



GIP ECOFOR

Programme "Biodiversité et Gestion Forestière" appel d'offres 2000

Rapport final, décembre 2003

Projet de recherches :

**"Influence des peupleraies sauvages et cultivées
et de la présence de mélèzes
sur la structuration génétique des populations
de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille foliaire"**

Responsables scientifiques:

Pascal FREY et Jean PINON

Unité de Recherches Pathologie Forestière, INRA, 54280 CHAMPENOUX

Remerciements :

La réalisation de ce projet n'aurait pas été possible sans la participation d'un nombre très important de personnes, à l'INRA et ailleurs. En particulier, nous tenons à remercier :

- tous les collègues de l'Unité de Pathologie Forestière qui ont participé aux tournées de récoltes sur le terrain et à l'analyse des 54 populations de *Melampsora larici-populina* entre 2001 et 2003 (soit 4901 isolats) : Claude Husson, Arlette Schipfer, Christine Géhin, Béranger Bertin, Axelle Andrieux, Florence Corpet et Frédéric Guinet

- les étudiants qui ont beaucoup sué sur le terrain, au laboratoire, et devant leur ordinateur pour l'analyse des données : Pierre Gérard (DEA), Florent Kempf (Magistère), Guillaume Lorin (BTS) et Benoît Barrès (thèse)

- Marie-Claude Monchablon pour la gestion comptable du projet

- François Lefèvre (INRA Avignon), Marc Villar et Catherine Bastien (INRA Orléans) et Jean-Luc Dupouey (INRA Nancy) pour les discussions constructives sur le projet

- nos indispensables guides sur le terrain : Pierre Munnier (retraité du SRPV) et Thierry Deville (technicien forestier) pour la Picardie, Patrick Adami (CRPF Gray) en Franche-Comté, Gilles Bossuet (CRPF Gap) et Paul Spanu (ONF Embrun) dans les Alpes

- les propriétaires des plantations étudiées, pour leur accueil toujours chaleureux : M. Cornu-Langy à La Quincy, Mme Ferté à Blanzky-les Fismes, M. Montagne à Mirabeau, M. Michel à Manosque

- M. Rolland (CRPF Avignon) pour la visite de la plantation de Mirabeau, Alain Berthelot et Thierry Fauconnier (Afofel) pour les informations sur cette plantation

- Pierre Cameletti (Pépinières Robin) pour ses informations sur le site de Valernes

- M. et Mme Zenou pour les longues soirées d'emballage des feuilles de peuplier au "Club des Marmottes" à Gap

- Gérard Paillard (DIC INRA) pour être venu filmer les chasseurs de rouille dans les ripisylves de la Durance

A tous un grand merci !

TABLE DES MATIERES :

| | |
|---|-----------|
| Résumé | 4 |
| 1. Rappel des objectifs principaux : | 6 |
| 2. Déroulement du projet : | 7 |
| 2.1. Choix initial des sites de récolte : | 7 |
| 2.2. Evolution du choix des sites en 2002 et 2003 | 7 |
| 2.3. Récoltes de populations de <i>M. larici-populina</i> de 2001 à 2003 | 9 |
| 2.4. Pathotypage des populations de <i>M. larici-populina</i> : | 9 |
| 2.5. Génotypage des populations de <i>M. larici-populina</i> : | 10 |
| 2.6. Caractérisation de la résistance de <i>P. nigra</i> à la rouille : | 10 |
| 3. Justification des écarts par rapport au projet de départ : | 11 |
| 4. Présentation des résultats de la recherche : | 12 |
| 4.1. Présence et intensité de l'infection en fonction de la date : | 12 |
| 4.2. Pathotypage des populations : | 13 |
| 4.2.1. Méthodes d'analyse des données : | 13 |
| 4.2.2. Nombre de pathotypes par population : | 14 |
| 4.2.3. Fréquence des pathotypes dans les populations : | 14 |
| 4.2.4. AFC sur les fréquences des pathotypes : | 16 |
| 4.2.5. Complexité des populations : | 16 |
| 4.2.6. Richesse des populations en pathotypes : | 17 |
| 4.2.7. Relation entre richesse et complexité : | 17 |
| 4.2.8. Equitabilité des fréquences en pathotypes : | 18 |
| 4.2.9. Différenciation entre populations dans l'espace : | 18 |
| 4.2.10. Différenciation entre populations dans le temps : | 19 |
| 4.3. Génotypage des populations: | 19 |
| 4.3.1. Extraction de l'ADN de <i>M. larici-populina</i> : | 19 |
| 4.3.2. Empreintes génétiques (RAPD): | 20 |
| 4.3.3. Méthodes d'analyse des données moléculaires : | 20 |
| 4.3.4. Variabilité intra-population : | 21 |
| 4.3.5. Différenciation entre les populations : | 22 |
| 4.3.6. Déséquilibres de liaison entre les marqueurs RAPD: | 23 |
| 4.4. Caractérisation de la résistance de <i>P. nigra</i> à la rouille : | 23 |
| 4.5. Conclusions et perspectives : | 25 |
| 5. Références bibliographiques : | 27 |
| 6. Liste des publications réalisées ou envisagées : | 29 |
| Figures et tableaux : | 30 |

RESUME

La rouille foliaire due à *Melampsora larici-populina* est actuellement la maladie la plus dommageable pour la populiculture européenne. En revanche, l'état sanitaire des peupleraies sauvages (ripisylves à *Populus nigra*) semble rester stable vis-à-vis de la rouille. C'est pourquoi, nous avons comparé la structure génétique de populations de *M. larici-populina* récoltées en peupleraies cultivées (Picardie et Franche-Comté) et en peupleraies sauvages (Alpes). De plus, pour chaque type de peuplement hôte (peupleraies cultivées et sauvages) nous avons comparé des sites avec et sans mélèzes à proximité, car le mélèze est l'hôte alternant du parasite sur lequel a lieu la reproduction sexuée.

Nous avons ainsi analysé 54 populations d'environ 100 isolats de *M. larici-populina* récoltées entre 2001 et 2003, sur mélèzes en mai et sur peupliers en début (juillet) et fin (septembre) d'épidémie. Les populations ont été caractérisées à l'aide de marqueurs sélectionnés (facteurs de virulence) et de marqueurs neutres (RAPD) pour les populations de septembre 2001. Au total, 42 pathotypes ont été identifiés dans les 54 populations, à l'aide de la gamme différentielle qui comporte huit clones de peuplier. La composition en pathotypes distingue très nettement les compartiments cultivé (richesse et complexité élevées) et sauvage (richesse et complexité faibles). De plus, la structure en pathotypes reste très stable au cours des trois années d'étude pour chacun des sites. La présence de mélèze augmente de façon très significative le nombre moyen de pathotypes par population, ce qui suggère un effet de la reproduction sexuée sur la diversité en pathotypes. En revanche, la proximité du mélèze n'influe pas sur la complexité des populations.

Les trois amorces RAPD utilisées ont permis de révéler 19 marqueurs polymorphes. Une très grande diversité génétique et très peu de clonalité ont été trouvés parmi les 743 isolats des neuf populations de septembre 2001, avec 566 phénotypes RAPD différents. Les distances génétiques entre les populations sont globalement faibles et les populations apparaissent moyennement différenciées. Un test de Mantel n'a mis en évidence aucune corrélation entre la structure génétique et la structure pathotypique des populations, ni entre la structure génétique et l'origine géographique des populations. L'analyse des déséquilibres de liaison entre marqueurs RAPD n'a pas mis en évidence un effet de la présence du mélèze sur la structure des populations étudiées.

Par ailleurs, ce projet nous a permis de mieux comprendre la dynamique spatio-temporelle de l'épidémie de rouille dans la ripisylve de la Durance, qui constitue un modèle d'épidémie en corridor. En effet, nos observations suggèrent que l'épidémie annuelle de

rouille débute dans les zones de sympatrie entre peupliers et mélèzes dans la haute vallée de la Durance et se propage au cours de l'été vers la basse vallée de la Durance, où les mélèzes sont absents. D'autre part, la présence de plusieurs petits compartiments cultivés enclavés dans l'énorme compartiment sauvage que constitue la ripisylve à *P. nigra*, nous a permis d'étudier les interactions entre les deux compartiments. Nous avons ainsi mis en évidence une "pollution" de la ripisylve par des isolats sélectionnés par des cultivars portant les résistances R2 et R7 en septembre 2002.

Enfin, l'étude du type de résistance chez *P. nigra* vis à vis de la rouille n'a pas mis en évidence de résistances qualitatives dans les 1529 interactions clone x isolats testées. De plus, l'analyse d'une composante de la résistance quantitative (latence) n'a mis en évidence aucune adaptation locale de *M. larici-populina* à son hôte *P. nigra*.

