathogène que ceux rarement mutés. Van der Plank (1968) a conceptualisé cette théorie sous le terme de « sélection stabilisante » qui lie la génétique de la fitness du parasite à la qualité de la résistance correspondante. Ainsi, un coût important de la virulence pourrait entraîner une durabilité plus conséquente pour le gène de résistance correspondant. Par exemple, le coût de la fitness de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, a été évalué pour trois gènes de résistance du riz, *Xa4*, *Xa7* et *Xa10* au champ (Vera Cruz *et al.* 2000). La virulence à *Xa7* est associée à une plus grande réduction de l'agressivité de l'agent pathogène que les virulences à *Xa4* et *Xa10*. Les souches virulentes à *Xa7* ne se maintiennent pas dans les populations naturelles et l'efficacité au champ du gène *Xa7* est donc conservée. Les auteurs concluent alors que le gène *Xa7* est probablement plus durable que *Xa4* ou *Xa10* car la mutation vers la virulence du gène *AvrXa7* impose un coût de virulence important.

Le nombre de mutations nécessaires pour l'acquisition de la virulence est un autre paramètre qui est relié à la durabilité (Harrison 2002). Il a comparé la durabilité relative de la résistance dans plusieurs pathosystèmes plante-virus et il a montré que plus le nombre de mutations nécessaires pour la virulence était important plus la résistance était durable. Ce mécanisme a également été observé pour le couple piment-*Potato virus Y* (PVY). La durabilité observée pour les allèles résistants au locus *pvr2* est reliée au nombre de mutations requises pour la virulence du virus (Ayme *et al.* 2007).

Ainsi, les gènes de résistance les plus durables sont ceux qui impliquent de multiples mutations dans l'agent pathogène pour devenir virulent ou impliquent un coût important dans la virulence. En parallèle, les agents pathogènes présentant des taux de mutations élevées seront ceux avec le plus fort potentiel évolutif.

2. La dérive génétique, dépendante de la taille des populations, influence la diversité génétique d'une population (cf. paragraphe 2.2.2). Les populations de grande taille présentent des taux de mutants plus importants que les populations de petite taille et la dérive génétique va diminuer la présence d'allèles rares. Ainsi, les populations pathogènes de petite taille auront un potentiel évolutif plus faible que les populations pathogènes de grande taille (McDonald *et al.* 2002). Des stratégies de gestion des cultures diminuant la taille des populations pathogènes, créant des goulots d'étranglement, peuvent donc être efficaces pour limiter l'adaptation des parasites en diminuant leur diversité génétique. Cependant, ce type de gestion pourrait également augmenter les pressions de sélection exercées sur l'agent pathogène et entraîner une accélération de l'adaptation à l'image de l'utilisation intensive d'antibiotique ou d'insecticide.

3. La migration d'un agent pathogène correspond à un flux de gènes ou de génotypes à des échelles plus ou moins importantes selon la capacité de dispersion de l'organisme et l'impact des activités humaines (cf. paragraphe 2.3.3). Les agents pathogènes présentant une capacité de migration importante montrent généralement une diversité génétique plus importante et seront donc considérés comme des agents pathogènes à fort potentiel évolutif.

Pour les organismes à recombinaison asexuée, la migration consistera en un échange entre populations de génotypes entiers. Ce mouvement de génotypes pourrait entraîner un risque plus important que la dispersion de propagules (flux de gènes) car les génotypes correspondent à un ensemble d'allèles liés déjà sélectionnés (McDonald *et al.* 2002) alors que la dispersion de propagules implique une recombinaison sexuée ultérieure qui pourrait entraîner des descendants moins adaptés dans un premier temps. Ces organismes clonaux peuvent ainsi être considérés comme des organismes avec un potentiel évolutif très important. Des méthodes de lutte contre la migration naturelle sont pratiquement impossibles à mettre en place ; par contre, il est possible de diminuer l'impact des dispersions engendrées par l'Homme.

4. La sélection est la force évolutive qui va permettre l'augmentation en fréquence des souches virulentes dans les populations pathogènes. La force de la pression de sélection exercée par les gènes de résistance va dépendre du type de résistance (qualitative ou quantitative) et du type d'interaction impliquée dans la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante hôte (cf. paragraphe 3.2.2). La sélection est par conséquent la force évolutive la plus facilement maîtrisable par l'Homme (Palumbi 2001). Les populations d'agents

pathogènes soumis à des gènes majeurs de résistance évolueront probablement plus rapidement que des agents pathogènes soumis à une résistance quantitative. Ainsi, la sélection est plus forte dans les cas où un seul gène de résistance majeur est utilisé dans des monocultures sur de grands espaces. Pour diminuer cette pression de sélection, une des alternatives est de « pyramider » plusieurs gènes majeurs de résistance en espérant que les mutations ne permettront pas de contourner chaque gène de résistance. Cette combinaison de gènes majeurs de résistance sera plus efficace, « durable », si chaque gène de résistance n'est pas déjà contourné par certaines populations et si chaque gène de résistance utilisé n'est pas également déployé un à un dans d'autres cultivars (Parlevliet 1997).

Une seconde alternative pour diminuer la pression de sélection imposée par les gènes majeurs de résistance est de favoriser la rotation dans le temps et l'espace de différents cultivars présentant différents gènes de résistance ou favoriser l'utilisation de culture en association. Ces stratégies vont entraîner une sélection disruptive sur les populations parasites en réduisant la pression de sélection contre tout allèle d'avirulence ou combinaison d'allèles d'avirulence (Pink 2002) et agir sur la dérive génétique en diminuant la taille des populations. Ce type de stratégie semble efficace pour diminuer l'impact de la maladie (Smithson et Lenné 1996 ; Zhu *et al.* 2000) mais reste peu utilisé dans les agro-écosystèmes (McDonald *et al.* 2002) pour différentes raisons pratiques telles que le besoin d'uniformité pour la récolte, le manque de diversité dans les gènes de résistance utilisés ou encore la difficulté à mettre en place des rotations à des échelles spatiales importantes impliquant de nombreuses coopératives ou agriculteurs.

L'utilisation de la résistance quantitative est également intéressante pour diminuer la pression de sélection exercée sur les populations parasites par son action non isolat spécifique. La durabilité plus importante de la résistance quantitative pourrait provenir du besoin de multiples mutations pour contourner les nombreux facteurs de résistance ou d'une sélection de variants virulents moins efficace dans le cas de plantes avec des résistances polygéniques. Cependant, l'érosion de la résistance quantitative est possible par l'augmentation de l'agressivité des populations parasites (Andrison *et al.* 2007).

Une autre stratégie pour augmenter la durabilité des gènes de résistance en retardant la sélection de variants virulents est de combiner dans les cultivars un gène de résistance majeur avec des gènes de résistance quantitative. Brun *et al.* (2010) et Palloix *et al.* (2009) ont démontré que cette stratégie augmentait la durabilité de la résistance respectivement pour un champignon et un virus.

5. La recombinaison ne constitue pas une des quatre forces évolutives, néanmoins, elle affecte fortement la distribution de la variabilité génétique au sein et entre les populations. Différents types de recombinaison existent chez les agents pathogènes comme la reproduction sexuée classique (méiotique) mais aussi des phénomènes de parasexualité (la fusion somatique ou la recombinaison mitotique, par exemple). Les agents pathogènes soumis à des niveaux importants de recombinaison évolueront généralement plus rapidement que des agents pathogènes qui ne recombinent que peu ou pas. Sous l'effet de la recombinaison, les agents pathogènes peuvent combiner différents allèles de virulence et contourner ainsi des combinaisons de gènes de résistance utilisées par les sélectionneurs. Pour diminuer le taux de recombinaison d'un agent pathogène, les gestionnaires peuvent agir sur les conditions environnementales nécessaires à la recombinaison comme éliminer les hôtes alternatifs près des cultures ou enlever les débris de plantes (souvent nombreux après une récolte) où la recombinaison peut se produire.

L'objectif de cette thèse est de mieux comprendre les pressions de sélection qui s'exercent sur la structure des populations d'un agent pathogène dans les agro-écosystèmes et plus particulièrement la pression de sélection exercée par les gènes de résistance et l'effet sur la durabilité des résistances. Comme nous l'avons décrit précédemment, beaucoup d'études traitent de ce sujet mais peu d'études ont été faites en étudiant l'impact des gènes de résistance sur la structure des populations à la fois au niveau moléculaire (étude de la variabilité génétique d'effecteurs à l'échelle des populations), au niveau populationnel et en relation avec l'évolution phénotypique des virulences. Les caractéristiques biologiques et agronomiques du système *Lactuca sativa* / *Bremia lactucae* présentées ci-après explicitent son intérêt en tant que modèle biologique pour étudier ces pressions de sélection.

5. Le modèle : *Lactuca sativa*-*Bremia lactucae*

5.1. La laitue cultivée : *Lactuca sativa*

La laitue cultivée, *Lactuca sativa*, appartient à l'une des plus grandes familles botaniques, les Astéracées qui comprend plusieurs espèces alimentaires dont le tournesol, l'artichaut, la chicorée et de nombreuses espèces ornementales comme le chrysanthème et le dahlia.

5.1.2 Le genre *Lactuca*

Le genre *Lactuca* est très vaste, avec plus de 100 espèces recensées à travers le monde. Il est caractérisé par la présence de « lait », le lactarium, liquide blanc collant qui s'écoule des blessures des feuilles ou tiges, qui lui a donné son nom. Toutes les *Lactuca* ont des feuilles sur les tiges florales, des capitules pauciflores (7-15 fleurons) à fleurs toutes ligulées (pétales soudés). Elles sont toutes diploïdes et en majorité autogames. Néanmoins, la pollinisation croisée n'est pas totalement exclue.

5.1.3 Biologie de la laitue cultivée

L. sativa est une plante herbacée annuelle avec deux phases bien distinctes :

- La phase végétative, formant une pomme plus ou moins fermée, est le stade utilisé pour la commercialisation (Fig. I.4). Un cycle de culture est effectué entre 10 et 15 semaines selon la variété et la région de production.



Figure I.4 : 2 types de laitue au stade récolte : à gauche laitue beurre, à droite laitue batavia (Photo B. Maisonneuve).

- La phase reproductrice, au cours de laquelle la tige centrale s'allonge (montaison), aboutit à la floraison et à la production de graines. La montaison est plus ou moins rapide selon les conditions climatiques et les génotypes. Elle est favorisée par des jours longs et de hautes températures. A la fin de la montaison, les plantes peuvent mesurer de 1 à 1,5m de haut et portent de nombreux capitules de 10 à 15 fleurons dont le développement est quasi synchrone. L'inflorescence ne s'ouvre qu'une fois, le matin, après le lever du soleil. A l'écartement des ligules, le style s'allonge et le stigmate se charge de pollen engendrant l'autopollinisation de la fleur. Si les conditions climatiques sont bonnes, dans les minutes suivantes, le capitule se referme et l'unique ovule de chaque fleuron est fécondé. La graine, un akène nu, va grossir et reste enfermée dans les bractées sur la plante.

5.1.4 Les variétés cultivées

La laitue est la première des salades consommées en France mais sous le vocable laitue se retrouvent divers cultigrupes commerciaux définis selon la forme de la pomme, de la forme et de la texture des feuilles (Fig. I. 5) :

- Les laitues pommées comprenant les laitues beurres appelées couramment laitue, et les laitues batavia (Fig. I. 6 a et b).
- Les laitues à couper où l'on trouve les variétés « Feuille de chêne » ou « Lollo rossa ». (Fig. I. 6 c)
- Les laitues romaines qui présentent une pomme allongée. (Fig. I. 6d)
- Les laitues grasses qui sont des laitues pommées à feuilles épaisses, assez craquantes et à nervures pennées.
- Les laitues tige ou laitues asperges ou celtuce surtout consommées en Asie.



Figure I.5 : Photos de laitues de 3 cultigrupes.

a : laitue beurre et **b :** laitue batavia (Photos de L. Jean). **c :** feuille de chêne et **d :** laitue romaine (Photos de B. Maisonneuve).

Ces différentes formes de la laitue sont les résultats d'une domestication débutée il y a environ 2500 ans, et plus récemment, de la sélection (Fig. I.6). Au cours du XX^{ème} siècle, les sélectionneurs ont adapté les variétés aux différents systèmes de culture (culture sous abri en hiver, en plein champ, résistance à la montaison en été), ont répondu à la demande des agriculteurs et des consommateurs (morphologie de la pomme, diversité des couleurs et de formes) et ont travaillé sur la résistance aux maladies. Ces caractéristiques, comme la morphologie de la pomme, peuvent avoir une influence différente sur le microclimat autour de la feuille et agir sur le taux d'humidité favorisant ou non certaines maladies.

Des croisements manuels entre ces variétés sont couramment effectués par les sélectionneurs malgré la petite taille et la rapidité d'ouverture des fleurs qui rendent les castrations délicates et fastidieuses. Les variétés commerciales sont toutes des variétés fixées reproduites par autofécondation. La sélection en Europe est actuellement très intense, surtout en France et aux Pays Bas. Chaque année, plus de 30 nouvelles variétés sont inscrites au catalogue officiel. Parallèlement, les amateurs cultivent encore d'anciennes variétés de la fin du XIX^{ème} siècle.



Figure I.6: Champ de sélection illustrant la diversité des variétés (Photo B. Maisonneuve).

5.1.5 Culture et production de la laitue cultivée

Elle est cultivée sur tous les continents et toute l'année mais le type commercialisé est différent selon les régions. Les principaux bassins de productions sont la Chine, les Etats-Unis (surtout la Californie) et l'Europe avec principalement l'Espagne, l'Italie et la France (Fig. I.7).

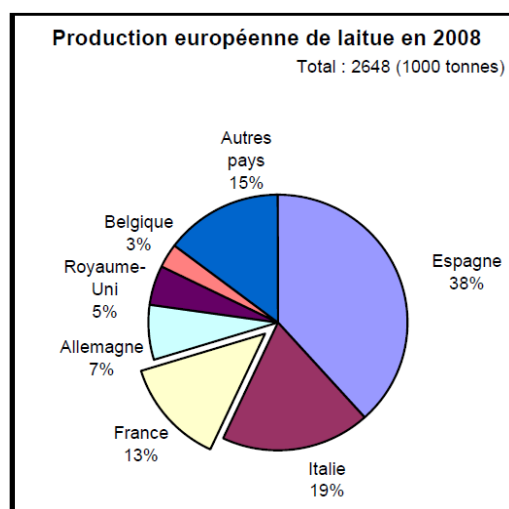


Figure I.7 : Répartition par pays de la production européenne de laitue en 2008 (source Eurostat)

En France, avec 800 millions de laitues produites sur 11 500 ha (source Agreste, campagne de mai 2010 à avril 2011), la laitue est la deuxième production maraîchère en valeur derrière la tomate : la batavia est le premier type commercial avec 38% de la production devant les laitues à couper (31%) et les laitues beurre (28%). 95% de la production de laitue est effectuée dans cinq bassins de production présentant des disparités de production selon la période et la région (Fig. I.8 a ; b).

Ainsi, le Sud-Est qui correspond aux régions administratives de Rhône-Alpes, Languedoc-Roussillon et Provence-Alpes-Côte d'Azur, représente 56,1% de la production nationale. Dans ce bassin de production, la majorité de la production est effectuée entre le début de l'automne et la fin de l'hiver (44 à 78 millions de têtes par mois d'octobre à février). À cette période de l'année, cette production s'effectue sous abris et les agriculteurs enchaînent les cycles de culture avec différentes variétés. Cependant, la production est maintenue au printemps et en été par des cultures de plein champ avec un niveau de production toujours supérieur aux autres bassins de production (Fig. I.8.b).

Le Nord, correspondant aux régions Ile-de-France et Nord-Pas-de-Calais, représentent 11,1% de la production nationale avec une production qui s'effectue majoritairement de mai à novembre. Les variétés de laitues sont principalement des variétés de plein champ. L'Ouest (Bretagne et Basse-Normandie) et le Centre-Ouest (Centre et Pays-de-la-Loire) représentent respectivement 8,7 et 8,5% de la production nationale. Les cultures sont, également, principalement des cultures de plein champ, effectués du printemps à la fin de l'automne. Ainsi, dans ces trois précédentes régions, les cultures de laitue s'arrêtent pendant l'hiver ou sont faites à des niveaux de production très faibles (Fig. I.8 b ; par exemple de 0 à 1 million de têtes par mois, de décembre à février, contre 10 à 11 millions de têtes par mois de juin à octobre, dans le Centre-Ouest).

Le Sud-Ouest, comprenant les régions Aquitaine et Midi-Pyrénées, est la cinquième région de production (8,2% de la production nationale) avec des cultures qui s'effectuent tout au long de l'année sous abris et en plein champ.

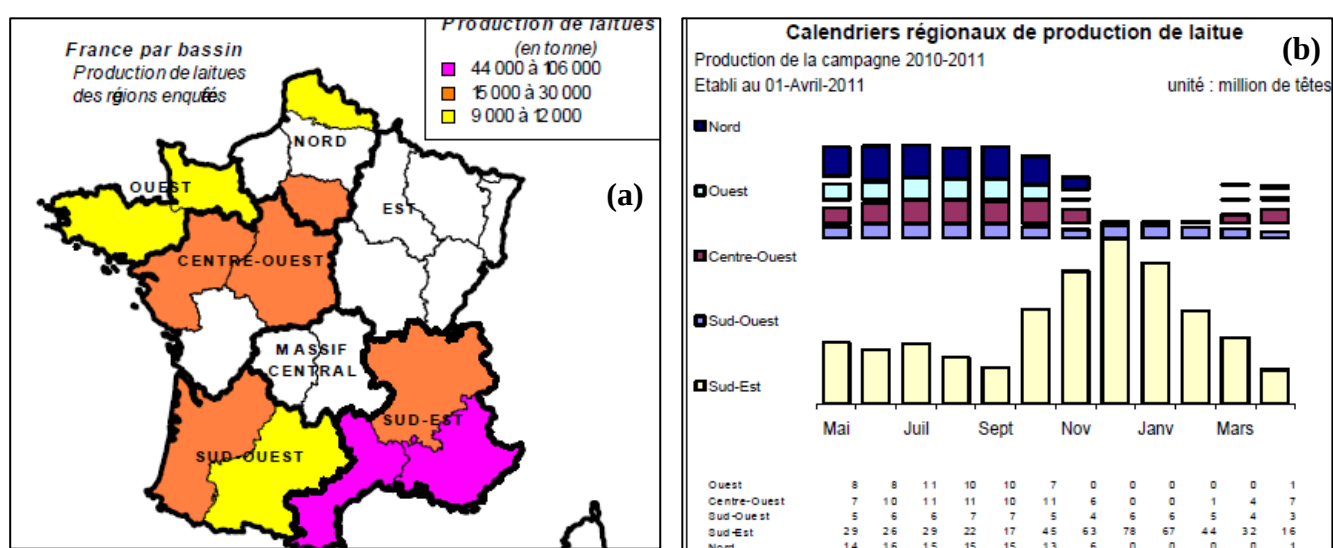


Figure I.8 : (a) Répartition de la production de laitue dans les cinq principaux bassins de production en France. (b) Production de la laitue (en million de têtes) par mois et par région de production.

La laitue est ainsi produite continuellement à l'échelle du territoire avec des variétés différentes favorisant ainsi des épisodes épidémiques des maladies.

5.2. Les laitues sauvages

Sur les 17 espèces de *Lactuca* décrites en Europe (Lebeda *et al.* 2001), seulement sept sont considérées comme des hôtes naturels de *B. lactucae* (Lebeda *et al.* 2002).

Sur ces sept espèces, *L. serriola*, aussi appelée laitue scariole, est l'hôte sauvage le plus commun (Hooftman *et al.* 2007 ; Lebeda *et al.* 2007 ; Petrzelova *et al.* 2004 ; Petrzelova *et al.* 2011). Cette espèce est l'espèce annuelle la plus proche de la laitue cultivée. Les croisements entre *L. sativa* et *L. serriola* sont faciles à réaliser et génèrent des descendants fertiles. Ainsi, les sélectionneurs ont utilisé cette espèce pour introduire des gènes de résistance à des agents pathogènes dont *B. lactucae*. *L. serriola* est très présente en France sur le bord des routes et chemins, les jachères et peut même se trouver à proximité des cultures de laitues (Fig. I. 9).



Figure I.9 : *L. serriola*. A gauche : *L. serriola* dans un mur en Provence (photo de R. Valade). Ci-dessus, photo d'une *L. serriola* dans un tunnel de fraisiers (Provence) proche d'un tunnel utilisé pour la culture de laitue (photo de B. Maisonneuve).

Deux autres espèces sont compatibles avec *L. sativa*, *L. saligna* et *L. virosa* (Fig. I. 10). *L. saligna* est moins fréquente en France que *L. serriola* et les croisements sont plus compliqués. En effet, il faut utiliser la plante sauvage comme parent femelle et les hybrides sont très peu fertiles. *L. virosa*, en majorité bisannuelle, a un latex plus abondant et est plus

éloignée de la laitue. La production d'hybride est très compliquée mais elle est possible entre certaines variétés de laitue et certains génotypes.



Figure I.10 : à gauche : *L. saligna* ; à droite : *L. virosa* (photos de B. Maisonneuve).

5.3. Maladies et Méthodes de lutte

5.3.1 Les bioagresseurs de la laitue cultivée

Les principaux problèmes de production dans tous les cultigrupes sont dus aux attaques d'agents pathogènes. Les laitues peuvent être infectées par un grand nombre de bioagresseurs appartenant aux principaux taxons du vivant :

- Des champignons tels que *Botrytis*, *Sclerotinia minor*, *Rhizoctonia solani*.
- Des bactéries foliaires avec *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* ou *Pseudomonas cichorii* et des bactéries racinaires comme *Rhizomonas suberifaciens*.
- Des insectes dont des pucerons, des thrips et des aleurodes. Ces taxons sont aussi vecteurs de virus.
- Des virus comme BWYV (luteovirus), CMV (cucumovirus), BPYV (closterovirus), TSWV (tospovirus), MiLV (ophiovirus), le LMV (potyvirus).
- Un oomycète : *Bremia lactucae* Regel.

De tous ces agents pathogènes, l'agent du mildiou de la laitue (*B. lactucae*) est l'un des principaux bioagresseurs.

5.3.2 La lutte chimique

Des traitements phytosanitaires sont disponibles pour lutter contre certains de ces bioagresseurs de la laitue.

Pour l'oomycète *Bremia*, la lutte ne peut être que préventive et seulement dans les cultures conventionnelles (pas de traitements homologués en agriculture biologique). Les dithiocarbamates sont utilisés depuis plus de 40 ans, mais comme ce sont des fongicides de contact, ils ne fournissent qu'un contrôle incomplet et préventif. De plus, l'utilisation intensive de fongicides a favorisé le développement de souches résistantes. La mise sur le marché de fongicides au métalaxyl (phénylamide) au début des années 1980 permettait un contrôle intégral de l'agent du mildiou. Cependant, des isolats résistants sont apparus dès 1983 en Grande-Bretagne (Crute 1987), en 1987 en France (Maisonneuve *et al.* 1989), à la fin des années 80 en Californie (Schettini *et al.* 1991) et au début des années 90 dans d'autres pays européens comme l'Italie (Cobelli *et al.* 1998). L'utilisation du fosetyl-aluminium, fongicide systémique déclenchant les mécanismes de défense de la plante, a également entraîné l'apparition d'isolats résistants au milieu des années 90 (Brown *et al.* 2004).

La lutte chimique nécessite une alternance entre les familles de produits utilisés afin de limiter les risques d'apparition de souches résistances ; de plus, le délai d'utilisation avant la récolte est de 21 à 28 jours et doit donc être combiné avec des mesures prophylactiques, notamment en limitant le taux d'humidité.

Néanmoins, la salade étant un légume-feuilles, consommé en frais, il est souhaitable de disposer d'un produit sain sans résidus de pesticides. Ainsi, la lutte génétique reste la meilleure protection.

5.3.3 La lutte génétique

Depuis les années 1950, les sélectionneurs ont cherché à développer la lutte génétique contre les différents agents pathogènes de la laitue et particulièrement contre *B. lactucae*.

De nombreuses études ont démontré que l'interaction entre la laitue et *B. lactucae* suivait une relation gène-pour-gène (Bonnier *et al.* 1994 ; Crute et Johnson, 1976 ; Farrara *et al.* 1987 ; Hulbert et Micheltore, 1985 ; Jeuken et Lindhout, 2002 ; Maisonneuve *et al.*

1994 ; Micheltmore *et al.* 1984). Les gènes de résistance, appelés gènes *Dm* (Downy mildew) procurent de hauts niveaux de résistance mais ils ne sont efficaces que pour les isolats exprimant le gène d'avirulence correspondant et pour une période limitée à cause de l'évolution des virulences de *Bremia*.

Les premières variétés résistantes, mises sur le marché vers 1960, possédaient des gènes identifiés dans d'anciennes variétés de laitue comme *Dm2* issu de Meikoningén, *Dm3* issu de la laitue Gotte à forcer utilisées en Europe ou *Dm7* issu d'une romaine blonde utilisée aux Etats-Unis (Crute 1992). *Dm3* est le seul gène de résistance de la laitue cloné à ce jour (Meyers *et al.* 1998 ; Shen *et al.* 1998, 2002). Ce gène code pour une protéine du type NB-LRR, similaire à d'autres gènes de résistance clonés (McHale *et al.* 2006). Ce gène est un membre de la famille multigénique RGC2 (Resistance Gene Candidate 2) et confère la résistance aux isolats de *Bremia* exprimant le gène d'avirulence *Avr3* (Kuang *et al.* 2004 ; Shen *et al.* 2002).

Plusieurs laboratoires ont ensuite recherché des résistances dans les espèces sauvages du genre *Lactuca* (*L. serriola*, *L. saligna* et *L. virosa*) compatibles avec *L. sativa*. Un grand nombre de gènes de résistance à *Bremia* a été identifié chez *L. serriola* et introduit dans des variétés commerciales (*Dm5/8* vers 1960 aux Etats-Unis, *Dm11* vers 1960, *Dm16* dans les années 1980, *R18* dans les années 1970, *R38* dans les années 1990) mais aucune de ces résistances ne se sont avérées durables. Les introgressions de gènes de résistance de *L. saligna*, débutées à la fin des années 1980, n'ont pas non plus permis l'acquisition d'une résistance durable. L'INRA a introgressé des résistances de deux accessions de *L. virosa* dans des lignées de laitue beurre (Maisonnette *et al.* 1999) ; ces résistances seraient bigéniques (Maisonnette 2003). Elles sont efficaces vis-à-vis de toutes les souches testées à ce jour.

A ce jour, au moins 27 facteurs de résistance et gènes *Dm* sont connus (Micheltmore *et al.* 2008). De nombreuses autres sources de résistance ont été identifiées mais n'ont pas été caractérisées. Il est fort probable que plusieurs centaines de gènes *Dm* avec une spécificité pour *B. lactucae* soient identifiés à court terme (Micheltmore *et al.* 2008). Même si la plupart des gènes de résistance utilisés fournissent une résistance qualitative, certains gènes (ex. *Dm6*, *Dm18*) peuvent conférer des phénotypes de résistance incomplets (Crute et Norwood 1978 ; Maisonnette *et al.* 1994). De plus, à de faibles températures, la résistance attribuée par plusieurs gènes *Dm* devient moins efficace (Judelson *et al.* 1992). Certains gènes de résistance confèrent une résistance partielle également nommée « résistance au champ » (Crute et Norwood 1981 ; Jeuken et Lindhout, 2002 ; Grube *et al.* 2005), révélée par une

moindre sensibilité des plantes en culture. Néanmoins, l'utilisation de ce type de résistance dans les programmes de sélection est encore plus fastidieuse que les gènes de résistance majeurs et donc très peu exploitée. En effet, les tests en condition contrôlée ne sont pas applicables à ce jour. Le niveau de tolérance doit être très élevé car la laitue étant un légume feuille, aucun symptôme ne doit être visible pour la commercialisation.

Ainsi, pour conférer aux génotypes, les résistances les plus larges possibles, les sélectionneurs s'efforcent de cumuler plusieurs gènes de résistance majeure dans chaque génotype. Cependant, l'évolution des virulences dans les populations de *Bremia* permet le contournement de ces résistances, parfois avant la commercialisation de la variété, remettant en cause plusieurs années de recherche.

A l'heure actuelle, les connaissances sur *B. lactucae* sont insuffisantes pour identifier les mécanismes impliqués dans le contournement de la résistance et donc prédire l'évolution des virulences dans les populations.

5.4. *Bremia lactucae*

5.4.1 Position systématique

B. lactucae est un oomycète appartenant à l'ordre des pérénosporales. Les oomycètes présentent une croissance filamenteuse et furent traditionnellement considérés comme des champignons avant que des analyses biochimiques et phylogénétiques démontrent qu'ils appartenaient au règne des Chromistes, sous-règne des Straménopiles, groupe comprenant notamment les algues brunes (Kamoun 2001). Néanmoins, les oomycètes et champignons phytopathogènes présentent des modes similaires de parasitisme suggérant une convergence évolutive (Tyler 2001). Plusieurs groupes d'oomycètes ont évolué en des agents pathogènes adaptés à différents types d'organismes eucaryotiques comme les animaux, les champignons ou les plantes. Les oomycètes ont probablement évolué, dans un premier temps, dans un environnement marin comme semble l'indiquer les analyses phylogénétiques sur l'embranchement. 60% des espèces de cet embranchement sont des agents pathogènes de plantes (Thines *et al.* 2010). D'ailleurs, ces agents phytopathogènes sont la cause de plusieurs maladies parmi les plus destructrices et économiquement importantes dans le monde (Lamour *et al.* 2009). Le parasitisme des plantes aurait au moins évolué trois fois indépendamment

dans différentes lignées d'Oomycètes, une fois chez les Saprolegniales et au moins deux fois chez les Péronosporales (Thines *et al.* 2010).

Les membres des Péronosporales, qui incluent les agents phytopathogènes comme les agents du mildiou (*Bremia*, *Plasmopara*), *Phytophthora*, *Pythium* et les rouilles blanches (*Albugo*), arborent différents types de parasitisme, de la saprotrophie à la biotrophie en passant par la nécrotrophie. L'évolution vers la biotrophie serait apparue en deux fois chez les Péronosporales, conduisant à l'émergence des rouilles blanches et des agents du mildiou. Cette biotrophie a évolué graduellement jusqu'à conduire à une forte spécialisation à l'hôte et à une biotrophie obligatoire. Cette biotrophie obligatoire a induit un isolement génétique important chez ces espèces, entraînant une spéciation et une radiation importante pour les agents du mildiou (environ 800 espèces décrites à ce jour) (Thines *et al.* 2010).

La classification systématique au sein des Péronosporales n'est pas totalement résolue et varie selon les analyses phylogénétiques notamment concernant la place des *Albuginaceae*. Alors que les premières analyses plaçaient les *Albuginaceae* proche de la famille des *Peronosporaceae*, plusieurs auteurs ont proposé de ne pas les considérer comme membre des Péronosporales (Hudspeth *et al.* 2003 ; Riethmüller *et al.* 2002 ; Thines et Spring 2005).

Ainsi, une seule famille resterait dans l'ordre des Péronosporales, les *Peronosporaceae* qui regroupent toutes les espèces agents du mildiou c'est-à-dire tous les biotrophes obligatoires (autres que les Albuginales) (Goker *et al.* 2007). Cette famille est composée des genres suivants : *Basidiophora*, *Benua*, *Bremia*, *Graminivora*, *Hyaloperonospora*, *Paraperonospora*, *Perofascia*, *Peronosclerospora*, *Peronospora*, *Plasmoverna*, *Protobremia*, *Sclerospora* et *Viennotia*.

De même, la position des espèces du genre *Phytophthora* est encore discutée car le genre est paraphylétique dans plusieurs analyses en comparaison avec les agents du mildiou (Cooke *et al.* 2000 ; Göker *et al.* 2007 ; Voglmayr 2003).

Deux espèces, *Bremia lactucae* et *Bremia graminicola* furent généralement considérées comme les deux seules espèces du genre *Bremia* (Regel, 1843) avant que les outils moléculaires ne soient disponibles. Ces espèces étaient chacune parasite d'une famille d'hôtes respectivement les *Asteraceae* et les *Poaceae* (Crute et Dixon 1981 ; Skidmore et Ingram 1985). Cependant, suite aux travaux de Thines et collaborateurs (2006), l'espèce *B. graminicola* a été placée dans un nouveau genre, *Graminicola*, laissant *B. lactucae* comme seule espèce du genre *Bremia*.

B. lactucae, a été décrit sur plus de 40 genres et 200 espèces de la famille des Astéracées (Lebeda *et al.* 2002) ; c'est un des plus importants agents pathogènes de la laitue cultivée. Néanmoins, le concept d'une seule espèce est remis en question depuis un siècle. En effet, environ 20 espèces et plusieurs sous-espèces de *Bremia* ont été décrites comme espèces pathogènes d'Astéracées. Par exemple, Sawada (1914) reconnaissait cinq espèces indépendantes dans le genre *Bremia* ou Tao (1998) considérait 11 espèces comme morphologiquement distinctes. Du fait de la difficulté à délimiter les espèces par des approches morphologiques, le concept d'espèces au sens large préconisé par Yerkes et Shaw (1959) était souvent appliqué (Choi *et al.* 2011 ; Thines *et al.* 2010). Des études phylogénétiques moléculaires ont permis de montrer qu'il existait une diversité génétique importante dans le genre *Bremia* (Choi *et al.* 2007 ; Thines *et al.* 2010 ; Voglmayr *et al.* 2004), impliquant l'existence de différentes lignées distinctes dans le genre. Ces lignées sont groupées selon le genre de l'hôte, ou même l'espèce de l'hôte ce qui indique un fort degré de spécialisation à l'hôte (Choi *et al.* 2011).

Ainsi, *B. lactucae* formerait un clade distinct, restreint aux individus se développant sur *Lactuca* (Lebeda *et al.* 2002 ; Lebeda *et al.* 2008 ; Thines *et al.* 2010 ; Choi *et al.* 2011). Les populations de *B. lactucae* sur des espèces différentes de *Lactuca* ne serviront donc pas d'inoculum dans les épidémies observées dans les cultures de laitue.

5.4.2 Biologie, cycle de vie et type sexuel

B. lactucae est un organisme diploïde, capable d'effectuer une reproduction sexuée et une reproduction asexuée ; la phase asexuée est responsable du développement des épidémies et des dégâts sur les cultures de laitue alors que la phase sexuée peut parfois être l'initiatrice de l'épidémie. Lors de la phase asexuée, l'appareil reproducteur est constitué de conidiophores, émergeant des tissus de la plante et se ramifiant de manière dichotomique en arborescences dont chaque ramification porte une seule conidie diploïde (Fig. I.11). Cette conidie est dispersée par le vent ou l'eau, et va germer directement en pénétrant la cuticule de la plante et les cellules épidermiques (Michelmore *et al.* 1988).



Figure I. 11: Conidiophore de *Bremia lactucae* portant des conidies (D. Blancard).

A la différence de nombreux autres membres des Péronosporacées, tel que *P. viticola*, il n'y a pas formation de zoospores, c'est-à-dire de spores flagellées, mobiles dans l'eau. Ces deux caractéristiques, une conidie non flagellée et une germination directe à travers la cuticule, démontrent une évolution très importante et étroite de *Bremia* avec son environnement. En effet, la perte des zoospores indique une adaptation au milieu terrestre (alors que les oomycètes sont probablement apparus à partir d'algues) et la pénétration directe démontre une spécialisation parasitaire importante (par le contournement des défenses de l'hôte). Ces caractéristiques biologiques confirment, avec les analyses phylogénétiques, que *Bremia* est un des agents du mildiou les plus spécialisés dans sa biotrophie.

B. lactucae est diploïde pour la majorité de son cycle de vie et majoritairement hétérothallique (Michelmore et Ingram 1981, 1982 ; Fig. I.12). Le cycle de reproduction asexuée est effectué en 1 à 3 semaines, permettant une propagation clonale, alors que le cycle sexué dure au moins 6 semaines. Quand deux hyphes, de types sexuels opposés, rentrent en contact, la sporulation asexuée est stoppée et des groupes de gamétanges sont formés au point de contact. Ensuite, des méioses s'effectuent dans l'oogone et l'anthéridie, et les gamètes haploïdes sont transférés de l'anthéridie vers l'oogone pour la fertilisation (Michelmore et Ingram 1981 ; Michelmore et Sansome 1982). Le produit de ce processus sexué, l'oospore, est une structure à longue durée de vie qui peut rester en dormance jusqu'à ce qu'un stimulus provoque la germination comme les exudats de la feuille (Morgan 1983).

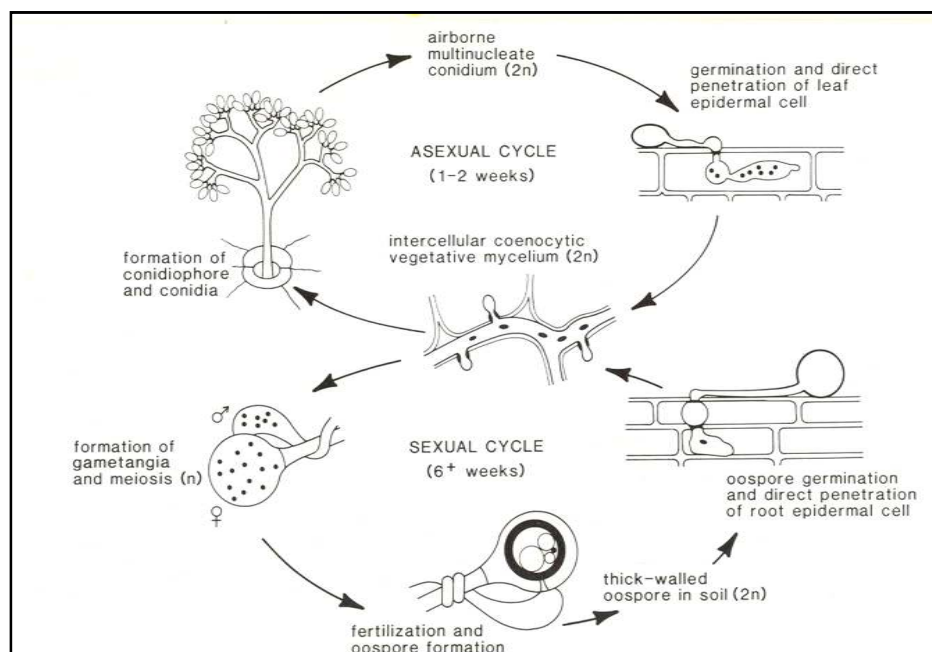


Figure I.12 : Cycle biologique de *Bremia lactucae* (Extrait de Michelmore *et al.* 1988).