1. RAPPEL DES OBJECTIFS PRINCIPAUX :

La peupleraie cultivée, monoclonale et équienne, constitue un des écosystèmes forestiers les plus simplifiés, ce qui la rend très fragile face à des agressions biotiques et abiotiques. En effet, la plantation sur de grandes superficies d'un très faible nombre de cultivars à résistance totale vis-à-vis de la rouille foliaire à *M. larici-populina*, a favorisé l'émergence et la dissémination très rapide de nouveaux pathotypes du parasite, capables de contourner toutes les résistances sélectionnées à ce jour. En revanche, l'état sanitaire des peupleraies sauvages (ripisylves à *Populus nigra*) semble rester stable vis-à-vis de la rouille. Les bases de cette stabilité résident vraisemblablement dans la diversité génétique des peupleraies sauvages, et dans l'influence de cette diversité sur la structuration des populations de *M. larici-populina*.

Ce projet avait pour objectif principal de tester cette hypothèse. Pour cela, nous avons comparé la structure génétique de populations de *M. larici-populina* récoltées en peupleraies cultivées (Picardie et Franche-Comté) et en peupleraies sauvages (vallées alpines). De plus, pour chaque type de peuplement hôte (peupleraies cultivées et sauvages) nous avons comparé des sites avec et sans mélèzes à proximité des peupleraies (moins de 2 km), car le mélèze est l'hôte alternant du parasite sur lequel a lieu la reproduction sexuée.

La structure des populations de *M. larici-populina* a été étudiée à l'aide de deux types de marqueurs : les facteurs de virulence (ou virulences), marqueurs phénotypiques fortement sélectionnés par l'hôte, et les marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), marqueurs moléculaires supposés neutres.

Un second objectif du projet consistait à étudier le type de résistance — qualitative ou quantitative — présent chez le peuplier noir (*Populus nigra*) vis-à-vis de la rouille. Cette étude a été réalisée par l'inoculation en conditions contrôlées de 46 clones de *P. nigra* originaires de trois vallées du Sud-Est de la France, avec 36 isolats de *M. larici-populina* originaires des mêmes vallées.

2. DEROULEMENT DU PROJET :

2.1. Choix initial des sites de récolte :

En mai 2001, nous avons réalisé trois prospections dans trois régions françaises, afin d'identifier des sites (peupleraies sauvages et cultivées) pour la récolte de populations de *M. larici-populina* aux différentes dates (Figures 1 et 2).

Concernant les peupleraies cultivées, nous avons choisi deux régions dans lesquelles la populiculture est très importante : la vallée de l'Aisne et la vallée de la Saône. Dans la vallée de l'Aisne, deux sites, distants d'environ 20 km, ont été retenus pour les récoltes de populations : un site avec mélèzes à proximité (La Quincy) et un site sans mélèzes (Blanzly-les-Fismes). Dans la vallée de la Saône, deux sites, distants d'environ 15 km, ont été retenus : un site avec mélèzes à proximité (Le Tremblois) et un site (*a priori*) sans mélèzes (St Vallier, Figure 3).

Concernant les peupleraies sauvages, nous avons choisi de prospector des sites dans les vallées alpines du Sud-Est pour trois raisons principales :

- la présence de peuplements de *Populus nigra* sauvages en ripisylves.
- l'éloignement des zones fortement populicoles afin de minimiser la contamination par des isolats de rouille venant de ces dernières.
- la présence de mélèzes assez fréquente en zone alpine.

Nous avons retenu deux couples de sites proches, avec et sans mélèzes, dans la vallée du Drac au nord-est de Gap, Champoléon (Figure 4) et La Rochette, distants d'environ 20 km, et dans la vallée de la Durance au nord-est d'Embrun, Siguret et Embrun, distants d'environ 6 km. Lors de notre tournée de récolte en septembre 2001, nous avons également récolté des isolats dans un site plus en aval dans la vallée de la Durance (La Brillanne).

2.2. Evolution du choix des sites en 2002 et 2003

Compte tenu des résultats des analyses de pathotypage des populations de septembre 2001, nous avons décidé de rajouter de nouveaux sites d'étude en 2002. D'une part, nous avons rajouté le site de Prelles (Figure 2) dans la haute vallée de la Durance, car c'est un site idéal d'alternance pour *M. larici-populina*, avec des peupliers et des mélèzes très imbriqués dans la ripisylve. Le site de Prelles présente régulièrement des niveaux d'infection plus élevés que celui de Siguret, qui est plus sec (Tableau I).

D'autre part, les observations de septembre 2001 suggéraient fortement que l'épidémie annuelle de rouille débutait dans les zones de sympatrie entre peupliers et mélèzes dans la haute vallée de la Durance et se propageait au cours de l'été vers la basse vallée de la Durance, où les mélèzes sont absents. Afin de mieux étudier ce phénomène, nous avons décidé en 2002 de renforcer nos efforts sur cette vallée. Ainsi, en juillet 2002, nous avons choisi 6 nouveaux sites en aval du Lac de Serre-Ponçon ce qui porte à 10 le nombre de sites sur la Durance. Ces sites se répartissent selon un transect d'environ 200 km de Prelles à Pont Mirabeau, avec un site tous les 20 km environ (Figure 2). En plus des sites déjà étudiés en 2001, des populations de *M. larici-populina* ont été récoltées dans ces nouveaux sites, en septembre 2002, juillet 2003 et septembre 2003.

Il s'est avéré que certains de ces nouveaux sites étaient proches de plantations de peupliers (Figure 2). Bien que de taille variable, ces compartiments cultivés sont infiniment plus petits que la ripisylve de la Durance. Néanmoins, il était important de tenir compte de ces plantations et en particulier des cultivars présents qui pourraient exercer une pression de sélection sur *M. larici-populina*. Une enquête sur le terrain, avec l'aide de M. Rolland (CRPF Avignon), nous a permis de recenser les différents cultivars et le nombre de tiges dans chaque plantation.

La plus grande plantation est celle de Mirabeau (50 ha), distante de 5 km du site de récolte de Pont Mirabeau. Il s'agit de différents essais gérés par l'Afocel et le CRPF. La plantation compte environ 11000 tiges de différents cultivars, dont 13% porteurs de la résistance R2 et 20% de la résistance R7. La plantation de Manosque, distante de 1,5 km de notre site de récolte de Manosque, couvre 21 ha et se compose de 3500 tiges. Parmi les 3 cultivars présents, 'Luisa Avanzo' (R2) représente 13% et 'Beaupré' (R7) 20%. Il est surprenant, mais purement fortuit, que ces deux plantations aient les mêmes fréquences de cultivars à R2 et à R7. De plus, à Valernes, il existe quelques centaines de tiges de 'Beaupré' en alignement dans une pépinière forestière commerciale, à 500 m de notre site de récolte. Enfin, nous avons repéré une plantation de quelques dizaines de tiges de 'Beaupré' à 3 km de notre site de récolte de La Rochette. L'existence de ces quelques petits compartiments cultivés, enclavés dans l'énorme compartiment sauvage que constitue la ripisylve de la Durance, est particulièrement intéressant pour l'étude des interactions fines entre les deux types de compartiments (cf. résultats).

Le site de St Vallier en Haute-Saône avait été retenu en 2001 comme un site sans mélèzes à proximité (moins de 2 km). L'analyse de la population de juillet 2002 a révélé un nombre de pathotypes (18), très important pour un début d'épidémie, suggérant la présence de mélèzes "cachés" dans un rayon de 2 km. En effet, Patrick Adami (CRPF Gray) a repéré

la présence de deux petits groupes de 10 et de 25 mélèzes dans des parcelles voisines, tous deux distants d'environ 750 m de la parcelle de peupliers étudiée. En conséquence, ce site "sans mélèze" doit en fait être considéré comme un site "avec mélèze", même si la distance peupliers mélèzes est supérieure à celle des autres sites "avec mélèzes". Pour l'analyse de l'effet de la présence des mélèzes, ce site a donc été classé dans la catégorie "peupleraie cultivée avec mélèzes".

2.3. Récoltes de populations de *M. larici-populina* de 2001 à 2003

Au total, 19 tournées de repérage et de récolte ont été effectuées entre mai 2001 et septembre 2003 (6 en Picardie, 5 en Franche-Comté et 8 dans les Alpes). Ces tournées de terrain ont mobilisé de 2 à 5 personnes par tournée, et au total 11 personnes (chercheurs, techniciens et stagiaires) ont participé à ces tournées, sans compter nos "guides" locaux, indispensables pour l'accès aux propriétés privées.

Dans les peupleraies cultivées, les populations ont été récoltées sur des parcelles du cultivar 'Robusta', qui présente l'avantage d'être sensible à tous les pathotypes de *M. larici-populina*, et donc d'héberger les populations les plus diversifiées (Pinon et Frey, 1997). Dans les peupleraies sauvages, les populations ont été récoltées sur des peupliers noirs (*Populus nigra*), qui ont *a priori* un comportement face à la rouille identique à 'Robusta' (Pinon et Frey, 1997). De plus, en mai 2002, nous avons récolté des populations de *M. larici-populina* sur son hôte écidien, le mélèze, dans les sites "avec mélèzes". Les mélèzes sont également *a priori* sensibles à tous les pathotypes (Pinon et Frey, 1997), ce qui semble se confirmer au vu des résultats de cette étude.