Les types sexuels semblent être déterminés par deux allèles à un seul locus avec la compatibilité de type B1 conféré par la condition homozygote récessive et le type B2 par l'état hétérozygote (Michelmore et Sansome 1982 ; Sicard *et al.* 2003). Cependant, les données actuelles n'excluent pas une situation plus complexe comme le double hétérozygote (Michelmore *et al.* 2008) qui fut proposé pour *P. infestans* (Fabritius et Judelson 1997). Certains isolats peuvent produire des oospores même en étant cultivé, isolé d'autres isolats. Ce phénomène est causé par de l'homothallisme secondaire qui pourrait être le résultat d'une trisomie des déterminants du type sexuel (Michelmore et Sansome 1982). Ces isolats se comportent en prépondérance comme des isolats de type B2 car ils produisent des oospores quand ils sont cultivés en combinaison avec des isolats B1 ; mais ils produisent aussi des oospores à une faible fréquence quand ils sont cultivés seuls, particulièrement à de fortes densités d'inoculum.

La prévalence de chaque type varie selon les pays et la plante hôte. Le type B2 prédominerait en Californie et sur la plante sauvage *L. serriola* en Europe alors que les deux types seraient plus répandues sur *L. sativa* en Europe (Michelmore et Ingram 1980 ; Lebeda et Blok 1990 ; Gustafsson *et al.* 1985 ; Lebeda *et al.* 2008). Ce résultat serait en adéquation avec l'important niveau de diversité de virulence observé dans les populations européennes et le faible niveau de diversité de virulence observé en Californie. En effet, cela indiquerait la

présence de reproduction sexuée dans les populations européennes alors qu'en Californie où le type sexuel B1 est très rarement retrouvé, les populations californiennes seraient à propagation essentiellement clonale (Michelmore *et al.* 2008).

5.4.3 Epidémiologie

Tous les stades de croissance de la laitue sont sensibles aux attaques de *Bremia*. Dès la germination des laitues, le *Bremia* peut produire une forte sporulation sur cotylédons verts ou légèrement nécrosés ; à un stade un peu avancé, les cotylédons sensibles jaunissent ou peuvent nécroser fortement. Les premiers symptômes sur feuilles vraies se traduisent par des tâches vertes claires à jaunes, bordées par les nervures sur la face supérieure des feuilles. Un feutrage blanc apparaît généralement 24 à 48 heures après le développement des premiers symptômes sur la face inférieure mais parfois également sur la face supérieure, c'est la sporulation. Finalement, les taches brunissent et pourrissent. Ces lésions peuvent aussi servir de points d'entrée pour des parasites secondaires comme *Botrytis cinerea*.

L'influence des conditions environnementales sur le développement de la maladie est assez bien documentée (Carisse *et al.* 2002 ; Crute et Dixon 1981 ; Nordskog *et al.* 2007 ; Scherm et Van Bruggen 1993, 1994, 1995, Wu *et al.* 2001, 2005 ;). Scherm et Van Bruggen ont étudié l'influence de la température et de l'humidité de la feuille sur l'infection sous condition contrôlée et ils ont démontré que l'infection intervient à des températures comprises entre 5 et 20°C avec, respectivement, un minimum de 4 et 8 heures d'humidité. Ils démontrèrent également par l'intermédiaire de pièges à spores (1995), que la libération de spores et l'infection se produisaient le matin quand l'humidité de la feuille est prolongée. Su et collaborateurs (2000, 2004) ont démontré que sous conditions contrôlées, la lumière ou une diminution de l'humidité relative déclenche la libération de spores. Ils en conclurent que le pic de libération de spores survenait une à deux heures après la levée du jour et que donc la sporulation était essentiellement nocturne. Carisse *et al.* (2002) ont également confirmé ces résultats mais ils ont également observé que la libération des spores étaient associés avec l'augmentation de la vitesse du vent. Les spores libérées peuvent avoir une durée de vie de deux jours. La germination survient entre deux et vingt heures avec la majorité des spores germant dans les cinq heures après contact avec l'hôte. L'eau est nécessaire à la germination, ainsi, éviter la présence d'eau sur les feuilles peut permettre d'empêcher le développement de

Tableau I.2 : Spectres de virulence et codes sextet des 27 souches de référence.

Hôte différentiel	Cobham Green																																				
Lednicky	UC DM2	Dandie	R4T57D	Valmaine	Sabine		LSE 57/15	UC DM10	Capitan	Hilde II	Pennlake	UC DM14		PIVT 1309	LSE/18	LS 102	Colorado	Ninja	Discovery		Argeles	RYZ 2164	RYZ 910457	Bedford	Balesta	Bellissimo											
1	2	3	4	5/8	6		7	10	11	12	13	14		15	16	17	18	36	37		38							11	58	00	00						
1	2	3	4	5	6		7	8	9	10	11	12		13	14	15	16	17	18		19	20	21	22	23	24											
1	2	4	8	16	32		1	2	4	8	16	32		1	2	4	8	16	32		1	2	4	8	16	32		Code Sextet									
Bl: 1	s	s	s	R	s	R	R	R	s	R	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	11	58	00	00							
Bl: 2	s	s	s	s	s	s	s	R	s	R	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R	s	R	R	R	s	s	63	58	00	49							
Bl: 3	s	R	R	R	s	s	s	s	s	R	s	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	s		56	59	01	32							
Bl: 4	s	s	s	R	s	s	R	s	s	R	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	27	59	00	00							
Bl: 5	s	s	R	s	R	R	R	s	s	R	s	s	R	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	05	27	01	00							
Bl: 6	s	s	s	R	s	s	R	R	s	s	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	27	62	00	00							
Bl: 7	s	s	s	s	s	R	s	s	s	R	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	47	59	00	00							
Bl: 10	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	63	59	00	00							
Bl: 11	s	s	R	R	s	s	s	s	s	R	s	s	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	57	59	03	00							
Bl: 12	s	s	R	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	57	63	03	00							
Bl: 13	s	s	R	s	R	s	R	s	s	s	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	21	63	00	00							
Bl: 14	s	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	63	62	00	00							
Bl: 15	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	31	31	00	00							
Bl: 16	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R*	R	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	63	31	02	00							
Bl: 17	s	R	s	s	R	s	R	s	s	R	s	s	s	s	R	R	s	R	s	s	R	R	R	s	R	R	22	59	41	08							
Bl: 18	s	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	R*	R	s	R	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	59	31	10	00							
Bl: 19	s	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	s	s	R	R	R	R	R	R	R	s	R	R	R	R	R	63	62	00	01							
Bl: 20	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	R	R	s	R	s	R	R	R	R	R	R	R	R	R	63	31	10	00							
Bl: 21	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	R	R	s	s	s	R	R	R	R	R	R	63	31	51	00							
Bl: 22	s	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	R	s	R	R	R	R	R	R	s	R	R	59	63	9	00							
Bl: 23	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	R	R	s	R	R	R	R	R	s	R	R	R	R	R	63	31	02	01							
Bl: 24	s	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	R	R	R	s	R	s	R	R	R	s	R	R	R	R	R	59	31	10	01							
Bl: 25	s	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	R	R	R	s	R	s	R	s	R	s	R	R	R	R	R	59	31	42	00							
Bl: 26	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	R	R	s	R	s	s	s	s	s	R	R	R	R	R	63	31	58	01							
Bl: 27	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	R	R	s	s	R	R	s	R	63	63	13	19							

R : Résistant

s : Sensible

Bremia. Dans les cultures, une irrigation des parcelles est préférable en début d'après-midi au lieu du matin où les spores sont libérées. Des températures relativement faibles et des conditions climatiques humides après une période nocturne, favorisent donc la sporulation et l'épidémie de l'agent du mildiou de la laitue.

5.4.4 Virulences

Les souches de *Bremia* sont caractérisées pour leur virulence sur une gamme de 25 hôtes différentiels¹. Chaque souche peut ainsi être identifiée par un spectre de virulence traduit en code sextet pour faciliter les comparaisons entre souches. Pour établir ce code, les 25 génotypes utilisés portant chacun un gène *Dm* ou un facteur de résistance, sont divisés en groupe de 6 et chaque variété se voit attribuer une valeur (1-2-4-8-16-32) (Van Ettehoven and Van der Arend 1999). La première variété de la gamme d'hôtes, Cobham green (Cg), correspond à une variété sensible universelle qui ne rentre pas en compte dans le code sextet. Pour les autres, si le génotype est sensible, la valeur attribuée est retenue alors qu'elle ne l'est pas si elle est résistante. Ensuite, on cumule les valeurs obtenues pour chaque groupe de six génotypes. Ainsi, une souche contournant toutes les résistantes d'un sextet aura une valeur de 63 et une valeur de 0 si elle est avirulente sur tous les génotypes (Tableau I.2).

L'IBEB (International Bremia Evaluation Board), groupe créé vers 1999 réunissant des sociétés de sélection et les services chargés des inscriptions des nouvelles variétés en France et aux Pays-Bas, regroupe chaque année, les spectres de virulence d'isolats de *B. lactucae* présents dans les cultures de l'Europe de l'Ouest. Après, une étude multilaboratoire de certaines des souches identifiées sur les variétés en Europe, l'IBEB peut officialiser leur spectre de virulences. La résistance à cette souche « officielle » ou de « référence », (notée Bl : suivi d'un numéro croissant à chaque nouvelle description²) peut être intégrée aux caractères de distinctions utilisées pour inscrire les nouvelles variétés au catalogue officiel

¹ Avant 2010, les souches étaient caractérisées par une gamme de 20 hôtes différentiels. Au début de la thèse, la gamme d'hôte était donc constituée de 20 hôtes différentiels. Ainsi, les souches isolées lors du projet n'ont pas toutes été pathotypées pour les 25 hôtes différentiels et pour faciliter les analyses, nous considérons seulement les 20 premiers hôtes différentiels sauf indication contraire.

² Avant les années 2000, les souches étaient nommées NL (Blok 1989) et n'étaient pas décrites par l'IBEB. Bl:17 est la première souche décrite selon cette dénomination.

(ex : Bl: 1 à Bl: 26 signifie que la variété est résistante aux souches officielles de *B. lactucae* 1 à 26).

Pour définir ces souches officielles, différents critères sont utilisés (Guenard *et al.* 1999 ; Van Ettehoven *et al.* 1999) comme la stabilité dans le temps et l'espace de la souche isolée, le nombre de virulences sur les gènes de résistance les plus usitées et également des critères commerciaux importants pour les différents sélectionneurs. A ce jour, 27 souches officielles ont été décrites (Tableau I.2).

Ces souches montrent une large diversité de spectres de virulence, suggérant une rapide évolution des souches depuis la description de la souche NL 1 au début des années 60. Les études sur l'évolution des virulences dans différentes populations européennes de *B. lactucae* ont montré une accumulation rapide de virulences nécessaires et la fixation de virulence « non nécessaires » (virulences correspondant à des gènes de résistance non utilisés ou plus utilisés dans les cultivars) (Crute 1987 ; Gustaffson et Larson 1984 ; Gustaffson *et al.* 1985 ; Lebeda et Zinkernagel 2003 ; Wellving et Crute 1978). Néanmoins, aucune souche isolée à ce jour ne possède toutes les virulences lui permettant de sporuler sur toutes les variétés. Les sélectionneurs réalisant du « pyramidage » de gènes dans les variétés cultivées, les cultures peuvent encore être protégées vis-à-vis de plusieurs souches actuelles mais sont toujours soumises à l'évolution des virulences des populations de *B. lactucae*.

Ainsi, l'objectif de la thèse est d'apporter des informations nouvelles sur les stratégies évolutives utilisées par l'agent du mildiou de la laitue, *B. lactucae*, pour contourner les gènes de résistance de l'hôte, en vue d'améliorer la durabilité des résistances. Afin de répondre à cet objectif, l'étude est structurée en trois principales questions de recherche :

1. Quel est l'influence de la reproduction et de la migration sur la structure des populations françaises de *B. lactucae* ?
2. Quelle est l'influence de la pression de sélection des gènes de résistance de la laitue sur la structure des populations françaises de *B. lactucae* ?
3. Comment évolue le polymorphisme d'effecteurs candidats (RxLR) dans des populations de *B. lactucae* soumis à la pression de sélection des gènes de résistance de la plante hôte ?

Dans une première partie (chapitre 2), nous présenterons le développement des marqueurs moléculaires neutres utilisés pour caractériser le rôle des forces évolutives sur la structure des populations de *B. lactucae* et nous indiquerons la stratégie d'échantillonnage mise en place lors de ce projet. Puis, les résultats seront présentés en trois chapitres correspondant aux trois questions de recherche posées.

Le chapitre 3 traitera dans un premier temps de la variabilité génétique en Europe. Dans un deuxième temps, nous décrirons la structure des populations françaises. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un article, en préparation pour une soumission à publication dans *Applied and Environmental Microbiology* où nous répondons, en particulier, à la question de recherche sur l'importance de la recombinaison sexuée et du flux de gènes dans les populations.

Le chapitre 4 consistera en l'étude de l'influence de la pression de sélection des gènes de résistance de la plante hôte sur la structure des populations de *Bremia*. Ces résultats seront également présentés sous la forme d'une publication en préparation pour une soumission dans *Molecular Ecology*.

Enfin je présenterai, dans le chapitre 5, l'évolution d'effecteurs candidats dans des populations de *B. lactucae* soumis à la pression de sélection des gènes de résistance de la plante hôte.

Pour conclure, nous discuterons de l'ensemble des résultats pour déterminer le potentiel évolutif et les perspectives offertes par les travaux de cette thèse pour améliorer la durabilité des résistances au *Bremia*.

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet Resist-Laitue (financé par un fond interministériel) réunissant deux partenaires privés, Gautier Semences et RijkZwaan, et deux partenaires publics, l'INRA (GAFL et UR BIOGER-CPP) et Agroparistech.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dans ce chapitre, les stratégies utilisées pour le développement des marqueurs moléculaires neutres, les problèmes rencontrés ainsi que les stratégies mises en place pour l'échantillonnage d'isolats de *B. lactucae* sont décrits. Nous évoquons également les travaux effectués par les différents partenaires du projet et les résultats qui n'ont pas été discutés dans les chapitres suivants.

1. Développement et mise au point de marqueurs moléculaires

Le faible nombre de données moléculaires de *B. lactucae* disponibles au début du projet de thèse, a nécessité la recherche, le développement et la mise au point de marqueurs moléculaires neutres discriminants pour étudier la diversité génétique des populations de *B. lactucae*. Nous avons choisi de rechercher et de développer des microsatellites. Ce sont des marqueurs nucléaires caractérisés par de courtes séquences (ou motifs) d'ADN répétées, généralement deux, trois ou quatre paires de base (par exemple, AC, GTA, TAGC) qui ont une haute capacité discriminante, sont reproductibles, et sont fréquemment utilisés dans des études de génétique des populations.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour la mise au point de ces microsatellites. Pour chaque méthode, le polymorphisme des marqueurs a été testé pour 16 isolats dont des souches de référence et un isolat prélevé sur *L. serriola*.

1. Une banque enrichie en microsatellites a été construite en 2008 (A. Speck), avant le début du projet de thèse, à partir de la souche de référence Bl: 14. Le séquençage de soixante séquences a permis l'identification de seulement deux microsatellites (Simple Sequence Repeat, SSR) polymorphes. Le nombre de répétitions de ces deux motifs SSR était faible, respectivement (GC)₄ et (AAT)₃. De plus, après la vérification des séquences polymorphes et des profils génotypiques, j'ai décidé de ne pas utiliser ces microsatellites car les tests de qualité n'étaient pas concluants (*i.e.* mauvaise reproductibilité des profils observés au séquenceur et polymorphisme observé en dehors des motifs répétés).

Le faible nombre de microsatellites polymorphes obtenus chez *Bremia*, par cette méthode, confirme la difficulté à caractériser des SSR polymorphes chez les oomycètes (Delmotte *et al.* 2006) et chez certaines espèces de champignons (Dutech *et al.* 2007).

2. Une recherche de marqueurs microsatellites, chez des espèces phylogénétiquement proches de *Bremia* (*Plasmopara viticola*, *Phytophthora ramorum*, *P. infestans*) a été effectuée dans la littérature. Sur les 30 marqueurs testés, aucun n'a répondu positivement à la totalité des tests de qualité. Ainsi, le transfert interspécifique de marqueurs microsatellites semble faible ; ce même type de résultats a déjà été observé chez des champignons (Dutech *et al.* 2007).

3. Seize SSR ont été identifiés dans une banque EST réalisée à l'université de Davis en Californie par l'équipe de R. Michelmore. J'ai testé le polymorphisme de ces microsatellites et deux se sont avérés polymorphes pour les souches testées (Rv_B14 et Rv_B16) et ont été utilisés dans l'analyse de la structure génétique des populations de *Bremia*.

4. Au début de la seconde année de la thèse, une nouvelle méthode couplant la production d'une banque ADN enrichie en microsatellites avec les technologies de séquençage à haut débit a été mise au point (Malausa *et al.* 2011). Cette technique a permis l'obtention de 21098 séquences brutes génomiques de *Bremia*. Parmi les séquences supérieures à 80 paires de base (pb), 1588 comportaient des motifs microsatellites répétés au minimum quatre fois permettant ainsi le dessin d'amorces pour 367 loci microsatellites dont 287 présentaient des motifs « parfaits », c'est-à-dire non interrompus dans leur répétition. A partir de ces 367 loci, 40 ont été choisis en fonction de la longueur de la séquence (entre 100 et 250 pb), du nombre de motifs répétés et de la température d'hybridation des amorces. A partir de ces 40 microsatellites, 10 loci ont été validés pour leur polymorphisme et leur reproductibilité.

Ainsi, 12 marqueurs microsatellites ont été utilisés dans l'étude de la diversité génétique de *B. lactucae* (Article 1).

Suite à la difficulté à obtenir des marqueurs microsatellites polymorphes lors de la première année du projet, des marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ont également été développés (Vos *et al.* 1995 ; Meudt et Clarke 2007). Après la mise au point de la technique sur le séquenceur, nous avons choisi une douzaine de combinaisons

d'amorces sélectives du type *EcoR1*-XX et *Mse1*-XXX. Ce type de combinaisons donnait des profils génotypiques intéressants en terme de nombre de marqueurs. Néanmoins, la mauvaise reproductibilité et lisibilité des profils sur le séquenceur n'a pas permis d'utiliser ces marqueurs pour l'analyse de la variabilité génétique de *Bremia*.

2. Echantillonnage des isolats de *B. lactucae*

Plusieurs stratégies d'échantillonnage ont été mises en place lors de la durée de la thèse.

2.1. Prélèvements de *B. lactucae* sur les variétés cultivées

1. Des prélèvements ont été réalisés chez des agriculteurs sur les variétés cultivées dans les cinq principaux bassins de production qui sont le Sud-Est, le Sud-Ouest, le Centre-Ouest, l'Ouest et le Nord. Cet échantillonnage a été effectué dans des cultures de plein champ et des cultures sous-abris. Le type de culture (agriculture biologique ou conventionnelle) a également été renseigné. Les prélèvements ont été réalisés à la fois par les partenaires privés (RijkZwaan et Gautier Semences S.A.S) et par l'équipe du GAFL dirigée par B. Maisonneuve. Lors de chaque prélèvement, au moins dix feuilles infectées par *B. lactucae* provenant de dix plantes différentes ont été échantillonnées. A partir de chaque feuille avec des symptômes, un isolement et une multiplication de la souche a été effectuée chez les différents partenaires. Les isolats ont été stockés à -80°C avant d'être transférés à Grignon (UR Bioger-CPP) où l'ADN génomique a été extrait et le génotypage a été effectué. Au total, plus de 40 sites différents ont été échantillonnés, 850 souches issues de ces prélèvements ont été isolées, multipliées et génotypées pendant la durée de ce projet.

2. Un suivi pluri-annuel a été réalisé dans neuf sites dans le Sud-Est. Chaque partenaire (Rijk Zwaan, Gautier semences, GAFL) a suivi plusieurs sites, et prélevé au moins dix isolats dans chaque culture quand il y avait une épidémie de *B. lactucae*. Cette stratégie d'échantillonnage nous a permis d'étudier l'évolution des populations de *Bremia* au cours du temps dans le plus important bassin de production de laitue français.

2.2. Echantillonnage de souches aériennes de *B. lactucae*

Dans les neuf sites suivis, des boîtes pièges composées de plantules au stade cotylédons étalés, de trois génotypes différents, Cobham green, Lednicky (*Dm1*), PIVT1309 (*Dm15*), ont été disposées dans des cultures (Fig. II.1). Cette méthode de piégeage (mise au point par B. Maisonneuve) a permis d'isoler plus de 200 souches « aériennes » de *B. lactucae*. Cette méthode permet comparer les génotypes et les phénotypes de virulence des isolats « piégés » avec ceux des variétés cultivées.



Figure II.1 : Boîte piège disposée dans une culture de laitue (Photo de B. Maisonneuve).

3. Phénotypes de virulence

A chaque prélèvement, les partenaires ont phénotypé sur les hôtes différentiels au stade cotylédons étalés, au moins un isolat. Ainsi, plus de 400 pathotypes ont été caractérisés lors du projet.

4. Informations complémentaires

4.1. Isolement monospore

L'isolement monospore n'est pas possible pour chaque isolat prélevé (très long et coûteux en moyen humain et financier). Or, des auteurs ont montré qu'une feuille pouvait être

tel-00769939, version 1 - 4 Jan 2013

infectée par plusieurs souches de *Bremia* (Gustaffson *et al.* 1985). Pour éviter un biais important dans les analyses, des isolements monospores ciblés ont été effectués selon le protocole établi au GAFL (Jean et Maisonneuve 2010). Ces isolements monospores ont été réalisés pour des isolats de chaque génotype identifié dans les cultures françaises (déterminé par les 12 microsatellites). Plus de 30 génotypes ont ainsi été vérifiés par des isolements monospores. Dans la majorité des cas, le génotype déterminé avec les monospores est identique à celui déterminé avec l'isolat d'origine. Pour cinq isolats, la différence entre les génotypes des monospores et de l'isolat d'origine ne provenait que d'un seul allèle à un locus ce qui, après vérification des profils génotypiques, semble indiquer la présence d'allèles nuls (mauvaise amplification d'un allèle ou erreur à la première lecture). Seuls deux génotypes préalablement identifiés correspondraient pour chacun à un mélange de deux souches différentes. Ces génotypes n'ont donc pas été inclus dans les analyses. Par contre, il est intéressant de noter que dans l'un des deux cas, les deux isolats en mélange présentaient deux types sexuels différents (B1 et B2).

Cette vérification des génotypes, par l'isolement monospore, nous a permis de postuler qu'une feuille présentant des symptômes n'est infectée que par une seule souche de *B. lactucae*.

4.2. Analyses complémentaires

Les prélèvements d'isolats de *B. lactucae* ont été effectués dans différents type de culture (sous-abri, plein champ, dans des cultures conventionnelles et biologiques). Nous avons analysé la variabilité génétique des isolats selon ces types de culture. Les résultats indiquent que les types de culture n'ont pas d'effet sur la structure génétique des populations de *B. lactucae*.

Les isolats prélevés dans les sites suivis par les partenaires ont été utilisés dans les analyses effectuées dans les chapitres suivants. Néanmoins, nous ne traiterons pas l'évolution temporelle des populations de *B. lactucae* dans le Sud-Est. Une analyse préliminaire des résultats a montré une stabilité dans les fréquences des virulences au cours du temps et une faible variabilité génétique (Maisonneuve *et al.* 2012). La rédaction d'un article traitant de l'évolution des populations de *Bremia* dans le Sud-Est sera réalisée au cours de l'année 2012.

CHAPITRE 3

DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE *BREMIA* *LACTUCAE* EN EUROPE ET STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS FRANÇAISES

1. Introduction

L'objectif de ce chapitre est de réaliser une première caractérisation de la variabilité génétique de souches européennes, de la structure génétique des populations françaises de *B. lactucae* et d'estimer quelles forces évolutives influencent cette structure.

Dans un premier temps, j'ai développé un set de microsatellites que j'ai validé en analysant la variabilité génétique des souches officielles et d'isolats d'une collection mondiale. J'ai ensuite utilisé ces marqueurs pour analyser la structure génétique des populations françaises de *Bremia* et estimer, plus particulièrement, la recombinaison au sein des populations et la migration, à la fois dans le compartiment cultivé et entre le compartiment sauvage-cultivé.

2. Résultats et discussion : Article 1

Les résultats obtenus sont présentés ci-après sous la forme d'un article en préparation pour une soumission à la revue Applied Environmental Microbiology :

Article 1: Genetic diversity of *Bremia lactucae* at the world and French regional scale

Title: Genetic diversity of *Bremia lactucae* at the worldwide and French regional scale.

Running title: Genetic diversity of *B. lactucae*

Authors: R.Valade², B. Maisonneuve³, C. Neema¹

¹AgroParisTech, UR BIOGER-CPP; ² INRA, UR BIOGER-CPP, 78850 Thiverval-Grignon, France

³INRA – UR1052, Unité de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, 84143 Montfavet , France

Corresponding author: C. Neema; e-mail: neema@supagro.inra.fr

Abstract:

Most pathogens are submitted to high selection pressure that can be induced by several variables according to their life traits. In the case of plant pathogens, host resistance may be considered as the main driving force of pathogen evolution, with pathogens evolving to overcome host resistance strategies. In the model system, *Bremia lactucae*, the causal agent of downy mildew on *Lactuca sativa*, several specific resistance genes are used to counter this pathogen with a heterogeneous spatial distribution in crops. In turn, pathogens show a rapid adaptation to host resistances, and characterization of population genetic structure could be an important step to identify evolutionary strategies used by pathogens to overcome host resistance.

Microsatellite markers were developed to study the genetic diversity of this biotrophic, heterothallic and diploid pathogen, and to determine the impact of recombination and migration on pathogen population structure. More than 300 isolates were recovered in France from 18 regions and different cultivars (carrying different resistance genes) of *L. sativa*. Genotypic diversity and gene diversity were low in the 18 populations sampled. Nine multilocus genotypes (MLG) were identified in France; among them, two were predominant. Results showed high clonality in French populations and gene flow between populations. The occurrence of gene flow between the wild and crop pathosystems was also shown. These results are discussed regarding durable resistance management.

Introduction:

In plant-pathogen interactions, selection drives the evolution of pathogens to counteract plant defenses and escape host recognition, which is similar in the case of gene-for-gene interactions. Pathogen adaptation is then determined by its evolutionary potential, which strongly depends on the genetic diversity within populations.

Several questions then arise: How much variation is present in populations? How does an adapted pathogen population maintain diversity? Which evolutionary forces drive the population dynamics? These questions are crucial for agrosystem management since most of the control methods are counteracted by almost all pathogens.

Bremia lactucae Regel, the pathogen responsible for lettuce downy mildew, is a good model to address these issues. It is a diploid oomycete that belongs to the Peronosporaceae family, an obligate pathogen host that is specific and primarily limited to the plant genus, *Lactuca* (Crute and Dixon 1981; Lebeda and Syrovátka 1988). *L. serriola*, the most common wild host species of this pathogen in Europe (Lebeda 2002), could be a source of inoculum for cultivated lettuce. Since the 1960s, breeding for resistance to *B. lactucae* has been a major challenge for breeding companies. Resistant cultivar studies showed that the interaction between *L. sativa* and *B. lactucae* is generally consistent with a gene-for-gene relationship (Crute and Johnson 1976; Farrara et al. 1987; Hulbert and Michelmore 1985; Illot et al. 1987; Crute 1992). Indeed, resistance is determined by avirulence factors of the pathogen that are recognized by major *Dm* (downy mildew) resistance genes (Lebeda et al. 2002; Maisonneuve et al. 1994; Michelmore et al. 2008), which confer high levels of resistance. However, *B. lactucae* has shown a considerable ability to break down new resistance introduced in lettuce, even with resistance genes introgressed from different wild *Lactuca* species. This quick adaptation to resistance leads to a high diversity of virulence available for *B. lactucae* populations. The understanding of evolutionary strategies used by the pathogen to break down new resistance is a major step towards improving resistance durability.

Analysis of virulence in population pathogens is useful for identifying the dynamics of virulence change, but the causes of genetic change are more difficult to determine. Knowledge about genetic diversity and evolutionary forces such as migration and recombination is required to identify adaptive mechanisms of pathogens to break down the plant resistance.

The specific aims of this study were to (i) develop microsatellite markers to study the genetic diversity of *B. lactucae*, (ii) investigate the genetic diversity and population structure of

lettuce downy mildew in France, and (iii) explore the hypothesis of a gene flow between crops and wild pathosystems.

Materials and methods:

***Bremia lactucae* samples:**

A total of 421 isolates of *Bremia lactucae* were recovered from 397 *L. sativa*, a cultivated lettuce, and 24 *L. serriola*, a wild lettuce.

Within the 397 isolates collected on cultivated lettuce, 39 belonged to a worldwide collection and had been isolated by collaborators and 21 isolates were official strains (Table 1). Official strains (designated “Bl”) are characterized by their virulence pattern against a host range of 25 lettuce genotypes, each harboring a specific resistance gene. Official strains have represented a part of *B. lactucae* virulence phenotypic diversity in Western European crops for the past 50 years.

In the other part, 337 isolates were recovered from contaminated cultures at 18 sites in France between December 2008 and August 2010. At each site, at least ten isolates were collected from ten different plants of the same cultivar (Table 2).

Ten isolates of *B. lactucae*, recovered on artichoke (supplied by Vegenov, Bretagne Biotechnologie Vegetale, 29250 Saint Pol de Léon, France) in French Brittany, were used as an outgroup.

Isolation of *B. lactucae* and DNA extraction:

One leaf with symptoms of downy mildew (sporulation or typical chlorotic spots) was taken from each diseased lettuce plant and one isolate was isolated. Isolation and multiplication were done as previously described (Maisonneuve et al. 1999). Genomic DNA was extracted from *B. lactucae* spore suspension using the DNeasy Plant kit (Quiagen) according to the manufacturer's instructions.

Identification of microsatellites markers:

Microsatellite markers were isolated by combining a biotin-enrichment protocol adapted from Kijas et al. (1994) and next generation pyrosequencing through 454 GS-FLX Titanium technology (Roche Applied Science) at Genoscreen (Lille, France). Genomic DNA (2 µg) was obtained from an admixture of five isolates from France recovered on *L. sativa* (3) and *L. serriola* (2) to maximize diversity. The biotin-enrichment protocol, like the 454 pyrosequencing, is described in Malausa et al. (2011).

Primer designs were done with 454 sequences obtained with QDD software (Meglécz et al. 2010). Enrichment adaptors were removed and sequences longer than 80 bp, which present at least four repeats of perfect microsatellites, were selected for further analysis. Sequence similarities were computed through an “all against all” BLAST (Altschul et al. 1997) in which microsatellite motifs were soft masked. Sequences for which pairwise similarity along the flanking regions was over 95% were grouped into contigs, and a 2/3 majority rule consensus sequence was created from each contig. Sequences that had a significant BLAST hit to other sequences with an overall similarity in the flanking region of below 95% were discarded to avoid potential intragenomic multicopy sequences. All unique sequences (with no BLAST hit to any other ‘454’ reads) and consensus sequences were checked for the presence of short repetitions in the flanking regions (Martin 2010). PCR primers were designed using QDD with the following criteria:

(a) target microsatellites displayed at least four repetitions, (b) the length of PCR product was between 100 and 300 bp, and (c) annealing temperatures of primer pairs were between 50 and 64°C with less than 4°C difference between primers. Among the 287 sequences for which primer pairs could be designed, 40 sequences were selected with a size of between 115 and 250 bp. Amplifications were performed with forward primers labeled with WellRed fluorescent dyes (FAM, HEX or NED).

Amplification reactions consisted of 10 ng template DNA, 200 µM dNTPs, 1 U *Taq* DNA polymerase (Promega), 2 mM MgCl₂, and 0.2 µM of each primer pair in a 10-µL reaction volume. Amplifications were run in an Applied Biosystems PCR system 9700 thermocycler, with initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 58°C or 60°C for 30 s according to the primer pair hybridization temperature, 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were loaded with a loading buffer (Promega) on agarose gel (3%) and visualized with an imager. PCR products were sized by capillary electrophoresis on an automated Beckman sequencer (CEQ 8000).

Sixteen microsatellite loci identified in a cDNA library (provided by R. Micheltore, unpublished data) were also screened for polymorphism using the above protocol.

Data analysis

Gene diversity was calculated for each locus and for each population, and estimated by expected heterozygosity (H_e , Nei's unbiased gene diversity, 1978). Gene diversity, observed heterozygosity and allelic richness were calculated using Fstat 2.9.3 (Goudet 1995).

Genetic distances among identified multilocus genotypes (MLG) were calculated over the 12 microsatellite loci using Cavalli-Sforza and Edwards chord distance (D_c) (Cavalli-Sforza and Edwards 1967), which is an appropriate distance for tree constructions (Kalinowski 2002). D_c was calculated with Microsat software (MSAT 2001) and an UPGMA tree was inferred from the distance matrix and visualized using Phylip software, version 3.68 (Felsenstein 1989). Bootstrapping of data was conducted in Phylip using 1,000 permutations.

To examine the relationships among isolates, minimum spanning networks (MSN) were constructed using the genetic distance of Bruvo et al. (2004), which incorporates microsatellite repeat numbers. Genetic distance matrices were calculated for all MLGs identified in France. MINSFNET (Excoffier 1993) was used to generate MSN from genetic distance matrices and trees were visualized with Hapstar (Excoffier 2005).

An MLG may result from distinct sexual reproduction events or clonal reproduction. We therefore estimated the probability (P_{sex} n re-encounter) of observing at least n times an MLG resulting from sexual reproduction. P_{sex} was estimated for all MLGs found at least two times in France, using Genclone 2.0 software (Arnaud-Haond and Belkhir 2007)

The clonal genotype diversity was calculated as $R = (1 - G)/(1 - N)$, where G is the number of MLGs present in a sample and N is the sample size. Another way was used to estimate the genotypic diversity, defined as the probability that two individuals taken at random have different multilocus genotypes, and was calculated using Multilocus (Agapow and Burt 2001) as the measure of multilocus linkage disequilibrium (r_d). r_d is based on the index of association corrected for the number of loci (Agapow and Burt 2001). Departure from random association of alleles across loci was assessed by bootstrapping alleles among individuals, 1000 times independently for each locus.

Assuming that each sampling site represented a distinct population, we computed pairwise F_{st} estimates for all French populations of *B. lactucae*, following the procedure of Weir and Cockerham (1984) and using Fstat 2.9.3 (Goudet 1995). Because inclusion of clonal multicopies can strongly distort linkage disequilibrium and F -statistics, F_{st} were estimated by using all datasets and clone-corrected data (one copy of each different MLG per population).

The unbiased estimator of Wright's F_{is} , was calculated according to Weir and Cockerham (1984) using Fstat 2.9.3 (Goudet 1995) to test the hypothesis of random union of gametes in each population.

A principal component analysis (PCA) was performed using the procedure available in the adegenet package (Jombart 2008) for R statistical freeware, version 2.7.2 (the R Foundation for Statistical Computing, 2008). PCA does not require strong assumptions such as the Hardy-Weinberg equilibrium or the absence of linkage disequilibrium between loci (Jombart et al. 2009), unlike methods of Bayesian clustering algorithms like those implemented in Structure 2.2 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003a).

Isolation By Distance (IBD) was assessed using the “isolde” procedure implemented in Genepop (Raymond and Rousset 1995), which tests the correlation between genetic and geographical distances using the regression of $F_{st}/(1-F_{st})$ ratios on the logarithm of distances, as suggested by Rousset (1997) for two-dimensional populations. The significance of regression slopes was evaluated from Mantel tests performed across 1000 permutations.

Results:

Development of microsatellite markers:

Among the 287 microsatellite loci obtained by pyrosequencing, 40 loci were selected to screen for polymorphism in a subset of eight isolates chosen from different origins in the worldwide collection. Within 40 microsatellite loci, ten showed polymorphism (25%) and were thus retained to study the genetic diversity of *B. lactuca*.

Of the 16 microsatellite loci identified in the cDNA library, only two were polymorphic (12.5%) for the set of eight isolates.

These 12 loci were then used for *B. lactuca* strain genotyping.

Characterization of microsatellite loci

Microsatellite alleles were determined for 60 strains collected on *L. sativa* (39 from a worldwide collection and 21 official strains) and seven strains collected on *L. serriola* (Table 1).

The 12 microsatellites were polymorphic for the set of 67 strains studied. Microsatellite allele sizes from all isolates were scored. The number of alleles observed at each locus ranged from two to seven, with the largest number of alleles identified at locus AIP11 (Table 3). Amplifications of these 12 microsatellite loci were also performed for ten strains recovered on

artichoke (Vegenov-BBV collection) in order to test transferability to other *Bremia* of the markers. Of the 12 microsatellite primer pairs tested, only four (33%) consistently produced an amplicon (Table 3).

Observed heterozygosity ranged from a value of 0.044 to 0.514, with an overall value of 0.285. Considering that the number of allele combinations per locus equals $n(n+1)/2$, where n is the number of alleles, 2.2×10^9 possible genotypes may be identified using those 12 microsatellites. To ensure that the set of loci used provides enough power to discriminate all multilocus genotypes (MLG) present in the sample, a Monte Carlo procedure was applied using Genclone software (1000 permutations) (Arnaud-Haond et al. 2007). The asymptote reached when plotting MLGs as a function of subsampled microsatellite markers showed that the set of loci allows an accurate determination of the number of genotypes in the sample.

Forty-six multilocus genotypes (MLG) were identified in the set of 67 strains studied, with 34 MLGs represented by a single strain (Table 1). Within 21 official strains, 19 MLGs were identified with three strains (Bl: 18; Bl: 24; and Bl: 25) sharing the same MLG (Table 1).

The unrooted UPGMA tree based on chord distance (Cavalli-Sforza and Edward 1967) showed that Australian isolates and North American strains were grouped in a clade that was different from that of the Europeans strains (Fig. 1). Official strains and isolates from *L. serriola* are generally found in the European clade.

Genetic diversity of *B. lactucae* in France:

Polymorphism for the 12 microsatellite loci previously described was determined for 337 *B. lactucae* isolates collected at 18 sites in France. One locus was monomorphic (locus RV_BL6), whereas the others were polymorphic with 27 alleles detected. All of these alleles had already been identified in the worldwide collection previously studied.

One to four alleles per locus were observed. Locus AIP11 simultaneously presented three alleles for 31 isolates. Thus, to facilitate further analyses and because the microsatellite dataset was discriminating enough with 11 microsatellites, the locus AIP11 was eliminated from the dataset. Nine MLGs were identified for the 337 strains studied (Table 4). Among them, two were common: MLG55 (46% of the isolates) and MLG7 (32% of the isolates).

At the French regional scale, clonal genotype diversity ($R = 0.024$) was low. Moreover, the probability of the same MLG occurring more than once because of recombination in a

randomly mating population (P_{sex}) was less than 0.05 for seven of the eight MLGs sampled at least twice at the French regional scale (Table 4).

Clonal genotypic diversity was low in all 18 French populations studied, reaching a maximum of 0.125 (Table 2). MLG55, the most frequent MLG, was essentially identified in southern populations and inversely MLG7, the next most frequent, was essentially observed in center-west populations (Fig. 2).

The mutational relationships among the nine MLGs are illustrated in the minimum spanning network (MSN) (Fig. 3). All MLGs were closely related except MLG1, which was found in only one population and composed of three private alleles. MLG55 and MLG7, the most frequent ones, are found on each side of the center of the network.

Structure of *B. lactucae* French populations

F-statistics indices

F_{is} values, which measure heterozygote deficit within populations, were significantly negative for all populations, indicating an excess of heterozygotes (Table 2). Furthermore, all r_d values were significantly different from those expected under random mating. With clone-corrected data, r_d values were never significantly different from the zero value expected for a panmictic population.

Genetic differentiation between French populations was significantly different from zero for 97 pairs out of 153. The highest F_{st} ($F_{st} = 0.3506$) was observed between the farthest northern population and a southern population. However, F_{st} was never significantly different from zero with clone-corrected data.

Clustering analysis

A PCA analysis distinguished five groups of populations (Fig. 4). The relative contributions of the first three axes to the total genetic variation were 44, 26 and 17%, respectively. Three groups were each constituted of only one population and were well separated from the other two groups. Each group was primarily represented by populations from the same area, as was suggested by the breakdown of MLGs in each population (Fig. 2). Two center-west populations (Roz sur Couesnon and Mont Saint Michel) were well isolated, but they were closer to a group mostly composed of center-west populations, whereas the separated group composed of only one southern population (les Garrigues) was closer to the group primarily composed of southern populations. The two largest groups were only separated by the first axis.

Isolation by distance

A low but significant positive correlation ($P < 0.05$, $R^2 = 0.07$, $y = 0.031x + 0.052$) was identified between the matrix of geographical distances among all populations and the matrix of genetic distance values ($F_{st}/(1-F_{st})$) (Rousset 1997).

Relationship between isolates from cultivated and wild lettuce

Twenty-four isolates recovered from *L. serriola* were genotyped with the 12 microsatellites. Thirty-three alleles were identified and eight MLGs were determined. Within these eight MLGs observed on prickly lettuce, six MLGs were specific to this host plant and two MLGs (MLG 55 and MLG1) were shared by isolates of the two host species.

Discussion:

Isolation and characterization of microsatellite loci:

Microsatellite markers, which are codominant markers, are powerful in population genetic studies of diploid organisms. However, the characterization of microsatellite markers can be very difficult and time-consuming (Dutech et al. 2007), especially in oomycetes. Few and unreliable markers were obtained by the classic method using an enriched DNA library (Speck, pers. unpublished). Two polymorphic microsatellite loci were obtained from EST provided by Micheltore et al. (2008). However, this method was not very efficient since only 2.5% of the loci tested were polymorphic.

New microsatellites were obtained using a new method that combined enriched DNA libraries and pyrosequencing (Malausa et al. 2011). In Malausa et al. (2011), the number of microsatellite markers isolated with this new procedure for 13 taxa were much larger and were obtained with a much lower cost and within a shorter length of time than traditional isolation techniques. Concerning *B. lactucae*, this technique provided 287 potential microsatellites with perfect motifs, which is slightly lower than the mean observed for the 13 taxa in Malausa et al. (2011). As a result, this process that combined multiplex enrichment and pyrosequencing was cost and time-efficient and can be a good alternative method for developing microsatellite markers in exotic organisms (Malausa et al. 2011).

Most of the isolates showed one or two alleles at each locus. However, the presence of three alleles was detected in 31 isolates at one locus (AIP11 locus). This result is not surprising since hyperploidy was previously detected in *B. lactuca* isolates by Hulbert and Micheltore

(1988). To confirm that hyperploidy was not the result of mixtures, cultures of single conidia from these isolates were carried out. Gene duplication could be an explanation for hyperploidy. However, no genetic variability was observed in this pattern and it was always the same three alleles that were present, with all the isolates sharing the same MLG. More likely explanations could be natural somatic variation or fusion of two diploid isolates of the same mating type since it had already been observed for *B. lactucae* (Michelmore et al. 2008) or other oomycetes (Ioos et al. 2007; Rumbou et al. 2005; Tooley et al. 1993).

Low genetic diversity was observed for the microsatellite markers developed. Nevertheless, the set of loci was powerful enough to determine an accurate number of genotypes; furthermore, the number of alleles identified per locus was in the same range as for other oomycetes (Delmotte et al. 2006; Ioos et al. 2007; Lees et al. 2006; Goss et al. 2009; Prospero et al. 2007), suggesting a relatively weak diversity for SSR markers in oomycetes.

Official strains were identified by different MLGs, except for three strains that shared the same MLG. Moreover, genetic diversity in official strains showed an important genetic variability in *B. lactucae*, which is consistent with virulence phenotype diversity in European populations (Lebeda et al. 2003).

Gene flow

Amplification of the 12 microsatellite markers with isolates of *B. lactucae* recovered from artichoke showed that only four markers gave reproducible amplicons. This result suggested a lack of interbreeding between isolates recovered from *Cynara scolymus* (artichoke) and those from *Lactuca* sp. Infected artichokes are therefore not likely to be a source of inoculum for *Lactuca* species, as was suggested for other Asteraceae (Lebeda et al. 2002; Volgmayr et al. 2004; Thines et al. 2010). Moreover, this result suggested that genetically distinct lineages could exist in *B. lactuca* species and could indicate special forms, as has been proposed by several authors (Choi et al. 2011; Thines et al. 2010; Volgmayr et al. 2004). The 12 microsatellite markers were successfully amplified for the 24 isolates recovered on *L. serriola*, confirming the close relationship between these isolates. Eight different MLGs were identified for these 24 isolates, two of which were shared with isolates recovered on *L. sativa* in France, suggesting a gene flow between the two pathosystems. This result confirmed those previously obtained by Lebeda (Lebeda et al. 1988; Lebeda et al. 2004; Lebeda et al. 2008).

The genetic differentiation of the overall *B. lactucae* French populations is low since no genetic differentiation was observed between populations when clone-corrected data per

population was used. Gene flow appears to occur at a large scale in France and this result was confirmed by the presence of two common MLGs, which were observed in populations separated by a distance of 680 km (Châteaugiron and Perpignan) for MLG55, and 800 km (Gatteville le Phare and Fontvieille) for MLG7. Human-induced transport could be an explanation of this long distance dispersal, which could be done by transport of infected seedlings between nurseries and crops. Aerial dispersion of asexual sporangia could also be an explanation but no studies have been conducted to demonstrate aerial long-distance dispersal of spores of *B. lactucae*. Wu et al. (2001) showed that the influence range of downy mildew incidence at one location on other locations was between 80 m and 3000 m. Nonetheless, a study was done in an area of approximately 100 km in length without using genetic markers. Moreover, it is generally assumed that sporangia of downy mildew pathogens can also be dispersed over long distances by wind (Crute 1981). Prospero et al. (2009) showed that for *Phytophthora ramorum*, genetic exchanges have occurred at a large scale.

Recombination:

Genotypic diversity and gene diversity were low in the 18 populations sampled, with nine MLGs identified in France. Among them, two were predominant.

Moreover, significant excess of heterozygotes was observed in all populations and multilocus analysis rejected the possibility of recombination within French populations. The combination of these results provides strong evidence for clonal reproduction in French populations. Indeed, a strong negative value of *Fis* is expected in clonal organisms (Balloux et al. 2003; Halkett et al. 2005), and clonal reproduction generates non-random association between loci (linkage disequilibrium) (Awadalla 2003). Moreover, the P_{sex} value associated with French MLGs indicated clonal reproduction.

Despite this indisputable high clonality observed in French populations of *B. lactucae* and also observed in other oomycetes (e.g., Montarry et al. 2008; Prospero 2009), we cannot reject the hypothesis that several events of sexual recombination could occur at a low rate in French populations. Indeed, both mating types were observed in France and one MLG (MLG60) could be the result of a sexual recombination event as indicated by its P_{sex} value. However, MLG55 and MLG60 were closely related genotypes that are more probably the result of somatic mutation than sexual recombination, and this mechanism has been shown to be significant in other oomycete populations (Goodwin et al. 1994; Dobrowolski et al. 2003; Ivors et al. 2006). Furthermore, all loci were homozygous for MLG60, so this pattern could

then be the result of a mitotic recombination. Mitotic recombination generally refers to crossing-over during mitosis, which results in the loss of heterozygosity at all loci distal to the chromosomal breakpoint. Loss of heterozygosity may also be the result of mitotic gene conversion, in which case only a small segment of the chromosome is altered (Goss et al. 2009). Mitotic recombination is thought to be responsible for frequent observations of loss of heterozygosity in *P. infestans* allozymes (Goodwin 1997) and *P. cinnamomi* microsatellites (Dobrowolski et al. 2003). Mitotic gene conversion has been observed in *P. sojae* (Chamnanpant et al. 2001). Mitotic recombination or gene conversion may also provide an explanation for homozygosity observed at all loci for MLG60 instead of sexual recombination.

The French center-west populations showed higher genetic and genotypic diversity, and higher observed heterozygosity than the southern populations (data not shown). These results suggested that several events of sexual reproduction could have occurred in center-west populations. The distribution of the host plant could be a key factor underlying this phenomenon. Indeed, lettuce production in France is greater in the southeast where lettuce is cultivated throughout the year at the regional scale, whereas in the center-west region, lettuce production is absent for four or five months. Sexual recombination could therefore be used by the pathogen to develop oospores and to survive during crop-free periods.

Structure and evolution of French *B. lactucae* populations

The PCA analysis confirmed a weak structure between center-west and southern populations of *B. lactucae* in France. Indeed, five groups of populations were identified and these populations were mostly clustered according to their geographical area. This result is also corroborated by the result of the minimum spanning network. Indeed, the nine MLGs in the MSN also tend to be grouped by geographical area of identification and MLGs seem to evolve gradually by stepwise mutation from the common MLG of each geographical area of identification. This result can be explained by gene flow at a high scale, which would be less efficient than gradual dispersion. Besides, a weak isolation by distance was found. New MLGs would therefore evolve at local sites according to a stepwise mutation model and would not always be widely dispersed. The shape of the network suggested the presence of different clonal lineages, especially between the two most common MLGs.

As a result, clonal lineages could be the outcome of directional selection related to a rare event of sexual recombination and mutation. However, further research is needed to study the

impact of resistance gene selection on the population structure of *B. lactucae* and to determine the evolutionary dynamics of adaptation in these organisms.

Acknowledgements

These studies were carried out within a partnership with Gautier Semences and Rijk Zwaan breeding companies within the framework of the RESIST-LAITUE project selected by the PEIFL “Pôle de Compétitivité”. We thank the colleagues of both companies in charge of this program, especially F. Moquet, M. Buisson and M. Deville for Gautier Semences, and A. Thabuis and M. Villevieille for Rijk Zwaan. For technical assistance with molecular tools, we are grateful to A. Ducasse at Bioger–CPP and to L. Jean, S. Jeuniau, E. Julliard, M. Lovera and J. Gaudin at INRA, M. Blachier at Rijk Zwann, and N. Bourdet at Gautier Semences for their technical assistance with *Bremia* collection and tests. We would also like to thank the growers and agricultural advisers who informed us about *Bremia* emergency. This program was supported by French Ministry grants 08290-6142, -6143, -6144 and -6194 (FUI grants) and a regional (Provence-Alpes-Côte d’Azur) grant within the RESIST-LAITUE project.

References

- Agapow PM, Burt A** (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* 1, 101-102.
- Altschul S, Madden T, AA S, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Arnaud-Haond S, Belkhir K** (2007) GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Mol Ecol Notes* 7, 15 - 17.
- Awadalla P** (2003) The evolutionary genomics of pathogen recombination. *Nature Reviews Genetics* 4, 50-60.
- Balloux F, Lehmann L, de Meeus T** (2003) The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics* 164, 1635 - 1644.
- Bruvo RI, Michiels NK, DeSouza TG, Schulenburg H** (2004) - A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. - 13, - 2106.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AW** (1967) Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet.* 19, 233-257.
- Chamnanpant J, Shan WX, Tyler BM** (2001) - High frequency mitotic gene conversion in genetic hybrids of the oomycete *Phytophthora sojae*. *Proc Natl Acad Sci*; 98(25):14530-5.
- Choi Y-J, Thines M, Runge F, Hong S-B, Telle S, Shin H-D** (2011) Evidence for high degrees of specialisation, evolutionary diversity, and morphological distinctiveness in the genus *Bremia*. *Fungal Biology* 115, 102-111.
- Crute IR** (1992) From breeding to cloning (and back again?): a case study with lettuce downy mildew. *Ann Rev Phytopathol* 30, 485-506.
- Crute IR, Dixon GR** (1981) Downy mildew diseases caused by the genus *Bremia* Regel : In D. M. Spencer (Ed.), *The downy mildews* (pp. 421–460). London, New York, San Francisco: Academic Press.
- Crute IR, Johnson AG** (1976) The genetic relationship between races of *Bremiae lactucae* and cultivars of *Lactuca sativa*. *Annals of Applied Biology* 83, 125-137.
- Delmotte F, Chen WJ, Richard-Cervera S, Greif C, Papura D, Giresse X, Mondor-Genson G, Corio-Costet MF** (2006) Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. *Molecular Ecology Notes* 6, 379-381.
- Dobrowolski M, Tommerup I, Shearer B, O'Brien P** (2003) Three clonal lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia revealed by microsatellites. *Phytopathology* 93, 695 - 704.
- Dutech C, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Barres B, Carlier J, Tharreau D, Giraud T** (2007) Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 44, 933-949.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S** (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics Online* 1, 47-50.

Excoffier L, Smouse P, JM. Q (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491

Farrara BF, Ilott TW, Michelmore RW (1987) Genetic analysis of factors for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in species of lettuce (*Lactuca sativa* and *L. serriola*). *Plant Pathology* 36, 499-514.

Felsenstein J (1989) PHYLIP -- Phylogeny Inference Package. *Cladistics* 5, 164-166.

Goodwin SB (1997) The Population Genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87, 462-473.

Goodwin SB, Cohen B, Fry W (1994) Panglobal distributions of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc Natl Acad Sci* 91, 11591 - 11595.

Goss EM, Larsen M, Chastagner GA, Givens DR, Grunwald NJ (2009) Population Genetic Analysis Infers Migration Pathways of *Phytophthora ramorum* in US Nurseries. *PLoS Pathog* 5, e1000583.

Goudet J (1995) FSAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86, 485-486.

Halkett F, Simon JC, Balloux F (2005) Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 194-201.

Hulbert SH, Ilott TW, Legg EJ, S.E. L, E.S. L, Michelmore RW (1988) Genetic analysis of the Fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. *Genetics* 120, 947-958.

Hulbert SH, Michelmore RW (1985) Linkage analysis of genes for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa*). In: TAG Theoretical and Applied Genetics, pp. 520-528.

Ilott TW, Durgan ME, Michelmore RW (1987) Genetics of Virulence in California Populations of *Bremia-Lactucae* (Lettuce Downy Mildew). *Phytopathology* 77, 1381-1386.

Ioos R, Barres B, Andrieux A, Frey P (2007) Characterization of microsatellite markers in the interspecific hybrid *Phytophthora alni ssp alni*, and cross-amplification with related taxa. *Molecular Ecology Notes* 7, 133-137.

Ivors K, Garbelotto M, Vries I, Ruyter-Spira C, Te Hekkert B, Rosenzweig N, Bonants P (2006) Microsatellite markers identify three lineages of *Phytophthora ramorum* in US nurseries, yet single lineages in US forest and European nursery populations. *Mol Ecol* 15, 1493 - 1505.

Jombart T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24 1403-1405

Jombart T, Pontier D, Dufour A (2009) Genetic markers in the playground of multivariate analysis. *Heredity* 102, 330-341.

Kalinowski ST (2002) Evolutionary and statistical properties of three genetic distances. *Molecular Ecology* 11, 1263-1273.

Lebeda A, Sedlarova M, Petrivalsky M, Prokopova J (2008) Diversity of defence mechanisms in plant-oomycete interactions: a case study of *Lactuca* spp. and *Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology* 122, 71-89.

Lebeda A, Petrzalova I (2004) Occurrence of race-specific resistance to *Bremia lactucae* in *Lactuca serriola* germplasm originating from four European countries. *Genetic variation for*

plant breeding. Proceedings of the 17th EUCARPIA General Congress, Tulln, Austria, 8-11 September 2004, 113-116.

Lebeda A, Zinkernagel V (2003) Evolution and distribution of virulence in the German population of *Bremia lactucae*. Plant Pathology 52, 41-51.

Lebeda A, Pink DAC, Astley D (2002) Aspects of the interactions between wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). In: Advances in Downy Mildew Research, pp. 85-117.

Lebeda A, Syrovatko P (1988) Specificity of *Bremia-Lactucae* Isolates from *Lactuca-Sativa* and Some Asteraceae Plants. Acta Phytopathologica Et Entomologica Hungarica 23, 39-48.

Lees AK, Wattier R, Shaw DS, Sullivan L, Williams NA, Cooke DEL (2006) Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. Plant Pathology 55, 311-319.

Maisonneuve B, Bellec Y, Souche S, Lot H (1999) New resistance against downy mildew and lettuce mosaic potyvirus in wild *Lactuca* spp. in : Lebeda, A.(ed), Kristkova, E., Proceedings of the Eucarpia meeting on leafy vegetables genetics and breeding, p: 191-197.

Maisonneuve B, Bellec Y, Anderson P, Michelmore RW (1994) Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Lactuca serriola* to existing clusters of resistance genes. In: TAG Theoretical and Applied Genetics, pp. 96-104.

Malaus T, Gilles A, Meglecz E, Blanquart HLN, Duthoy SP, Costeodat C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Delye C, Feau N, Frey P, Gauthier R P, Guillemaud T, Hazard L, Le Corre VR, Lung-Escarmant B, Mala P-JG, Ferreira SP, Martin J-FO (2011) High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. Molecular Ecology Resources 11, 638-644.

Martin J, Pech N, Meglécz E, Ferreira S, Costeodat C, Dubut V, Malausa T, Gilles A (2010) Representativeness of microsatellite distributions in genomes, as revealed by 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. BMC Genomics 11.

Meglécz E, Costeodat C, Dubut V, Gilles A, Malausa T, Pech N, Martin J-F (2010) QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. Bioinformatics 26, 403-404.

Michelmore R, Wong J (2008) Classical and molecular genetics of *Bremia lactucae*, cause of lettuce downy mildew. European Journal of Plant Pathology 122, 19-30.

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89, 583-590.

Prospero S, Grünwald NJ, Winton LM, Hansen EM (2009) Migration Patterns of the Emerging Plant Pathogen *Phytophthora ramorum* on the West Coast of the United States of America. Phytopathology 99, 739-749.

Prospero S, Hansen EM, Grünwald NJ, Winton LM (2007) Population dynamics of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum* in Oregon from 2001 to 2004. Molecular Ecology 16, 2958-2973.

Raymond M, Rousset F (1995) Genepop (version 1.2), population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity 86, 248-249.

Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. Genetics 145, 1219-1228.

Rumbou A, Gessler C (2007) Particular Structure of *Plasmopara viticola* Populations Evolved Under Greek Island Conditions. *Phytopathology* 96, 501-509.

Thines M, Runge F, Telle S, Voglmayr H (2010) Phylogenetic investigations in the downy mildew genus *Bremia*; reveal several distinct lineages and a species with a presumably exceptional wide host range. In: *European Journal of Plant Pathology*, pp. 81-89. Springer Netherlands.

Voglmayr H, Rietmuller A, Goker M, Weiss M, Oberwinkler F (2004) Phylogenetic relationships of *Plasmopara*, *Bremia* and other genera of downy mildew pathogens with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial LSU rDNA sequence data. *Mycological Research* 108, 1011-1024.

Weir B, Cockerham C (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.

Wu BM, van Bruggen AHC, Subbarao KV, Pennings GGH (2001) Spatial analysis of lettuce downy mildew using geostatistics and geographic information systems. *Phytopathology* 91, 134-142

Table 1: Characteristics of a set of 67 isolates of *B. lactucae*

Group	Isolate	MLG
Official European Races[†]	Bl: 1	MLG20
	Bl: 2	MLG64
	Bl: 3	MLG47
	Bl: 4	MLG24
	Bl: 5	MLG3
	Bl: 6	MLG43
	Bl: 7	MLG22
	Bl: 12	MLG49
	Bl: 13	MLG23
	Bl: 14	MLG26
	Bl: 15	MLG17
	Bl: 16	MLG2
	Bl: 17	MLG53
	Bl: 18	MLG35
	Bl: 20	MLG34
	Bl: 21	MLG18
	Bl: 22	MLG48
	Bl: 24	MLG35
	Bl: 25	MLG35
	Bl: 26	MLG61
	Bl: 27	MLG7
European isolates[†]	Number of Isolates	MLG
Czech Republic	1	MLG27
Germany	6	MLG44, 4*MLG55, MLG62
Italy	8	MLG14, 2*MLG33, 2*MLG41, 2*MLG61, MLG74
The Netherlands	8	4*MLG13, MLG19, 2*MLG30, MLG36
Portugal	3	2*MLG28, MLG31
Great Britain	7	3*MLG13, MLG46, 2*MLG51, MLG63
Non-European isolates[†]	Number of Isolates	MLG
Australia	3	MLG68, MLG71 and MLG72
USA	3	MLG69, 2*MLG70
<i>L. serriola</i> isolates	Number of Isolates	MLG
France	6	2*MLG1, MLG10, MLG55, MLG59, MLG73
Germany	1	MLG67

[†] Isolates recovered from *L. sativa*

MLG = MultiLocus Genotype

Table 2: Genetic characteristics of 18 French *B. lactucae* populations corresponding to 337 isolates.

Geographical area	Populations	n isolates	N MLG	R	A _r	F _{is}	H _O	H _E	r _D
South-East (214 isolates)	30 Aramon ¹	38	2	0.027	1.53	-0.631	0.321	0.198	1.00
	80 Cantarel_Ga ²	24	2	0.044	1.27	-0.769	0.239	0.137	1.00
	13 Eyragues_G.S ³	29	2	0.036	1.34	-0.849	0.270	0.148	1.00
	13 Eyragues_T. ⁴	10	1	0	1.27	-1.000	0.272	0.144	NA
	13 Fontvieille ⁵	13	1	0	1.45	-1.000	0.455	0.236	NA
	84 Cantarel_GRAB ⁶	28	2	0.037	1.54	-0.592	0.338	0.214	1.00
	84 Montfavet-L.G ⁷	37	2	0.028	1.60	-0.345	0.292	0.219	1.00
	66 Perpignan ⁸	20	2	0.05	1.36	-0.860	0.318	0.175	NA
	69 Saint-Martin-en-Haut ⁹	15	1	0	1.45	-1.000	0.454	0.2351	NA
Center-West (114 isolates)	49 Brion ¹⁰	10	2	0.111	1.36	-0.950	0.355	0.191	NA
	35 Châteaugiron ¹¹	10	1	0	1.27	-1.000	0.273	0.144	NA
	37 St Martin-le-Beau ¹²	48	3	0.043	1.63	-0.636	0.434	0.267	0.65
	50 Gatteville-le-Phare ¹³	8	1	0	1.45	-1.000	0.455	0.242	NA
	50 Mont St Michel ¹⁴	9	1	0	1.55	-1.000	0.546	0.289	NA
	45 Ouvrouer les champs ¹⁵	9	2	0.125	1.54	-0.872	0.444	0.250	0.44
	35 Roz sur Couesnon ¹⁶	10	1	0	1.45	-1.000	0.455	0.239	NA
	45 Saint Florent ¹⁷	10	1	0	1.45	-1.000	0.455	0.2392	NA
South-West	47 Le passage ¹⁸	9	1	0	1.36	-1.000	0.364	0.193	NA

Number of MLG identified (N), Clonal genotype diversity (R), Allelic richness (A_r), Fixation index (F_{is}), Observed Heterozygosity (H_O), Expected Heterozygosity (H_E), Multilocus linkage disequilibrium (r_D).

Sites^x: Numbers refer to numbers on Fig. 2

Table 3: Polymorphism characteristics of 12 microsatellite loci for 67 worldwide *B. lactucae* isolates.

Locus name	Primer sequence (5' to 3')†	Repeat motif	Size range (bp)	Number of alleles	H_o	H_E
Rv_BL4*	F : [NED] TTTATCGGCTGAAGCTGTTG R : TCCAGTGCATTCTCGTCATC	GCT	141-144	2	0.044	0.043
Rv_BL6*	F : [HEX] CGTCCCACTCGCCCTACT R : ACTTTTGGTTGGAGCTGCTG	CAG	131-134	2	0.058	0.162
AIP20	F : [NED]: GCTTCGTCCCATGCTCTTT R : TCGTCAGTAGGAATGTTGCG	AC	144-146	2	0.352	0.311
AIP39	F : [NED] GCTTGACAGTTCCATCTGAGG R : TTGTGCGAACCAGTCTTGAG	GTC	209-214	3	0.455	0.410
AIP11	F : [NED]: GCTTGACAGTTCCATCTGAGG R : TTGTGCGAACCAGTCTTGAG	GT	123-137	7	0.514	0.747
AIP12*	F : [HEX] CGATTGGCCAGCTATATTCC R : GAACGCTGGGTCTGAGTTTC	AGA	199-202	2	0.397	0.354
AIP28	F : [HEX] GCGAAATACGTTTGCATTG R : AAGACTCGGAATGAGCTTCAG	TG	119-121	2	0.205	0.186
AIP14	F : [FAM] CTACCGTGTGACCAGCTCAA R : GGCACCGATAATGTCAGCTT	AC	139-143	3	0.338	0.285
AIP9	F : [FAM] CTGAAGCAGACCTCGACACA R : TCCTACGCTCTCGATTGGAT	AAG	131-140	4	0.191	0.227
AIP35*	F : [HEX] CGACGGAAGATTGCGACT R : CAACAACCTCTCGGCCTCTC	GAA	218-230	5	0.338	0.363
AIP13	F : [FAM] TTGGCTTCCTCTTCGGTAAA R : CACCCAATGAGGAGCAACTT	TCT	137-143	3	0.044	0.099
AIP33	F : [HEX] ACTGAATGGCCGAATTGGAT R : TTTACCATTCCAACGTGGTG	TGT	125-128	2	0.485	0.494
Mean				3.083	0.285	0.307
s.d.				1.498	0.165	0.182

* Markers amplified for isolates recovered from artichoke.

† Fluorophores (FAM, HEX or NED) used for labeling each forward primer are specified within the primer sequence. H_o : Observed Heterozygosity; H_E : Expected Heterozygosity.

Table 4: MLG identified with 11 microsatellites and P_{sex} value for 337 *B. lactucae* French isolates

MLG	N*	P_{sex} (n re-encounter)
MLG1	8	4.08E-54
MLG7	107	8.64E-178
MLG28	1	NA
MLG40	11	4.81E-13
MLG30	13	1.72E-22
MLG39	29	7.54E-14
MLG45	10	1.04E-19
MLG55	155	3.67E-163
MLG60	3	0,67

*N = number of isolates

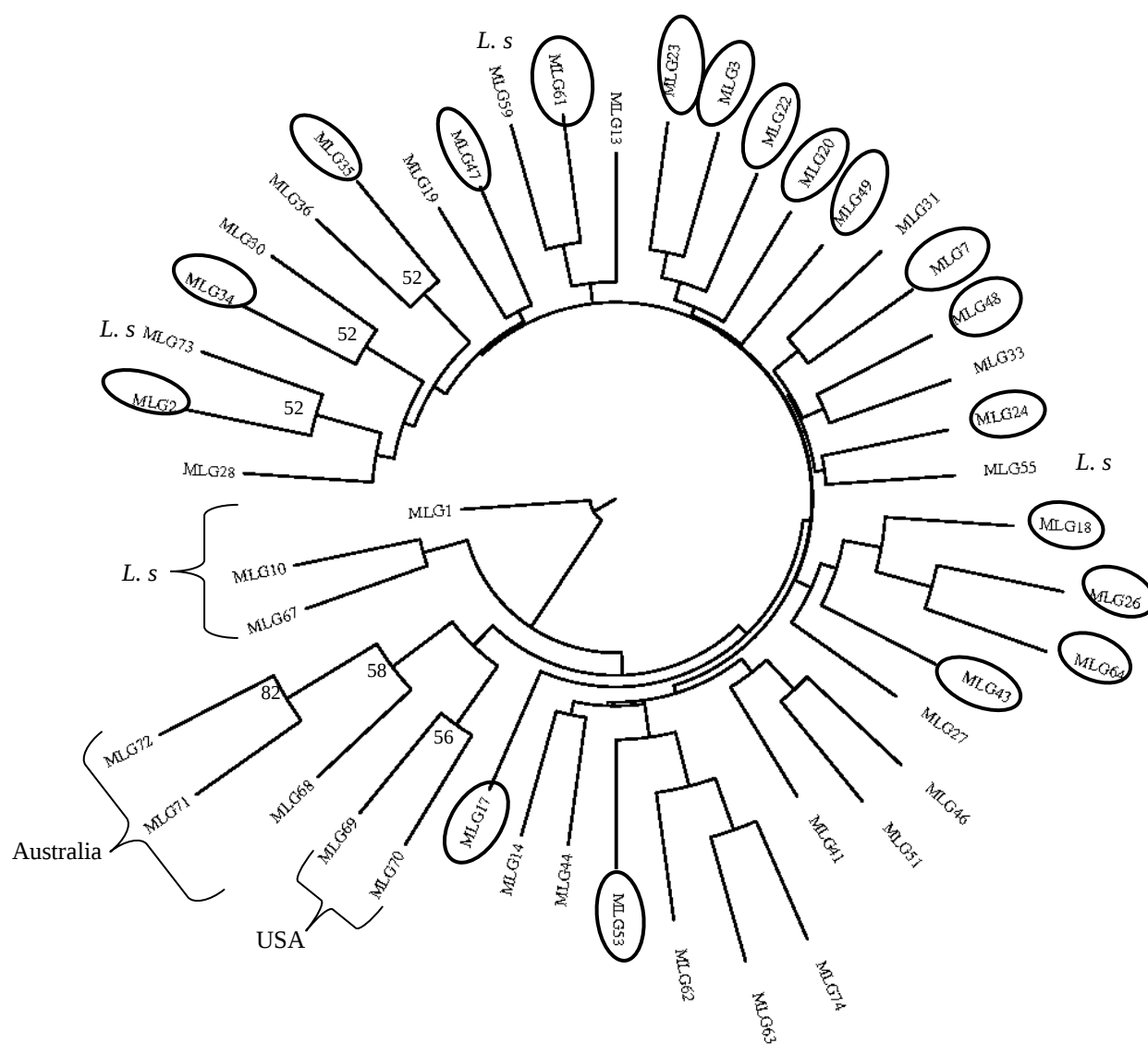


Fig. 1: UPGMA dendrogram based on Dc (chord distance) among 46 multilocus genotypes of *B. lactucae* identified with 12 microsatellites.

Support values greater than 50% using 1,000 bootstrap samples are shown.

L. s MLG recovered on *L. serriola*.

○ Official European races

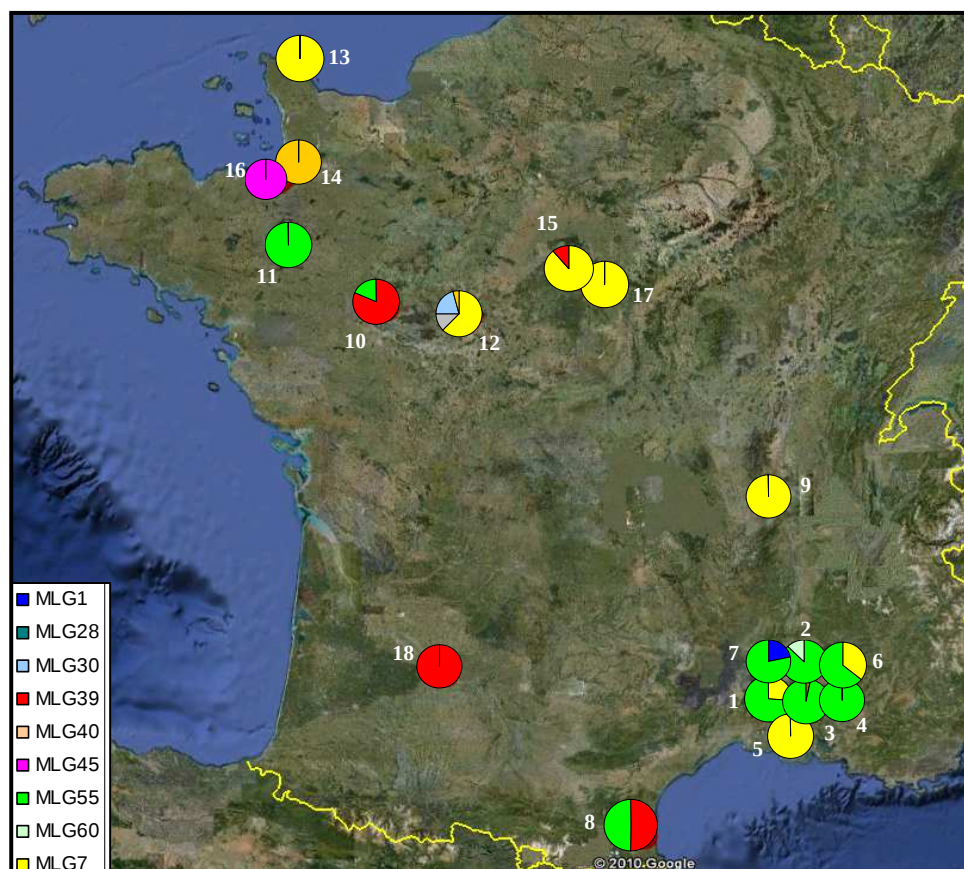


Fig. 2: Geographic distribution and frequency of nine MLGs identified for 337 isolates of *B. lactucae* at 18 sites⁽¹⁾ in France

1: The 18 sites are marked 1 to 18.

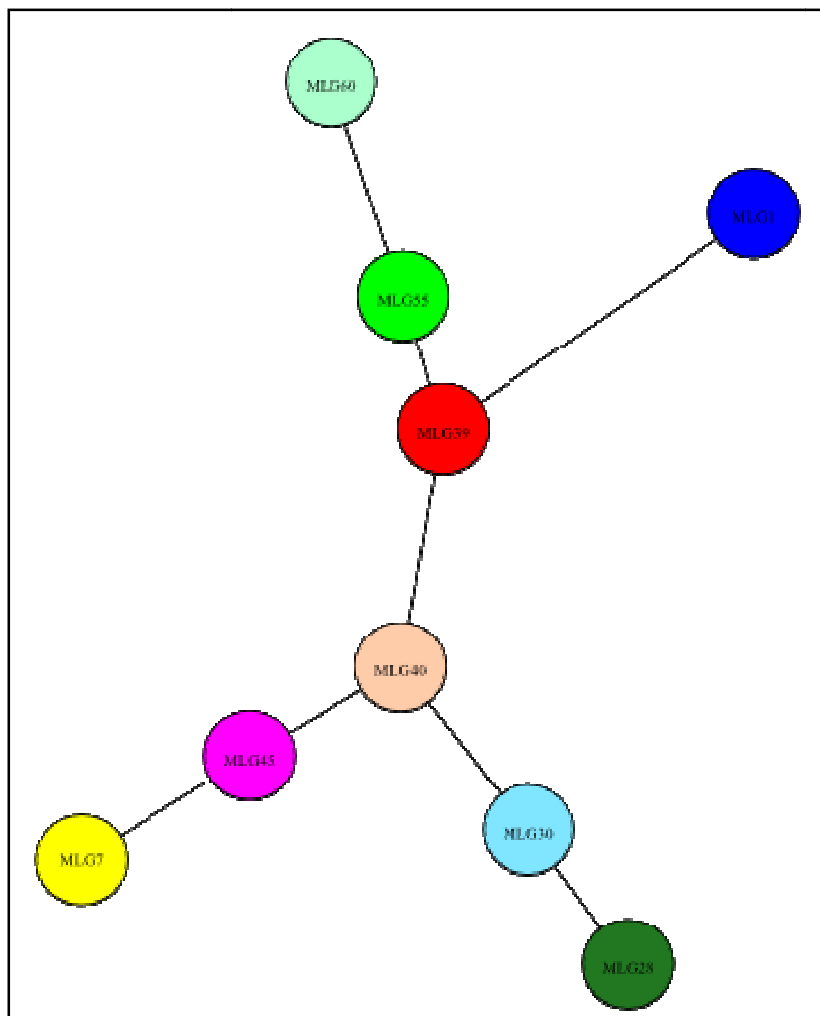


Fig. 3: Minimum spanning network for the nine MLGs of *B. lactucae* in France.

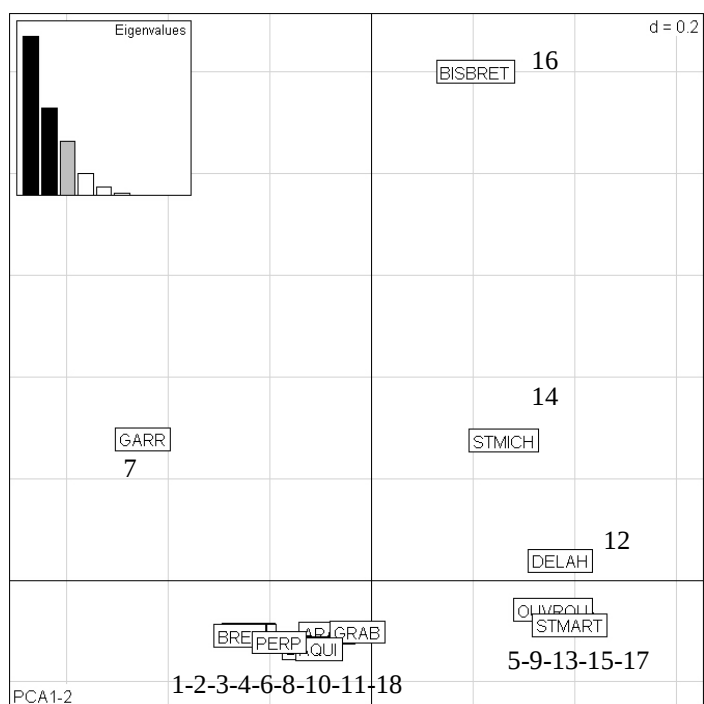


Fig. 4: Principal component analysis (PCA) and Eigen values performed for 18 populations of *B. lactucae* based on 11 microsatellite markers.