Le tableau I résume les observations de présence et d'intensité de l'infection, soit des mélèzes (mai 2001 et mai 2002), soit des peupliers (toutes les autres dates).

2.4. Pathotypage des populations de *M. larici-populina* :

A partir des feuilles de peuplier récoltées, pour chaque population, environ 200 urédies bien individualisées ont été isolées et multipliées sur des disques foliaires de *Populus x euramericana* 'Robusta', de façon à obtenir un effectif final d'environ 100 isolats par population. De même, à partir des aiguilles de mélèze infectées, environ 200 écidies par population ont été repiquées sur des disques foliaires de 'Robusta'. Ces isolats ont ensuite été inoculés sur la gamme différentielle de clones de peupliers, selon des méthodes publiées (Pinon et Frey, 1997). Cette gamme contient 8 clones de peuplier qui portent des gènes de

résistance différents, permettant de mettre en évidence la présence de 8 virulences. Chaque combinaison de virulences constitue un pathotype.

Au total 54 populations ont été analysées par pathotypage, soit un total de 4901 isolats de *M. larici-populina*. Le tableau II récapitule les caractéristiques des 54 populations, leurs effectifs, le nombre de pathotypes et d'autres paramètres (cf. résultats).

2.5. Géotypage des populations de *M. larici-populina* :

Nous avons analysé le premier lot de populations, soit les 9 populations de septembre 2001, à l'aide de marqueurs RAPD (cf. résultats). Toutefois, pour des raisons explicitées plus loin, nous avons fait le choix de ne pas analyser les autres populations avec des marqueurs RAPD, mais d'investir dans la mise au point de marqueurs microsatellites. Ces marqueurs sont en cours de développement et n'ont pas encore été utilisés pour l'analyse de l'ensemble des populations récoltées.

2.6. Caractérisation de la résistance de *P. nigra* à la rouille :

Afin de déterminer si *P. nigra* présente des résistances de type qualitative vis-à-vis de *M. larici-populina*, nous avons réalisé une expérience d'inoculation croisée en conditions contrôlées entre des clones de *P. nigra* originaires de trois vallées du Sud-Est de la France et des isolats de *M. larici-populina* originaires des mêmes vallées. Ainsi, nous avons élevé en serre 46 clones de *P. nigra* originaires des vallées du Gard, de la Durance et de la Drôme. Puis nous avons inoculé chacun de ces clones avec 36 isolats de *M. larici-populina* originaires des mêmes vallées. Nous avons analysé l'ensemble des 1529 interactions testées (sur 1656 interactions possibles) afin de détecter d'éventuelles interactions incompatibles et/ou des phénomènes d'adaptation locale du champignon à son hôte (Gandon *et al.* 1996).

3. JUSTIFICATION DES ECARTS PAR RAPPORT AU PROJET DE DEPART :

Concernant le génotypage des populations de *M. larici-populina*, nous avons fait le choix, fin 2002, au vu des résultats de l'analyse des populations de septembre 2001, de ne pas analyser le reste des populations à l'aide des marqueurs RAPD. En effet, ceux-ci présentent deux inconvénients majeurs : (1) la trop faible reproductibilité de la technique RAPD lorsqu'elle s'applique à des faibles quantités d'ADN (< 10 ng par RAPD), ce qui est notre cas en raison du caractère biotrophe obligatoire du champignon; (2) le caractère dominant des marqueurs RAPD, qui ne permet pas de distinguer les marqueurs homozygotes et hétérozygotes. *M. larici-populina* étant dicaryotique (formellement diploïde), les fréquences alléliques ne peuvent pas être calculées de façon exacte, mais estimées par des méthodes de correction, telles que celle de Lynch et Milligan (1994).

C'est pourquoi, nous avons décidé d'investir dans la mise au point de marqueurs microsatellites, co-dominants, donc plus pertinents pour les études de génétique des populations sur un organisme diploïde. La mise au point de marqueurs microsatellites représente un investissement très important pour chaque nouvelle espèce étudiée, car il faut isoler, cloner et séquencer un grand nombre de fragments d'ADN pour espérer en trouver quelques uns contenant des loci microsatellites polymorphes. Cette étape est en cours depuis février 2003 et fait l'objet de la première partie de la thèse de Benoît Barrès. La deuxième partie de la thèse consistera en l'utilisation de ces marqueurs pour l'étude des populations décrites dans ce projet, qui sont actuellement cryo-conservées à -85°C .

Par conséquent, les populations récoltées et caractérisées par pathotypage et génotypage RAPD au cours de ce projet serviront de base à des études de génétique des populations bien au-delà de la période 2001-2003.

4. PRESENTATION DES RESULTATS DE LA RECHERCHE :

4.1. Présence et intensité de l'infection en fonction de la date :

Le tableau I résume les notations de terrain concernant la présence et l'intensité de l'infection des mélèzes ou des peupliers par *M. larici-populina* en fonction du type de peuplement et de la date de récolte. Au mois de mai, évidemment, seuls les mélèzes sont infectés. Quelques différences d'intensité peuvent être observées entre mai 2001 et mai 2002, mais le champignon est présent sur les mélèzes dans tous les sites, ce qui confirme notre choix des sites.

En juillet 2002, on note une infection plus faible des peupliers dans les sites sans mélèzes (y compris à St Vallier, qui est un site intermédiaire, avec des mélèzes à 750 m des peupliers), ce qui montre un effet de la proximité des mélèzes sur la précocité d'infection des peupliers. Ceci confirme les résultats d'une enquête menée par le DSF en 1999 et 2000 sur toute la France, qui avait conclu à une précocité accrue de l'infection de 2 à 3 semaines dans les peupleraies proches de mélèzes (Renaud et al. 2001).

Il est intéressant de noter que la rouille était absente en juillet 2002 dans tous les sites de la vallée de la Durance en aval du Lac de Serre Ponçon, alors qu'elle était présente dans les trois sites en amont. Ceci démontre clairement l'absence d'une survie asexuée du champignon (sous forme d'urédospores), car il était présent par exemple à la Brillanne en septembre 2001. En septembre 2002, tous les sites étaient infectés, avec un gradient d'infection qui diminue vers l'aval. Ces résultats suggèrent que la rouille se propage de l'amont vers l'aval de la Durance, c'est à dire de la zone de sympatrie entre peupliers et mélèzes, vers la zone d'allopatrie (Figure 2).

En 2003, la sécheresse printanière a été très défavorable à l'alternance de la rouille sur les mélèzes, avec des infections indétectables dans la plupart des sites. De plus, la sécheresse et la canicule estivale ont été très défavorables à l'épidémie sur peupliers. Ceci fut particulièrement le cas dans la moitié nord de la France, donc dans nos sites de Picardie et de Franche-Comté, où aucune infection n'était détectable en juillet. En revanche, les ripisylves à *P. nigra* ont dû bénéficier d'un microclimat très localisé plus favorable à la rouille que le macroclimat. En effet, tous les sites sauvages avec mélèzes étaient infectés en juillet 2003, ainsi que deux sites de la basse vallée de la Durance (Valernes et Les Mées), sans qu'il n'y ait d'explication évidente pour l'origine de l'inoculum primaire.

L'épidémie en 2003 s'est développée très tardivement, à partir de septembre. Nous n'avons pas récolté d'échantillons en Franche-Comté car les peupliers avaient fortement

souffert de la sécheresse dans les deux sites et étaient quasiment défeuillés. Dans la vallée de la Durance, l'épidémie semble s'être propagée vers l'aval, sans atteindre les sites les plus en aval.

4.2. Pathotypage des populations :

4.2.1. Méthodes d'analyse des données :

Les populations sont décrites et comparées par l'intermédiaire de différentes variables : fréquence des pathotypes, fréquence des virulences, richesse et complexité des populations. Les indices de diversité utilisés en écologie au niveau spécifique sont couramment employés pour l'étude de populations d'agents pathogènes, notamment pour les rouilles des céréales (Groth et Roelfs, 1987; Kolmer, 1991; Andrivon et de Vallavieille-Pope, 1995). Les mesures de diversité au sein des populations prennent en compte deux facteurs : la richesse en espèces correspondant au nombre d'espèces distinctes, et l'équilibre des fréquences des espèces ou équitabilité (Magurran, 1988). Dans le cas de populations d'agents pathogènes, ces indices permettent d'évaluer la richesse et l'équitabilité des pathotypes.

L'indice alpha (α) décrit la richesse en pathotypes au sein d'une population (Magurran, 1988). Il est calculé de la façon suivante : $\alpha = N(1-x)/x$ après avoir obtenu x dans l'équation suivante : $Np/N = [(1-x)/x] [-\ln(1-x)]$ avec Np le nombre de pathotypes et N le nombre total d'isolats dans la population (Pinon et Frey, 1997).