1: The 18 sites are marked 1 to 18

CHAPITRE 4

EFFET DE LA PRESSION DE SÉLECTION DES GÈNES DE RÉSISTANCE DE LA PLANTE HÔTE SUR LA STRUCTURE DES POPULATIONS DE *BREMIA LACTUCAE* EN FRANCE

1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit la structure des populations françaises de *B. lactucae* à l'aide de marqueurs moléculaires neutres. Nous avons montré que les populations de *Bremia* sont principalement soumises à un régime de reproduction asexuée et que des flux de gènes se produisent à l'échelle française. Nous avons également identifié des signes de rares événements de recombinaison sexuée notamment dans les bassins de production du nord de la France. L'identification de différentes lignées clonales, évoluant indépendamment par mutation, a suggéré une sélection de ces lignées clonales, mais cette sélection n'a pas été caractérisée dans cette étude.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier la pression de sélection exercée par les gènes de résistance de la plante hôte sur la structure des populations et d'identifier les mécanismes impliqués dans l'évolution des virulences chez *B. lactucae*. Des marqueurs neutres (12 microsatellites) et des marqueurs soumis à sélection (19 virulences) ont ainsi été utilisés pour caractériser cette sélection.

2. Résultats et discussion : Article 2

Les résultats obtenus sont présentés ci-après sous la forme d'un article en préparation pour une soumission à la revue *Molecular Ecology* :

Article 2: Selection pressure imposed by resistance genes impacts the population structure of the lettuce downy mildew

Selection pressure imposed by resistance genes impacts the population structure of the lettuce downy mildew

Romain Valade¹, Brigitte Maisonneuve² and Claire Neema^{13*}

¹ *AgroParisTech, INRA UR BIOGER-CPP, Thiverval Grignon, 78850, France*

² *INRA, GAFL Domaine St Maurice, 84143 Montfavet cedex, France*

³ *Montpellier supagro, UMR BGPI, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier, cedex05, France*

*Correspondence: Claire Neema
Claire.neema@supagro.inra.fr

Abstract:

Selection by host probably plays the most prominent role among evolutionary forces shaping pathogen population structures. Therefore, understanding how major resistance genes influence the pathogen population structure should improve the management strategies of resistance genes and maximized their durability. *B. lactucae*, the lettuce downy mildew, causing the most important disease affecting lettuce worldwide, has shown an important ability to break down new resistance genes introduced in *Lactuca sativa*. Here, we investigated the selection pressure exerted by resistance genes used in lettuce cultivars on the population structure of *B. lactucae* in France and the main adaptive mechanisms involved in the evolution of virulence. A total of 405 isolates, collected from 23 sites, and corresponding to 14 resistance gene combinations, were genotyped using 12 microsatellites markers. A subset of 107 isolates was characterised for virulence on a differential set. Clustering analyses revealed that *B. lactucae* populations could be clustered into three genetically distinct groups with good correlations with resistance genes. We discuss how selection exerted by resistance genes can influence the adaptation mechanisms for virulence in *B. lactucae* populations and impact the population structure.

.

Introduction:

Plant diseases generate significant economic losses and impose constraint on food production worldwide. They are often controlled with pesticides, but in the context of sustainable development, the use of chemical molecules should be decreased. The use of genetic resistance has the advantage of being more environmentally friendly. However, the ability of pathogens to breakdown resistance was regularly observed. Johnson (1979, 1984) has defined the concept of durable resistance as a resistance that remains effective while being extensively used in agriculture for a long time in an environment conducive to disease. Durability will depend on the ability of pathogen populations to adapt faster or slower in response to selection by host resistance. New virulence may evolve via several different mechanisms: through mutations in virulence genes (or parasexual processes); through sexual recombination between different genotypes; through introduction and emergence of a new genotype coming from other areas or wild host plant. All these mechanisms are well known and have ever been observed in many pathogens like *Phytophthora infestans* (Goodwin 1997) *Plasmopara halstedii* (Delmotte al. 2008) or *Melampsora larici-populina* (Xhaard *et al.* 2011) but few studies have investigated the influence of different major resistance genes on these adaptative mechanisms at the population level. Selection by hosts probably plays the most prominent role among evolutionary forces shaping pathogen population structures (Mc Donald & Linde 2002), and it is also the force that can be the most easily manipulated by man, through plant breeding and cultivar deployment (Palumbi 2001). Therefore, understanding how major resistance genes influence the population structure and so the adaptive mechanisms at the population level could improve the management of resistance genes and help maximizing their durability.

Bremia lactucae, an oomycete belonging to peronosporaceae family, is a suitable model to study impact of selection pressure of resistance genes on pathogen population structure. *B. lactucae* causes lettuce downy mildew, the most important disease affecting lettuce worldwide (Michelmore *et al.* 2008). Many studies have showed that the interaction between *Lactuca sativa* and *B. lactucae* is conforms to a gene-for-gene relationship (Crute and Johnson 1976; Hulbert and Michelmore 1985; Farrara *et al.* 1987; Illot *et al.* 1987). Resistance is determined by avirulence factors of the pathogen which are recognized by major *Dm* (for Downy mildew) genes or resistance (R) factors (Michelmore *et al.* 2008). Most of the resistance is considered to be race specific (Maisonneuve *et al.*, 1994; Lebeda *et al.* 2002) and *Dm* genes confer high levels of resistance. However, *B. lactucae* has shown an important

ability to break down new resistance genes introduced in lettuce even resistance gene introgressed from different *Lactuca* species. The introduction of new resistance cultivars is often followed by the emergence of new virulent pathogen strains. This quick adaptation to resistance leads to a high diversity of virulence available for *B. lactucae* populations. Previous studies, using virulence markers, suggested that the way of management of resistance gene in lettuce could act as an important selection pressure and influence the changes in the *B. lactucae* population structure (Crute 1987; Lebeda and Zinkernagel 2003) but the main mechanisms of adaptation are unknown. A previous study (Valade *et al.* submitted) has shown, with neutral markers, low levels of genetic diversity in France, high gene flow and a weak differentiation between *Bremia* populations of South and center-west of France which could be the result of few sexual recombination events. In this study, we used both neutral markers (12 microsatellites) and selected markers (19 virulence markers) to investigate the selection pressure exerted by different major resistance genes used in lettuce cultivars on *Bremia* population structure in France and to evaluate the main adaptive mechanisms involved in the evolution of virulence.

Materials and Methods

Sampling strategy:

Bremia lactucae isolates were collected from 23 sites in the two most important production areas of lettuce in France, in South region and in Center-West region (Table 1). Samplings were done between winter 2006/2007 and summer 2011. Several samplings were made during two or three consecutive years in the same site and even in the same season on several cultivars (Table 1). At each sampling, at least ten isolates were collected from ten different plants (one leaf per plant) of the same cultivar.

Isolates were recovered from 31 different varieties which can be discriminated according to their resistance genes. The cultivars were pooled in 14 groups, corresponding to 14 different resistance gene combinations, thanks the informations given by two breeders companies (RijkZwaan and Gautier Semences) (Table 1; resistance gene combinations are coded). Isolates found in each group were considered as one *Bremia* population in order to study selection pressure of resistance gene on *Bremia* population structure.

In South of France, we also used “trap” boxes containing three lettuce seedling genotypes, Cobham Green, Lednicky (*Dm1*), PIVT1309 (*Dm15*) which are susceptible to trap aerial spores. Six sampling sites were chosen (Table 2) and “trap” boxes were disposed in the

center of the crop for 26-28 hours every two weeks during winter. Then, they were incubated in growth chamber and cotyledons were surveyed during seven to ten days which is the mean period needed for sporulation. This sampling strategy permitted us to compare *Bremia* populations selected on lettuce cultivar and aerial spores of *Bremia* present in the fields.

Virulence phenotype:

Virulence of at least one isolate of *Bremia* per sampling were characterized on a differential set of 19 cultivars. The set consist of three groups of six cultivars (sextet) and one cultivar. The position of a differential cultivar within the sextet determines the sextet value of host differential. Sextet values are ascending powers of 2 (1, 2, 4, 8, 16 or 32). The sextet code of an isolate is the sum of the sextet values of the differentials which are susceptible (Van Ettehoven and Van der Arend 1999). Hence, isolates can be easily compared thanks to their sextet code.

Table 1: Characteristics of the 405 *B. lactucae* isolates recovered from 23 sampled sites.

Regions	Sampled Sites	Sampling seasons	Resistance gene Combinations	MLG	Number of isolates
Center-West of France 150 isolates	Chailly en Biere	Winter 2010/2011	AD	79	18
				7	2
	Gatteville-le-fard	Winter 2009/2010	ABD	7	6
				79	4
	Lille	Winter 2011/2012	AI	55	1
				100	3
	Longué	Winter 2009/2010	AE	29	2
				30	4
	Mt St Michel	Summer 2009	ABD	40	9
	Saint Florent	Spring 2009	D	7	10
		Spring 2009	D	7	10
	Saint Martin le beau (1)	Spring 2009	AD	7	3
		Summer 2009	D	30	7
				7	10
		Winter 2009/2010	ABD	7	10
		Summer 2010	AD	7	2
				30	6
		Spring 2011	ABD	79	10
	Saint Martin le beau (2)	Winter 2010/2011	AD	7	10
	Roscoff	Winter 2010/2011	ABD	45	9
				81	4
	Roz sur Couesnon	Summer 2010	ABD	45	10

South of France 255 isolates	Aramon*	Winter 2009/2010	AI	55	10
		Winter 2009/2010	AC	55	10
		Spring 2010	BCF	55	10
		Spring 2010	ABD	7	10
	Avignon (1)	Winter 2008/2009	ABC	55	1
			BCG	55	1
			AB	55	2
			AC	55	2
			AI	55	1
	Avignon (2)	Winter 2008/2009	B	55	9
		Winter 2009/2010	ABD	7	10
			ABC	55	9
	Avignon-Cantarel*	Winter 2008/2009	BCG	55	3
			ABC	55	3
		Spring 2009	BCG	55	8
			AB	55	2
		Winter 2009/2010	ABC	55	24
				60	2
		Winter 2010/2011	AI	55	10
	Eyragues (1)*	Winter 2006/2007	AE	1	6
	Eyragues (2)*	Winter 2008/2009	AE	55	9
		Spring 2009	AI	28	1
				55	9
		Winter 2009/2010	A	55	10
		Spring 2010	AI	55	6
	Fontvieille*	Winter 2009/2010	ABD	7	11
	Les Garrigues	Spring 2010	AE	1	8
			BCH	55	10
		Spring 2011	AE	1	2
			BCH	55	3
	Loriol du Comtat	Winter 2010/2011	AC	54	2
				55	9
	Monteux	Winter 2007/2008	ACI	55	5
	Montfavet	Winter 2010/2011	AE	1	1
			BCH	54	1
				55	7
				56	2
	St Ange*	Spring 2011	ABD	7	10
	St Martin en haut	Spring 2009	D	7	8
			D	7	8

Regions, sampled sites, sampling seasons, resistance gene combinations of each cultivar and multilocus genotypes (MLG) identified on each cultivar are indicated. The number of isolates for each MLG recovered from each sampled cultivar is noted. * sampling sites with “trap” boxes. Numbers in bracket are corresponding to different sites in the same town.

Mating type (MT) determination:

B. lactucae is a heterothallic organism; thus, two mating types (B1 and B2) need to be present simultaneously on the same plant for the pathogen to undergo sexual reproduction. The mating type was determined by pairing on a cotyledon the tested isolate with known B1 and B2 testers then by observing cotyledon for oospores formation under microscope. Isolates forming oospores with B1 reference were rated as B2 MT, while those that formed oospores with the B2 reference were rated as B1 MT.

DNA extraction and genotyping

One leaf with symptoms of downy mildew (sporulation or well developed chlorotic spots) was taken from each diseased lettuce plant or seedling in “trap” boxes, and allowed isolation of one strain. Multiplication and isolation were done as described previously (Maisonneuve *et al.*, 1999). Genomic DNA was extracted from *B. lactucae* spores suspension using DNeasy Plant kit (Quiagen) following manufacturer’s protocol.

Twelve polymorphic microsatellites loci were used (Valade *et al.*, submitted) to genotype *Bremia* isolates. Amplification reactions consisted of 10ng template DNA, 200µM dNTPs, 1 U *Taq* DNA polymerase (Promega), 2 mM MgCl₂, and 0.2µM of each primer pair (using forward primers labelled with WellRed fluorescent dyes FAM, HEX or NED) in a 10 µL reaction volume. Amplifications were run in a Applied Biosystems PCR system 9700 thermocycler, with initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C or 60 °C for 30 s according to the primer pairs hybridization temperature, 72 °C for 30 s, and a final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were sized by capillary electrophoresis on an automated Beckman sequencer (CEQ 8000).

Data analysis:

Bremia isolates were genotyped with the twelve microsatellites markers and assigned to several groups of multilocus genotypes (MLGs) sharing the same alleles at all loci.

To examine the relationships among isolates, minimum spanning networks (MSN) were constructed using the genetic distance of Bruvo *et al.* (2004), which incorporate microsatellite repeat number. Genetic distance matrices were calculated for all MLGs observed in France. MINSNET (Excoffier *et al.* 1992) was used to generate MSN from genetic distances matrices and trees were visualized with Hapstar (Prim 1957; Excoffier 2005).

A principal component analysis (PCA) and a correspondence analysis (CA) were performed using the procedure available in the package adegenet (Jombart 2008) for the statistical freeware R version 2.7.2 (the R foundation for Statistical Computing 2008) to seek respectively a typology of individuals and a typology of populations (one population is formed of isolates recovered from cultivars of the same group of resistance gene combination). In order to support the clusters observed with ACP and CA, we computed pairwise F_{ST} estimates for these clusters, following Weir and Cockerham (1984) using Fstat 2.9.3 (Goudet 1995).

Gene diversity was calculated for each cluster and estimated by expected heterozygosity (H_e , Nei's unbiased gene diversity, 1978). Gene diversity, observed heterozygosity and allelic richness were calculated using Fstat 2.9.3 (Goudet 1995). The clonal genotype diversity was calculated as $R = (G-1)/(N-1)$ where G is the number of MLG present in a sample and N is the sample size. An other way was used to estimate the genotypic diversity, defined as the probability that two individuals taken at random have different multilocus genotypes, and was calculated using Multilocus (Agapow & Burt 2001) as the measure of multilocus linkage disequilibrium (r_d). r_d is based on the index of association corrected for the number of loci (Agapow & Burt 2001). Departure from random association of alleles across loci was assessed by bootstrapping alleles among individuals 1000 times independently for each locus.

The unbiased estimator of Wright's F_{IS} , was calculated according to Weir and Cockerham (1984) using Fstat 2.9.3 (Goudet 1995) to test hypothesis of random association of gametes in each cluster. A MLG may result from distinct sexual reproduction events or clonal reproduction; therefore we estimated the probability (P_{sex} n re-encounter) of observing at least n times a MLG resulting from sexual reproduction. P_{sex} was estimated for all MLGs found at least n times in France, by using the software Genclone 2.0 (Arnaud-Haond & Belkhir 2007) where n equals the number of copies of the MLG.

Genotypic and phenotypic matrices were constructed to evaluate relationships between genotypes and phenotypes. An index of dissimilarity based on a simple matching (Sokal and Michener 1958) and implemented in DARWIN 5.0 (Perrier *et al.* 2006) was used to obtain a phenotypic distance matrix (by using one isolate per phenotype). This distance estimate suited phenotypic measure of virulence on a differential set of cultivars, which produces binary variables (resistant or susceptible) with similar weight on each modality (Goyeau *et al.* 2007). The genetic distance matrix between pairs of isolates (one copy per multilocus genotype) was estimated using Cavalli-Sforza and Edwards chord distance (Dc) (Cavalli-Sforza and Edwards

1967). Dc was calculated with Microsat software (MSAT 2001). Correlation between genetic and phenotypic distances was evaluated using simple Mantel tests performed with the ZT program developed by E. Bonnet and Y. Van de Peer([url: http://bioinformatics.psb.ugent.be/software/details/ZT](http://bioinformatics.psb.ugent.be/software/details/ZT)). Mantels tests were performed on single pathotype-genotype combinations (i.e., one copy per couple) with 10,000 permutations.

Results

Genetic diversity in France

A total of 405 isolates was collected from 23 sites with 255 isolates and 150 isolates recovered respectively from South and Center-West regions of France and genotyped using the 12 microsatellites markers. 26 alleles were found over the twelve microsatellite loci with one to four alleles per locus. One locus (RV_B16) was monomorphic for the 405 isolates sampled and was excluded of the markers set for the analyses.

14 different MLGs were detected ($R = 0.03$). Two MLGs were predominant, 43 percent of *Bremia* isolates belonged to MLG 55 and 30 percent belonged to MLG 7 (Table 2). Six MLGs (MLG 55, MLG 7, MLG 79, MLG 45, and MLG 1) were sampled during several seasons of lettuce production and two MLGs (MLG 55 and MLG 7) were found in both lettuce production areas (Table 1).

The high P_{sex} values (Table 2) for ten MLGs indicated that the over-representation of these MLGs might result from clonal amplification. Three MLGs (MLG 54, MLG 56 and MLG 60) could result from sexual recombination event as it was indicated by their P_{sex} value. However, MLG 54, MLG 56 and the most frequent MLG 55, were closely related genotypes because only one allele was different between these three MLGs. The relationship between MLG 60 and MLG 55 was more complex with three differences. These differences are more likely due to the presence of null alleles, mitotic or somatic mutation than sexual recombination.

***B. lactucae* isolates recovered from trap boxes**

Six sites were surveyed in South of France and permitted us to trap 75 isolates each coming from one seedling. Of the 75 isolates, five MLGs were found of which two were MLGs never found before on lettuce cultivars (MLG 48 and MLG 57). Three MLGs (MLG 1, MLG 7, MLG 55) represented 96 percent of isolates (Table 3).

Table 2: Characteristics of the 14 Multilocus genotypes (MLG) that were discriminated using 11 microsatellites loci on the 405 *B. lactucae* isolates.

MLG	Cluster	n (n per cluster)	Mating type (n MT)	P_{sex} n reencounter
55	1 and 3	174 (165 and 9)	B1 (4)	0
54	1	3	B1 (1)	0,35
100	1	3	ND	0,04
56	1	2	ND	0,1
60	1	2	B1 (1)	0,26
28	1	1	B2 (1)	NA
7	2	120	B2 (16)	0
79	2	32	B2 (1)	1,60E-48
45	2	19	B1 (1)	1,71E-53
40	2	9	B1 (4)	3,89E-13
81	2	4	B1 (1)	0,002
30	2 and 3	17 (14 and 3)	B1 (1)	1,50E-65
1	3	17	B2 (2)	1,65E-128
29	3	2	ND	0,001

Cluster assignment, number of isolates (n), mating type (MT), number of MT determined (n MT) and P_{sex} n re-encounter.

Table 3: MLGs and number of *Bremia* isolates recovered from trap boxes in the different sampled sites surveyed.

Sampled site	Season	MLG	n
Aramon	Winter 2009/2010	7	15
		55	16
		57	1
Avignon-Cantarel	Winter 2008/2009	55	19
	Winter 2009/2010	55	1
Eyragues (1)	Winter 2006/2007	1	1
		48	2
Eyragues (2)	Winter 2008/2009	55	12
	Winter 2009/2010	7	2
		55	4
Fontvieille	Winter 2009/2010	7	1
St Ange	Winter 2010/2011	1	1

MLGs never found on cultivated lettuce are in shaded boxes.

Clustering analysis:

Thirty one cultivars were pooled in 14 groups, corresponding to 14 different resistance gene combinations (Table 1) and isolates found in each group were considered as one *Bremia* population. Three clusters of populations were identified with a principal component analysis (PCA) performed on the 405 isolates of *B. lactucae* genotyped with twelve microsatellite markers (Fig. 1a). Axes 1 and 2 of the PCA accounted respectively for 43.9% and 23.2% of total genetic variability. The Correspondance analysis performed with the 14 populations confirmed the typology observed with ACP (Fig. 1b). The cluster 1 grouped 174 isolates virulent on ten resistance gene combinations (A, AB, ABC, ACI, AI, B, BCF, BCG, BCH, and AC). Cluster 2 grouped 197 isolates virulent on three resistance gene combinations (D, AD and ABD) and cluster 3 grouped isolates virulent on combination AE.

The three clusters were supported by the highly significant genetic differentiation (F_{ST}) (Table 4). The major difference between clusters 1 and 2 is the presence of the resistance gene D in cluster 2. The difference between clusters 1, 2 and 3 is the presence of the resistance gene E within cluster 3. Further genetic analyses were thus conducted by pooling *Bremia* populations into these three clusters.

Genetic characteristics of the three clusters:

The three clusters showed low genotype diversity and were principally composed of specific MLG (Table 5). The most frequent MLG was MLG 55 found both in cluster 1 and cluster 3 respectively 95% and 28% of isolates (Table 2). MLG 7, the second most frequent MLG, was only found in cluster 2 (61% of isolates) (Table 2).

F_{is} values, measures heterozygote deficit within populations, were significantly negative for all clusters indicating an excess of heterozygotes. Furthermore, all r_d values were significantly different from those expected under random mating. With clone corrected data, r_d values were not significantly different from the zero value expected for a panmictic population except in cluster 2.

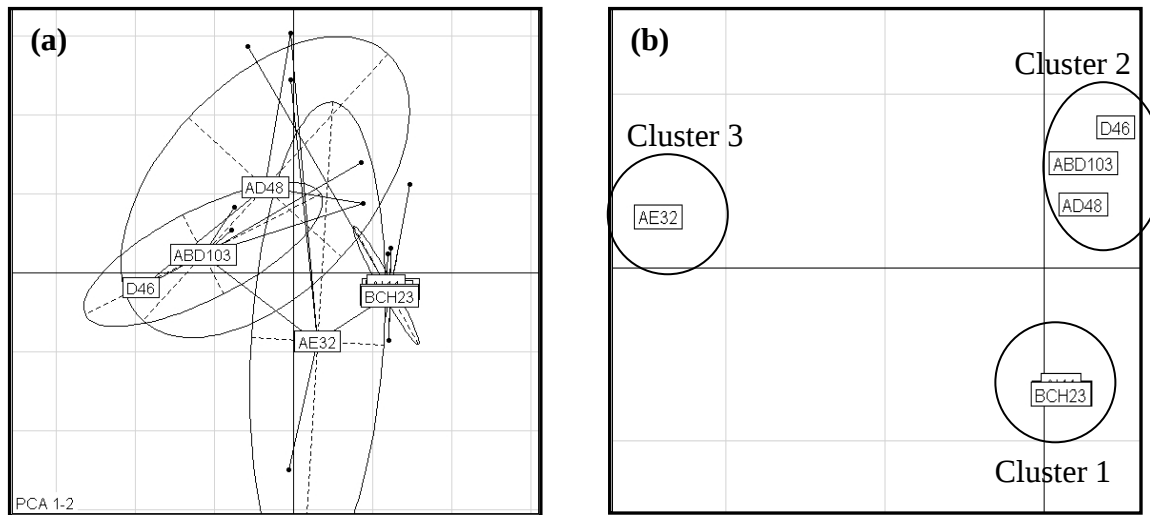


Figure 1: (a) Principal component analysis (PCA) performed on the 405 isolates of *B. lactucae* genotyped by twelve microsatellite markers. Each point represents an isolate, and is connected to the mean point of its population by a black segment. The ellipses are used to point out the dispersion of isolates within each population.

(b) Correspondance analysis (CA) performed on the 14 populations of *B. lactucae* genotyped by twelve microsatellite markers. Clusters identified are represented by a circle with the name of each one indicated. In PCA and CA, each population is named by the resistance gene combination corresponding and followed by the number of isolates.

Table 4: Genetic differentiation (F_{ST}) between clusters.

F_{ST}	Cluster 1	Cluster 2
Cluster 2	0.23*	
Cluster 3	0.25*	0.21*

* Statistically significant ($p < 0.05$).

Table 5: Genetic characteristics of the three clusters of *B. lactucae* isolates revealed by clustering analysis.

	Cluster 1 (N=174)	Cluster 2 (N=197)	Cluster 3 (N=32)
Number of MLG	6	6	4
Number of specific MLG	5	5	2
R	0.029	0.026	0.10
H_o	0.36	0.42	0.42
H_e	0.19	0.29	0.38
Ar	1.49	1.91	2.19
F_{IS}	-0.928	-0.430	-0.106
r_d	0.42*	0.34*	0.64*
r_d (without multicopies)	0.19*	0.013	0.44*

N, Number of isolates; R, clonal genotype diversity; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; Ar, allelic richness; r_d , multilocus linkage disequilibrium with or without multicopies. * Statistically significant ($p < 0.05$)

Mating types:

We determined the MT of isolates representing each different MLG by considering that isolates with the same MLG should exhibit the same MT. To confirm this hypothesis, we determined several MT of isolates belonging to the two most frequent MLG. MT were determined for 33 isolates corresponding to eleven MLGs. B1 and B2 were observed in each cluster (Table 2). Nevertheless, the frequency of MT within each cluster varied strongly. Within cluster 1, all MLGs were B1 except MLG 28 which is a rare MLG, whereas within cluster 2, 75% of isolates would be B2 and 25% B1.

The MT obtained for 16 isolates, corresponding to MLG 7, were B2 type. The four isolates belonging to MLG 55 were MT B1 as the four isolates belonging to MLG40, supporting the hypothesis that for one genotype there is only one MT (Table 2).

Relationship between MLGs

The mutational relationships among the 14 MLGs are illustrated in the minimum spanning network (MSN) (Fig. 2). All the MLGs found in cluster 1 were genetically closely related except MLG 28. MLGs belonging to clusters 2 and 3 were more dispersed in the MSN.

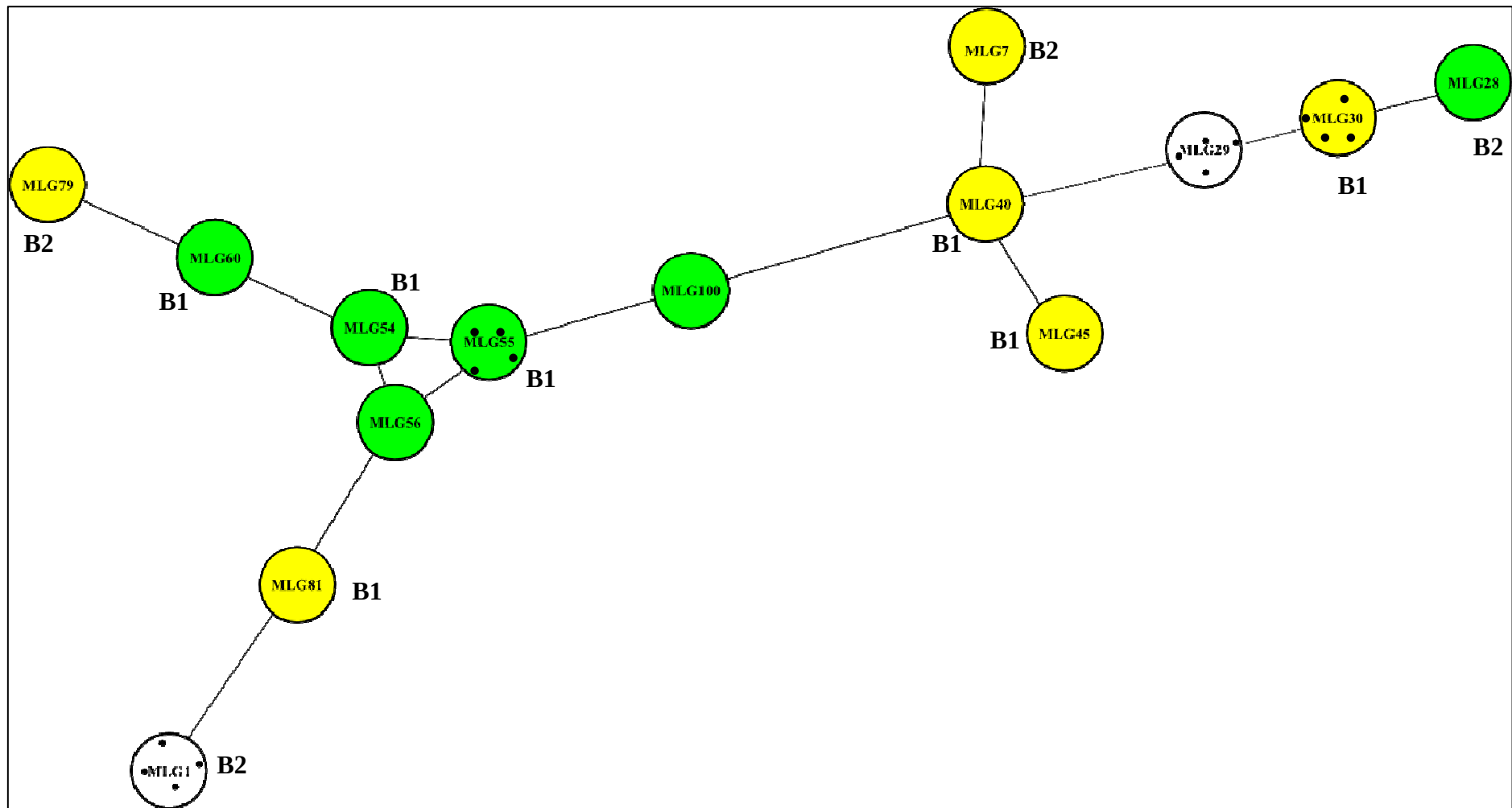


Figure 2: Minimum spanning network among the 14 MLGs of *B. lactucae* observed in France.

Green: MLG found in cluster 1; Yellow: MLG found in cluster 2; White and black points: MLG found in cluster 3; Green or yellow with black points: MLG found in cluster 3 and cluster 1 or 2. Bx, Mating type for each MLG.

Virulence variability and relationships between pathotypes and genotypes:

Virulence phenotypes of 107 strains of *B. lactucae* were characterized on a set of 19 differential hosts and 21 different pathotypes were obtained (Table 6). Two pathotypes were the most frequent (59-63-42-01 and 63-63-09-01) and matched respectively the two most frequent MLGs: MLG 55 and MLG 7. However, MLG 55 corresponded to seven different pathotypes and MLG 7 corresponded to five different pathotypes. In each case, the observed pathotypes are closely related each other and differed, from the dominant, by very few virulence genes (Table 6). For the others MLGs which matched with several pathotypes, only one or two virulence genes were different. One exception was for MLG81 where pathotypes were different for three virulence genes.

Six pathotypes matched different MLGs (Table 6). However, these MLG are closely related on the minimum spanning network (Fig. 2).

Each cluster corresponding mainly to different pathotypes. The main difference between clusters 1 and 2 was for virulence against *Dm3* and *Dm37*. In cluster 3, frequencies of virulence were mainly different from other clusters for most *Dm* genes (Table 6).

A total of 30 pathotype-genotype combinations were identified and four groups of pathotypes could be defined according to the virulence patterns, MLGs relationships and clustering analyses (Table 6, enclosed in boxes). Results indicated a strong congruence between pathotypes and genotypes except for MLG 81 and MLG 79. This strength relationship between pathotype-genotype was supported by a mantel test on the 30 pathotype-genotype combinations which revealed a strong positive correlation between pathotypic and genotypic distance matrixes ($r = 0.675$, $P < 0.0001$).

Table 6: Characterization of *Bremia* isolates: pathotype, microsatellites genotype and clustering analysis.

Differential host	Lednický	UC DM2	Dandie	R4T57D	Valmaine	Sabine	LSE 57/15	UC DM10	Capitan	Hilde II	Pennlake	UC DM14	PIVT 1309	LSE/18	LS 102	Colorado	Ninja	Discovery	Argeles	MLGs found in Cluster 3	MLGs found in Cluster 1	MLGs found in Cluster 2	Total number of isolates
Dm / R	1	2	3	4	5/8	6	7	10	11	12	13	14	15	16	17	18	36	37	38	1 29 30† 55	55 54 60 100	79 30 7 40 45 81	
00-01-15-01	R	R	R	R	R	R	s	R	R	R	R	R	s	s	s	s	R	R	s	1			1
00-33-15-01	R	R	R	R	R	R	s	R	R	R	R	s	s	s	s	s	R	R	s	8			8
57-63-40-01	s	R	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	R	R	s	R	s	s		1		1
59-31-42-01	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	R	R	s	R	s	R	s	s		3		3
59-63-40-01	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	R	R	s	R	s	s		3		3
59-63-42-01	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	R	s	R	s	s	1	19	1 1	22
59-63-43-01	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	R	s	s		11	3	14
59-63-47-01	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	s		1		1
59-63-58-01	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	R	s	s	s	s		1		1
27-63-10-01	s	s	R	s	s	R	s	s	s	s	s	s	R	s	R	s	R	R	s			4	4
59-63-14-01	s	s	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	R	R	s		1		1
63-63-08-00	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	R	R	s	R	R	R		2		2
63-63-09-01	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	R	s	R	R	s		1	19 2	22
63-63-08-01	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	R	R	s	R	R	s	1		1	2
63-31-09-01	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	R	R	s	R	R	s			1	1
63-63-11-01	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	R	R	s			1 2 5	8
63-63-13-01	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	s	R	R	s		8	1	9
63-63-15-01	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	R	s			1	1
63-63-10-01	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	R	s	R	R	s				1
63-63-14-01	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	R	R	s				1
63-63-62-01	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R	s	s	s	s	s	s				1
																							107

† The three isolates MLG30 found in cluster 3 were not phenotyped.

Discussion:

A previous study (Valade *et al.* submitted) on population structure of *B. lactucae* in France had shown an important gene flow between populations, high clonality, and suggest an influence of selection exerted by resistance genes on the population structure.

In the present study, we investigated the selection exerted by resistance genes on population structure of *B. lactucae* in France. To test this hypothesis, isolates of *Bremia* recovered from lettuce cultivars with the same resistance gene combinations were considered as one population. Multivariate analyses revealed that *B. lactucae* isolates could be clustered into three genetically distinct groups according to host cultivar resistance.

The first result supporting this hypothesis was provided by isolates recovered from trap boxes. Indeed, of the 75 isolates caught in south of France crops, just three isolates corresponded to exotic MLG (*i.e.* not found on cultivars). Thus, the others corresponded to the most frequent MLGs found on plants (MLG 55, MLG 7 and MLG1). This result confirmed resistance genes select few genotypes with corresponding virulence. A close relationship between *Dm* genes used and the homogenization of virulence diversity of pathogen populations was already demonstrated by Crute (1987) and Lebeda *et al* (2003).

A new virulence may evolve via several different mechanisms: mutations in virulence genes in clonal lineages (or parasexual processes as mitotic recombination or somatic fusion); sexual recombination between different genotypes; introduction or emergence of a new genotype migrate from other areas or wild host plant. Our data indicate that all these mechanisms could occur in *Bremia* populations.

First, the clusters had a clonal structure as shown by their low genotypic diversity, low genic diversity and their F_{IS} value indicating an excess of heterozygotes relative to random mating. Indeed, strong negative value of F_{IS} are expected in clonal organisms (Balloux *et al.* 2003; Halkett *et al.* 2005) and clonal reproduction generates non-random association between loci (linkage disequilibrium) (Awadalla 2003). Our results showed that a clonal lineage can include several pathotypes as it was observed for eight MLGs (Table 6). This result argues that mutations in a MLG may lead to new virulence in the same genetic background. In each case, the observed pathotypes are closely related each other and differed, from the dominant pathotypes, by very few virulence genes. Two non-exclusive mechanisms may be responsible for this phenotypic variability. The firsts, mutation in avirulence genes, has already been suggested in *B. lactucae* (Lebeda and Zinkernagel 2003) and in several oomycetes plant pathogens, *Phytophthora infestans* (Goodwin 1997), *P. sojae* (Drenth *et al.* 1996),

Plasmopara halstedii (Delmotte *et al.* 2008). The second mechanism, parasexual recombination is also likely, given the high selfing rate of *B. lactucae* inferred from our analysis. One proof could be the relationship between MLG 55 and MLG 60 where all loci were homozygous for MLG 60. Indeed, this mechanism is thought to be responsible for frequent loss of heterozygosity and has been shown to be significant in populations of *Bremia* (Michelmore *et al.* 2008) and other oomycetes (Goodwin 1997; Dobrowolski *et al.* 2003; Ivors *et al.* 2006; Spring and Zipper 2006). Mitotic recombination generally refers to crossing-over during mitosis which results in the loss of heterozygosity at all loci distal to the chromosomal breakpoint. Loss of heterozygosity may also be the result of mitotic gene conversion in which case only a small segment of the chromosome is altered (Goss *et al.* 2009). Given that most avirulence was inherited as single dominant unlinked loci (Michelmore and Ingram 1981; Norwood *et al.* 1983; Norwood and Crute 1984; Michelmore *et al.* 1984; Ilott *et al.* 1987; Michelmore *et al.* 2008), mitotic recombination can reveal recessive variation that previously hidden in heterozygotes (Goodwin 1997).

Isolates with closely related MLGs but the same virulence phenotypes (Table 6, Fig.1), are most likely to have been generated via stepwise patterns of mutation in neutral markers, following establishment of a founding MLG. Stepwise mutation has been demonstrated as an important mechanism for generating diversity in populations of asexual pathogen species (Jimenez-Gasco *et al.* 2004; Fisher *et al.* 2005; Barrett *et al.* 2008a). All these mechanisms are supported by the strong positive correlation between phenotypic and genotypic distance matrixes ($r = 0.675$).

Second, our results indicated that occasional recombination events may occur in *Bremia* populations and more particularly in cluster 2 where genic diversity is higher and multilocus linkage disequilibrium (r_d), performed without multicopies, is not significantly different from the value expected under random mating. This result is supported by the variability observed in cluster 2 with twelve different pathotypes identified (Table 6). Indeed, MLGs of cluster 2 were more dispersed on the MSN and several pathotypes differed by many virulence genes. Sexual recombination is considered to be important for generating considerable genetic variation in virulence in populations of *B. lactucae* on *L. sativa* (Gustafsson *et al.* 1985; Lebeda and Schwinn 1994; Michelmore *et al.* 2008) and was also suggested to occur particularly in center-west of France where the production of lettuce is absent or weak during four to five months (Valade *et al.*, submitted). Beside, genotypic variability within cluster 2 was higher in center-west than in South of France. Nevertheless,

isolates leading to outcrossing and the resulting MLGs are more difficult to highlight and need further research.

Third, our results indicate that isolates may have emerged through migration from the wild host plant, *L. serriola*. Isolates of MLG 1, found only in cluster 3, were not genetically closely related with the other isolates (three private alleles) and pathotypes were very different. These isolates were, likely, isolates that allowed clustering into three groups and not two because of their weight in the analyses. Two MLG1 isolates were recovered from “trap” boxes and more precisely from the seedling PIVT1309 which is a *L. serriola* host. Moreover, in a previous study (Valade *et al.* submitted), MLG 1 isolates were also found on wild *L. serriola* and we demonstrated that gene flow is likely to occur between *Bremia* from *L. sativa* and *L. serriola*. This result is also corroborated by previous inoculation studies (Lebeda *et al.* 1988; Lebeda *et al.* 2004; Lebeda *et al.* 2008). It can thus be expected that gene flow, between the two hosts, could be favored by some resistance genes (likely, resistance gene E in our study) and could permit a quick break down of resistance coming from *L. serriola*. Moreover, this selection could favor reproduction between isolates from *L. sativa* and isolates from *L. serriola* and could thus allow new recombinations of virulence genes.

The combination of large populations, due to asexual reproduction, recombination events, with strong selective pressures induced by resistance genes is likely to favour the emergence of new virulent pathotypes by all the mechanisms previously described. According clusters, the importance of each mechanism can be different. Hence, resistance genes impact differently the population structure of *Bremia* in France and select different phenotypic and genetic groups. Breeders used pyramiding of major resistance genes to reduce selection pressure and protect crops. Nevertheless, combination of major resistance genes is more durable only if each resistance gene is not ever breakdown by some populations and if each resistance gene used is not deployed one by one in other cultivars (Parlevliet 1997). Unfortunately, within lettuce varieties, resistance gene D was first deployed alone, four or five years ago, and has been more and more used in combination (with resistance genes ever used) at a large scale and high frequency (Thabuis, personal communication). Hence, we could suppose that this resistance management have contributed to the population structure observed in this study by promoting recombination events in *Bremia* populations and emergence of new virulence phenotypes. We could hypothesise that if resistance gene D was used alone, we would observed an evolution nearest to the evolution of *Bremia* observed in

cluster 1 (i.e. an evolution through mutations) which is, likely, less severe because this is generating less diversity.

Conclusion:

This study on the genetic structure of *B. lactucae* in France is the first providing evidence of the selection pressure exerted by resistance genes on population structure of *Bremia*. Our results revealed three genetic groups that were structured by different resistance gene combinations of cultivated lettuce. Our analyses showed that this structure may result from different adaptation mechanisms for virulence. Next step could be to investigate if the distribution and diversity of resistance genes will have impact on the distribution and diversity of effectors in pathogen populations.

References

- Agapow PM, Burt A** (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* 1, 101-102.
- Arnaud-Haond S, Belkhir K** (2007) GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Mol Ecol Notes* 7, 15 - 17.
- Awadalla P** (2003) The evolutionary genomics of pathogen recombination. *Nature Reviews Genetics* 4, 50-60.
- Balloux F, Lehmann L, de Meeus T** (2003) The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics* 164, 1635 - 1644.
- Barrett LG, Thrall PH, Burdon JJ, Linde CC** (2008) Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 23, 678-685.
- Bruvo RI, Michiels NK, D'Souza TG, Schulenburg H** (2004) - A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. - 13, - 2106.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AW** (1967) Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet.* 19, 233-257.
- CRUTE IR, JOHNSON AG** (1976) The genetic relationship between races of *Bremiae lactucae* and cultivars of *Lactuca sativa*. *Annals of Applied Biology* 83, 125-137.
- Crute IR** (1987) The geographical distribution and frequency of virulence determinants in *Bremia lactucae*: relationships between genetic control and host selection. In: Wolfe MS, Caten CE, eds. *Populations of plant pathogens: their Dynamics and Genetics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Delmotte F, Giresse X, Richard-Cervera S, M'Baya J, Vear F, Tourvieille J, Walser P, de Labrouhe DT** (2008) Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection Genetics and Evolution* 8, 534-540.
- Dobrowolski M, Tommerup I, Shearer B, O'Brien P** (2003) Three clonal lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia revealed by microsatellites. *Phytopathology* 93, 695 - 704.
- Drenth A, Goodwin SB** (1999) Population structure of oomycetes. In: *Structure and Dynamics of fungal populations* (ed. Worral JJ), pp. 195-224. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Excoffier L, Smouse P, JM. Q** (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131. 479-491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S** (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software for population genetics data analysis. *Evol. Bioinformatics Online* 1, 47-50.

- Farrara BF, Iltott TW, Michelmore RW** (1987) Genetic analysis of factors for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in species of lettuce (*Lactuca sativa* and *L. serriola*). *Plant Pathology* 36, 499-514.
- Fisher MC, Hanage WP, de Hoog S, Johnson E, Smith MD, White NJ, Vanittanakom N** (2005) Low Effective Dispersal of Asexual Genotypes in Heterogeneous Landscapes by the Endemic Pathogen *Penicillium marneffei*. *PLoS Pathog* 1, e20 EP -.
- Goodwin SB** (1997) The Population Genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87, 462-473.
- Goss EM, Larsen M, Chastagner GA, Givens DR, Grünwald NJ** (2009) Population Genetic Analysis Inferred Migration Pathways of *Phytophthora ramorum* in US Nurseries. *PLoS Pathog* 5, e1000583.
- Goudet J** (1995) FSAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86, 485-486.
- Goyeau H, Halkett F, Zapater M, Carlier J, Lannou C** (2007) Clonality and host selection in the wheat pathogenic fungus *Puccinia tritici*. *Fungal Genetics and Biology* 44, 474 - 483.
- Gustafsson M, Liljeroth E, Gustafsson I** (1985) Pathogenic variation and sexual reproduction in Swedish populations of *Bremia lactucae*. In: TAG Theoretical and Applied Genetics, pp. 643-649.
- Halkett F, Simon JC, Balloux F** (2005) Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 194-201.
- Hulbert SH, Michelmore RW** (1985) Linkage analysis of genes for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa*). In: TAG Theoretical and Applied Genetics, pp. 520-528.
- Iltott TW, Durgan ME, Michelmore RW** (1987) Genetics of Virulence in California Populations of *Bremia lactucae* (Lettuce Downy Mildew). *Phytopathology* 77, 1381-1386.
- Ivors K, Garbelotto M, Vries IDE, Ruyter-Spira C, Hekkert BT, Rosenzweig N, Bonants P** (2006) Microsatellite markers identify three lineages of *Phytophthora ramorum* in US nurseries, yet single lineages in US forest and European nursery populations. *Molecular Ecology* 15, 1493-1505.
- Jimenez-Gasco M, Milgroom M, Jimenez-Diaz RM** (2004) Stepwise Evolution of Races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Inferred from Fingerprinting with Repetitive DNA Sequences. *Phytopathology* 94, 228-235.
- Johnson R** (1979) The Concept of Durable Resistance. *Phytopathology* 69, 198-199.
- Johnson R** (1984) A critical analysis of durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* 22, 309 - 330.
- Jombart T** (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24, 1403-1405.
- Lebeda A, Schwinn FJ** (1994) The Downy Mildews - an Overview of Recent Research Progress. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 101, 225.
- Lebeda A, Pink DAC, Astley D** (2002) Aspects of the interactions between wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). In: *Advances in Downy Mildew Research*, pp. 85-117.
- Lebeda A, Zinkernagel V** (2003) Evolution and distribution of virulence in the German population of *Bremia lactucae*. *Plant Pathology* 52, 41-51.
- Maisonneuve B, Bellec Y, Anderson P, Michelmore RW** (1994) Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Lactuca serriola* to existing clusters of resistance genes. In: TAG Theoretical and Applied Genetics, pp. 96-104.
- Maisonneuve B, Bellec Y, Souche S, Lot H** (1999) New resistance against downy mildew and lettuce mosaic potyvirus in wild *Lactuca* spp. in : Lebeda, A.(ed), Kristkova, E., *Proceedings of the Eucarpia meeting on leafy vegetables genetics and breeding*, p: 191-197.
- McDonald BA, Linde C** (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40, 349-+.
- Michelmore RW, Ingram DS** (1981) Recovery of Progeny Following Sexual Reproduction of *Bremia Lactucae*. *Transactions of the British Mycological Society* 77, 131.
- Michelmore RW, Norwood JM, Ingram DS, Crute IR, Nicholson P** (1984) The inheritance of virulence in *Bremia lactucae* to match resistance factors 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 and 11 in lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Pathology* 33, 301-315.

- Michelmore R, Wong J** (2008) Classical and molecular genetics of *Bremia lactucae*, cause of lettuce downy mildew. *European Journal of Plant Pathology* 122, 19-30.
- Nei M** (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- Norwood JM, Crute IR, Gordon PL** (1983) Downy mildew of lettuce - inheritance of specific virulence. Annual report, 1982., 73.
- Norwood JM, Crute IR** (1984) Downy mildew of lettuce. Genetic interactions controlling specificity. Annual report, 1983., 78-79.
- Palumbi SR** (2001) Humans as the World's Greatest Evolutionary Force. *Science* 293, 1786-1790.
- Parlevliet JE** (1997) Durable resistance In: H. Hartleb, R. Heitefuss & H.H. Hoppe (Eds.), *Resistance of Crop Plants against Fungi*.
- Perrier X, Jacquemoud-Collet JP** (2006) DARwin software.
- Prim R** (1957) Shortest connection networks and some generalizations. *Bell System Technical Journal* 36, 1389-1401.
- Sokal RR, Michener CD** (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull* 28, 1409-1438.
- Spring O, Zipper R** (2006) Evidence for asexual genetic recombination in sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*. *Mycological Research* 110, 657-663.
- Van Ettekovén K, van der Arend A** (1999) Identification and denomination of "new" races of *Bremia lactucae*, 171-181.
- Weir B, Cockerham C** (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.
- Xhaard C, Fabre B, Andrieux A, Gladieux P, Barrès B, Frey P, Halkett F** (2011) The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. *Molecular Ecology* 20, 2739-2755.

CHAPITRE 5

VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE D'EFFECTEURS CANDIDATS (RxLR) DANS DES POPULATIONS FRANÇAISES DE *BREMIA LACTUCAE*

1. Introduction

L'étude de la structure génétique des populations permet d'appréhender les forces évolutives qui s'exercent sur celles-ci. Nous avons montré que les gènes de résistance de l'hôte exercent une pression de sélection qui structure les populations françaises de *B. lactucae*.

La sélection conduit à l'évolution des gènes de résistance de l'hôte pour reconnaître les protéines d'avirulence de l'agent pathogène et à l'évolution des gènes d'avirulence pour éviter la reconnaissance par les protéines de résistance, décrit sous l'hypothèse de la Reine rouge. Sous cette hypothèse, deux scénarii évolutifs peuvent se produire au niveau populationnel : (i) la course aux armements où des balayages sélectifs se produisent ; les allèles sont fixés de façon répétée au fur et à mesure que les deux espèces acquièrent de nouvelles « armes » et de nouvelles défenses (Bergelson 2001) ; (ii) la guerre des tranchées où la sélection est balancée et permet le maintien à long terme de la variabilité génétique aux loci concernés (Michelmore et Meyers 1998). La connaissance du type de sélection et de son influence sur l'évolution des populations de *Bremia* peut permettre de documenter les théories sur l'évolution des interactions hôtes-pathogènes mais aussi de proposer des stratégies de gestion durable des gènes de résistance.

Les agents pathogènes produisent des molécules effectrices qui sont sécrétées dans la plante hôte. Ces protéines d'une taille généralement inférieure à 300 acides aminés et potentiellement nécessaires au pouvoir pathogène peuvent être reconnues par les protéines de résistance de la plante hôte et conduire à l'arrêt du développement de l'agent pathogène. Ils seront alors nommés gènes d'avirulence (Jones et Dangl 2006). De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer les types de sélection s'exerçant sur les effecteurs pathogènes. Elles ont montré que les deux types de sélection pouvaient s'exercer sur ces gènes et qu'elles étaient souvent liées au type d'interaction (directe ou indirecte) entre la protéine effectrice et la protéine de résistance (Allen *et al.* 2004 ; Dodds *et al.* 2006 ; Ma et Guttman 2008 ; Staats *et al.* 2007 ; Stergiopoulous *et al.* 2007 ; Stergiopoulous et De Wit 2009 ; Win *et al.* 2007). Par exemple, une sélection diversifiante est observée chez *Cladosporium fulvum* pour le gène d'avirulence *Avr4* (Stergiopoulous *et al.* 2007) alors qu'une sélection balancée est observée pour le gène *ATR13* chez *Hyalonospora parasitica* (Allen *et al.* 2004) et le gène d'avirulence *AvrL567* chez *M. lini* (Dodds *et al.* 2006).

Ces études sont généralement réalisées sur des séquences de gènes provenant d'isolats d'origines variées ou des séquences homologues d'espèces proches. Mais, dans les agro-écosystèmes, l'utilisation de résistances spécifiques peut sélectionner une mosaïque de génotypes différents chez l'agent pathogène dans différentes régions géographiques. Ainsi, une approche de génétique des populations peut être utilisée pour reconstruire les patrons de sélection dans le temps et dans l'espace et mieux comprendre l'évolution des interactions entre l'hôte et l'agent pathogène dans les agro-écosystèmes (Stukenbrock et McDonald 2009). A ce jour, peu d'études ont utilisé cette approche, nous pouvons citer Schürch et collaborateurs (2004) sur l'évolution de *Nip1* chez *Rhynchosporium secalis*, Stukenbrock et McDonald (2007) sur l'évolution de l'effecteur *SnTOxA* chez *Phaeosphaeria nodorum*, Stergiopoulos et collaborateurs (2007) sur l'évolution de plusieurs effecteurs de *C. fulvum*, et deux études sur l'évolution de gènes d'avirulence chez *Leptosphaeria maculans* (Gout *et al.* 2007 ; Parlange *et al.* 2009). Ces études ont concerné des séquences de gènes d'effecteurs dans différentes populations géographiques pour déterminer l'action de la sélection locale exercée par les populations d'hôtes. Ainsi, la connaissance des fréquences alléliques et la distribution des allèles peut permettre d'identifier les mécanismes moléculaires (mutations non-synonymes, délétion, insertion) qui caractérisent l'acquisition de la virulence chez un agent pathogène. Cette approche peut également permettre d'identifier des signes de sélection positive dans des gènes candidats et percevoir leur fonction dans l'interaction hôte-pathogène. Par exemple, l'identification d'une délétion complète d'un gène candidat effecteur peut indiquer que ce gène n'est pas essentiel au pouvoir pathogène alors que l'observation d'une sélection diversifiante peut indiquer que ce gène est important pour le pouvoir pathogène.

Les oomycètes possèdent un très grand nombre de gènes codant pour des effecteurs. Au moins treize gènes d'avirulence ont été clonés à ce jour chez des espèces de *Phytophthora* (*P. infestans* et *P. sojae*) et chez *Hyaloperonospora parasitica*. Ces protéines d'avirulence présentent toutes un signal peptide suivi d'un motif conservé RxLR (*i.e.* arginine- acide aminé x-leucine-arginine). Ce motif peut aussi être associé à un motif dEER moins conservé que le motif RxLR mais caractérisé par une série d'acides aminés acides (Kamoun 2006). Le motif RxLR-dEER est similaire en séquence et en localisation au motif RxLxE/D/Q nécessaire pour la translocation des protéines effectrices de *Plasmodium falciparum* dans le cytoplasme des cellules sanguines de l'hôte (Hiller *et al.* 2004). Ainsi, il a été montré que le motif RxLR est impliqué dans la translocation chez l'hôte (Birch *et al.* 2006 ; Morgan et Kamoun 2007 ; Whisson *et al.* 2007) et que ces protéines effectrices sont soumises à une sélection positive dans leur domaine C-terminal (Haas *et al.* 2009 ; Jiang *et al.* 2008 ; Vleeshouwers *et al.* 2008 ;

Win *et al.* 2007). Ces effecteurs RxLR sont donc des protéines modulaires avec deux principaux domaines fonctionnels : le domaine N-terminal contient le signal peptide et le motif RxLR qui a pour fonction la sécrétion et la translocation, et le domaine C-terminal contient l'activité effectrice impliquée dans la manipulation des défenses de l'hôte (Kamoun 2006). Les effecteurs RxLR sont considérés comme étant des membres d'une famille multigénique ayant évolué rapidement à partir d'un seul gène présent chez ancêtre commun (Jiang *et al.* 2008). La duplication de copies très proches et la variation du nombre de copies sont fréquentes dans les gènes codant pour des effecteurs à motif RxLR (Qutob *et al.* 2009). Par exemple, de nombreux effecteurs RxLR putatifs, de 17% dans le génome de *P. sojae* à 65% dans le génome de *P. ramorum*, ont été évalués comme étant présents en un minimum de deux copies (Qutob *et al.* 2009). Cette caractéristique indiquerait la possibilité d'une importante redondance dans leurs fonctions (Birsch *et al.* 2008).

La connaissance de ce motif permet de rechercher des effecteurs candidats dans les données génomiques chez différents oomycètes. Dix sept gènes candidats codant 17 protéines effectrices à motif RxLR ont ainsi été identifiés chez *B. lactucae* (Michelmore *et al.* 2008 et communication personnelle). Nous avons testé le polymorphisme pour ces effecteurs candidats et initié une approche de génétique des populations pour étudier l'évolution de ces effecteurs dans des populations de *Bremia* soumises aux pressions de sélection exercées par les gènes de résistance de la laitue.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Choix des effecteurs candidats étudiés

Dix sept séquences d'effecteurs candidats à motif RxLR (ou RxLR-like) ont été identifiées dans une banque de cDNA de *B. lactucae* (données personnelles de R. Michelmore). Un test préliminaire du polymorphisme a été effectué en utilisant seize souches de *B. lactucae* d'origines géographiques variées et de géotypes différents (identifiés avec 12 marqueurs microsatellites) (Tableau V.1)

Tableau V.1 : Caractéristiques des seize isolats de *B. lactucae* utilisés pour l'étude préliminaire du polymorphisme des 17 effecteurs candidats à motif RxLR.

Isolats	Hôte	Site	MLG
Serr66/99	<i>L. serriola</i>	Allemagne	67
B4g/06	<i>L. serriola</i>	Eyragues (13)	48
Serr04/07	<i>L. serriola</i>	Aubagne (13)	1
C82:P24	<i>L. sativa</i>	Californie (USA)	65
Bl: 1	<i>L. sativa</i>	Souche officielle	20
Bl: 25	<i>L. sativa</i>	Souche officielle	35
Bl: 26	<i>L. sativa</i>	Souche officielle	61
FR06-b/06	<i>L. sativa</i>	Eyragues (13)	1
2G6a/09	<i>L. sativa</i>	Eyragues (13)	55
FR13B10/09	<i>L. sativa</i>	Eyragues (13)	55
FR04/08	<i>L. sativa</i>	Avignon (84)	39
FR10-a/08	<i>L. sativa</i>	Le passage (47)	39
FR03-f/08msp3	<i>L. sativa</i>	Brion (49)	66
FR11-b/08	<i>L. sativa</i>	St martin en haut (69)	7
F915a	<i>L. sativa</i>	S.A. Guenot (45)	7
F920b	<i>L. sativa</i>	Delahaye (37)	7

MLG, génotype multilocus déterminé par 12 microsatellites.

2.2. Populations de *B. lactucae*

L'étude du polymorphisme, à l'échelle populationnelle, des effecteurs candidats RxLR a été réalisée dans cinq populations :

- Deux populations (pop 1 et 2) issues des deux principaux bassins de production de laitue en France (Sud-Est et Centre-Ouest) pour caractériser le polymorphisme de huit effecteurs. Ces populations sont constituées d'isolats prélevés dans des sites proches, à la même période de l'année et sur trois variétés différentes (collecte de 10 isolats par variété) (Tableau V.2 a, b).
- Trois autres populations du Centre-Ouest (pop 3, 4 et 5) pour compléter l'étude du polymorphisme de RxLR7 et RxLR9 (Tableau V.IIc).

Tableau V.2 a : Caractéristiques de la population du Centre-Ouest (pop 1) choisie pour l'étude du polymorphisme des huit RxLR.

Région	Dpt	Site	saison	Combinaisons de gènes de résistance des plantes hôtes	MLG
Centre-Ouest	37	Saint Martin le beau	printemps-été 2009	AD	30 et 7
				D	7
		Tours		D	7

10 isolats de *B. lactucae* par plante hôte ont été prélevés.

Tableau V.2 b : Caractéristiques de la population du Sud-Est (pop 2) choisie pour l'étude du polymorphisme des huit RxLR.

Région	Dpt	Site	saison	Combinaisons de gènes de résistance des plantes hôtes	MLG
Sud-Est	84	Avignon- GRAB	Hiver 2009/2010	ABD	7
				ABC	55
		Avignon- Cantarel		ABC	55 et 60

10 isolats de *B. lactucae* par plante hôte ont été prélevés.

Tableau V.2 c : Caractéristiques des trois populations du Centre-Ouest choisies pour compléter l'étude du polymorphisme des RxLR7 et RxLR9.

Région	Dpt	Site	saison	Combinaisons de gènes de résistance des plantes hôtes	MLG
Centre-Ouest	77	Chailly en Bière (3)	Hiver 2010/2011	AD	79
				AD	79 et 7
	35	Roz sur Couesnon (4)	Hiver 2010/2011	ABD	45
		Chateaugiron (5)		NC	55

NC : gènes de résistance non connus. Les chiffres entre parenthèse indiquent le numéro de la population. 10 isolats de *B. lactucae* par plante hôte ont été prélevés.

2.3. Méthodes d'analyses du polymorphisme des séquences RxLR

2.3.1. Séquençage « direct »

Dans un premier temps, dix isolats des populations (1) et (2) ont été séquencés par une méthode de séquençage « direct » (séquençage classique). *B. lactucae* étant diploïde, le séquençage direct permet d'identifier des sites hétérozygotes et des sites polymorphes dans les séquences des gènes (Fig. V.1) mais cette méthode ne permet pas d'obtenir la séquence exacte des allèles pour un locus présentant plusieurs sites hétérozygotes. Cette étude préalable a été réalisée afin de cloner et séquencer seulement les loci présentant des sites hétérozygotes et non la totalité des effecteurs. Ainsi, le nombre de sites hétérozygotes par effecteur testé a été déterminé.

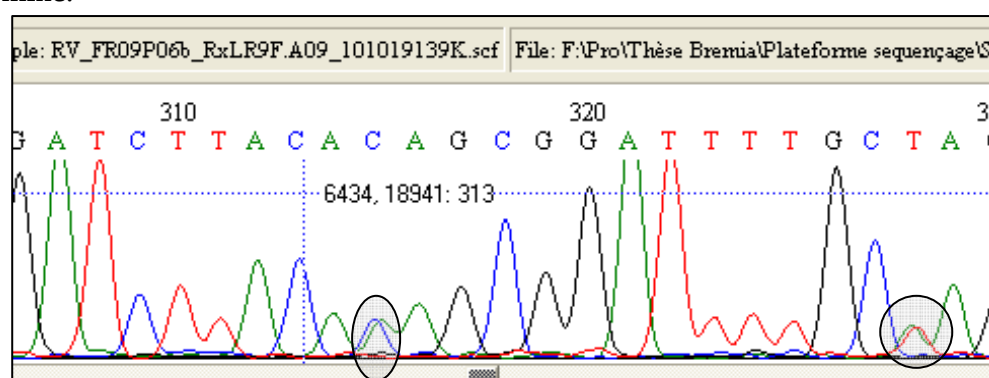


Figure V.1 : Portion de la séquence de l'effecteur candidat RxLR9. Deux sites hétérozygotes sont représentés dans les cercles grisés.

2.3.2. Clonage bactérien et séquençage

Nous avons séquençé chaque allèle présentant des sites hétérozygotes après clonage dans des bactéries. Pour ce faire, après une amplification classique par PCR des effecteurs candidats, les produits PCR ont été insérés dans des plasmides puis des bactéries ont été transformées par choc thermique avec les plasmides contenant l'insert à séquençer. Après incubation, les colonies bactériennes transformées présentant l'insert ont été isolées. Avec cette technique, chaque colonie bactérienne transformée contient un seul allèle du locus étudié. Au moins cinq colonies, par isolat étudié, ont été séquençées soit dans les deux sens (Forward et Reverse) soit dans un seul sens (Forward) si la séquence était inférieure à 500 pb.

2.3.3. Méthode de « génotypage » à haut débit : la HRM (High Resolution Melting)

2.3.3.1. Principe de la technique HRM

La technique HRM est basée sur les propriétés de fusion des ADN double brins. La température de fusion d'un ADN double brin est définie comme la température où 50% de l'ADN est simple brin (SantaLucia Jr 1998). La paire nucléotidique CG possède une meilleure tolérance aux hautes températures de fusion que la paire nucléotidique AT. Ainsi, si un allèle a une plus grande proportion de CG, sa température de fusion (T_m) sera plus élevée. L'analyse HRM est une extension de l'analyse des courbes de fusion, devenue possible grâce à la nouvelle génération des fluorophores incorporés à l'ADN double brin (Wittwer *et al.* 2003). Ces fluorophores ont une faible toxicité pour la PCR et peuvent être utilisés à de hautes concentrations permettant la saturation complète du produit PCR double brin. Cette saturation permet d'empêcher la redistribution des fluorophores dans des régions non dénaturées pendant la dissociation ; ainsi la fluorescence mesurée est d'une très grande précision (c.à.d. qu'il y a une linéarité entre la fluorescence et la courbe de dénaturation de l'ADN) (Wittwer *et al.* 2003). Cette caractéristique permet d'obtenir une plus grande résolution des courbes de fusion et rend possible, par exemple, la détection d'un seul SNP dans des amplicons PCR et donc la discrimination de différents allèles en fonction de leur T_m (Fig. V.2). La technique HRM est considérée comme la méthode la plus simple pour le génotypage et la détection de mutations du fait qu'elle est réalisée immédiatement après la qPCR (Montgomery *et al.* 2007 ; Reed *et al.* 2007). Cette méthode a, par exemple, été utilisée pour rechercher des mutations liées à des maladies humaines (Millat *et al.* 2009 ; Pineda-Alvarez *et al.* 2010), pour génotyper des bactéries (Stephens *et al.* 2008) ou des algues

(Granados-Cifuentes *et al.* 2011), ou pour des études génétiques sur les espadons (Smith *et al.* 2010).

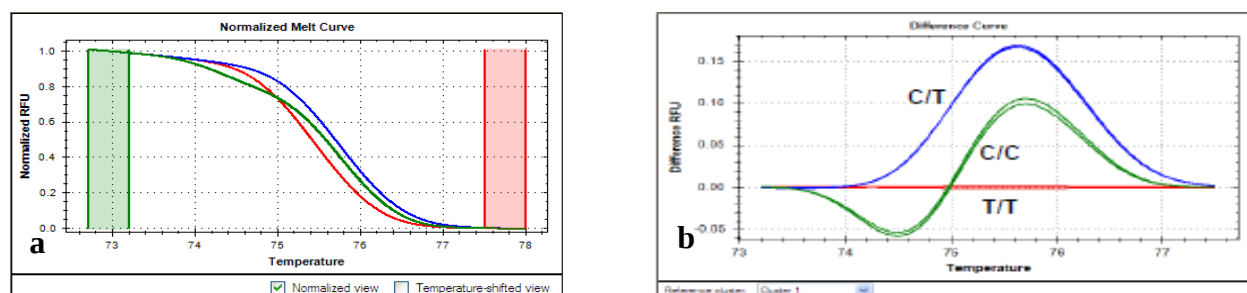


Figure V.2: Courbes de fusion de trois allèles différents. qui sont normalisées (a) Représentation après normalisation des données. (b) Représentation des trois courbes en utilisant une courbe comme référence (en rouge) grâce au logiciel de la plateforme HRM (Precision Melt Analysis Software™ Biorad). Les SNPs de chaque courbe sont indiqués.

2.3.3.2. Méthodologie

L'utilisation de la technique HRM nécessite dans un premier temps la mise au point de la PCR quantitative en temps réel (qPCR) :

➤ Choix des amorces et de l'amplicon :

Il faut dessiner des amorces qui permettent l'amplification d'un produit PCR final de 80 à 150 bp et qui s'hybrident à une température comprise entre 55 et 65°C. Elles ne doivent pas former de dimères ou de structures secondaires.

Pour chaque effecteur étudié en HRM, nous avons dessiné plusieurs couples d'amorces permettant l'amplification d'un produit PCR représentatif des allèles obtenus par séquençage. Par exemple, si deux SNPs permettaient la discrimination de trois allèles, nous avons dessiné les amorces de façon à amplifier ces deux SNPs.

➤ Test d'efficacité des amorces :

Dans une réaction qPCR, l'efficacité de la réaction doit être très proche de 100%. Une gamme standard est faite pour déterminer cette efficacité (dilution en série des ADN de 2ng/μL à 2.10⁴ ng/μL) et un témoin (eau) est réalisé pour vérifier qu'il n'y a pas amplification d'un produit non spécifique (en regardant la courbe de fusion). Pour déterminer l'efficacité, une courbe du Ct (Threshold cycle, unité de quantification de la qPCR : point où la fluorescence dépasse de manière significative le bruit de fond) est tracée en fonction de la

quantité d'ADN initial. Si l'efficacité est de 100 % on a une pente de -3, et un R^2 environ égal à 1. Pour pouvoir utiliser des amorces en qPCR, il faut que le R^2 soit supérieur à 0,985 et l'efficacité comprise entre $0,85 < E < 1,05$.

La valeur de Ct obtenue pour chaque dilution permet de déterminer la concentration idéale de départ de l'ADN à amplifier. La valeur du Ct doit être comprise entre 15 et 30 et cette valeur doit être obtenue pour une concentration pratique à la manipulation et permettant une bonne reproductibilité.

2.3.3.3. Protocole d'amplification

Les réactions de qPCR suivies par l'analyse HRM ont été faites en utilisant le fluorophore Evagreen (Biorad) sur le CFX96 (Biorad) selon le protocole d'amplification suivant :

- 98°C pendant 2 minutes
 - 98°C pendant 5 secondes
 - T_m des amorces (55-60°C) pendant 10 secondes
 - 98°C pendant 1 minute
 - 70°C pendant 1 minute
 - 75°C à 95°C par incrément de 0.2°C toutes les 10 secondes et lecture de la fluorescence à chaque incrément permettant l'obtention de la courbe de fusion qui permettra l'analyse HRM.
- } 39 fois

2.3.3.4. Analyse HRM

Pour chaque plaque qPCR, des duplicats ou des triplicats de chaque amplification ont été réalisés pour valider la reproductibilité des réactions. Chaque allèle différent d'un effecteur préalablement séquencé a été amplifié et analysé par HRM. Les groupes obtenus permettent de discriminer les différents allèles. Ensuite, nous avons amplifié des allèles de séquence inconnue pour les isolats de *B. lactucae* et comparé les courbes de fusion obtenues avec les courbes de fusion des allèles connus. Ainsi, selon les courbes de fusion, nous avons déterminé les allèles présents pour chaque isolat dans les populations étudiées. Dans chaque plaque qPCR, nous avons mis des témoins positifs (tous les allèles possibles) pour éviter des erreurs d'assignation qui pourraient être dues à la variabilité des « runs » entre eux. Si une nouvelle courbe de fusion était obtenue avec les allèles de séquence inconnue, la séquence a

été vérifiée après clonage bactérien. Chaque nouvel allèle obtenu, a été utilisé comme témoin positif pour les « runs » suivants.

2.3.4. Détermination du nombre de copies des effecteurs par qPCR et séquençage d'un gène de référence

Afin d'essayer d'identifier le nombre de copies des effecteurs candidats dans le génome de *B. lactucae*, un protocole de PCR quantitative a été mis au point. L'amplification de deux gènes de référence (considérés en monocopie dans le génome), la bêta-tubuline et l'actine ont été comparées avec l'amplification des effecteurs RxLR présentant des signes de multicopies après les résultats de séquençage.

Le gène de la bêta-tubuline a également été séquencé pour cinq isolats de chaque population (1 et 2) afin de pouvoir comparer le polymorphisme des effecteurs par rapport à un gène de ménage soumis à une évolution répondant à la théorie neutraliste.

3. Résultats

3.1. Polymorphisme des effecteurs candidats

Le polymorphisme des effecteurs candidats pour seize souches de *B. lactucae* a été déterminé. En parallèle, l'équipe de R. Michelmore a également étudié le polymorphisme de ces gènes candidats avec leur propre set d'isolats.

La comparaison des résultats a permis d'identifier huit gènes candidats polymorphes qui sont potentiellement intéressants pour l'étude du polymorphisme à l'échelle des populations (Tableau V.3).

Tableau V.3 : Caractéristiques des séquences des 17 effecteurs candidats à motif RxLR.

Locus	Taille attendue (pb)	Peptide signal	Polymorphisme Observé sur un set de 16 souches
RxLR1	303	oui	non
RxLR2	378	oui	oui
RxLR3	426	oui	oui
RxLR4	345	oui	oui
RxLR5	309	oui	oui
RxLR6	318	oui	très faible
RxLR7	519	oui	oui
RxLR8	972	oui	très faible
RxLR9	726	oui	oui
RxLR10	606	oui	très faible
RxLR11	612	oui	très faible
RxLR12	561	oui	très faible
RxLR13	439	oui	très faible
RxLR14	363	oui	oui
RxLR15	812	oui	non
RxLR16	558	oui	oui
RxLR17	654	non	oui

Les huit effecteurs choisis pour l'étude du polymorphisme dans les populations de *Bremia* sont en grisés.

3.2. Polymorphisme des effecteurs candidats RxLR dans les populations françaises de *B. lactucae*

Le séquençage d'un gène pour un grand nombre d'isolats est long et coûteux. Afin de pouvoir étudier l'évolution d'effecteurs candidats dans un grand nombre de populations, nous avons utilisé la technique HRM qui peut permettre l'identification à haut débit d'allèles présents dans une population. Nous avons ainsi mis au point cette méthode pour différents effecteurs de *Bremia*.

3.2.1. RxLR2 (378pb)

Douze sites hétérozygotes (Hz) ont été observés dans la séquence de l'effecteur candidat après le séquençage de 20 isolats (dix isolats de chaque population 1 et 2). Néanmoins, le clonage et le séquençage de trois inserts par isolat n'a pas permis d'obtenir des séquences de bonne qualité notamment à cause de la présence d'un motif microsatellite dans

la séquence après les motif RxLR-like et DEER. Ceci pourrait indiquer que cet effecteur candidat est un pseudogène ce qui est probable du fait de l'importance des pseudogènes à motif RxLR dans le génome des oomycètes (Win *et al.* 2007). Ainsi, nous avons décidé de ne pas étudier la dynamique évolutive de cet effecteur candidat dans les populations de *Bremia*.

3.2.2. RxLR4 (345pb)

Dix sites Hz ont été observés après le séquençage direct des 20 isolats. Ces sites se trouvent principalement à la fin de la séquence. Ces sites Hz ont été retrouvés dans les dix isolats du Centre-Ouest (Pop1) séquencés. Ils ont également été identifiés dans trois isolats de la population du Sud-Est (2) pris sur la variété jumper. Ces isolats présentent tous des génotypes identiques avec les 12 marqueurs microsatellites (MLG7). Les sept autres isolats de la population 2 séquencés ne présentent pas ces sites hétérozygotes et ont un génotype différent (MLG 55).

Cet effecteur candidat semble être un choix intéressant pour étudier son polymorphisme dans les populations de *Bremia*. Cependant, la séquence protéique ne contient pas un vrai motif RxLR. Nous avons donc décidé de ne pas continuer l'étude de ce gène candidat pendant la thèse faute de temps mais il pourrait être utilisé dans des projets futurs.

3.2.3. RxLR14 (363pb)

Quinze sites Hz ont été observés après le séquençage direct du gène. Néanmoins, comme pour RxLR4, en l'absence de « vrai » motif RxLR, nous avons décidé de ne pas étudier ce candidat pendant la durée de la thèse.

3.2.4. RxLR5 (309pb)

Quinze sites Hz ont été identifiés après le séquençage direct. Nous avons également identifié dans plusieurs isolats, l'insertion d'une séquence de 33 pb à la fin du gène candidat par rapport à la séquence de référence donnée par R. Micheltore. Cette insertion entraîne l'apparition d'un codon stop tronquant la protéine de trois acides aminés. Le clonage et le séquençage de trois inserts pour 20 isolats (dix de chaque population 1 et 2) a mis en évidence que les deux types d'allèles (avec ou sans l'insertion) pouvaient être identifiés dans une souche ; c'est le cas pour les dix isolats de la population 1 séquencés (MLG7 et MLG30) alors

que tous les isolats de la population 2 séquencés (MLG55 et MLG7) ne possèdent que les allèles avec l'insertion de séquence. Néanmoins, les résultats du séquençage direct indiquent que les isolats MLG7 de la population 2 présentent également les deux types d'allèles.

Huit couples d'amorces différents ont été dessinés permettant théoriquement d'identifier les allèles avec ou sans la délétion par la technique HRM. Sur ces huit couples d'amorces, deux seulement sont utilisables pour une analyse HRM. Les résultats préliminaires semblent indiquer une assez bonne correspondance entre les groupes observés par la technique HRM et les séquences. Cependant, la correspondance n'est pas parfaite et la poursuite de l'étude nécessite le séquençage d'un plus grand nombre d'allèles clonés par isolat (au moins cinq par isolat).

3.2.5. RxLR3 (426pb)

Les amorces dessinées dans la région codante du gène candidat n'ont pas permis d'amplifier le gène dans l'ensemble des isolats. Nous avons redessiné des amorces dans les régions UTR qui ont permis l'amplification de ce gène pour tous les isolats étudiés.

Le séquençage direct et le séquençage de plusieurs inserts par isolat a montré la présence de 14 sites polymorphes dont la délétion d'une paire de base au début du gène et l'existence de deux sites polymorphes à la fin expliquant la non amplification du gène avec les premières amorces dessinées. Six mutations non synonymes et sept allèles différents ont été identifiés. Ces sept allèles codent sept protéines différentes et la délétion d'une paire de base dans deux allèles entraîne l'apparition de codons stops et rendent la protéine putative potentiellement non fonctionnelle.