L'indice de Shannon décrit lui aussi la richesse en pathotypes et se calcule de la façon suivante : $H_S = - \sum_i p_i \ln p_i$ avec p_i la fréquence du i -ème pathotype (Andrivon et de Vallavieille-Pope, 1995). L'indice relatif de Shannon se calcule de la façon suivante : $H_{SR} = H_S / H_{Smax} = H_S / \ln N$ (Andrivon et de Vallavieille-Pope, 1995).

Un autre indice de richesse est celui de Gleason : $H_G = (Np - 1) / \ln N$. L'indice relatif de Gleason se calcule de la façon suivante : $H_{GR} = H_G / H_{Gmax} = (Np - 1) / (N - 1)$ (Andrivon et de Vallavieille-Pope, 1995).

L'indice de Simpson (Magurran, 1988) décrit la dominance de certains pathotypes au sein de la population : $D = \sum_i (n_i(n_i-1)) / (N(N-1))$ avec n_i le nombre d'isolat du i -ème pathotype

L'équitabilité peut être estimée soit par l'indice "inverse de Simpson" :

$1 / D = (N(N-1)) / \sum_i (n_i (n_i-1))$, soit par l'indice "complément de Simpson" :

$$1-D = 1 - \left[\sum_i (n_i(n_i-1)) / (N(N-1)) \right]$$

Un autre indice d'équitabilité est celui de Shannon Evenness : $H_E = H_S / \ln N_p$ avec H_S l'indice de Shannon.

Le nombre moyen de virulences par isolat ou complexité (C_p) (Andrison et de Vallavieille-Pope, 1995) est estimé comme suit $C_p = \sum_i (p_i \cdot v_i)$ avec v_i le nombre de virulences du i-ème pathotype et p_i la fréquence du i-ème pathotype dans la population considérée.

L'indice de différenciation phénotypique, aussi appelé indice de Rogers (1972), permet de différencier les populations en prenant comme base la fréquence de leurs pathotypes (Groth et Roelfs, 1987; Kolmer, 1991) :

$H_r = 0.5 \sum_i |p_{i1} - p_{i2}|$ où p_{i1} et p_{i2} sont les fréquences du i-ème pathotype dans la première et dans la deuxième population, respectivement.

4.2.2. Nombre de pathotypes par population :

L'analyse des pathotypes des 54 populations étudiées (soit 4901 isolats) nous a permis de trouver 42 pathotypes différents (sur les $2^8 = 256$ pathotypes théoriques). Le tableau II résume les caractéristiques des 54 populations : type de peupleraie, nombre d'isolats, nombre de pathotypes, indices de complexité, de richesse et d'équitabilité.

Les populations récoltées en peupleraies cultivées présentent en général un nombre de pathotypes plus élevé (4 à 19) que celles récoltées en peupleraies sauvages (1 à 13, Tableau 2). Une analyse de variance à deux facteurs (compartiment, présence de mélèzes) montre que l'effet compartiment est très hautement significatif ($p = 0,0001$) sur le nombre de pathotypes (Tableau III). De plus, la présence de mélèzes à proximité des peupleraies augmente très significativement ($p = 0,0015$) le nombre de pathotypes.

4.2.3. Fréquence des pathotypes dans les populations :

Pour la présentation des fréquences des pathotypes dans les différentes populations, nous avons retenu de présenter les populations de septembre 2001 (Figure 5), de septembre 2002 (Figure 6), septembre 2003 (Figure 7), et de l'ensemble des 54 populations étudiées (Figure 8).

Si l'on observe la composition des populations de septembre 2001 (Figure 5), on constate que les populations issues de peupleraies cultivées présentent un grand nombre de pathotypes, dont certains pathotypes complexes (comme le pathotype 1-3-4-5-7). Les

pathotypes portant la virulence 7 (V7) capables de contourner la résistance (R7) du cultivar 'Beaupré', représentent de 39 à 75%. Cette forte proportion s'explique par des surfaces importantes plantées en 'Beaupré' dans les régions de peupliculture intensive (Pinon *et al.*, 1998). A l'inverse, les populations issues de peupleraies sauvages présentent peu de pathotypes, et le pathotype 0 (ne portant aucune virulence) représente à lui seul 60 à 85% des isolats. Les autres pathotypes présents sont également très simples (2 et 4). Seule la population de La Rochette présente 26% du pathotype 1-3-4-5-7, et 5% du pathotype 1-3-5-7, deux pathotypes à V7, caractéristiques des peupleraies cultivées. Une enquête sur le terrain en mai 2002 a permis de localiser une très petite plantation de 'Beaupré' à 3 km du site de La Rochette. Cette plantation pourrait être une source d'inoculum de type V7 pour la population de La Rochette.

Les populations récoltées en septembre 2002 dans les nouveaux sites de la basse vallée de la Durance sont dans l'ensemble caractérisées par un faible nombre de pathotypes et une forte proportion de pathotypes simples (0 et 4) (Figure 6). Deux sites se distinguent nettement des autres : Valernes et Pont Mirabeau. Ces deux sites présentent un grand nombre de pathotypes, 8 et 13, respectivement, dont certains pathotypes caractéristiques du compartiment cultivé. En effet, nous avons trouvé 69% de pathotypes à V7 à Valernes (dont 39% du pathotype 1-3-5-7, qui est rare dans toutes les autres populations), ce qui traduit bien la proximité des tiges de 'Beaupré' (R7). De même, nous avons trouvé 38% de pathotypes à V2 et 46% de pathotypes à V7 à Pont Mirabeau, ce qui suggère l'influence de la plantation de Mirabeau (comportant des cultivars à résistances R2 et R7). En revanche, la population de Manosque, pourtant très proche d'une plantation contenant aussi des clones à résistances R2 et R7, ne présente que 1% de pathotypes à V2 et 4% de pathotypes à V7.

Les populations récoltées en septembre 2003 présentent les mêmes différences évidentes entre les peupleraies cultivées et les peupleraies sauvages, que les années précédentes (Figure 7). Toutes les populations collectées en peupleraies sauvages présentent une très large proportion (> 90%) de pathotypes très simples (0 et 4). En 2003, la population de Valernes reflète très peu (3%) l'influence des tiges de 'Beaupré' présentes à proximité. En effet ces dernières étaient nettement moins infectées par la rouille qu'en septembre 2002, ce qui suggère que l'arrivée des isolats à V7 était plus tardive en 2003. De plus, les quelques isolats trouvés à Valernes en juillet 2003 étaient de "type sauvage" (0 et 4), donc il semble que ces pathotypes aient largement infecté les peupliers noirs avant l'arrivée de pathotypes à V7, spécifiquement sélectionnés par le cultivar 'Beaupré'. A l'inverse, les résultats de 2002 suggèrent que les pathotypes à V7 sont arrivés plus précocement, se sont multipliés de façon spécifique sur les 'Beaupré', puis ont "pollué" la

ripisylve proche. Enfin, aucune infection n'a pu être trouvée à Pont Mirabeau en septembre 2003, bien qu'un début d'infection ait été repéré sur les 'Beaupré' de la plantation de Mirabeau, 5 km en amont.

La figure 8 présente la composition en pathotypes de la totalité des 54 populations étudiées de 2001 à 2003, ordonnées par site. Bien que difficilement lisible, l'allure générale de la figure illustre deux faits majeurs : (1) la différence de composition en pathotypes des populations des compartiments cultivés et sauvages ; (2) la grande stabilité de la composition en pathotypes sur les trois années d'études. Ainsi pour la plupart des sites, on retrouve les mêmes pathotypes majoritaires d'une date de récolte à une autre, avec des variations de fréquences relatives des différents pathotypes. Cette stabilité suggère une certaine résilience du pathosystème.

4.2.4. AFC sur les fréquences des pathotypes :

Les trois populations à effectifs très faibles (Valernes 07/03 : 11 isolats, Les Mées 07/03 : 11 isolats et Manosque 09/03 : 17 isolats) ont été retirées dans la suite des analyses, ce qui porte à 51 le nombre total de populations étudiées sur les 3 ans.

L'AFC (Analyse Factorielle des Correspondances) réalisée sur les fréquences des pathotypes distingue très nettement les compartiments cultivé et sauvage sur l'axe 1 (36% de la variance totale), à l'exception de trois populations qui ont des positions intermédiaires sur l'axe 1 (Figure 9). Ces trois populations sont celles de Valernes (09/02), Pont Mirabeau (09/02) et La Rochette (09/01). Comme détaillé plus haut, ces trois sites sauvages sont proches de compartiments cultivés, et leurs populations ont été "polluées" par des isolats sélectionnés par des cultivars portant des gènes de résistance à la rouille (R2 et R7). L'axe 3 (10% de la variance totale) sépare les populations des deux compartiments selon les différents pathotypes présents (Figure 9 B), en particulier selon les fréquences respectives des pathotypes 0 et 4 dans les populations des sites sauvages (données non présentées).