Nous avons débuté la mise au point des couples d'amorces pour discriminer les allèles par la HRM. Trois couples d'amorces différents ont été dessinés permettant théoriquement d'identifier les différents allèles. Ces trois couples d'amorces semblent utilisables pour une analyse HRM. Les résultats préliminaires semblent indiquer une assez bonne correspondance entre les groupes observés par la HRM et les séquences. Cependant, la correspondance n'est pas parfaite et la poursuite de l'étude nécessite le séquençage du gène pour un plus grand nombre d'isolats et pour un plus grand nombre d'allèles clonés par isolat. Ce gène semble être un bon candidat pour étudier la dynamique évolutive d'un effecteur dans des populations de *Bremia*.

3.2.6. RxLR16 (558pb)

Le séquençage direct a mis en évidence la présence d'un grand nombre de sites Hz. Le clonage et le séquençage d'au moins cinq inserts par isolat (pour les 10 isolats des populations 1 et 2) a confirmé la présence de 37 sites polymorphes dont 22 sites correspondaient à des mutations non synonymes. 41 allèles différents ont ainsi été identifiés codant pour 28 protéines différentes dont neuf ont perdu leur fonction à cause de la présence de codons stop dans la séquence.

De deux à cinq allèles par isolat ont été identifiés (Tableau V. 4). *B. lactucae*, étant diploïde, nous devrions n'identifier qu'un ou deux allèles par isolat. Ce résultat suggère que l'effecteur candidat RxLR16 est présent en plusieurs copies dans le génome de *Bremia*.

Tableau V. 4 : Le nombre et les différents allèles de RxLR16 identifiés dans 20 isolats de *B. lactucae* issus des populations 1 et 2 après le résultat du séquençage d'au moins 5 inserts par isolat.

POP	MLG	ALLELES	POP	MLG	ALLELES
Centre-Ouest (1)	7	20-21-22 66	Sud-Est (2)	55	29-35-36-55 62
	7	50-24		55	20-37-38-39
	7	20-25-26 60 65		60	20-26-51-54
	30	20 21-28-29 64		55	20-57-40-53-26
	7	20-60-26		55	20-26 60 70
	30	52-26-32-30		55	20-29-41-58
	30	26-30-34-59		55	20 30 61 69
	7	26-30-33-67		7	20-63-42
	7	23-25-28		7	20
	7	20-21-28-29 64		7	20-34-42

*Le génotype (MLG) de chaque isolat est indiqué.
Chaque allèle est identifié par un numéro spécifique.*

Nous avons évalué le nombre de copies pour ce gène candidat par une approche de qPCR en comparant la valeur du Ct de deux gènes de référence considérés en monocopie dans le génome (la bêta-tubuline et l'actine). Les résultats indiquent que l'effecteur candidat RxLR16 serait présent entre 14 et 18 copies dans le génome de *B. lactucae*.

La présence d'un grand nombre de copies pour cet effecteur n'a pas permis la poursuite des analyses et notamment de l'analyse HRM. Afin d'utiliser cet effecteur pour l'étude de la variabilité génétique des effecteurs dans les populations, il faudra au préalable tenter d'identifier une seule copie de ce gène. Nous avons, dans ce but, dessiner des amorces dans les courtes régions UTR (UnTranslated Region) mais ces amorces n'ont pas permis d'identifier une seule copie du gène.

3.2.7. *RxLR9 (726pb)*

Le séquençage direct a mis en évidence la présence de 32 sites Hz dans la séquence du gène, confirmés par le séquençage de cinq inserts par isolat. 18 mutations non synonymes ont été remarquées et seulement deux allèles ont été identifiés, dans l'ensemble des isolats séquencés, codant pour deux protéines de 241 acides aminés (Fig. V. 3). L'allèle 1 a été identifié dans tous les isolats alors que l'allèle 2 n'a été retrouvé que dans dix isolats sur les 20 séquencés. De plus, l'allèle 2 a toujours été retrouvé à l'état hétérozygote à la différence de l'allèle 1 (Tableau V.5).

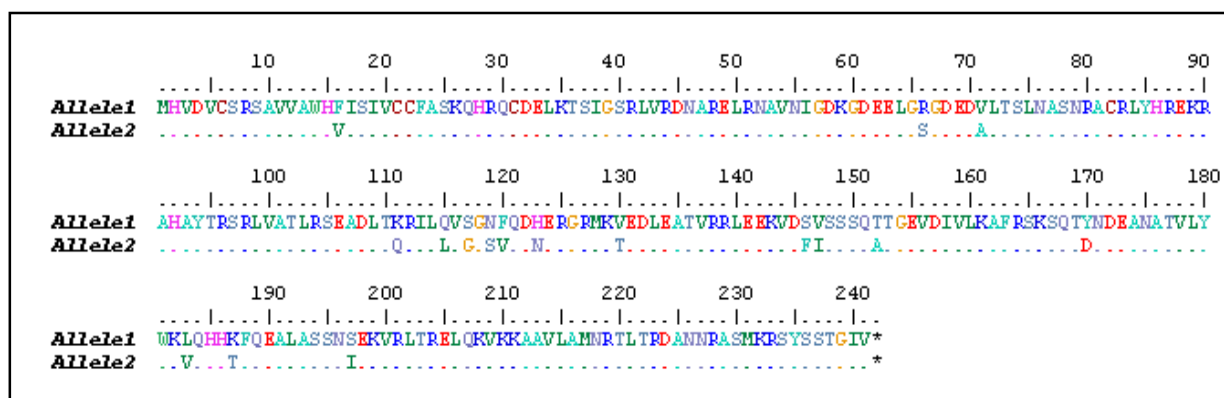


Figure V.3 : Séquences protéiques des deux allèles RxLR9 identifiés après le séquençage des inserts bactériens des 20 isolats des populations 1 et 2 de *B. lactucae*.

Tableau V.5 : Allèles de RxLR9 identifiés dans les 20 isolats de *B. lactucae* des populations 1 et 2.

Population	MLG	Allèles	Gènes de résistance	Population	MLG	Allèles	Gènes de résistance
Centre-Ouest (1)	7	1	D	Sud-Est (2)	55	1-2	ABC
	7	1			55	1-2	
	7	1			60	1-2	
	30	1-2	AD		55	1-2	ABC
	7	1			55	1-2	
	30	1-2			55	1-2	
	30	1-2			55	1-2	
	7	1	D		7	1	ABD
	7	1			7	1	
	7	1			7	1	

Le génotype (MLG) de chaque isolat est indiqué.

Plusieurs couples d'amorces qPCR ont été dessinés autour de sites polymorphes afin de mettre au point une méthode de génotypage à haut débit par l'analyse HRM. Un couple d'amorce a permis l'amplification d'un fragment de 116 paires de base comprenant 3 sites polymorphes (Fig. V.4).

	1	80
Allele1	ATGCATGTCGATGTTTGTTCACGCTCGGCAGTCGTAGCTTGGCAC	TTATTTC AATTGTGTGCTGCTTTGCTTC
Allele2	ATGCATGTCGATGTTTGTTCACGCTCGGCAGTCGTAGCTTGGCAC	TTATTTC AATTGTGTGCTGCTTTGCTTC
	81	160
Allele1	GCATCGTCAGTCGATGAATTAAGACAAGCATTGGGTCGCGATTGGTTCGAGACAATGCAAGAGAGCTTCGTAATGCAG	
Allele2	GCATCGTCAGTCGATGAATTAAGACAAGCATTGGGTCGCGATTGGTTCGAGACAATGCAAGAGAGCTTCGTAATGCAG	
	161	240
Allele1	TTAATATCGGCGATAAAGGCGATGAAGA	ACTTGGAAAGAGGTGATGAAGATGTTCTCACTTCGTTGAATGCATCAAATCGA
Allele2	TTAATATCGGCGATAAAGGCGATGAAGA	ACTTGGAAAGGTGATGAAGATGTTCTCACTTCGTTAAATGCATCAAATCGA
	241	320
Allele1	GCATGTCGACTGTATCATCGCGAGAAGCGGG	CACACGCATACACCAGAAGCAGATTGGTAGCAACTTTAAGAAGTGAAGC
Allele2	GCATGTCGACTGTATCATCGCGAGAAGCGGG	CACACGCATACACCAGAAGCAGATTGGTAGCAACTTTAAGAAGTGAAGC
	321	400
Allele1	GGATCTTACAAGCGGATTTTGC	AAGTAAGTGGCAATTTTCAAGACCATGAACGTGGTCAATGAAAAGTGAAGATTAG
Allele2	GGATCTTACAAGCGGATTTTGC	AAGTAAGTGGCAATTTTCAAGACCATGAACGTGGTCAATGAAAAGTGAAGATTAG
	401	480
Allele1	AGGCTACCGTGAGGAGATTAGAGGAGAAAGTTGATT	CTGTAAGTAGTAGCCAAACACGGGCGAAGTGGATATTGTGCTA
Allele2	AGGCTACCGTGAGGAGATTAGAGGAGAAAGTTGATT	CTGTAAGTAGTAGCCAAACACGGGCGAAGTGGATATTGTGCTA
	481	560
Allele1	AAAGCCTT	AGGTCGAAGAGCCAAACATATAATGACGAAGCGAATGCAACTGTTTGTACTGGAATTTGCAGCACCATAA
Allele2	AAAGCCTT	AGGTCGAAGAGCCAAACATATAATGACGAAGCGAATGCAACTGTTTGTACTGGAATTTGCAGCACCATAA
	561	640
Allele1	ATTTCAGGAAGCGCTGGCTTCTAGCAATAGT	GAAAAAGTGCAGCTACTCGGAGCTCCAGAAGGTGAAGAAGGCAGCAG
Allele2	ATTTCAGGAAGCGCTGGCTTCTAGCAATAGT	GAAAAAGTGCAGCTACTCGGAGCTCCAGAAGGTGAAGAAGGCAGCAG
	641	720
Allele1	TGCTAGCAATGAATCGAACGTTGACTCGAGACGCAATAAT	CGCGCAAGCATGAAGAGATCGTACAGCAGCACTGGCATA
Allele2	TGCTAGCAATGAATCGAACGTTGACTCGAGACGCAATAAT	CGCGCAAGCATGAAGAGATCGTACAGCAGCACTGGCATA
	721	
Allele1	GTTTAA	
Allele2	GTTTAA	

Figure V.4: Séquences des deux allèles RxLR9 avec les 32 sites polymorphes (en rouge) et le produit d'amplification utilisé pour l'analyse HRM (encadré par le couple d'amorces q2, en vert).

L'efficacité de ce couple d'amorces (99,7%) et le R^2 (0,999) a permis son utilisation dans des expériences de qPCR et pour l'analyse HRM. L'analyse HRM des 20 isolats préalablement séquencés a permis d'identifier deux groupes correspondant à deux courbes de fusion différentes (Fig. V.5).

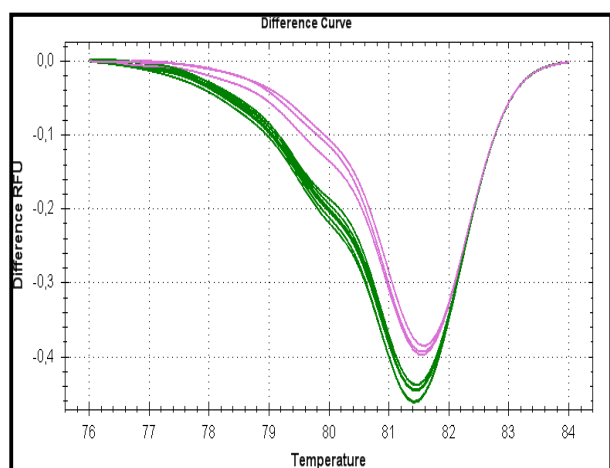


Figure V.5: Analyse HRM du gène RxLR9 amplifié par les amorces q2 des 20 isolats séquencés. Une couleur correspond à un groupe de courbes de fusion présentant le même profil. Le groupe 1 est en violet et le groupe 2 en vert.

Le groupe 1 (en violet) comprend tous les isolats homozygotes avec l'allèle 1 alors que le groupe 2 (en vert) comprend tous les isolats hétérozygotes pour le gène candidat RxLR9. Les groupes identifiés par l'analyse HRM concordent avec les résultats du séquençage.

L'analyse HRM des 40 isolats des populations du Centre-Ouest (1) et du Sud-Est (2) a permis d'identifier cinq groupes différents. La majorité des isolats ont été retrouvés dans le groupe 1 ou le groupe 2 permettant ainsi d'en déduire les allèles RxLR9 présents dans chaque isolat. Trois nouveaux groupes ont également été identifiés (Tableau V.6).

Tableau V.6 : Analyse HRM du gène RxLR9 pour 40 isolats de *B. lactucae* de deux populations (1 et 2) et allèles RxLR9 présents.

Isolats	MLG	Groupe HRM	Allèles déduits de l'analyse HRM	Isolats	MLG	Groupe HRM	Allèles déduits de l'analyse HRM
F920b (1)	7	Groupe1	Allèles 1	F924j (1)	30	Groupe2	Allèles 1 et 2
F920e (1)	7	Groupe1	Allèles 1	F924l (1)	30	Groupe2	Allèles 1 et 2
F920f (1)	7	Groupe1	Allèles 1	F924h (1)	30	Groupe2	Allèles 1 et 2
F920g (1)	7	Groupe1	Allèles 1	P06b (2)	55	Groupe2	Allèles 1 et 2
F920h (1)	7	Groupe1	Allèles 1	P07a (2)	55	Groupe2	Allèles 1 et 2
F920i (1)	7	Groupe1	Allèles 1	P07b (2)	55	Groupe2	Allèles 1 et 2
F920k (1)	7	Groupe1	Allèles 1	P07c (2)	55	Groupe2	Allèles 1 et 2
F924m (1)	7	Groupe1	Allèles 1	P08a (2)	55	Groupe2	Allèles 1 et 2
F938f (1)	7	Groupe1	Allèles 1	P08b (2)	55	Groupe2	Allèles 1 et 2
F938g (1)	7	Groupe1	Allèles 1	P08p (2)	55	Groupe2	Allèles 1 et 2
F938h (1)	7	Groupe1	Allèles 1	P10d (2)	55	Groupe2	Allèles 1 et 2
F938i (1)	7	Groupe1	Allèles 1	P10f (2)	55	Groupe2	Allèles 1 et 2
F938j (1)	7	Groupe1	Allèles 1	P10g (2)	55	Groupe2	Allèles 1 et 2
F938k (1)	7	Groupe1	Allèles 1	P10h (2)	55	Groupe2	Allèles 1 et 2
F938l (1)	7	Groupe1	Allèles 1	P10m (2)	55	Groupe2	Allèles 1 et 2
P11d (2)	7	Groupe1	Allèles 1	P10p (2)	55	Groupe2	Allèles 1 et 2
P11f (2)	7	Groupe1	Allèles 1	F924g (1)	30	Groupe 3	INCONNUS
P11g (2)	7	Groupe1	Allèles 1	F924k (1)	30	Groupe 3	INCONNUS
P11h (2)	7	Groupe1	Allèles 1	P11p (2)	55	Groupe 4	INCONNUS
P11m (2)	7	Groupe1	Allèles 1	F920j (1)	7	Groupe 5	INCONNUS
P11t (2)	7	Groupe1	Allèles 1				

Le génotype (MLG) de chaque isolat et la population d'origine (1 ou 2) sont indiqués.

Les 3 nouveaux groupes sont en grisé.

Afin d'identifier les allèles RxLR9 présents dans les isolats des trois nouveaux groupes (Groupes 3 à 5), les allèles ont été clonés et séquencés.

Le séquençage des allèles RxLR9 des isolats du groupe 4 et du groupe 5 a montré que ces groupes sont des erreurs d'assignation probablement dues à des erreurs de manipulation qui peuvent provenir, par exemple, de la dilution ou d'une contamination.

L'analyse des séquences pour les deux isolats du groupe 3 a montré que l'isolat F924g est homozygote pour l'allèle 2. Cette assignation correspond réellement à la présence d'un nouveau groupe car cette situation n'avait pas encore été identifiée. Par contre, le résultat pour l'isolat F924k n'est pas cohérent car les deux allèles ont été identifiés. Il devrait donc être retrouvé dans le groupe 2.

L'analyse HRM du gène RxLR9 permet un génotypage rapide avec un taux d'assignation correct proche de 100%. L'analyse a été réalisée sur trois autres populations de *B. lactucae*. Les résultats montrent que les isolats des trois populations appartiennent au groupe 1 (Tableau V.7). L'allèle 1 est donc présent à l'état homozygote dans toutes ces populations.

Tableau V.7 : Résultats des analyses HRM pour le gène candidat RxLR9 pour trois populations de *B. lactucae* (3, 4 et 5).

Région	Dpt	Site	Gènes de résistance	MLG	Analyses HRM	Allèles déduits de l'analyse
Centre-Ouest	77	Chailly en Bière (3)	AD	79	Groupe 1	Allèle 1 homozygote
			AD	79 et 7	Groupe 1	Allèle 1 homozygote
	35	Roz sur Couesnon (4)	ABD	45	Groupe 1	Allèle 1 homozygote
		Chateaugiron (5)	NC	55	Groupe 1	Allèle 1 homozygote

Les génotypes (MLG) identifiés dans chaque population sont indiqués.

NC : gènes de résistance du cultivar non connus

3.2.8. RxLR7 (519 pb)

Le séquençage direct a mis en évidence la présence de dix sites Hz dans la séquence du gène, confirmés par le séquençage de cinq inserts par isolat. Six sites correspondaient à des mutations non synonymes et huit allèles différents ont été identifiés dans l'ensemble des isolats séquencés codant pour cinq protéines de 172 acides aminés (Fig. V.6). L'allèle 1 et l'allèle 5 codent la même protéine ainsi que l'allèle 4 et l'allèle 8. Pour les protéines 2, 4, 6 et 7 des mutations non synonymes sont présentes dans le motif RxLR.

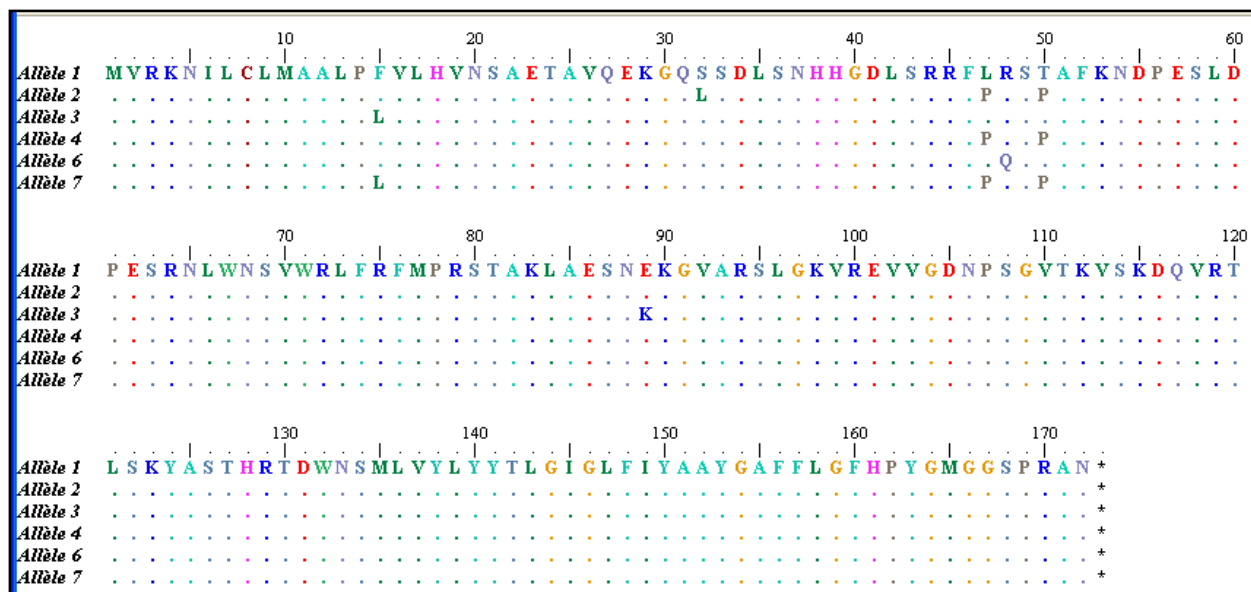


Figure V.6 : Séquences protéiques des huit allèles du gène candidat RxLR7 identifiés après le séquençage des inserts bactériens de 20 isolats de *B. lactucae* issues des populations 1 et 2. Les allèles codant les mêmes protéines ne se sont pas représentés

Deux à cinq allèles par isolat ont été identifiés. Le nombre de copies pour ce gène candidat a été évalué par une approche qPCR en comparant la valeur du Ct de deux gènes de référence considérés en monocopie dans le génome (la bêta-tubuline et l'actine). Les résultats indiquent que l'effecteur candidat RxLR7 serait présent entre 1 et 3 copies dans le génome de *Bremia*. Il est difficile de conclure sur le nombre exact de copies car la différence de Ct est faible.

L'amplification du gène candidat avec des amorces dessinées dans la région UTR n'a pas permis d'isoler une seule copie du gène. Malgré la présence probable de ce gène en plusieurs copies, nous avons essayé de mettre au point une analyse HRM.

Plusieurs couples d'amorces qPCR ont été dessinés autour de sites polymorphes. Un couple d'amorce avec une efficacité proche de 100% a permis l'amplification d'un fragment de 84 paires de base comprenant deux sites polymorphes. Cette amplification permettait, théoriquement, de discriminer les individus présentant différentes associations d'allèles comme TT (par exemple des individus avec les allèles 1 et 5), TC (par exemple, allèles 2 et 8), TY (Y signifiant Hz T/C ; par exemple, allèles 1 et 2) ou encore YY (par exemple, allèles 1 et 3). (Tableau V.8).

Tableau V.8 : Sites polymorphes des huit allèles du gène RxLR7 identifiés dans les isolats de *B. lactucae* des populations 1 et 2.

	pos 43	pos 54	pos 95	pos 140	pos 143	pos 148	pos 174	pos 265	pos 309	pos 453
Allèle 1	T	T	C	T	G	A	A	G	A	G
Allèle 2	.	C	T	C	.	C	C	.	T	.
Allèle 3	C	C	.	.	.	.	C	A	T	.
Allèle 4	.	C	.	C	.	C	C	.	T	C
Allèle 5	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.
Allèle 6	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.
Allèle 7	C	C		C		C	C		T	
Allèle 8	.	C	.	C	.	C	C	.	.	.

Les deux sites amplifiés pour l'analyse HRM sont en grisés

. : la base est identique à la séquence de référence qui est l'allèle 1

La première analyse a été effectuée avec les 20 isolats préalablement séquencés pour lesquels 6 à 14 inserts ont été séquencés (Tableau V.9). Ces isolats présentaient dans les SNP analysés par la HRM, trois types d'association d'allèles (TY, YY et YC). L'analyse HRM identifie quatre groupes d'isolats (Tableau V.9). Ces groupes ne correspondent pas parfaitement avec les résultats du séquençage.

Néanmoins, la présence de quatre groupes alors que trois groupes étaient attendus a soulevé une question sur la capacité de discrimination de la HRM et donc de son utilisation pour des analyses de discrimination allélique. Une analyse plus approfondie des résultats a montré que les groupes 1 et 2 discriminaient les SNPs TY en fonction des allèles observés. En effet, les isolats avec les allèles 1 et 2 sont dans le groupe 1, alors que tous les isolats avec les allèles 4-5-6 ont été identifiés dans le groupe 2. Cette correspondance entre les données de séquençage et l'analyse HRM pourrait être expliquée par une hypothèse basée sur la proportion des allèles dans chaque isolat. Dans les isolats du groupe 1, la proportion d'allèle TT et TC (allèles 1 et 2) devrait être identique alors que dans les isolats du groupe 2, les allèles TT (allèles 5 et 6) devraient être dans une proportion plus importante que les allèles TC (allèle 4). Afin de tester cette hypothèse, nous avons effectué une analyse HRM en mélangeant, dans des proportions connues, les allèles insérés dans des plasmides (Fig. V.7).

Tableau V.9 : Allèles du gène candidat RxLR7 identifiés dans 20 isolats séquencés, SNPs correspondants dans l'amplicon HRM et résultats de l'analyse HRM.

Région	Isolat	Gènes de résistance	MLG	Allèles identifiés	Nombre de Clones séquencés	SNP dans le fragment HRM	Groupes HRM
Centre-Ouest (1)	F920b	D	7	1_2	6	TY	Groupe 1
	F920c	D	7	1_2	6	TY	Groupe 1
	F920d	D	7	1_2	6	TY	Groupe 1
	F924d	AD	30	3_4	8	YC	Groupe 3
	F924e	AD	7	1_2_4	8	TY	Groupe 1
	F924f	AD	30	1_3_4	8	YY	Groupe 3
	F924i	AD		2_4_7_1_3	14	YY	Groupe 4
	F938c	D	7	1_2	6	TY	Groupe 1
	F938d	D	7	1_2	6	TY	Groupe 1
	F938e	D	7	1_2	6	TY	Groupe 1
Sud-Est (2)	FR09P07y	ABC	55	4_5_6	8	TY	Groupe 2
	FR09P08p_msp2	ABC	55	4_5_6	14	TY	Groupe 2
	FR09P09a_msp2	ABC	60	4_5_8	14	TY	Groupe 1
	FR09P09b	ABC	55	4_5_6	8	TY	Groupe 2
	FR09P10a	ABC	55	4_5_6	8	TY	Groupe 2
	FR09P10b	ABC	55	4_5_6	8	TY	Groupe 2
	FR09P10c	ABC	55	4_5_6	8	TY	Groupe 2
	FR09P11a	ABD	7	1_2	8	TY	Groupe 1
	FR09P11b	ABD	7	1_2	6	TY	Groupe 1
	FR09P11c	ABD	7	1_2	6	TY	Groupe 1

La souche F924i (grisé) serait après plusieurs analyses le résultat d'un mélange

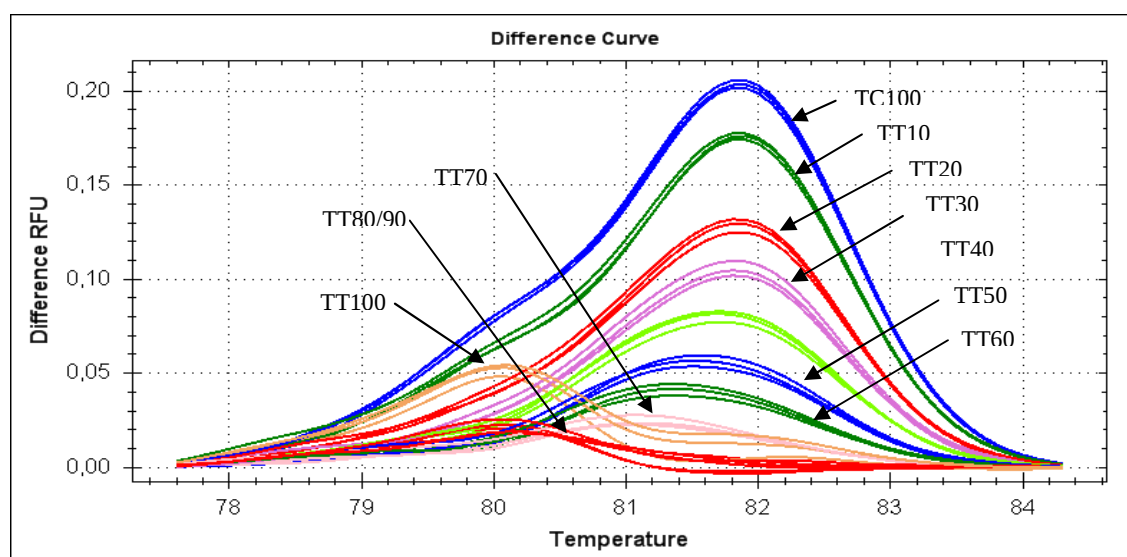


Figure. V.7 : Analyse HRM du ratio d'allèles. Chaque proportion des plasmides avec les allèles TT et TC testée est affichée sur la figure en pourcentage.

L'analyse des résultats a montré que les courbes reflétaient correctement la proportion d'allèles (Fig. V.7). Chaque proportion est identifiée comme un groupe sauf les proportions TT80% et TT90% qui ont une courbe de fusion d'allure proche et qui ont été regroupés ensemble par le logiciel. La comparaison des courbes de fusion des isolats du groupe 1 et du groupe 2 avec les courbes de fusion des proportions d'allèles a montré que les isolats du groupe 1 auraient une proportion d'allèles TT proche de 80/90% et les isolats du groupe 2 une proportion TT proche de 50%. Ce résultat confirme ainsi notre hypothèse et explique la séparation en deux groupes des isolats avec les allèles TY.

La sensibilité importante de la HRM permet ainsi de pouvoir discriminer les allèles de cet effecteur candidat malgré la présence probable de deux ou trois copies de ce gène. Cette sensibilité importante de la HRM a également été utilisée dans des analyses d'expression pour déterminer les variants alléliques les plus exprimés dans différents tissus (Yuan *et al.* 2008).

L'analyse HRM a été effectuée sur les trois autres populations de *B. lactucae* (Tableau V.10). Une déduction des allèles présents pour chaque isolat a pu être faite selon les groupes HRM. Néanmoins, des données supplémentaires sont nécessaires pour valider ce résultat. En effet, les données de séquençage ont montrés que le groupe 1 était composé d'isolats avec les allèles 1/2 mais qu'il pouvait également être constitué d'isolats avec les allèles 4/5/8 (retrouvé une seule fois) ou les allèles 1/2/4 (retrouvé une seule fois également). Néanmoins, il est intéressant d'observer qu'il existe une relation entre les données génotypiques obtenues avec les marqueurs neutres et les données alléliques. En effet, les isolats avec le MLG55 auraient tous les mêmes allèles et seraient différents des isolats avec le MLG 7, 30, 45 et 79 qui auraient également tous les mêmes allèles. L'analyse des protéines putatives présentes dans les isolats indique que tous les isolats possèdent des protéines avec le motif RxLR modifié.

Tableau V.10 : Résultats des analyses HRM pour le gène RxLR9 pour les trois populations de *B. lactucae*.

Région	Dpt	Site	Gènes de résistance	MLG	Analyses HRM	Allèles déduits de l'analyse
Centre-Ouest	77	Chailly en Bière (3)	AD	79	Groupe 1	1-2
			AD	79 et 7	Groupe 1	1-2
	35	Roz sur Couesnon (4)	ABD	45	Groupe 1	1-2
		Chateaugiron (5)	NC	55	Groupe 2	4-5-6

NC : Non connus

3.3. Polymorphisme du gène de la bêta-tubuline

Le séquençage d'environ 1000 pb du gène de la bêta-tubuline (1503 pb) pour les cinq isolats de chaque population n'a montré la présence que d'un seul site polymorphe entre les isolats : une mutation synonyme.

4. Discussion et Conclusions

L'identification de gènes d'avirulence chez les oomycètes a été accélérée par la découverte du motif RxLR présent dans beaucoup de ces gènes dans les génomes de *Phytophthora infestans* et *P. sojae*. Il a été montré que cette famille d'effecteur est en première ligne dans l'évolution et l'adaptation des oomycètes envers leurs hôtes. Ces effecteurs à motif RxLR sont soumis à des pressions de sélection importante qui ont entraînées une évolution rapide de ces gènes et une diversité importante de cette famille multigénique (Jiang *et al.* 2008 ; Win *et al.* 2007). Cette pression de sélection exercée par les gènes de résistance de la plante hôte sur les gènes d'avirulence va agir sur les mécanismes moléculaires de reconnaissance de la protéine d'avirulence par la protéine de résistance. Ces différents mécanismes peuvent être des changements d'acides aminés dans la protéine d'avirulence, des délétions d'une partie du gène ou du gène complet, des insertions de transposon ou encore de l'extinction transcriptionnelle.

Dans un premier temps, nous avons donc recherché des signes de sélection positive dans les 17 effecteurs candidats identifiés dans une banque cDNA de *B. lactucae* par R. Micheltore (Communication personnelle) en étudiant leur polymorphisme.

4.1. Polymorphisme des 17 effecteurs candidats RxLR

Sur les 17 gènes effecteurs candidats testés, deux n'ont montré aucun polymorphisme de séquence. Le set d'isolat utilisé n'est peut être pas suffisant pour identifier du polymorphisme dans ces gènes. Il est également possible que ces gènes candidats soient soumis à une sélection négative. La sélection négative agit en enlevant des mutations délétères. Si ces gènes sont soumis à ce type de sélection, cela peut suggérer qu'ils sont importants au développement de l'agent pathogène. A ce stade, notre étude ne nous permet pas de valider cette hypothèse. Néanmoins, il pourrait être intéressant de continuer d'étudier

ces deux gènes candidats en séquençant le gène pour un plus grand nombre d'isolats et effectuer des études d'expression *in planta*. Si ces effecteurs candidats s'avéraient primordiaux dans le développement de *Bremia*, ils pourraient constituer une piste de recherche pour améliorer la lutte contre l'agent du mildiou de la laitue en recherchant des fongicides ou des gènes de résistance qui pourraient cibler ces gènes.

Le polymorphisme observé pour les quinze autres effecteurs candidats est très variable, de deux à trois sites polymorphes jusqu'à une trentaine de sites dans des séquences variant de 303 à 972 pb. Ce taux de polymorphisme est comparé avec le taux de polymorphisme observé dans un gène de ménage, la bêta-tubuline. Nous avons identifié un seul site polymorphe dans la séquence du gène de la bêta-tubuline. Ce résultat indiquerait un polymorphisme plus important dans les effecteurs et donc potentiellement des signes de sélection positive. Néanmoins, un plus grand nombre d'isolats doit être séquencé pour la bêta-tubuline et sur un plus grand nombre de gène pour valider cette hypothèse.

Le polymorphisme des 17 effecteurs candidats a été évalué pour des isolats prélevés sur *L. sativa* mais aussi pour des isolats prélevés sur *L. serriola*. Pour la plupart des effecteurs, le polymorphisme est plus important entre les isolats de *L. serriola* et les isolats de *L. sativa* que le polymorphisme entre les isolats de chaque plante hôte. Néanmoins, l'isolat prélevé sur *L. sativa* et l'isolat prélevé sur *L. serriola*, présentant le même génotype (MLG1), ont montré la même variabilité de séquence pour les effecteurs étudiés. De plus, ces isolats présentent généralement des séquences proches de celles des deux autres isolats prélevés sur *L. serriola*. Ces résultats semblent confirmer une différenciation importante entre les isolats des deux plantes hôtes, mais qu'un flux de gènes entre les isolats prélevés sur *L. serriola* et *L. sativa* est possible (Article 1 ; Lebeda *et al.* 2008).

Il serait intéressant d'étudier des isolats prélevés sur *L. sativa* par rapport aux isolats prélevés sur *L. serriola* pour l'évolution des RxLR, et peut être mettre en évidence des patrons d'évolution et d'adaptations différents entre un hôte sauvage et un hôte cultivé.

4.2. Identification de sélection positive dans les séquences des effecteurs candidats RxLR

Nous avons identifié différents types de polymorphisme dans les populations de *B. lactucae* étudiées. Nous avons observé un nombre important de mutations non synonymes et des délétions (ou insertion) d'une ou plusieurs paires de base, suggérant des signes de

sélection positive. L'identification d'une possible sélection positive sur ces différents effecteurs indiquerait qu'ils sont potentiellement reconnus par les gènes de résistance de la plante hôte et donc qu'ils soient des gènes d'avirulence. Néanmoins, la validation de cette hypothèse nécessite d'augmenter le nombre d'isolats séquencés par RxLR, d'identifier une seule copie de chaque effecteur présent en plusieurs copies et d'effectuer des tests statistiques comme le test MK (McDonald et Kreitman 1991) qui est un rapport d_N/d_S (nombre de mutations non synonymes sur nombre de mutations synonymes) ou des tests basés sur les fréquences alléliques comme le test D de Tajima (Tajima 1989).

En postulant que les effecteurs étudiés sont reconnus par les gènes de résistance de la plante hôte, les différents modes d'évolution observés dans les effecteurs, la présence de délétion ou d'insertion (indels) dans les RxLR3 et RxLR5 et la présence de mutations non synonymes dans les autres effecteurs, pourraient être la conséquence du type d'interaction s'exerçant entre la protéine de résistance et la protéine d'avirulence.

La présence d'indels dans les gènes, conduisant à une protéine tronquée potentiellement non fonctionnelle, suggère une pression de sélection qui favorise l'absence de l'effecteur dans l'interaction avec l'hôte. Ce type de mécanisme est similaire à la délétion complète du gène dans son effet mais à l'avantage de permettre un retour vers la protéine fonctionnelle plus facilement que dans le cas d'une délétion complète du gène et par conséquent ces allèles dégénérés peuvent agir comme un réservoir génétique (Ma et Guttman 2008). Ce type d'évolution adaptative est souvent associé aux effecteurs qui modifient une cible dans l'hôte et qui sont donc reconnues indirectement par les protéines de résistance selon le modèle de garde ou du leurre (cf. Chapitre I, paragraphe 3.2.2) (Bent et Mackey 2007 ; Jones et Dangl 2006). Ce mécanisme lié à une interaction indirecte a été observé pour différents gènes d'avirulence comme *Avr4E*, *Avr9* ou *Avr2* (Stergiopoulos *et al.* 2007). Ce type d'évolution avec une perte de fonction de l'effecteur implique un coût faible sur la valeur sélective ou une compensation de la fonction par d'autres effecteurs (Ma et Guttman 2008). D'ailleurs la présence de nombreux gènes codant pour des RxLR chez les oomycètes indiquerait la possibilité d'une importante redondance dans leurs fonctions (Birsch *et al.* 2008). Par exemple, Qutob *et al.* (2009) ont montré que plusieurs copies de RxLR pouvaient contribuer au maintien de la fitness. Selon le même raisonnement, la présence de mutations non synonymes dans le RxLR7 modifiant le motif RxLR pourrait également indiquer une pression de sélection favorisant la non-translocation de la protéine dans le cytoplasme de l'hôte. D'ailleurs, les mutations non synonymes pour cet effecteur ont toutes été observées dans la partie N-terminale de la protéine contrairement aux autres effecteurs testés comme

RxLR9, RxLR3 ou RxLR16. Ces résultats suggèrent donc également une interaction indirecte entre l'effecteur et les protéines de résistance.

La présence d'un grand nombre de mutations non synonymes pour les autres effecteurs suggère une interaction directe entre les effecteurs et les protéines de résistance. En effet, dans le cas d'une reconnaissance directe, l'apparition de mutations modifiant la protéine peut permettre d'éviter la reconnaissance sans altérer la fonction effectrice et diminuer la fitness. Par exemple, le gène *AvrLm4-7* montre une double reconnaissance par les gènes de résistance *Rlm4* et *Rlm7* et, quand ce gène est soumis à la pression de sélection exercée par *Rlm4*, une mutation non synonyme apparaît ce qui permet d'éviter la reconnaissance par le gène de résistance *Rlm4* sans altérer la reconnaissance par *Rlm7* (Parlange *et al.* 2009). Les mutations non synonymes sont majoritairement présentes dans le domaine C-terminal des protéines putatives à l'image de ce qui a déjà été observé pour d'autres RxLR (Haas *et al.* 2009 ; Jiang *et al.* 2008 ; Win *et al.* 2007).

4.3. Evolution du polymorphisme des effecteurs RxLR7 et RxLR9 à l'échelle populationnelle

Une étude de la dynamique évolutive des effecteurs à l'échelle locale a été initiée pour les effecteurs RxLR7 et RxLR9 avec la technique HRM, méthode permettant une discrimination à haut débit des allèles présents dans les populations de *Bremia*.

Les premiers résultats montrent que la HRM est une méthode sensible, reproductible et efficace pour « génotyper » des populations pathogènes. Cette méthode est d'autant plus utile pour des agents pathogènes diploïdes qui nécessitent une étape préalable de clonage bactérien du gène étudié avant de pouvoir le séquencer. Ainsi, à une échelle populationnelle qui exige le clonage et le séquençage d'un nombre important d'isolats, la HRM permet de réduire les coûts et le temps (environ 4 heures pour avoir un résultat en HRM contre 72 heures pour une méthode classique). La mise au point de cette technique implique l'identification préalable des différents allèles présents pour un locus et la mise au point de couples d'amorces permettant de discriminer la totalité des allèles. Grâce à cette technique, nous avons pu initier une étude de génétique des populations d'un effecteur (RxLR7), probablement présent en deux ou trois copies, avec seulement un couple d'amorce grâce à la sensibilité de la méthode. Dans ce cas précis, la méthode ne permet pas d'obtenir des résultats définitifs mais elle donne des pistes de réflexion pour la poursuite de l'étude.

L'analyse de la dynamique évolutive des deux effecteurs montre plusieurs résultats marquants. Tout d'abord, les allèles identifiés dans chaque isolat pour les deux RxLR (RxLR7 et RxLR9) sont généralement concordants avec les données obtenues avec les marqueurs neutres. Par exemple, les isolats MLG7 présentent tous les mêmes allèles et sont différents de tous les isolats MLG55 excepté pour la population de Chateaugiron (pop 5) avec les allèles RxLR9 (homozygote pour l'allèle 1 alors que les autres MLG55 sont hétérozygotes). Cette concordance est également retrouvée avec les groupes de génotypes identifiés lors des études précédentes (cf. articles 1 et 2). En effet, les isolats MLG79 et MLG45 présentent les mêmes types d'allèles que les isolats MLG7. De la même façon, les isolats MLG55 et l'isolat MLG60 qui sont très proches génétiquement présentent les mêmes allèles pour les deux effecteurs (une différence est observée pour le RxLR7 ; les isolats sont 4-5-6 et 4-5-8 mais l'allèle 8 code pour la même protéine que l'allèle 4). Ces résultats suggèrent donc qu'une pression de sélection est exercée par les gènes de résistance sur ces effecteurs candidats. Ainsi, ces effecteurs seraient potentiellement utiles dans le pouvoir pathogène et pourraient être reconnues par des gènes de résistance de la plante hôte ce qui entraînerait cette pression de sélection.

Un deuxième résultat marquant concerne la dynamique évolutive du gène RxLR9 dans les populations de *Bremia*. Tous les isolats MLG55 de la population du Sud-Est sont hétérozygotes pour ce locus alors que les isolats MLG55 prélevés sur la variété dactary dans le Centre-Ouest sont homozygotes avec l'allèle 1. Or, ces derniers ont été prélevés un an après ceux du Sud-Est. Nos résultats indiquent également que les isolats MLG55 seraient apparus dans les cultures de laitue avant les isolats MLG7 (Valade, communication personnelle). La perte de l'allèle 2 dans les isolats MLG55 pourrait indiquer qu'une sélection positive entraînant l'homozygotie à ce locus, s'exerce sur cet effecteur. Cette sélection serait active ce qui pourrait indiquer que les gènes de résistance utilisés à l'heure actuelle par les sélectionneurs ont un effet sur cet effecteur. Néanmoins, cette hypothèse ne peut pas être vérifiée à ce stade de l'étude. De plus, nous ne connaissons pas les gènes de résistance présents dans la variété dactary ce qui implique que nous ne pouvons pas comparer avec les autres variétés échantillonnées, notamment sur la présence ou non du gène D (cf. article 2). Nous pouvons tout de même comparer les virulences observées entre les isolats. Les résultats indiquent que les isolats de Chateaugiron ont des virulences qui se rapprochent à la fois des isolats MLG 55 et MLG7. Par exemple, ils sont virulents sur *Dm3* (virulence observée pour les MLG7 et non pour les MLG55) et sur *Dm37* (virulence observée pour les MLG55 et non pour les MLG7) (cf. article 2) Ce résultat indiquerait que cette lignée clonale a probablement

évoluée par un mécanisme de mutation dans les gènes d'avirulence (car le fond génétique semble identique, le même génotype neutre) sous l'effet de la sélection exercée par les gènes de résistance.

A ce stade de l'étude, nous ne pouvons pas conclure sur le type de sélection exercée sur les effecteurs candidats. Néanmoins, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'effecteur RxLR9 serait soumis à une sélection diversifiante alors que l'effecteur RxLR7 serait soumis à une sélection balancée. En effet, la faible diversité génétique observée pour l'effecteur RxLR9 et le maintien de plusieurs allèles pour RxLR7 coïncident avec les signatures de ces deux types de sélection. La sélection diversifiante va entraîner des balayages sélectifs qui vont diminuer la variabilité au niveau populationnel sous l'effet des gènes de résistance (Brown 1994 ; Stukenbrock et Mc Donald 2009) alors que la sélection balancée va permettre un maintien du polymorphisme dans les populations (Stukenbrock et Mc Donald 2009). La poursuite de l'étude est nécessaire pour pouvoir tester ces hypothèses.

4.3.1. Conclusions et perspectives

Cette étude préliminaire sur la dynamique évolutive des effecteurs dans les populations de *B. lactucae* semble indiquer que les effecteurs candidats étudiés sont soumis à la pression de sélection exercée par les gènes de résistance et qu'ils seraient, par conséquent, de possibles gènes d'avirulence. Ainsi, ce type d'étude à l'échelle populationnelle peut permettre d'étudier la dynamique de l'évolution des effecteurs dans le temps et l'espace mais également d'identifier des gènes d'avirulence.

L'étude de la dynamique évolutive à l'échelle populationnelle sera poursuivie selon les mêmes méthodes pour d'autres effecteurs comme RxLR3 et RxLR5 et d'autres populations de *B. lactucae* isolées sur des variétés présentant des gènes de résistance différents pourront être étudiées. Des expériences de Southern Blot doivent également être effectuées pour identifier le nombre de copies de chaque RxLR.

La poursuite de l'étude nécessitera également d'identifier la fonction de ces différents effecteurs par des tests d'expression transitoire dans des laitues possédant différents gènes de résistance en utilisant *Agrobacterium* (Wroblewski *et al.* 2005). Nous pourrions ainsi déterminer si ces effecteurs sont des gènes d'avirulence et identifier les gènes de résistance correspondant.

Ces études permettront d'apporter de nouvelles données utiles pour proposer des pistes de gestion des gènes de résistance et améliorer leur durabilité.

CHAPITRE 6

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Cette discussion générale a pour objectif de synthétiser les résultats obtenus dans les différents chapitres de cette thèse et de les relier entre eux afin de les discuter dans le cadre général d'une réflexion sur la lutte contre l'agent du mildiou de la laitue et l'amélioration de la durabilité des résistances. Nous essaierons d'intégrer ces résultats pour évaluer le potentiel évolutif de *B. lactucae* et proposer des pistes de gestion des résistances. Enfin, des perspectives d'approfondissement de l'étude seront évoquées.

Des études précédentes ont été réalisées avec des marqueurs neutres (RFLP et AFLP) (Hulbert *et al.* 1988 ; Sicard *et al.* 2003) dans l'objectif de réaliser une carte génétique de *B. lactucae*. Hulbert et Micheltore (1988) ont également étudiés le polymorphisme de 25 isolats d'une collection mondiale à l'aide de marqueurs RFLP. Ces études ont permis d'identifier une variabilité génétique importante en Europe et des niveaux élevés d'hétérozygotie. La variabilité des phénotypes de virulence dans les populations de *B. lactucae* a également été étudiée dans différents pays européens (Crute 1987 ; Gustafson *et al.* 1985 ; Lebeda et Zinkernagel 2003 ; Sharaf *et al.* 2007). Ces analyses sont utiles pour identifier la dynamique évolutive des virulences dans les populations mais elles ne permettent pas de caractériser les forces évolutives et les mécanismes d'adaptation.

Le développement de marqueurs moléculaires neutres (les microsatellites) et de marqueurs potentiellement soumis sélection (effecteurs candidats RxLR et phénotypes de virulence) nous a permis d'évaluer la variabilité génétique de *Bremia* en Europe et de caractériser les forces évolutives s'exerçant sur la structure des populations françaises de *B. lactucae*.

Quel système de reproduction prédomine dans les populations de *Bremia* et quel est son influence sur la structure des populations ?

La faible diversité génétique et génotypique observée en France confirme l'hypothèse que *B. lactucae* se développe selon un système de reproduction asexuée. *B. lactucae* est un agent pathogène spécialiste obligatoire. Cette caractéristique pourrait entraîner de nombreux événements d'extinctions locales et de recolonisation et engendrer des goulots d'étranglement. Dans ce cas, les populations sont fragmentées, de petites tailles et devraient présenter une forte différenciation génétique sous l'effet de la dérive génétique (Thrall *et al.* 2001). Nos résultats montrent que la différenciation génétique observée entre les populations

françaises de *Bremia* est faible et non significative (Article 1). Ce résultat est, en partie, la conséquence des caractéristiques de la culture de laitue en France. En effet, à l'échelle de la France, la laitue est cultivée toute l'année ce qui, potentiellement, permet à l'agent pathogène de développer des épidémies avec un régime de reproduction asexuée tout au long de l'année. Ainsi, peu de goulots d'étranglement surviendraient dans les populations qui seraient donc des populations de grande taille où la dérive génétique a un faible effet sur la structure des populations. Néanmoins, à l'échelle régionale, la disponibilité en ressource n'est pas la même. Dans le Sud-Est de la France qui est le plus important bassin de production de laitue, la culture est effectuée toute l'année alors que dans les autres bassins de production, les cultures sont réalisées sur une durée de 7 à 9 mois et l'influence de la dérive génétique pourrait y être plus importante. Une diversité génétique plus importante dans le nord de la France que dans le Sud-Est pourrait être le résultat d'événements de recombinaison sexuée dans cette région. Ce résultat est aussi confirmé par la diversité des profils de virulence observée qui est moins importante dans le Sud-Est que dans les autres bassins de production (Maisonneuve 2011).

Nous avons identifié les deux types sexuels dans les principaux bassins de production. Dans le Sud-Est, les deux types sexuels ont parfois été identifiés dans le même champ sur deux variétés différentes. Pourtant nous n'avons pas identifié de signes de recombinaison sexuée dans ce bassin. Une hypothèse, basée sur les traits d'histoire de vie de la laitue et sur l'avantage sélectif de la reproduction asexuée, peut être avancée pour expliquer ce résultat. Dans les régions où la production de laitue est interrompue au cours de l'année, la reproduction sexuée peut permettre aux populations de *Bremia* de survivre par la production d'oospores. Ainsi, à la saison suivante, de nouvelles souches peuvent émerger et créer de la variabilité génétique. Ces goulots d'étranglements pourraient ainsi expliquer la différenciation génétique observée entre le Sud-Est et le nord de la France. Dans le Sud-Est, la plante hôte est disponible tout au long de l'année, la reproduction clonale peut ainsi avoir un avantage sélectif sur la reproduction sexuée. En effet, le développement clonal permet de disperser des populations préalablement adaptées aux gènes de résistance utilisés (McDonald *et al.* 2002) alors que la reproduction sexuée va redistribuer les allèles dans les isolats qui peuvent ainsi être moins adaptés aux gènes de résistance que les isolats parents. Sous cette hypothèse, la reproduction sexuée pourrait être importante en France mais elle serait masquée par la pression de sélection exercée par les gènes de résistance de la plante l'hôte. Cette hypothèse peut expliquer pourquoi les populations de *Bremia* s'adaptent très rapidement au déploiement d'un nouveau gène de résistance. La recombinaison sexuée permet dans ce cas de combiner de nouvelles virulences dans les isolats qui pourront avoir ainsi un avantage sélectif sur les

isolats clonaux : l'importance de la recombinaison sexuée dans la variabilité et l'évolution des virulences a déjà été proposée ultérieurement (Crute 1992; Gustafsson *et al.* 1985 ; Lebeda and Schwinn 1994).

Nous avons tenté d'identifier des signes de recombinaison sexuée dans les principaux bassins de production en échantillonnant, pendant une épidémie, un nombre important d'isolats (30 isolats monospores). Ces analyses n'ont pas permis d'identifier une variabilité génétique importante qui aurait pu être le signe d'une reproduction sexuée.

Quel est l'influence de la migration sur la structure génétique de *B. lactucae* ?

Seules quatre marqueurs microsatellites sur les douze testés sont amplifiés chez les isolats de *B. lactucae* prélevés sur artichaut. Ces résultats confirment l'hypothèse d'une forte spécialisation à l'hôte et la présence d'un flux de gènes nul ou très limité entre les isolats de *Bremia* des différents genres d'*Asteraceae* infectés. Ainsi, les isolats de *Bremia* se développant sur un genre différent de *Lactuca* pourront très rarement se développer sur des *Lactuca* (Lebeda *et al.* 2002 ; Thines *et al.* 2010 ; Volgmayr *et al.* 2004). Ces souches ne constituent donc pas la source des épidémies de *Bremia* sur les laitues cultivées.

Par contre, nous avons montré qu'une migration peut exister entre le compartiment sauvage (*L. serriola*) et le compartiment cultivé (*L. sativa*). Cependant, notre échantillonnage sur la plante hôte sauvage ne nous permet pas de déterminer l'importance de ce flux de gènes. Plusieurs études, basées sur les virulences, ont montré que ce flux de gènes est probablement assez faible (Lebeda *et al.* 1988 ; Lebeda *et al.* 2004 ; Lebeda *et al.* 2008). Néanmoins, l'introgession de gènes de résistance de *L. serriola* dans les laitues cultivées a pu favoriser ce flux de gènes et le compartiment sauvage pourrait ainsi servir de réservoir génétique au *Bremia*. Il pourrait permettre des recombinaisons de virulence entre les isolats des deux plantes hôtes et accélérer l'adaptation aux résistances.

Les fréquences alléliques observées, la faible différenciation génétique des populations françaises et le faible isolement par la distance identifiée suggère un flux de gènes important, à l'échelle européenne. Ce flux de gènes est probablement favorisé par les traits d'histoire de vie de l'hôte dont la production intensive de laitue. Il a également été montré que les spores asexuées de *Bremia* peuvent être dispersées sur de longues distances par le vent (Crute 1981). D'ailleurs, le terme flux de génotypes (McDonald *et al.* 2002) serait probablement plus approprié dans le modèle *Bremia*. Il pourrait aussi être favorisé par un transport induit par l'Homme. En effet, en France, de nombreux agriculteurs utilisent des plants de laitue qui sont

cultivés dans des pépinières. Ces pépinières peuvent fournir un grand nombre d'agriculteurs exerçant dans différentes régions. Par exemple, une pépinière de Loire-Atlantique a fourni des plants à des agriculteurs d'Indre et Loire, de la Manche et de Bretagne pour lesquels nous avons prélevés du *Bremia* dans les cultures. Ainsi, des plantes infectées dans la phase asymptomatique de la maladie, peuvent être dispersées dans différentes régions. Ce type de migration due à l'Homme a été montré pour de nombreux agents pathogènes dont des oomycètes comme *P. ramorum* (Mascheretti *et al.* 2008 ; Prospero *et al.* 2009) et *P. infestans* (Fry *et al.* 1993). Nous ne pouvons pas, à ce stade de l'étude, différencier la migration due à la dispersion aérienne ou à une dispersion humaine, mais nous pouvons conclure que *Bremia* a une importante capacité de mobilité en France à l'image de *P. infestans* (Montarry *et al.* 2010).

Ce flux de gènes important contribue à favoriser les épidémies de *Bremia* en France et à diminuer l'influence de la dérive génétique.

Quel est l'influence de la pression de sélection des gènes de résistance sur la structure des populations ?

Nos résultats montrent que la pression de sélection exercée par les gènes de résistance (*Dm*) est importante dans la structure des populations de *B. lactucae* en France. Ce résultat est cohérent avec la faible diversité génétique observée dans les cultures alors que les populations pourraient être potentiellement très diversifiées. En effet, nos résultats montrent une diversité génétique importante en Europe, des flux de gènes possibles entre le compartiment sauvage et le compartiment cultivé et une variabilité des virulences importantes. Cette variabilité importante dans les virulences a également été montrée par de nombreuses études (revue dans Crute 1987 ; Lebeda et Zinkernagel 2003 ; Sharaf *et al.* 2007). Or, à un temps donné, les gènes de résistance utilisés sont peu diversifiés et sont présents sur une grande échelle. Si ces gènes exercent une pression de sélection très importante, ils vont diminuer la variabilité phénotypique des populations pathogènes. L'influence de la sélection des gènes *Dm* sur la variabilité phénotypique a déjà été observée (Crute 1987). Notre étude relie, pour la première fois, cette sélection des gènes *Dm* sur la variabilité phénotypique à la variabilité génétique.

Cette importante pression de sélection des gènes de résistance sur la structure des populations de *B. lactucae* a également été confirmée par les analyses réalisées sur les isolats des boîtes pièges. Sur un total de 220 isolats piégés depuis 2006, seulement 15 isolats représentant neuf génotypes différents n'ont jamais été identifiés dans des cultures de laitue

(Valade, comm. pers). Ce résultat montre que les génotypes aériens sont majoritairement les mêmes génotypes que ceux présents sur les variétés. Ainsi, la pression de sélection exercée par les gènes de résistance favorise l'émergence et le maintien des souches les mieux adaptées à de fortes fréquences. Néanmoins, ces neuf génotypes qui, pour certains, présentent des combinaisons de virulence différentes pourraient constituer un réservoir génétique pour *B. lactucae*. De nouvelles combinaisons de gènes de résistance pourraient sélectionner ces souches et remplacer les populations préexistantes.

Les gènes de résistance *Dm* sélectionnent plusieurs lignées clonales (MLG7 et MLG55 par exemple) et groupes de génotypes avec des fonds génétiques différents et des combinaisons de virulence différentes. Ce type de structure a été observé chez différents agents pathogènes comme *Melampsora Larici-populina* sur peuplier (Xhaard *et al.* 2011) ou *Puccinia tritici* sur blé (Goyeau *et al.* 2007). Les premières analyses sur la variabilité allélique et la dynamique évolutive des effecteurs RxLR sont également concordantes avec cette structure car la différence entre les allèles est généralement reliée aux lignées clonales.

Mécanismes d'adaptation de *Bremia lactucae* face aux gènes de résistance de la laitue

Les souches pathogènes peuvent évoluer selon différents mécanismes qui sont des mutations (non synonymes, délétions complètes ou partielles, mutations non sens) dans les gènes de virulence, des phénomènes d'instabilité génomique (recombinaison mitotique, fusions somatiques...), la recombinaison sexuée entre différents génotypes et des phénomènes d'introduction et d'émergence à partir d'un hôte différent ou de régions différentes. L'ensemble de ces mécanismes a été observé chez différents oomycètes comme *P. infestans* (Goodwin 1997) ou *Plasmopara halstedii* (Delmotte *et al.* 2008).

Nos résultats semblent indiquer que tous ces phénomènes surviennent dans les populations françaises de *Bremia* et qu'ils sont différents selon les gènes de résistance utilisés.

Nos résultats suggèrent une évolution par mutation dans les lignées clonales. En effet, les lignées clonales telles que MLG55 ou MLG7 correspondent à différents phénotypes de virulence très proches entre eux (trois virulences différentes au maximum par rapport au phénotype majoritaire). Ces mutations dans des gènes d'avirulence sont également accompagnées par des mutations neutres ce qui permet de former des groupes de génotypes avec le même fond génétique. Par exemple, le MLG55 est très proche des MLG39, MLG54,

MLG56, MLG60 et MLG100 selon les phénotypes de virulence, les marqueurs neutres et également les effecteurs candidats RxLR. Ces génotypes sont généralement retrouvés sur des variétés présentant les mêmes résistances et nous n'avons identifié qu'un seul type sexuel pour tous ces génotypes. Ainsi, ces résultats suggèrent une évolution par mutation pour l'ensemble de ces génotypes dont la vitesse dépendra de la pression de sélection exercée par les gènes de résistance. Ces génotypes avec le même fond génétique n'ont cependant probablement pas la même valeur sélective. Par exemple, dans les années 2006-2007, MLG39 était le génotype dominant identifié sur plusieurs variétés possédant le gène de résistance A seul ou en combinaison avec les gènes C, K ou I (Valade comm. pers.). Les années suivantes, la fréquence de ce génotype a fortement diminuée au profit du génotype MLG55 alors que plusieurs variétés avec les mêmes gènes de résistance étaient toujours cultivées. Nous pouvons suggérer que le MLG55 provient du MLG39 à partir de mutations dans un ou plusieurs gènes effecteurs et qu'il possède une valeur sélective plus importante lui permettant d'être sélectionné par les gènes de résistance. Néanmoins, nous ne pouvons pas déterminer les gènes mutés. En effet, les variétés utilisées peuvent posséder des gènes de résistance qui ne sont pas utilisés dans la détermination des phénotypes de virulences. Cependant, nous pouvons comparer les variétés sur lesquels nous avons échantillonné MLG39 et MLG55. Les résultats montrent qu'aucun isolat MLG39 n'a été identifié sur des variétés possédant le gène B seul ou en combinaison avec le gène A alors que les isolats MLG55 sont retrouvés sur toutes les combinaisons de résistance (sans le gène de résistance D). Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que les isolats MLG39 ne peuvent pas se développer sur le gène B et que l'acquisition de la virulence pour ce gène par des mutations a permis l'émergence des génotypes MLG55 à partir du fond génétique de MLG39 qui ont ensuite été favorablement sélectionnés par les gènes de résistance. Il serait intéressant d'effectuer des comparaisons de valeur sélective entre les différents isolats rassemblés dans les mêmes groupes de génotypes.

Nous pouvons également émettre l'hypothèse d'une évolution des virulences dans ces groupes de génotypes par des processus de parasexualité comme la fusion somatique, des recombinaisons mitotiques ou encore de l'homothallisme secondaire. Ces phénomènes sont très fréquents chez les oomycètes (Delmotte *et al.* 2008 ; Dobrowlski *et al.* 2003 ; Goodwin 1997 ; Kamoun 2003) dont *B. lactucae* (Michelmore *et al.* 2008).

L'analyse des effecteurs candidats suggèrent également une évolution par mutation dans les lignées clonales comme nous l'avons observé avec la perte de l'hétérozygotie pour le gène candidat RxLR9 dans une population d'isolats MLG55 alors que tous les autres isolats MLG55 sont hétérozygotes à ce locus.

Des mutations dans des gènes effecteurs peuvent donc expliquer la dynamique évolutive de différentes lignées clonales dans les populations de *Bremia*.

La recombinaison sexuée aurait également un rôle important dans l'évolution des virulences et l'adaptation aux résistances dans les populations de *Bremia* en France. L'importance de la recombinaison sexuée dans l'adaptation des résistances est bien connue pour de nombreux agents pathogènes. Notre étude suggère que ce sont les gènes de résistance utilisés et leurs gestions qui pourraient avoir un impact différent sur le système de reproduction de *B. lactucae*. Une hypothèse avancée pour expliquer cette pression de sélection qui pourrait favoriser la recombinaison sexuée est l'utilisation du pyramidage de gènes dans les variétés. En effet, les isolats prélevés sur des variétés avec plusieurs gènes de résistance présentent une variabilité phénotypique et génotypique plus importante que les isolats prélevés sur des variétés monogéniques (Article 2). Le pyramidage de gènes a pu favoriser la recombinaison sexuée notamment car les gènes de résistance utilisés étaient déjà contournés par d'autres types d'isolats. Par exemple, un nouveau gène de résistance (gène D) a été utilisé seul, puis en combinaison avec d'anciens gènes de résistance déjà contournés par plusieurs génotypes de *B. lactucae*. De plus, ce gène a été beaucoup utilisé, dans un premier temps, dans des variétés de plein champ cultivées dans les régions du nord de la France (Thabuis comm. pers.), régions où nous supposons que la recombinaison sexuée permettrait la survie des populations de *Bremia* pendant les périodes sans cultures de laitue.

Nos résultats démontrent également une adaptation des populations de *Bremia* aux gènes *Dm* par flux de gènes avec les plantes hôtes sauvages. Cette sélection pour des isolats de *L. serriola* semble assez faible mais elle peut avoir des conséquences dramatiques sur les cultures de laitue. En effet, les isolats MLG1 qui ont été majoritairement prélevés sur une seule variété et sur des *L. serriola* ont provoqués des dégâts tellement importants dans le Sud-Est, pendant l'hiver 2006-2007, que la variété a ensuite été retirée des catalogues. Les gènes *Dm* peuvent ainsi sélectionner pour des isolats provenant du compartiment sauvage qui ont des combinaisons de virulence et des fonds génétiques très différents des isolats prélevés sur *L. serriola*. Ce type de sélection pourrait entraîner de nouvelles combinaisons dans les gènes d'avirulence augmentant ainsi la capacité d'adaptation de *Bremia*.

Nous pouvons également noter une complexification des phénotypes de virulences dans les lignées clonales ou les groupes de génotypes et la persistance des virulences dites non nécessaires c'est-à-dire, qui ne sont pas reconnues par les gènes de résistance utilisés à l'heure actuelle. Cette complexification et accumulation de virulences « non nécessaires » a déjà été démontrée chez *Bremia* (Lebeda et Zinkernagel 2003) et seraient fréquentes chez les oomycètes (Drenth et Goodwin 1999). Néanmoins, cette accumulation pourrait avoir un effet sur la valeur sélective. En effet, nous pouvons observer que, pour les lignées clonales MLG7 et MLG55, les phénotypes les plus fréquents ne sont pas ceux présentant le plus grand nombre de virulences.

La pression de sélection exercée par les gènes de résistance de la plante hôte semble influencer les différents mécanismes d'adaptation dans les populations françaises de *B. lactucae*. Ce résultat pourrait être corrélé au type de sélection exercée par les gènes *Dm* sur les effecteurs de *Bremia*. Les premières analyses semblent indiquer que les effecteurs de *Bremia* pourraient être soumis à une sélection balancée et diversifiante. La sélection diversifiante va entraîner des balayages sélectifs qui vont diminuer la variabilité au niveau populationnel sous l'effet des gènes de résistance (Brown 1994 ; Stukenbrock et Mc Donald 2009) alors que la sélection balancée va permettre un maintien du polymorphisme dans les populations (Stukenbrock et Mc Donald 2009). Or, la variabilité génétique observée dans les deux groupes de génotypes structurés par les gènes *Dm* présentent des patrons de polymorphisme différents qui pourraient être la conséquence de ces deux types de sélection.

Potentiel évolutif de *Bremia* et conséquences sur la gestion des résistances : **Comment améliorer la durabilité des résistances ?**

L'ensemble des résultats montre que *B. lactucae* est un agent pathogène avec un fort potentiel évolutif selon le modèle de Mc Donald et Linde (2002). *Bremia* montre des flux de gènes important, une reproduction mixte (asexuée et sexuée), des mécanismes d'adaptation très variés et la pression de sélection des gènes de résistance est forte.

L'ensemble de ces caractéristiques indique que l'utilisation de gènes majeurs de résistance ne permettra pas d'empêcher des épidémies de *Bremia* et favorisera une adaptation rapide des populations. L'utilisation du pyramidage de gènes ne semble pas efficace et pourrait même avoir un effet inverse en augmentant la variabilité génétique et permettant la recombinaison de souches avec des fonds génétiques différents. Si du pyramidage de gène est

effectué, il faudrait que les gènes utilisés ne soient pas déjà contournés par des populations et que chaque gène de résistance ne soit pas déployé un à un dans d'autres cultivars (Parlevliet 1997). Cependant, une telle gestion des résistances nécessite des échanges entre les sélectionneurs sur les gènes de résistance qu'ils utilisent. Or, cet échange est difficile pour des raisons concurrentielles.

Une gestion spatio-temporelle des résistances pourrait être mise en place dans le nord de la France pour améliorer la durabilité des résistances. Les populations de *Bremia* subissant des goulots d'étranglement dans ces régions, l'alternance de différents gènes de résistance par saison pourrait diminuer le développement épidémique en empêchant les oospores de se développer sur le ou les nouveaux gènes de résistance de la saison suivante. Une étude préalable par le phénotypage et le génotypage de spores aériennes (méthode des boîtes pièges) peut permettre de déterminer les virulences présentes et les différents fonds génétiques afin de maximiser le choix des gènes de résistance à utiliser. Néanmoins, le flux de gènes important pourrait rendre cette stratégie inefficace.

L'utilisation de la résistance quantitative pourrait être intéressante dans la lutte contre *B. lactucae*. Cependant, une érosion de la résistance quantitative est possible par l'augmentation de l'agressivité des populations comme c'est le cas pour *P. infestans* (Andrivon *et al.* 2007) qui présente un potentiel évolutif proche de celui de *Bremia*. De plus, la laitue étant un légume feuille, aucun symptôme ne doit être visible pour pouvoir commercialiser la plante.

Une autre stratégie pour augmenter la durabilité des gènes de résistance en retardant la sélection de variants virulents serait de combiner dans les cultivars un gène de résistance majeur avec des gènes de résistance quantitative. Brun *et al.* (2010) et Palloix *et al.* (2009) ont démontré que cette stratégie augmentait la durabilité de la résistance respectivement pour un champignon sur le colza et un virus sur le piment.

Les études pour améliorer la durabilité de la résistance pourraient également concerner la recherche de gènes d'avirulence indispensables au développement de *Bremia* et pour lesquels le coût de la virulence est important comme pour *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Vera Cruz *et al.* 2000).

Malgré la lutte génétique, des mesures prophylactiques, comme contrôler le taux d'humidité et éviter la présence de débris de plantes entre les cultures, sont nécessaires pour limiter les épidémies de *B. lactucae* et améliorer la durabilité des résistances.

Perspectives

En conclusion, ce travail a permis d'apporter des informations nouvelles sur les forces évolutives s'exerçant sur les populations de *Bremia* et les mécanismes d'adaptation aux résistances. Mais, il soulève également de nouvelles questions de recherche et de nouvelles perspectives d'études.

L'identification d'un flux de gènes probable entre le compartiment sauvage soulève plusieurs questions. Y'a-t-il de la recombinaison sexuée sur la plante hôte sauvage ? Agit-il comme réservoir génétique et accélère-t-il l'adaptation aux résistances ?

Le génome de *Bremia* n'est pas encore disponible mais l'assemblage est en cours dans le laboratoire de R. Michelmore (UC Davis, Californie). Une collaboration pour le séquençage d'une dizaine de génotypes identifiés en France pourrait être réalisée avec R. Michelmore. Ce séquençage permettra probablement d'identifier des effecteurs candidats RxLR supplémentaires. L'étude de la dynamique évolutive des effecteurs pourra ainsi être poursuivie avec un plus grand nombre d'effecteurs et permettre de caractériser plus précisément la sélection exercée par les gènes de résistance.

BIBLIOGRAPHIE

Agrios GN (1997) Plant Pathology Academic Press, New York.

Aguilera G, Refrégier G, Yockteng R, Fournier E, Giraud T (2009) Rapidly evolving genes in pathogens: Methods for detecting positive selection and examples among fungi, bacteria, viruses and protists. *Infection, Genetics and Evolution* 9, 656-670.

Allen RL, Bittner-Eddy PD, Grenville-Briggs LJ, Meitz JC, Rehmany AP, Rose LE, Beynon JL (2004) Host-Parasite Coevolutionary Conflict Between Arabidopsis and Downy Mildew. *Science* 306, 1957-1960.

Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 535-544.

Andersson JO (2005) Lateral gene transfer in eukaryotes. In: *Cellular and Molecular Life Sciences*, pp. 1182-1197. Birkhäuser Basel.

Andrion D, Pilet F, Montarry J, Hafidi M, Corbiere R, Achbani E, Pelle R, Ellisseche D (2007) Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: Evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* 97, 338 - 343.

Ayme Vr, Petit-Pierre J, Souche S, Palloix A, Moury B (2007) Molecular dissection of the potato virus Y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the pvr2 resistance allelic series in pepper. *Journal of General Virology* 88, 1594-1601.

Baer CF, Miyamoto MM, Denver DR (2007) Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences. *Nature Review Genetics* 8, 619-631.

Balloux F, Lehmann L, de Meeus T (2003) The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics* 164, 1635-1644.

Balter M (2007) Seeking Agriculture's Ancient Roots. *Science* 316, 1830-1835.

Barrett LG, Thrall PH, Burdon JJ, Linde CC (2008a) Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host-parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 23, 678-685.

Barrett LG, Thrall PH, Burdon EJ, Nicotra AB, Linde CC (2008b) Population structure and diversity in sexual and asexual populations of the pathogenic fungus *Melampsora lini*. *Molecular Ecology* 17, 3401-3415.

Bent AF, Mackey D (2007) Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol* 45, 399-436.

Bergelson J, Kreitman M, Stahl EA, Tian D (2001) Evolutionary Dynamics of Plant R-Genes. *Science* 292, 2281-2285

Biffen RH (1905) Mendel's laws of inheritance and wheat breeding. *The Journal of Agriculture Science* 1, 4-48.

Birch PRJ, Rehmany AP, Pritchard L, Kamoun S, Beynon JL (2006) Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends in Microbiology* 14, 8-11.

Bonnier FJK, Reinink K, Groenwold R (1994) Genetic analysis of *Lactuca* accessions with new major gene resistance to lettuce downy mildew. *Phytopathology* 84, 462-468.

Brown JKM, Tellier A (2011) Plant-Parasite Coevolution: Bridging the Gap between Genetics and Ecology. *Annual Review of Phytopathology*. 49, 345-367.

Brown JKM (2003) Little Else But Parasites. *Science* 299, 1680-1681.

Brown JKM, Hovmøller MS (2002) Aerial Dispersal of Pathogens on the Global and Continental Scales and Its Impact on Plant Disease. *Science* 297 537-541.

Brown JKM (1994) Chance and selection in the evolution of barley mildew. *Trends in Microbiology* 2, 470-475.

Brown S, Koike ST, Ochoa OE, Laemmlen F, Michelmore RW (2004) Insensitivity to the fungicide fosetyl-aluminum in California isolates of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*. *Plant Disease* 88, 502-508.

Brun H, Chevre A, Fitt B, Powers S, Besnard A, Ermel M, Huteau V, Marquer B, Eber F, Renard M, Andrion D (2010) Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol* 185, 285 - 299.

- Burdon JJ** (1992) Host population subdivision and the genetic structure of natural pathogen populations. *Adv. Plant. Path* 8, 81-94.
- Carisse O, Phillion V** (2002) Meteorological factors affecting periodicity and concentration of airborne spores of *Bremia lactucae*. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* 24, 184-193.
- Charlesworth B** (1989) The evolution of sex and recombination. *Trends in Ecology & Evolution* 4, 264-267.
- Choi YJ, Hong SB, Shin HD** (2007) Extreme size and sequence variation in the ITS rDNA of *Bremia lactucae*. *Mycopathologia* 163, 91-95.
- Choi Y-J, Thines M, Runge F, Hong S-B, Telle S, Shin H-D** (2011) Evidence for high degrees of specialisation, evolutionary diversity, and morphological distinctiveness in the genus *Bremia*. *Fungal Biology* 115, 102-111.
- Cobelli L, Collina M, Brunelli A** (1998) Occurrence in Italy and characteristics of lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*) resistant to phenylamide fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 104, 449-455.
- Collier SM, Moffett P** (2009) NB-LRRs work a "bait and switch" on pathogens. *Trends in Plant Science* 14, 521-529.
- Cooke D, Drenth A, Duncan J, Wagels G, Brasier C** (2000) A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genet Biol* 30, 17 - 32.
- Cooke D, Schena L, Cacciola S** (2007) Tools to detect, identify and monitor *Phytophthora* species in natural ecosystems. *J Plant Pathol* 89, 13 - 28.
- Couch B, Fudal I, Lebrun M, Tharreau D, Valent B, van Kim P, Notteghem J, Kohn L** (2005) Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. *Genetics* 170, 613 - 630.
- Couvet D, Gouyon, P.H., Kjelleberg, F., Olivieri, I., Pomente, D., Valdeyron, G.** (1985) De la métapopulation au voisinage: la génétique des populations en déséquilibre. *Génétique, Sélection, Evolution* 17, 407-413.
- Crute IR** (1992) From breeding to cloning (and back again?): a case study with lettuce downy mildew. *Ann Rev Phytopathol* 30, 485-506.
- Crute IR** (1987) The geographical distribution and frequency of virulence determinants in *Bremia lactucae*: relationships between genetic control and host selection. In: Wolfe MS, Caten CE, eds. *Populations of plant pathogens: their Dynamics and Genetics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Crute IR, Norwood JM, Gordon PL** (1987) The Occurrence, Characteristics and Distribution in the United-Kingdom of Resistance to Phenylamide Fungicides in *Bremia-Lactucae* (Lettuce Downy Mildew). *Plant Pathology* 36, 297-315.
- Crute IR, Dixon GR** (1981) Downy mildew diseases caused by the genus *Bremia* Regel : In D. M. Spencer (Ed.), *The downy mildews* (pp. 421-460). London, New York, San Francisco: Academic Press.
- Crute IR, Norwood JM** (1978) Incomplete specific resistance to *Bremia lactucae* in lettuce. *Annals of Applied Biology* 89, 467-474.
- Crute IR, Johnson AG** (1976) The genetic relationship between races of *Bremia lactucae* and cultivars of *Lactuca sativa*. *Annals of Applied Biology* 83, 125-137.
- Dangl JL, Jones JDG** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. 411, 826-833.
- de la Cruz F, Davies J** (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology* 8, 128-133.
- de Meeus T, McCoy KD, Prugnolle F, Chevillon C, Durand P, Hurtrez-Bousses S, Renaud F** (2007) Population genetics and molecular epidemiology or how to "debusquer la bête". *Infection Genetics and Evolution* 7, 308-332.
- de Meeûs T, Renaud F** (2002) Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends in Parasitology* 18, 247-251.