4.2.5. Complexité des populations :

La complexité (nombre moyen de virulences par isolat) est nettement plus élevée pour les populations issues de peupleraies cultivées que pour celles issues de peupleraies sauvages (Tableau II). L'analyse de variance à deux facteurs montre que l'effet compartiment est très hautement significatif ($p = 0,0001$) sur la complexité, alors que la

présence de mélèzes à proximité n'a pas d'effet significatif sur la complexité ($p = 0,87$) (Tableau III).

4.2.6. Richesse des populations en pathotypes :

Plusieurs indices d'écologie qui expriment la richesse spécifique (ici, la richesse pathotypique) ont été calculés : indice alpha, indice de Shannon, indice relatif de Shannon, indice de Gleason et indice relatif de Gleason (Tableau II). Des représentations graphiques de chacun des indices pour l'ensemble des populations montrent des résultats très peu différents de ceux obtenus avec le nombre de pathotypes (données non présentées). En effet, les effectifs des populations étant en général fixés à environ 100 isolats, hormis quelques populations d'effectifs plus réduits, les différents indices sont directement proportionnels au nombre de pathotypes. L'indice de richesse qui nous semble le plus informatif est celui de Shannon, car il intègre les fréquences des différents pathotypes, contrairement aux indices Alpha et de Gleason, qui se calculent uniquement à partir de l'effectif total et du nombre de pathotypes. Enfin, les indices relatifs de Shannon et de Gleason semblent trop pondérés par rapport à l'effectif.

Comme pour le nombre de pathotypes, l'analyse de variance à deux facteurs montre que les effets "compartiment" et "présence de mélèze" sont très significatifs sur l'indice alpha ($p = 0,0001$ et $p = 0,001$, respectivement), et sur l'indice de Shannon ($p = 0,0001$ et $p = 0,017$, respectivement) (Tableau III).

4.2.7. Relation entre richesse et complexité :

La figure 10 présente la position des 51 populations dans un plan défini par la richesse (indice de Shannon) et la complexité. Dans ce plan, on distingue très nettement les compartiments cultivé (richesse et complexité élevées) et sauvage (richesse et complexité faibles). L'effet de la présence des mélèzes sur la richesse est également perceptible, avec un décalage vers la droite des populations "avec mélèzes" par rapport aux populations "sans mélèzes". Enfin, il est intéressant de noter que les trois points verts ("sauvage sans mélèzes") ayant les valeurs de complexité les plus élevées correspondent (dans l'ordre de complexité décroissante) aux populations de Valernes (09/02), Pont Mirabeau (09/02) et La Rochette (09/01).

La complexité semble corrélée positivement à la richesse. En effet, les peupleraies cultivées hébergent des populations riches en pathotypes complexes (comme le pathotype 1-3-4-5-7), qui peuvent, par recombinaison des loci de virulence, donner naissance à de nombreux autres pathotypes plus ou moins complexes. A l'inverse, les peupleraies sauvages hébergent des populations composées de peu de pathotypes, qui sont très simples (comme les pathotypes 0, 2 et 4). Cependant, en théorie, on pourrait imaginer des populations composées de peu de pathotypes très complexes ainsi que des populations composées de beaucoup de pathotypes simples.

4.2.8. Équitabilité des fréquences en pathotypes :

L'indice de Simpson (D), qui exprime la dominance de certains pathotypes, son inverse (1/D) et son complément (1-D), qui expriment l'équitabilité des fréquences, ainsi que l'indice de Shannon Evenness (Magurran 1988) ont été calculés. Quel que soit l'indice utilisé, l'équitabilité est plus élevée dans les populations du compartiment cultivé par rapport au compartiment sauvage (Tableau II). En effet, dans les peupleraies sauvages, on observe une dominance du pathotype 0.

Cependant, on constate sur nos populations une très forte corrélation entre l'équitabilité et la richesse, quels que soient les indices utilisés. Par exemple, on obtient une très bonne corrélation ($R^2 = 0,97$) entre l'indice inverse de Simpson et l'indice de Shannon (Figure 11). Cette corrélation entre richesse et équitabilité, déjà observée dans des études antérieures (Pinon et Frey, 1997), soulève la question de la notion d'équitabilité.

4.2.9. Différenciation entre populations dans l'espace :

L'indice de différenciation phénotypique (indice de Rogers) permet de comparer les fréquences des pathotypes pour chaque paire de populations à une date donnée. En particulier, pour les populations de septembre 2001, cet indice présente des valeurs faibles (0,21 à 0,48) entre les paires de populations "cultivé-cultivé" et des valeurs très faibles (0,07 à 0,37) entre les paires de populations "sauvage-sauvage", ce qui traduit une grande similitude des populations au sein de chacun des deux compartiments (Tableau IV). La valeur la plus faible de la comparaison "sauvage-sauvage" est obtenue entre les populations de Siguret et d'Embrun, qui sont également les deux sites les plus proches géographiquement (environ 6 km). A l'inverse les valeurs obtenues entre chaque paire de

populations "cultivé-sauvage" présentent des valeurs très élevées (0,68 à 1), ce qui traduit une forte différenciation entre les deux compartiments. Les valeurs les plus faibles de la comparaison "cultivé-sauvage" sont obtenues entre la population de La Rochette et les populations des peupleraies cultivées, ce qui peut s'expliquer par les 31% de pathotypes à V7 présents à La Rochette.

4.2.10. Différenciation entre populations dans le temps :

L'indice de Rogers permet également de comparer les fréquences des pathotypes pour un site donné à des dates successives. Ainsi, en fonction des données disponibles, nous avons calculé les indices de Rogers entre chaque paire de population collectées au même site à des dates successives (Tableau V). Aucune tendance dans l'évolution temporelle des populations ne se dégage très nettement. Les valeurs sont très variables, variant de 0,02 (populations successives quasi-identiques) à 0,69 (populations successives très différentes). Cette valeur très élevée correspond à la comparaison entre les populations collectées à Valernes en septembre 2002 (population très "polluée" par des isolats à V7 venant du compartiment cultivé) et en septembre 2003 (population très peu "polluée" par des isolats à V7).

4.3. Génotypage des populations:

4.3.1. Extraction de l'ADN de *M. larici-populina*:

Environ un milligramme d'urédospores est prélevé et placé dans des tubes Eppendorf de 2 ml. Les échantillons sont broyés à l'aide de deux billes de verre de 3 mm de diamètre et une vingtaine de billes de 2 mm de diamètre dans 100 μ l de tampon d'extraction, ceci grâce à un agitateur IKA VIBRAX VXR. L'efficacité du broyage a été vérifiée par comptage des spores détruites au microscope optique, ainsi que par migration de l'ADN total sur gel d'agarose à 0,7%. L'ADN des spores est extrait en utilisant un Kit QIAGEN Plant DNeasy™, et récupéré dans 200 μ l de tampon d'élution (environ 1 ng / μ l).

4.3.2. Empreintes génétiques (RAPD):

Six nanogrammes d'ADN total de chaque échantillon (5 μ l de solution mère) sont ajoutés au mélange d'amplification et la RAPD est réalisée selon les conditions mises au point au laboratoire par Foulon (1999) et déjà appliquées à une étude de populations de *M. larici-populina* par Feau (2000). Les cycles de PCR sont effectués dans un thermocycleur PTC 200 (MJ Research).

Trois amorces de dix nucléotides ont été utilisées, parmi les quatre choisies par Feau (2000) □ OPF-14, OPG-11 et OPG-15 (Operon Technology, Alameda, CA, USA). Elles doivent permettre la production de bandes les plus polymorphes possibles et l'obtention de profils facilement interprétables. Elles sont composées de 60 à 70% de bases G et C et ne comprennent pas de séquences palindromiques.

Les produits d'amplification sont séparés sur des gels d'agarose à 1,5% et la migration est réalisée à 5 V/cm dans du tampon TBE 0.5 X (Tris base 45 mM, Acide borique 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8). L'ADN est visualisé au bromure d'éthidium et les photos de gels sont numérisées à l'aide d'un système d'acquisition d'images (Gel Doc 2000™, Bio-Rad).

La taille des bandes est estimée par comparaison à un marqueur de taille de 100 pb par l'intermédiaire du logiciel d'analyse Gel Compar II™ (Applied Maths). L'expérience est répétée au moins deux fois pour chacun des 778 isolats des neuf populations de septembre 2001 afin de fournir une robustesse suffisante à l'interprétation des résultats.