Delmotte F, Giresse X, Richard-Cervera S, M'Baya J, Vear F, Tourvieille J, Walser P, de Labrouhe DT (2008) Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection Genetics and Evolution* 8, 534-540.

Delmotte F, Chen WJ, Richard-Cervera S, Greif C, Papura D, Giresse X, Mondor-Genson G, Corio-Costet MF (2006) Microsatellite DNA markers for *Plasmopara viticola*, the causal agent of downy mildew of grapes. *Molecular Ecology Notes* 6, 379-381.

Delmotte F, Leterme N, Gauthier J-P, Rispe C, Simon J-C (2002) Genetic architecture of sexual and asexual populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* based on allozyme and microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11, 711-723.

Dobrowolski MP, Tommerup IC, Shearer BL, O'Brien PA (2003) Three Clonal Lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia Revealed by Microsatellites. *Phytopathology* 93, 695-704.

Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti A-M, Teh T, Wang C-IA, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 8888-8893

Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. 11, 539-548.

Drenth A, Goodwin SB (1999) Population structure of oomycetes. In: *Structure and Dynamics of fungal populations* (ed. Worral JJ), pp. 195-224. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Dutech C, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Barres B, Carlier J, Tharreau D, Giraud T (2007) Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 44, 933-949.

Ellis JG, Dodds PN (2011) Showdown at the RXLR motif: Serious differences of opinion in how effector proteins from filamentous eukaryotic pathogens enter plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 14381-14382.

Fabritius A-L, Judelson HS (1997) Mating-type loci segregate aberrantly in *Phytophthora infestans* but normally in *Phytophthora parasitica*: implications for models of mating-type determination. In: *Current Genetics*, pp. 60-65. Springer Berlin / Heidelberg.

Farrara BF, Ilott TW, Michelmore RW (1987) Genetic analysis of factors for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in species of lettuce (*Lactuca sativa* and *L. serriola*). *Plant Pathology* 36, 499-514.

Flor H (1971) Current status of gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9, 275 – 296.

Flor H (1956) The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv Genet* 8, 29 - 54.

Friesen TL, Stukenbrock EH, Liu ZH, Meinhardt S, Ling H, Faris JD, Rasmussen JB, Solomon PS, McDonald BA, Oliver RP (2006) Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. *Nature Genetics* 38, 953-956.

Fry WE, Goodwin SB, Dyer AT (1993) Historical and recent migrations of *phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant Disease* 77, 663-661.

Gomez-Alpizar L, Carbone I, Ristaino JB (2007) An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 3306-3311

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

Gandon S, Capowiez Y, Dubois Y, Michalakis Y, Olivieri I (1996) Local Adaptation and Gene-For-Gene Coevolution in a Metapopulation Model. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 263 1003-1009

Geiger HH, Heun M (1989) Genetics of Quantitative Resistance to Fungal Diseases. *Annual Review of Phytopathology*. 27, 317-341.

Gill DE (1978) Effective Population Size and Interdemic Migration Rates in a Metapopulation of the Red-Spotted Newt, *Notophthalmus viridescens* (Rafinesque). *Evolution* 32, 839-849.

Gillepsie JH (1998) Population genetics, a concise guide The John Hopkins University Press, London.

Giraud T (2004) - Patterns of within population dispersal and mating of the fungus *Microbotryum violaceum* parasitising the plant *Silene latifolia*. - 93, - 565.

Gladieux P, Zhang X-G, Roldan-Ruiz I, Caffier V, Leroy T, Devaux M, Glabeke SV, Coart E, Cam BL (2010) Evolution of the population structure of *Venturia inaequalis*, the apple scab fungus, associated with the domestication of its host. *Molecular Ecology* 19, 658-674.

Goker M, Voglmayr H, Riethmuller A, Oberwinkler F (2007) How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. *Fungal Genetics and Biology* 44, 105-122.

Goodwin SB (1997) The Population Genetics of Phytophthora. *Phytopathology* 87, 462-473.

Gout L, Kuhn ML, Vincenot L, Bernard-Samain S, Cattolico L, Barbetti M, Moreno-Rico Os, Balesdent M-Hln, Rouxel T (2007) Genome structure impacts molecular evolution at the AvrLm1 avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environmental Microbiology* 9, 2978-2992.

Gower CM, Webster, J.P. (2004) Fitness of indirectly transmitted pathogens: restraint and constraint. *Evolution* 58, 1178-1184.

Goyeau H, Halkett F, Zapater M, Carlier J, Lannou C (2007) Clonality and host selection in the wheat pathogenic fungus *Puccinia triticinia*. *Fungal Genetics and Biology* 44, 474 - 483.

Grandos-cifuentes C, Rodriguez-Lannety M (2011) The use of high-resolution melting analysis for genotyping Symbiodinium strains: a sensitive and fast approach. *Molecular Ecology Resources* 11, 394-399.

Grube RC, Ochoa OE (2005) Comparative genetic analysis of field resistance to downy mildew in the lettuce cultivars 'Grand Rapids' and 'Iceberg'. *Euphytica* 142, 205-215.

Guenard M, Cadot V, Boulineau F, Fontanges H (1999) Collaboration between breeders and GEVES-SNES for the harmonization and evaluation of a disease resistance test: *Bremia lactucae* of the lettuce. *Eucarpia Leafy Vegetables*

Gustafsson M, Liljeroth E, Gustafsson I (1985) Pathogenic variation and sexual reproduction in Swedish populations of *Bremia lactucae* In: TAG Theoretical and Applied Genetics, pp. 643-649. Springer Berlin / Heidelberg.

Haas B, Kamoun S, Zody M, Jiang R, Handsaker R, Cano L, Grabherr M, Kodira C, Raffaele S, Torto-Alalibo T (2009) Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* 461, 393 - 398.

Halkett F, Simon JC, Balloux F (2005) Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 194-201.

Hardy HG (1908) Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 28, 49-50.

Harrison B (2002) Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. In: *Euphytica*, pp. 181-192. Springer Netherlands.

Hein I, Gilroy EM, Armstrong MR, Birch PRJ (2009) The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions. *Molecular Plant Pathology* 10, 547-562.

Heitman J (2006) Sexual Reproduction and the Evolution of Microbial Pathogens. *Current Biology* 16, R711-R725.

Hiller NL, Bhattacharjee S, van Ooij C, Liolios K, Harrison T, Lopez-Estrano C, Haldar K (2004) A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science*. 306, 1934-1937.

Holub EB (2001) The arms race is ancient history in Arabidopsis, the wildflower. 2, 516-527.

Hooftman DAP, Nieuwenhuis BPS, Posthuma KI, Oostermeijer JGB, den Nijs H (2007) Introgression potential of downy mildew resistance from lettuce to *Lactuca serriola* and its relevance for plant fitness. *Basic and Applied Ecology* 8, 135-146.

Hudspeth DSS, Stenger D, Hudspeth MES (2003) A cox2 phylogenetic hypothesis for the downy mildews and white rusts. *Fungal Diversity* 13, 47-57.

Hulbert SH, Illott TW, Legg EJ, S.E. L, E.S. L, Micheltmore RW (1988) Genetic analysis of the Fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. *Genetics* 120, 947-958.

Hulbert SH, Micheltmore RW (1988) DNA Restriction Fragment Length Polymorphism and Somatic Variation in the Lettuce Downy Mildew Fungus, *Bremia lactucae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1, 17-24.

Hulbert SH, Michelmore RW (1985) Linkage analysis of genes for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa*). In: TAG Theoretical and Applied Genetics, pp. 520-528. Springer Berlin / Heidelberg.

Ilott TW, Durgan ME, Michelmore RW (1987) Genetics of Virulence in California Populations of *Bremia-Lactucae* (Lettuce Downy Mildew). *Phytopathology* 77, 1381-1386.

Ioos R, Andrieux A, Marcais Bt, Frey P (2006) Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genetics and Biology* 43, 511-529.

Jean L, Maisonneuve B (2010) Production de souches monospores d'un oomycète, parasite obligatoire, *Bremia lactucae* regel. Le cahier des techniques de l'INRA 69.

Jeuken M, Lindhout P (2002) *Lactuca saligna*, a non-host for lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*), harbors a new race-specific Dm gene and three QTLs for resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 105, 384-391.

Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. 19, 4004-4014.

Jiang RHY, Tripathy S, Govers F, Tyler BM (2008) RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 4874-4879.

Johnson R (1992) Past, present and future opportunities in breeding for disease resistance, with examples from wheat. In: *Euphytica*, pp. 3-22. Springer Netherlands.

Johnson R (1979) The Concept of Durable Resistance. *Phytopathology* 69, 198-199.

Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. 444, 323-329.

Judelson HS, Tyler BM, Michelmore RW (1992) Regulatory sequences for expressing genes in oomycete fungi. *Mol Gen Genet.* 234, 138-146.

Kamoun S (2001) Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 295-300.

Kamoun S (2006) A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes. *Annu Rev Phytopathol.*

Kamoun S (2003) Molecular genetics of pathogenic Oomycetes. 2, 191-199.

Keeling PJ, Palmer JD (2008) Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. 9, 605-618.

Kettlewell HB (1959) Darwin's missing evidence. *Sci Am.* 200, 48-53.

Kidwell MG (1993) Lateral transfer in natural populations of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 27, 235-256.

Kimura M (1983) The neutral theory of molecular evolution Cambridge University Press, Cambridge.

Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75, 2868-2872.

Kimura M (1953) "Stepping stone" model of population. *Ann. Rept. Nat. Inst. Genetics* 3, 62-63.

Kuang H, Woo S-S, Meyers BC, Nevo E, Michelmore RW (2004) Multiple Genetic Processes Result in Heterogeneous Rates of Evolution within the Major Cluster Disease Resistance Genes in Lettuce. *The Plant Cell Online* 16, 2870-2894.

Lajeunesse MJ, Forbes MR (2002) Host range and local parasite adaptation *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 269 703-710

Lamour K, Kamoun S (2009) Oomycete Genetics and Genomics. In: *Oomycete Genetics and Genomics*, pp. i-xvii. John Wiley & Sons, Inc.

Large E (1940) *The Advance of the Fungi* New York: Henry Holt and Co.

Le Guen V, Garcia D, Mattos CRR, DoarÃ© F, Lespinasse D, Seguin M (2007) Bypassing of a polygenic *Microcyclus ulei* resistance in rubber tree, analyzed by QTL detection. *New Phytologist* 173, 335-345.

Leach J, Cruz C, Bai J, Leung H (2001) Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annu Rev Phytopathol* 39, 187 - 224.

Lebeda A, Petrzela I, Maryska Z (2008) Structure and variation in the wild-plant pathosystem: *Lactuca serriola*-*Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology* 122, 127-146.

Lebeda A, Dolezalova I, Kristkova E, Dehmer KJ, Astley D, van de Weil CCM, van Treuren R (2007) Acquisition and ecological characterization of *Lactuca serriola* L. germplasm collected in the Czech Republic, Germany, the Netherlands and United Kingdom. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54, 555-562.

Lebeda A, Zinkernagel V (2003) Evolution and distribution of virulence in the German population of *Bremia lactucae*. *Plant Pathology* 52, 41-51.

Lebeda A, Pink DAC, Astley D (2002) Aspects of the interactions between wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). In: *Advances in Downy Mildew Research*, pp. 85-117.

Lebeda A (2002) Occurrence and variation in virulence of *Bremia lactucae* in natural populations of *Lactuca serriola*. In: *Advances in Downy Mildew Research*, pp. 179-183.

Lebeda A, Dolezalova I, Kristkova E, Mieslerova B (2001) Biodiversity and ecogeography of wild *Lactuca* spp. in some European countries. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48, 153-164.

Lebeda A, Pink DAC (1998) Histological aspects of the response of wild *Lactuca* spp. and their hybrids, with *L-sativa* to lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). *Plant Pathology* 47, 723-736.

Lebeda A, Schwinn FJ (1994) The Downy Mildews - an Overview of Recent Research Progress. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 101, 225.

Lebeda A, Blok I (1990) Sexual compatibility types of *Bremia lactucae* isolates originating from *Lactuca serriola*. In: *European Journal of Plant Pathology*, pp. 51-54. Springer Netherlands.

Leblois R, Rousset Fo, Estoup A (2004) Influence of Spatial and Temporal Heterogeneities on the Estimation of Demographic Parameters in a Continuous Population Using Individual Microsatellite Data *Genetics* 166 1081-1092

Lindhout P (2002) The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica* 124, 217-226.

Ma W, Guttman DS (2008) Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. *Current Opinion in Plant Biology. Biotic Interactions* - Edited by Murray Grant and Sophien Kamoun 11, 412-419.

Maisonneuve B, Jeuniaux S, Juillard E, Lovera M, Gaudin J, Valade R, Neema C (2012) Populations de *Bremia* en Provence. *Journées Jean Chevaugéon IX, rencontres de mycologie*

Maisonneuve B (2011) Virulence of *Bremia lactucae* populations in Southern France between 2006 and 2011. *Eucarpia Leafy vegetables* 24-26 August 2011.

Maisonneuve B (2003) *Lactuca virosa*, a source of disease resistance genes for lettuce. *EUCARPIA leafy vegetables 2003. Proceedings of the EUCARPIA Meeting on Leafy Vegetables Genetics and Breeding*, Noordwijkerhout, Netherlands, 19-21 March 2003, 61-67.

Maisonneuve B, Bellec Y, Souche S, Lot H (1999) New resistance against downy mildew and lettuce mosaic potyvirus in wild *Lactuca* spp. in : Lebeda, A.(ed), Kristkova, E., *Proceedings of the Eucarpia meeting on leafy vegetables genetics and breeding*, p: 191-197.

Maisonneuve B, Bellec Y, Anderson P, Michelmore RW (1994) Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Lactuca serriola* to existing clusters of resistance genes. In: *TAG Theoretical and Applied Genetics*, pp. 96-104. Springer Berlin / Heidelberg.

Maisonneuve B, Leroux P, Bellec Y (1989) Resistance to phenylamide fungicides in *Bremia lactucae* (lettuce downy mildew) in France. *ISPP Chemical Control Newsletter*.

Malausa T, Gilles A, Meglecz E, Blabquart HLN, Duthoy SP, Costeodot C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Delye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T, Hazard L, Le Corre VR, Lung-Escarmant B, MALa P-JG, Ferreira SP, Martin J-FO (2011) High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources* 11, 638-644.

Malécot G (1950) Quelques schémas probabilistes sur la variabilité des populations naturelles. *Ann. Univ. Lyon, sci.* 13, 37-60.

Mascheretti S, Croucher P, Vettraino A, Prospero S, Garbelotto M (2008) Reconstruction of the Sudden Oak Death epidemic in California through microsatellite analysis of the pathogen *Phytophthora ramorum*. *Mol Ecol* 17, 2755 - 2768.

Mayr E (1982) Speciation and Macroevolution. *Evolution* 36, 1119-1132.

McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40, 349-+.

McDonald JH, Kreitman M (1991) Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. 351, 652-654.

McHale LK, Truco M, Kozik A, Wroblewski T, Ochoa OE, Lahre KA, Knapp SJ, Michelmore RW (2009) The genomic architecture of disease resistance in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* 118, 565-580.

Meudt HM, Clarke AC (2007) Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12, 106-117.

Meyers BC, Chin DB, Shen KA, Sivaramakrishnan S, Lavelle DO, Zhang Z, Michelmore RW (1998) The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell* 10, 1817-1832.

Michelmore R, Wong J (2008) Classical and molecular genetics of *Bremia lactucae*, cause of lettuce downy mildew. *European Journal of Plant Pathology* 122, 19-30.

Michelmore RW, Meyers BC (1998) Clusters of Resistance Genes in Plants Evolve by Divergent Selection and a Birth-and-Death Process. *Genome Research* 8, 1113-1130.

Michelmore RW, ILOTT TW, Hulbert SH, FARRARA BF (1988) The downy mildews. In: *Advances in Plant Pathology*, pp. 53-79. Academic Press, London.

Michelmore RW, Norwood JM, Ingram DS, Crute IR, Noeholson P (1984) The inheritance of virulence in *Bremia lactucae* to match resistance factors 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 and 11 in lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Pathology* 33, 301-315.

Michelmore RW, Ingram DS (1982) Secondary Homothallism in *Bremia-Lactucae*. *Transactions of the British Mycological Society* 78, 1.

Michelmore RW, Sansome ER (1982) Cytological Studies of Heterothallism and Secondary Homothallism in *Bremia-Lactucae*. *Transactions of the British Mycological Society* 79, 291.

Michelmore RW, Ingram DS (1980) Heterothallism in *Bremia-Lactucae*. *Transactions of the British Mycological Society* 75, 47.

Michelmore RW, Ingram DS (1981) Origin of Gametangia in Heterothallic Isolates of *Bremia-Lactucae*. *Transactions of the British Mycological Society* 76, 425.

Michelmore RW, Ingram DS (1981) Recovery of Progeny Following Sexual Reproduction of *Bremia-Lactucae*. *Transactions of the British Mycological Society* 77, 131.

Millat G, Chanavat Vr, Rodriguez-Lafrasse C, Rousson R (2009) Rapid, sensitive and inexpensive detection of SCN5A genetic variations by high resolution melting analysis. *Clinical Biochemistry* 42, 491-499.

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

Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L (2007) Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nat Protoc.* 2, 59-66.

Mopper S, Stiling P, Landau K, Simberloff D, Van Zandt P (2000) Spatiotemporal variation in leafminer population structure and adaptation to individual oak trees. *Ecology* 81, 1577-1587.

Morgan W, Kamoun S (2007) RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Current Opinion in Microbiology Host-microbe interactions: fungi/parasites/viruses* 10, 332-338.

Morgan WM (1983) Viability of *Bremia lactucae* oospores and stimulation of their germination by lettuce seedlings. *Transactions of the British Mycological Society* 80, 403-408.

Mucyn TS, Clemente A, Andriotis VME, Balmuth AL, Oldroyd GED, Staskawicz BJ, Rathjen JP (2006) The Tomato NBARC-LRR Protein Prf Interacts with Pto Kinase in Vivo to Regulate Specific Plant Immunity

10.1105/tpc.106.044016 The Plant Cell Online 18 2792-2806

Mundt CC (2002) Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. Annual Review of Phytopathology. 40, 381-410.

Nadler SA (1995) Microevolution and the genetic structure of parasite populations. J. Parasitol. 81, 395-403.

Narusaka M, Shirasu K, Noutoshi Y, Kubo Y, Shiraishi T, Iwabuchi M, Narusaka Y (2009) RRS1 and RPS4 provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. The Plant Journal 60, 218-226.

Nordskog B, Gadoury DM, Seem RC, Hermansen A (2007) Impact of diurnal periodicity, temperature, and light on sporulation of *Bremia lactucae*. Phytopathology 97, 979-986.

Olivieri (2009) Chapitre 3 du livre Biologie Evolutive: Génétique et évolution des populations et des métapopulations. De Boeck.

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

Palumbi SR (2001) Humans as the World's Greatest Evolutionary Force. Science 293, 1786-1790.

Parlange F, Daverdin G, Fudal J, Kuhn M-L, Balesdent M-Hln, Blaise Fo, Grezes-Besset B, Rouxel T (2009) *Leptosphaeria maculans* avirulence gene AvrLm4-7 confers a dual recognition specificity by the Rlm4 and Rlm7 resistance genes of oilseed rape, and circumvents Rlm4-mediated recognition through a single amino acid change. Molecular Microbiology 71, 851-863.

Parlevliet J (2002) Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. Euphytica 124, 147 - 156.

Parlevliet JE (1993) What is Durable Resistance, A General Outline Durability of Disease Resistance eds. Jacobs T, Parlevliet JE), pp. 23-40. Springer Netherlands.

Parlevliet JE (1997) Durable resistance In: H. Hartleb, R. Heitefuss & H.H. Hoppe (Eds.), Resistance of Crop Plants against Fungi.

Petrzelova I, Lebeda A (2004) Occurrence of *Bremia lactucae* in natural populations of *Lactuca serriola*. Journal of Phytopathology 152, 391-398.

Petrzelova I, Lebeda A (2011) Distribution of race-specific resistance against *Bremia lactucae* in natural populations of *Lactuca serriola*. In: European Journal of Plant Pathology, pp. 233-253. Springer Netherlands.

Pineda-Alvarez DE, Dubourg CI, David Vr, Roessler E, Muenke M (2010) Current recommendations for the molecular evaluation of newly diagnosed holoprosencephaly patients. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics 154C, 93-101.

Pink D (2002) Strategies using genes for non-durable disease resistance. In: Euphytica, pp. 227-236. Springer Netherlands.

Ploch S, Thines M (2011) Obligate biotrophic pathogens of the genus *Albugo* are widespread as asymptomatic endophytes in natural populations of Brassicaceae. Molecular Ecology 20, 3692-3699.

Pouget R (1990) Histoire de la lutte contre le *phylloxera* de la vigne en France (1868-1895).

Price PW (1980) Evolutionary biology of parasites Princeton University Press., Princeton, New Jersey, USA.

Prospero S, Grünwald NJ, Winton LM, Hansen EM (2009) Migration Patterns of the Emerging Plant Pathogen *Phytophthora ramorum* on the West Coast of the United States of America. Phytopathology 99, 739-749.

Qutob D, Tedman-Jones J, Dong S, Kuflu K, Pham H, Wang Y, Dou D, Kale SD, Arredondo FD, Tyler BM, Gijzen M (2009) Copy Number Variation and Transcriptional Polymorphisms of *Phytophthora sojae* RXLR Effector Genes Avr1a and Avr3a. PLoS ONE 4, e5066 EP -.

Rauch G, Kalbe M, Reusch TBH (2005) How a complex life cycle can improve a parasite's sex life. Journal of Evolutionary Biology 18, 1069-1075.

Reed GH, Kent JO, Wittwer CT (2007) High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. Pharmacogenomics 8, 597-608.

Riethmuller A, Voglmayr H, Goker M, Weiss M, Oberwinkler F (2002) Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 94, 834-849.

Roslin T, Laine A-L, Gripenberg S (2007) Spatial population structure in an obligate plant pathogen colonizing oak *Quercus robur*. *Functional Ecology* 21, 1168-1177.

Roughgarden J (1979) *Theory of Population Genetics and Evolutionary Ecology: An Introduction* Macmillan Publishing Company, New York.

Rousset F (2004) *Genetic Structure and Selection in Subdivided Populations* Princeton University Press.

Rousset F (2000) Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* 13, 58-62.

Sanders IR (2006) Rapid disease emergence through horizontal gene transfer between eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution* 21, 656-658.

Schardl CL, Craven KD (2003) Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. *Molecular Ecology* 12, 2861-2873.

Scherm H, van Bruggen AHC (1995) Concurrent spore release and infection of lettuce by *Bremia lactucae* during mornings with prolonged leaf wetness. *Phytopathology* 85, 552-555.

Scherm H, van Bruggen AHC (1994) Weather variables associated with infection of lettuce by downy mildew (*Bremia lactucae*) in coastal California. *Phytopathology* 84, 860-865.

Scherm H, van Bruggen AHC (1993) Response surface models for germination and infection of *Bremia lactucae*, the fungus causing downy mildew of lettuce. *Ecological Modelling* 65, 281-296.

Schettini TM, Legg EJ, Michelmores RW (1991) Insensitivity to metalaxyl in California populations of *Bremia lactucae* and resistance of California lettuce cultivars to downy mildew. *Phytopathology* 81, 64-70.

Schurch Sp, Linde CC, Knogge W, Jackson LF, McDonald BA (2004) Molecular Population Genetic Analysis Differentiates Two Virulence Mechanisms of the Fungal Avirulence Gene NIP1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. *PMI* 17, 1114-1125.

Segarra J (2005) Stable Polymorphisms in a Two-Locus Gene-for-Gene System. *Phytopathology* 95, 728-736.

Shabab M, Shindo T, Gu C, Kaschani F, Pansuriya T, Chintla R, Harzen A, Colby T, Kamoun S, van der Hoorn RAL (2008) Fungal Effector Protein AVR2 Targets Diversifying Defense-Related Cys Proteases of Tomato. *The Plant Cell Online* 20 1169-1183

Sharaf K, Lewinsohn D, Nevo E, Beharav A (2007) Virulence patterns of *Bremia lactucae* in Israel. In: *Phytoparasitica*, pp. 100-108. Springer Netherlands.

Shen KA, Chin DB, Arroyo-Garcia R, Ochoa OE, Lavelle DO, Wroblewski T, Meyers BC, Michelmores RW (2002) Dm3 is one member of a large constitutively expressed family of nucleotide binding site-leucine-rich repeat encoding genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15, 251-261.

Shen KA, Meyers BC, Islam-Faridi MN, Chin DB, Stelly DM, Michelmores RW (1998) Resistance Gene Candidates Identified by PCR with Degenerate Oligonucleotide Primers Map to Clusters of Resistance Genes in Lettuce. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 11, 815-823.

Sicard D, Legg E, Brown S, Babu NK, Ochoa O, Sudarshana P, Michelmores RW (2003) A genetic map of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*, constructed from molecular markers and avirulence genes. *Fungal Genetics and Biology* 39, 16-30.

Skidmore DI, Ingram DS (1985) Conidial morphology and the specialization of *Bremia lactucae* Regel (*Peronosporaceae*) on hosts in the family Compositae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 91, 503-522.

Slarkin M (1985) Gene Flow in Natural Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16, 393-430.

Smith BL, Lu C-P, Alvarado Bremer JR (2010) High-resolution melting analysis (HRMA): a highly sensitive inexpensive genotyping alternative for population studies. *Molecular Ecology Resources* 10, 193-196.

Smithson JB, Lenné JM (1996) Varietal mixtures: a viable strategy for sustainable productivity in subsistence agriculture. *Annals of Applied Biology* 128, 127-158.

Spooner DM, McLean K, Ramsay G, Waugh R, Bryan GJ (2005) A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 14694-14699

- Staats M, van Baarlen P, Schouten A, van Kan JAL, Bakker FT** (2007) Positive selection in phytotoxic protein-encoding genes of *Botrytis* species. *Fungal Genetics and Biology* 44, 52-63.
- Stahl EA, Dwyer G, Mauricio R, Kreitman M, Bergelson J** (1999) Dynamics of disease resistance polymorphism at the *Rpm1* locus of *Arabidopsis*. 400, 667-671.
- Stephens AJ, Inman-Bamber J, Giffard PM, Huygens F** (2008) High-resolution melting analysis of the spa repeat region of *Staphylococcus aureus*. *Clin Chem.* 54, 432-436.
- Stergiopoulos I, De Kock MJD, Lindhout P, De Wit PJGM** (2007) Allelic Variation in the Effector Genes of the Tomato Pathogen *Cladosporium fulvum* Reveals Different Modes of Adaptive Evolution. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 1271-1283.
- Stergiopoulos I, de Wit PJGM** (2009) Fungal Effector Proteins. *Annual Review of Phytopathology.* 47, 233-263.
- Stukenbrock EH, McDonald BA** (2007) Geographical variation and positive diversifying selection in the host-specific toxin *SnToxA*. *Molecular Plant Pathology* 8, 321-332.
- Stukenbrock EH, McDonald BA** (2008) The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 46, 75-100.
- Stukenbrock EH, McDonald BA** (2009) Population Genetics of Fungal and Oomycete Effectors Involved in Gene-for-Gene Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22, 371-380
- Su H, van Bruggen AHC, Subbarao KV, Scherm H** (2004) Sporulation of *Bremia lactucae* affected by temperature, relative humidity, and wind in controlled conditions. *Phytopathology* 94, 396-401..
- Su H, van Bruggen AHC, Subbarao KV** (2000) Spore release of *Bremia lactucae* on lettuce is affected by timing of light initiation and decrease in relative humidity. *Phytopathology* 90, 67-71.
- Tajima F** (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics.* 123, 585-595.
- Takken FLW, Tameling WIL** (2009) To Nibble at Plant Resistance Proteins. *Science* 324, 744-746.
- Tellier A, Brown J** (2007) Stability of genetic polymorphism in host-parasite interactions. *Proc Royal Soc London B- Biol Sci* 274, 809 - 817.
- Thines M, Kamoun S** (2010) Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 427-433.
- Thines M, Runge F, Telle S, Voglmayr H** (2010) Phylogenetic investigations in the downy mildew genus *Bremia* reveal several distinct lineages and a species with a presumably exceptional wide host range. In: *European Journal of Plant Pathology*, pp. 81-89. Springer Netherlands.
- Thines M, Spring O** (2005) A revision of *Albugo* (Chromista, Peronosporomycetes). *Mycotaxon* 92, 443-458.
- Thompson JN** (1999) The evolution of species interactions. *Science* 284, 2116-2118.
- Thrall PH, Burdon JJ** (2003) Evolution of virulence in a plant host-pathogen metapopulation. *Science* 299, 1735-1737.
- Thrall PH, Burdon JJ** (2002) Evolution of gene-for-gene systems in metapopulations: the effect of spatial scale of host and pathogen dispersal. *Plant Pathology* 51, 169-184.
- Thrall PH, Burdon JJ, Young A** (2001) Variation in resistance and virulence among demes of a plant host pathogen metapopulation. *Journal of Ecology* 89, 736-748.
- Tian D, Traw MB, Chen JQ, Kreitman M, Bergelson J** (2003) Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. 423, 74-77.
- Tyler BM** (2001) Genetics and genomics of the oomycete host interface. 17, 611-614.
- Van der Biezen EA, Jones JD** (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci.* 23, 454-456.
- van der Does HC, Rep M** (2007) Virulence Genes and the Evolution of Host Specificity in Plant-Pathogenic Fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 1175-1182.
- Van der Hoorn RAL, De Wit PJGM, Joosten MHJ** (2002) Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends in Plant Science* 7, 67-71.

van der Hoorn RAL, Kamoun S (2008) From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell Online* 20 2009-2017

Van Ettekovén K, van der Arend A (1999) Identification and denomination of "new" races of *Bremia lactucae*, 171-181.

Van Putten WF, Elzinga JA, Biere A (2007) Host fidelity of the pollinator guilds of *Silene Dioica* and *Silene latifolia*: possible consequences for sympatric host race differentiation of a vectored plant disease. *Int. J. Plant Sci.* 168, 421-434.

Vanderplank J (1968) New York: Academic Press.

Vera-Cruz C, Bai J, Ona I, Leung H, Nelson R, Mew T, Leach J (2000) Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13500 - 13505.

Vleeshouwers VGAA, Raffaele S, Vossen JH, Champouret N, Oliva R, Segretin ME, Rietman H, Cano LM, Lokossou A, Kessel G, Pel MA, Kamoun S (2011) Understanding and Exploiting Late Blight Resistance in the Age of Effectors. *Annual Review of Phytopathology.* 49, 507-531.

Voglmayr H (2003) Phylogenetic relationships of *Peronospora* and related genera based on nuclear ribosomal ITS sequences. *Mycological Research* 107, 1132-1142.

Voglmayr H, Rietmüller A, Goker M, Weiss M, Oberwinkler F (2004) Phylogenetic relationships of *Plasmopara*, *Bremia* and other genera of downy mildew pathogens with pyriform haustoria based on Bayesian analysis of partial LSU rDNA sequence data. *Mycological Research* 108, 1011-1024.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee Tvd, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414.

Wahlund S (1928) Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen von Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* 11, 65-108.

Weinberg W (1908) On the demonstration of heredity in man. In: Boyer SH (1963) *Papers on human genetics*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Wellwing A, Crute IR (1978) The virulence characteristics of *Bremia lactucae* populations present in Sweden from 1971 to 1976. *Annals of Applied Biology* 89, 251-256.

Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, van West P, Chapman S, Hein I, Toth IK, Pritchard L, Birch PRJ (2007) A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. 450, 115-118.

WILFERT L, JIGGINS FM (2010) Host-parasite coevolution: genetic variation in a virus population and the interaction with a host gene. *Journal of Evolutionary Biology* 23, 1447-1455.

Win J, Morgan W, Bos J, Krasileva K, Cano L, Chaparro-Garcia A, Ammar R, Staskawicz B, Kamoun S (2007) Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Plant Cell* 19, 2349 - 2369.

Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ (2003) High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry* 49, 853-860.

Woods AC (1984) Moko Disease - atypical symptoms induced by afluroidal variants of *Pseudomonas solanacearum* in banana plants. *Phytopathology* 74, 972-976.

Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution* 19, 395-420.

Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics* 15, 323-354.

Wroblewski T, Tomczak A, Micheltore R (2005) Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal* 3, 259-273.

Wu BM, Subbarao KV, van Bruggen AHC (2005) Analyses of the relationships between lettuce downy mildew and weather variables using geographic information system techniques. *Plant Disease* 89, 90-96.

Wu BM, van Bruggen AHC, Subbarao KV, Pennings GGH (2001) Validation of weather and leaf wetness forecasts for a lettuce downy mildew warning system. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* 23, 371-383.

Wu BM, van Bruggen AHC, Subbarao KV, Pennings GGH (2001) Spatial analysis of lettuce downy mildew using geostatistics and geographic information systems. *Phytopathology* 91, 134-142.

Xhaard C, Fabre B, Andrieux A, Gladieux P, Barrès B, Frey P, Halkett F (2011) The genetic structure of the plant pathogenic fungus *Melampsora larici-populina* on its wild host is extensively impacted by host domestication. *Molecular Ecology* 20, 2739-2755.

Zaffarano PL, McDonald BA, Linde CC (2008) Rapid speciation following recent host shifts in the plant pathogenic fungus *Rhynchosporium*. *Evolution*. 62, 1418-1436. Epub 2008 Apr 1412.

Zhan J, Pettway RE, McDonald BA (2003) The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genetics and Biology* 38, 286-297.

Zhou J-M, Chai J (2008) Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Current Opinion in Microbiology Cell Regulation* 11, 179-185.

Abstract

Resistance genes introgressed into cultivated plants are frequently overcome by pathogens, causing outbreaks and economic losses. Therefore, understanding the evolutionary strategies involved in the adaptation of pathogen populations is needed to improve the sustainable management of resistance. *Bremia lactucae*, the lettuce downy mildew, is under strong selection pressure exerted by host resistance genes. Under this selection pressure, *B. lactucae* populations showed a rapid adaptation to host resistance. The study of pathogen genetic structure may help to understand the evolutionary mechanisms involved in the overcoming of resistant genes. Study of the genetic structure (neutral and potentially selected markers) of *B. lactucae* populations in France was conducted in order to identify the evolutionary forces involved in the adaptation of the plant pathogen and to determine the influence of selective pressure of host resistance genes on the population structure.

We developed 12 microsatellites markers, to study genetic structure of *B. lactucae* populations in France. Over 800 isolates were collected from the most important production areas of the host plant, *Lactuca sativa*. These isolates were taken from different cultivars grouped according to their resistance gene combinations. Moreover, a prospection in the wild compartment allowed sampling isolates of *B. lactucae* on the wild host *L. serriola*. The polymorphism of several RxLR candidate effectors was studied in several *Bremia* populations.

Our results showed clonality in *Bremia* populations but rare events of sexual reproduction are also suggested. Weak genetic differentiation between populations suggested important gene flow between populations at French regional scale. Gene flow was also found between the wild and the crop pathosystems indicating a possible role of wild host plants as genetic reservoir. Moreover, analyzing the population genetic structure suggests the presence of different clonal lineages, resulting probably from selection pressure of resistance genes.

Characterizing the population structure of *B. lactucae* allowed to highlight the strong evolutionary potential (significant gene flow, mixed mating system, selection by resistance genes) of *B. lactucae* explaining its rapid adaptation to host resistance. Thus, we can suggest some management strategies of resistance genes as promoting the use of quantitative resistance and use of crop association to improve the durability of resistance.

Résumé

Des nouvelles résistances aux agents pathogènes introgressées dans les plantes cultivées sont fréquemment contournées dans différents pathosystèmes, engendrant des épidémies et des pertes économiques. En conséquence, la compréhension des stratégies évolutives impliquées dans l'adaptation des populations pathogènes est nécessaire pour améliorer la gestion durable des résistances. *Bremia lactucae*, agent pathogène de la laitue est un organisme diploïde, hétérothallique avec des cycles de reproduction sexuée et asexuée. Cet oomycète est soumis aux fortes pressions de sélection exercées par des gènes de résistance de la plante hôte. Sous cette pression de sélection, les populations de *B. lactucae* ont montré une rapide adaptation aux résistances hôtes qui se sont donc avérées peu durables. L'étude de la structure génétique d'un agent pathogène peut permettre de comprendre les mécanismes évolutifs impliqués dans le contournement des résistances variétales. Ainsi, une étude de la structure génétique (neutre et potentiellement soumise à sélection) des populations de *B. lactucae* en France a été conduite afin d'identifier les forces évolutives impliquées dans le contournement des résistances de l'hôte et de déterminer l'influence des pressions de sélection des gènes de résistance de la plante hôte sur cette structure.

J'ai validé 12 microsatellites, marqueurs moléculaires neutres, pour analyser la structure génétique de *B. lactucae* en France. Plus de 800 isolats ont été prélevés dans les plus importants bassins de production de la plante hôte, *Lactuca sativa*. Ces isolats ont été prélevés sur différentes variétés regroupées selon leur combinaison de gènes de résistance. Par ailleurs, une prospection dans le compartiment sauvage a permis d'échantillonner des isolats de *B. lactucae* sur la plante hôte adventice *L. serriola*. Le polymorphisme de plusieurs effecteurs candidats à motif RxLR a été étudié dans différentes populations de *Bremia*.

La faible diversité génétique et l'excès d'hétérozygotie observés sont en faveur d'une reproduction clonale mais de rares événements de reproduction sexuée sont également suggérés par les résultats. Par ailleurs, la faible différenciation génétique entre populations suggère des flux de gènes importants à l'échelle des régions. Des flux de gènes ont également été mis en évidence entre le pathosystème du compartiment sauvage et le pathosystème du compartiment cultivé évoquant un possible rôle de réservoir génétique des plantes hôtes adventices. Une structuration des populations en plusieurs lignées clonales résultant de la pression de sélection des gènes de résistance des cultivars est également indiquée par l'analyse des résultats des marqueurs neutres et sélectionnés.

La caractérisation de la structure des populations de *B. lactucae* nous permet de mettre en évidence le fort potentiel évolutif (flux de gènes importants, système de reproduction mixte, sélection de mutants et de migrants par les gènes de résistance) de *B. lactucae* expliquant la rapide adaptation aux résistances hôtes. Ainsi, nous pouvons suggérer des pistes de gestion des gènes de résistance comme favoriser l'utilisation de résistances quantitatives et l'utilisation de cultures d'association afin d'améliorer la durabilité des résistances.