4.3.3. Méthodes d'analyse des données moléculaires :

La présence ou l'absence de bande permet de calculer des distances génotypiques entre les isolats, sur l'ensemble des marqueurs étudiés, grâce à l'indice de similarité de Dice □ $2a/(2a+b+c)$, où $a = [1,1]$, $b = [0,1]$, $c = [1,0]$, 1 indiquant la présence d'une bande et 0 son absence. Les matrices de similarité permettent de construire des dendrogrammes pour chaque population par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Les urédospores de *M. larici-populina* étant dicaryotiques et les marqueurs RAPD étant dominants, les fréquences alléliques sont estimées par la méthode de Lynch et Milligan (1994). L'hétérozygotie attendue, les distances génétiques estimées de Nei (1978) ainsi que les F-statistiques (F_{ST} de Weir et Cockerham, 1984) sont calculés à l'aide du logiciel TFGA (Tools For Population Genetic Analyses) version 1.3 (Miller, 1997). Ce dernier permet

également de réaliser un test de Mantel afin de tester une éventuelle corrélation entre les distances génétiques estimées et les distances calculées par l'indice de Rogers sur la structure en pathotypes des populations. Un autre test de Mantel est réalisé pour tester une éventuelle corrélation entre les distances génétiques estimées et les distances géographiques entre sites, en transformant les valeurs des deux matrices par l'intermédiaire d'une fonction logarithmique. Les dendrogrammes construits par la méthode UPGMA basée sur les distances génétiques de Nei sont réalisés également à l'aide de ce logiciel, et les valeurs des bootstraps sont calculées par 1000 ré-échantillonnages sur tous les loci.

La non-association au hasard des phénotypes RAPD (absence ou présence de bande) est appréhendée de deux manières différentes : un test exact de Fisher est réalisé de la même manière que pour les virulences, et d'autre part un indice d'association (I_A) est calculé dans chaque population à l'aide du logiciel Multilocus 1.2 (Agapow et Burt, 2000). Cet indice est une estimation de l'association multilocus des phénotypes RAPD. Le même indice est recalculé ($I_{A_{corr}}$) avec les marqueurs dont la fréquence est comprise entre 0,1 et 0,9 pour éliminer l'effet des moins polymorphes (Samils *et al.*, 2001). Cet indice est utilisé afin de corriger l'effet éventuel d'une amplification clonale de certains génotypes adaptés au cours d'une épidémie (Milgroom, 1996). On en tire un indice standardisé qui élimine l'influence du nombre de loci étudiés : $I_{A_{corr}}^S = \frac{I_{A_{corr}}}{\sqrt{r-1}}$ avec r le nombre de loci analysés.

4.3.4. Variabilité intra-population :

Trois amorces RAPD ont été utilisées pour amplifier l'ADN des isolats des neuf populations de *M. larici-populina* récoltées en septembre 2001. Un total de 19 marqueurs polymorphes a été retenu. Ils ont permis de déterminer les phénotypes multilocus RAPD de 743 isolats analysés au total. Un total de 566 phénotypes multilocus RAPD différents a été mis en évidence.

Les fréquences alléliques ont été estimées par la méthode de Lynch et Milligan (1994), la technique RAPD ne donnant pas directement accès aux hétérozygotes. Ces fréquences sont donc calculées en supposant les populations être à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Les taux d'hétérozygotie attendue qui en découlent sont relativement élevés, les valeurs étant comprises entre 0,289 et 0,394 (Tableau VI). La population semblant la plus clonale est celle de La Brillanne, avec le taux d'hétérozygotie le plus faible. Effectivement, il n'a été détecté que 55 phénotypes multilocus différents au sein des 91 isolats analysés dans

cette population, alors que les autres populations sont composées de 80 à 95% d'isolats possédant des phénotypes multilocus RAPD différents.

4.3.5. Différenciation entre les populations :

A partir des fréquences alléliques estimées, les distances génétiques non biaisées de Nei (Nei, 1978) entre chaque paire de populations ont été calculées (Tableau VII). Les valeurs obtenues sont globalement peu élevées (inférieures à 0,1). Le dendrogramme construit par la méthode UPGMA à partir de ces distances regroupe les populations franc-comtoises entre elles (Le Tremblois et St Vallier), ainsi que les populations picardes (La Quincy et Blanzay) (Figure 12). Par contre, la structure génétique des populations picardes ressemble plus à celle de trois populations alpines (Champoléon, Embrun et Siguret) qu'à celles des populations franc-comtoises. Les populations de la vallée de la Durance (Embrun et Siguret) sont également regroupées, alors que la population de La Rochette est très éloignée de l'autre population de la vallée du Drac, Champoléon. La population de La Brillanne se différencie également des autres populations sur le dendrogramme.

Le dendrogramme réalisé sur les distances génétiques entre populations des trois régions géographiques étudiées montre que les populations picardes possèdent une structure génétique plus proche de celle des populations alpines que des franc-comtoises (Figure 13).

Un dernier dendrogramme réalisé sur les distances génétiques entre les cinq populations alpines regroupe les populations d'Embrun et Siguret, alors que celle de Champoléon est beaucoup plus proches de celles-ci que de la population de La Rochette, pourtant très proche géographiquement (Figure 14).

Une analyse spatiale hiérarchisée des populations a été réalisée grâce au calcul des F-statistiques à plusieurs échelles (Tableau VIII). L'ensemble des neuf populations paraît moyennement structuré, avec une forte significativité ($F_{ST} = 0,078$, $P < 0,000$). La plus faible différenciation s'observe au sein des régions franc-comtoise et picarde, entre chaque couple de populations. Par contre les populations alpines sont bien plus fortement différenciées ($F_{ST} = 0,088$, $P < 0,000$). D'autre part, la valeur du F_{ST} diminue lorsque l'on réalise l'analyse sur les populations des trois régions géographiques, et devient relativement faible, même s'il reste très significatif, lors de l'analyse sur les populations des deux compartiments, sauvage et cultivé.

Le test de Mantel réalisé sur la matrice de distances génétiques de Nei et sur celle des distances basée sur la structure des populations en pathotypes (indice de Rogers) n'a pas révélé de corrélation entre la structuration pathotypique et la structuration moléculaire des populations ($r=0,077$, $P=0,294$).

L'autre test de Mantel réalisé cette fois-ci entre les matrices de distances génétiques de Nei et de distances géographiques (log-transformées), n'a pas montré de corrélation significative entre la structuration moléculaire des populations et leur origine géographique ($r=0,205$, $P=0,133$).

4.3.6. Déséquilibres de liaison entre les marqueurs RAPD:

Les populations qui possèdent le plus fort taux de déséquilibres de liaison significatifs entre phénotypes RAPD sont deux populations de peupleraies sauvages, La Rochette et La Brillanne (14,3 et 14%), et une population de peupleraie cultivée, La Quincy, au sein de laquelle la proportion atteint plus de 18% (Tableau IX). Les autres populations présentent des taux de non-association au hasard significatives en dessous de 10%. L'indice d'association (I_A) estimé sur tous les loci est relativement élevé dans les populations de La Rochette et de La Brillanne (0,677 et 0,881) par rapport aux autres populations. Celle de La Quincy observe un I_A compris entre les deux précédents et ceux des populations de Blanzay et du Tremblois en particulier. L'indice $I_{A_{corr}}$ calculé sur les loci dont la fréquence des marqueurs est comprise entre 0,1 et 0,9 tend à faire diminuer les écarts entre ces valeurs. La population de La Brillanne, possédant la plus forte proportion d'isolats ayant le même génotype, présente une des valeurs les plus faibles. L'indice $I_{A_{corr}}^S$ standardisé par rapport au nombre de loci analysés tend à homogénéiser les valeurs des différentes populations, celles du couple de populations picardes et de la population de La Rochette restant les plus élevées (0,031 et 0,039).

4.4. Caractérisation de la résistance de *P. nigra* à la rouille :

Nos collègues généticiens ont montré que *P. nigra* n'exprimait pas de résistance qualitative envers des isolats de *M. larici-populina* originaires du compartiment cultivé et représentant différents pathotypes couvrant la gamme de virulences connues (Légionnet *et al.* 1999). De ce fait les peupliers noirs sauvages diffèrent fondamentalement de la majorité

des cultivars hybrides utilisés en populiculture moderne (cultivars à résistance qualitative). On peut penser que les peupliers noirs exercent une pression de sélection sur les populations de *M. larici-populina* beaucoup plus douce que celle exercée par les cultivars récents.

Afin de déterminer si *P. nigra* présente des résistances de type qualitative envers des isolats de *M. larici-populina* originaires du compartiment sauvage, nous avons réalisé une expérience d'inoculation croisée en conditions contrôlée entre des clones de *P. nigra* originaires de trois vallées du Sud-Est de la France et des isolats de *M. larici-populina* originaires des mêmes vallées. L'inoculation croisée de 46 clones de *P. nigra* originaires des vallées du Gard (24 clones), de la Durance (14 clones) et de la Drôme (8 clones) avec 36 isolats de *M. larici-populina* originaires des vallées du Gard (11 isolats), de la Durance (15 isolats) et de la Drôme (10 isolats) n'a mis en évidence aucune interaction incompatible. En effet, la totalité des 1529 interactions testées (sur 1656 interactions possibles) se sont révélées compatibles (Figure 15). Il semble donc qu'il n'existe pas d'adaptation locale du champignon à son hôte (Gandon *et al.* 1996), sur le plan de la résistance qualitative, au moins à l'échelle des trois vallées étudiées.

Nous avons également étudié un caractère de résistance quantitatif, la latence, c'est à dire le délai entre l'inoculation et la sporulation du champignon, sur ces 1529 interactions. Bien qu'il existe des différences de latence entre les combinaisons clones x isolats, celle-ci n'est pas significativement différente entre les interactions sympatriques ($8,16 \pm 1,43$ jours) et les interactions allopatriques ($8,14 \pm 1,57$ jours) (Figure 15). Par conséquent, une adaptation locale du champignon à son hôte, sur le plan de la résistance quantitative, semble également peu probable.

Cette absence d'adaptation locale, aussi bien sur le plan qualitatif que quantitatif, peut s'expliquer éventuellement par l'échelle géographique réduite de notre étude (environ 300 km). En effet, les capacités de dissémination des graines et du pollen de peuplier et surtout celles des spores de *M. larici-populina* sont vraisemblablement trop grande pour espérer détecter un phénomène d'adaptation locale à cette échelle. C'est pourquoi, nous avons décidé de reconduire le même type d'expérience d'inoculation croisée, mais cette fois à l'échelle de l'aire de répartition naturelle de *P. nigra*, i.e. l'Europe et une partie de l'Asie centrale, avec l'aide du réseau *P. nigra* d'Euforgen (European Forest Genetic Resources Programme).

4.5. Conclusions et perspectives :

Nous avons montré au cours de ce projet que les populations de *M. larici-populina* collectées dans les peupleraies cultivées se caractérisent par une richesse et une complexité nettement supérieures à celles collectées dans les peupleraies sauvages. Ceci suggère la sélection de pathotypes complexes sous l'effet des gènes de résistance déployés en populiculture. De plus, la présence de mélèzes à proximité des peupleraies augmente très significativement la richesse des populations.

Ce projet nous a permis de mieux comprendre la dynamique spatio-temporelle de l'épidémie de rouille dans la ripisylve de la Durance. Cette vallée présente une valeur de modèle pour des études couplées d'épidémiologie et de génétique des populations. Le fonctionnement de l'épidémie selon un modèle en corridor, avec une propagation "mono-dimensionnelle" devrait rendre plus facile à la fois l'étude de l'épidémie et celle de la structure des populations, comparée à des épidémies "bidimensionnelles" avec des sources d'inoculum primaire (mélèzes) réparties aléatoirement.

D'autre part, la présence de plusieurs petits compartiments cultivés enclavés dans l'énorme compartiment sauvage que constitue la ripisylve à *P. nigra*, nous a permis d'étudier les interactions entre les deux compartiments. Nous avons ainsi mis en évidence une "pollution" de la ripisylve par des isolats sélectionnés par des cultivars portant les résistances R2 et R7 en septembre 2002. Ce phénomène était beaucoup plus discret en 2003. Il sera intéressant de suivre ces sites pendant plusieurs années. Nous envisageons également de suivre de façon plus détaillée un site (Valernes) dans le temps et dans l'espace afin de mieux cartographier la "pollution" par les pathotypes à V7.

L'utilisation de marqueurs moléculaires (RAPD) a montré que les distances génétiques entre les populations étaient très faibles. Ceci est vraisemblablement dû à la très grande capacité de dissémination des spores de rouille. Aucune corrélation n'a été trouvée entre la structure génétique et la structure pathotypique des populations, ni entre la structure génétique et l'origine géographique des populations. L'analyse des déséquilibres de liaison entre marqueurs RAPD n'a pas mis en évidence un effet de la présence du mélèze sur la structure des populations étudiées. Cependant, il faut préciser que cette analyse a porté sur les populations de septembre 2001, donc des populations de fin d'épidémie. Il est probable que la migration de nombreux individus des sites avec mélèzes vers les sites sans mélèzes tendent à réduire les différences entre populations sexuées et "asexuées" au cours de l'épidémie. C'est pourquoi, l'analyse de populations collectées en début d'épidémie (juillet)

pourrait révéler un effet significatif de la présence des mélèzes sur les déséquilibres de liaison.

Par ailleurs, comme détaillé plus haut, nous avons décidé de mettre au point des marqueurs microsatellites, co-dominants, donc plus pertinents pour les études de génétique des populations sur un organisme diploïde, tel que *M. larici-populina*. Ces marqueurs microsatellites seront utilisés pour l'analyse future des populations récoltées et caractérisées au cours de ce projet, qui ont été conservées.

Concernant la recherche de résistance qualitative ou quantitative chez *P. nigra*, nous avons décidé de reconduire le même type d'expérience d'inoculation croisée, mais cette fois à l'échelle de l'aire de répartition naturelle de *P. nigra*, i.e. l'Europe et une partie de l'Asie centrale, avec l'aide du réseau *P. nigra* d'Euforgen (European Forest Genetic Resources Programme). Cette expérience nous permettrait de tester l'hypothèse d'une adaptation locale de *P. nigra*, cette fois à une échelle géographique beaucoup plus large (Gandon et al., 1996). De plus, la détection éventuelle de cas d'interactions incompatibles nous permettrait d'identifier des clones différentiels de *P. nigra* qui pourraient s'ajouter à la gamme différentielle actuelle. En effet celle-ci s'avère peu discriminante pour les populations issues du compartiment sauvage, avec une majorité de pathotypes 0, i.e. capables d'infecter aucun des clones de cette gamme. Ceci peut s'expliquer par le fait que les 8 gènes de résistance qualitative présents dans la gamme différentielle actuelle sont tous hérités d'un parent *Populus deltoides*, qui n'a pas co-évolué avec *M. larici-populina*. Il s'agit donc dans ce cas de résistance "exaptée" (Newcombe, 1998).

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

- Agapow, P. M. et Burt, A.** (2000). Multilocus 1.2. Dept of Biology, Imperial College, Silwood Park, Ascot, UK.
- Andrивon, D. et de Vallavieille-Pope, C.** (1995). Race diversity and complexity in selected populations of fungal biotrophic pathogens of cereals. *Phytopathology*, **85**: 897-905.
- Feau, N.** (2000). Variabilité phénotypique et diversité génétique de trois populations de *Melampsora larici-populina* Kleb, agent de la rouille des peupliers. Rapport de DEA de Biologie Forestière, Université Henri Poincaré Nancy I. 21 p.
- Foulon, C.** (1999). Etude de la variabilité moléculaire au sein des groupes de races E4 et E5 de *Melampsora larici-populina* Kleb., agent de la rouille des peupliers: mise au point de la technique RAPD. Rapport de DAA Protection des Plantes et Environnement, Institut National Agronomique Paris-Grignon. 39 p.
- Gandon, S., Capowiez, Y., Dubois, Y., Michalakіs, Y. et Olivieri, I.** (1996). Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **263**: 1003-1009.
- Groth, J. V. et Roelfs, A. P.** (1987). The concept and measurement of phenotypic diversity in *Puccinia graminis* on wheat. *Phytopathology*, **77**: 1395-1399.
- Kolmer, J. A.** (1991). Phenotypic diversity in two populations of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in Canada during 1931-1987. *Phytopathology*, **81**: 311-315.
- Legionnet, A., Muranty, H. et Lefèvre, F.** (1999). Genetic variation of the riparian pioneer tree species *Populus nigra*. II. Variation in susceptibility to the foliar rust *Melampsora larici-populina*. *Heredity*, **82**: 318-327.
- Lynch, M. et Milligan, B. G.** (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.*, **3**: 91-99.
- Magurran, A. E.** (1988). Ecological diversity and its measurement. University Press, Cambridge. 192 p.
- Milgroom, M. G.** (1996). Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **34**: 457-477.
- Miller, M.** (1997). Tools for Population Genetic Analyses version 1.3. Northern Arizona University, Flagstaff, AZ, USA.
- Nei, M.** (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**: 583-590.
- Newcombe, G.** (1998). A review of exapted resistance to diseases of *Populus*. *Eur. J. Forest Pathol.*, **28**: 209-216.
- Pinon, J. et Frey, P.** (1997). Structure of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar. *Eur. J. Plant Pathol.*, **103**: 159-173.
- Pinon, J., Frey, P., Husson, C. et Schipfer, A.** (1998). Poplar rust (*Melampsora larici-populina*): the development of E4 pathotypes in France since 1994. *Finnish Forest Research Institute, Research papers*, **712**: 57-64.

Renaud, J.P., Maugard, F., de Villebonne, D., Frey, P., Pinon, J. (2001). La rouille des peupliers (*Melampsora larici-populina* Kleb.) en France. Résultats de l'enquête nationale de 1999 et de 2000. Rapport du Département Santé des Forêts, 10 p + annexes.

Rogers, J. S. (1972). Measures of genetic similarity and genetic distance. *In Studies in genetics, University of Texas Publications*, 145-153.

Samils, B., Stepien, V., Lagercrantz, U., Lascoux, M. et Gullberg, U. (2001). Genetic diversity in relation to sexual and asexual reproduction in populations of *Melampsora larici-epitea*. *Eur. J. Plant Pathol.*, **107**: 871-881.

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

6. LISTE DES PUBLICATIONS REALISEES OU ENVISAGEES :

Publications dans des revues à comité de lecture :

Deux publications sont envisagées à partir des résultats de cette étude, l'une (Gérard et al., en préparation) sur le génotypage des populations, l'autre sur l'étude pathotypique sur les trois années.

Communication dans des congrès :

Frey P., Gérard P., Feau N., Husson C., Schipfer A., Lefèvre F., Pinon J. (2002). Influence des peupleraies sauvages et cultivées et de la présence de mélèzes sur la structuration génétique des populations de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille foliaire. Journées Jean Chevaugeon. 4^e Rencontres de Mycologie - Phytopathologie, Aussois, 13-17 mars 2002 (Poster + Résumé).

Frey P., Gérard P., Feau N., Husson C., Schipfer A., Lefèvre F., Pinon J. (2003). Influence des peupleraies sauvages et cultivées, et de la présence de mélèzes, sur la structuration génétique des populations de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille foliaire. Journées du Réseau de Mycologie de la Société Française de Microbiologie. Nancy, 15-17 janvier 2003 (Oral + Résumé).

Gérard P., Husson C., Pinon J., Frey P. (2003). Influence des peupleraies sauvages et cultivées, et de la présence de mélèzes, sur la structuration génétique des populations de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille foliaire. 25^{ème} colloque Le Petit Pois Dérivé, réunion du Groupe de Génétique et Biologie des Populations, Toulouse, 25-28 août 2003 (Poster + Résumé).

Frey P., Gérard P., Feau N., Husson C., Pinon J. (2003). *Melampsora* on poplar in Europe: variability and population biology. International Symposium on *Melampsora* on *Salicaceae*, Belfast, UK, 10-12 septembre 2003 (Oral, conférencier invité).

Frey P., Gérard P., Feau N., Husson C., Pinon J. (2003). Les *Melampsora* des peupliers en Europe : variabilité et génétique des populations. Séminaire du Centre de Recherches en Biologie Forestière, Université Laval, Québec, Canada, 3 octobre 2003 (Oral, conférencier invité).

Rapports de stage :

Gérard P. (2002). Influence des peupleraies sauvages et cultivées, et de la présence de mélèzes, sur la structuration génétique des populations de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille foliaire. DEA de Biologie Forestière, Université Henri Poincaré - Nancy I, 25 p.

Kempf F. (2002). Evolution phénotypique des populations de *Melampsora larici-populina*, agent de la rouille foliaire des peupliers, sous l'influence des peupleraies sauvages et cultivées, et de la présence de mélèzes. Magistère de Biotechnologies, Université de Paris-Sud / Ecole Normale Supérieure de Cachan, 22 p.

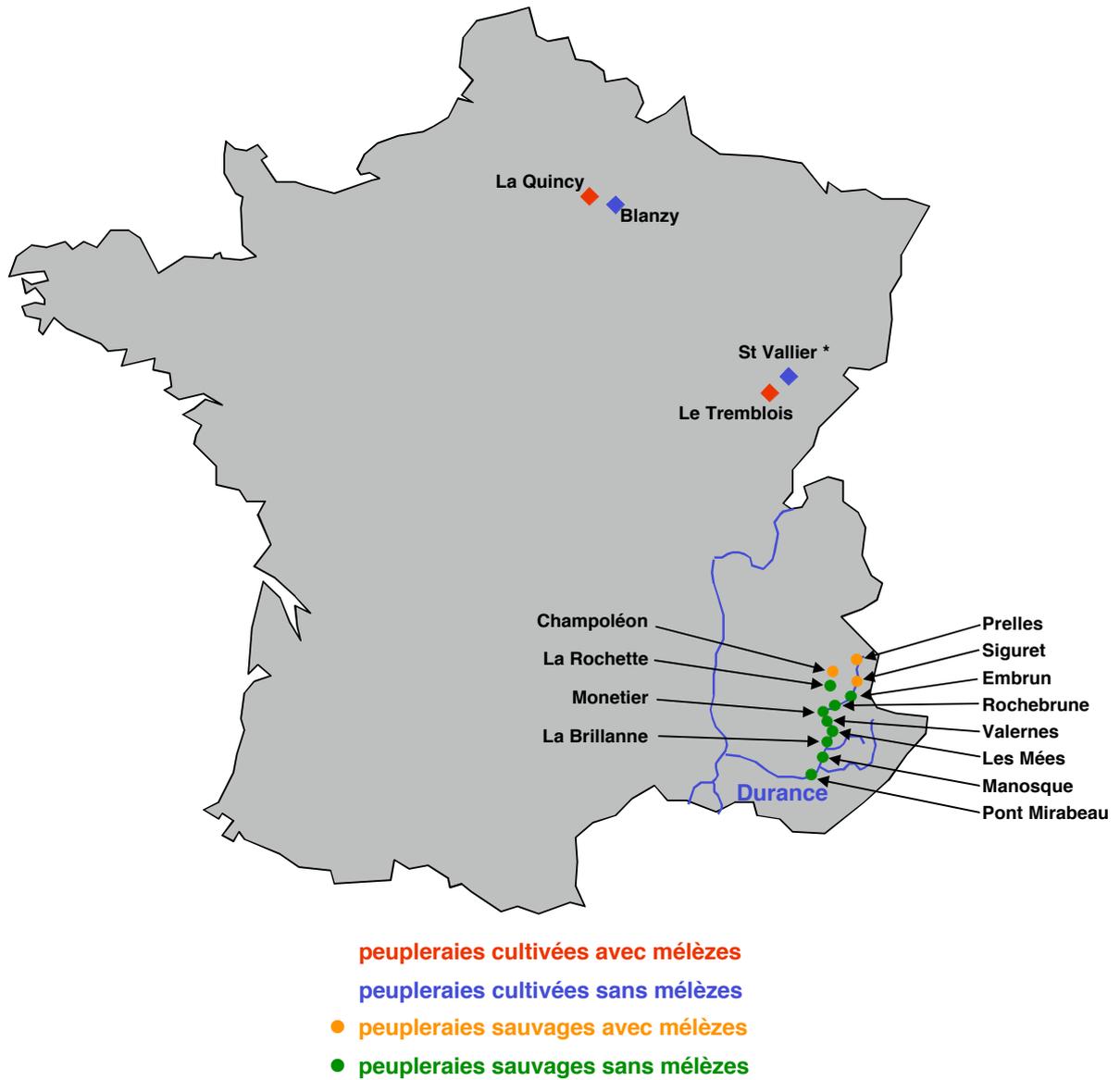


Figure 1 : localisation des sites de récolte étudiés entre 2001 et 2003. * Le site de St Vallier avait été retenu en 2001 comme un site sans mélèzes à proximité, mais des mélèzes ont été trouvés en octobre 2002, distants de 750 m de la parcelle de peupliers étudiée. Voir la figure 2 pour une carte détaillée des sites dans les Alpes.



Figure 2 : Localisation des sites de récolte étudiés entre 2001 et 2003 dans les vallées de la Durance et du Drac. Les sites de récolte sont représentés par des étoiles grises, les petits compartiments cultivés enclavés dans la ripisylve par des cercles rouges. La vallée de la Durance constitue un modèle d'épidémie en corridor pour la rouille du peuplier. En effet, l'épidémie annuelle débute au printemps dans la zone de sympatrie peuplier – mélèze (en amont du Lac de Serre-Ponçon), puis se propage vers l'aval pendant l'été.



Figure 3 : Peupleraie cultivée de la vallée de la Saône (St Vallier, 70). Parcelle de *Populus x euramericana* 'Robusta'.



Figure 4 : Peupleraie sauvage de la vallée du Drac (Champoléon, 05). Peupliers noirs (*Populus nigra*) et mélèzes (*Larix decidua*) dans la ripisylve.

Tableau I : Présence et intensité de l'infection des mélèzes ou des peupliers par *M. larici-populina* dans les différents sites aux différentes dates de prospection entre 2001 et 2003.

| Localité | compart. | mélèzes | mai-01 | sep-01 | mai-02 | juil-02 | sep-02 | juil-03 | sep-03 |
|---------------|----------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|--------|
| La Quincy | cultivé | oui | + | +++ | ++ | ++ | +++ | - | ++ |
| Blanzey | cultivé | non | - | +++ | - | + | +++ | - | + |
| Le Tremblois | cultivé | oui | + | +++ | + | ++ | +++ | - | ND |
| St Vallier | cultivé | non* | - | +++ | - | + | +++ | - | ND |
| Champoléon | sauvage | oui | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | + | +++ |
| La Rochette | sauvage | non | - | ± | - | - | + | - | ND |
| Prelles | sauvage | oui | ND | ND | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Siguret | sauvage | oui | + | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| Embrun | sauvage | non | - | +++ | - | + | +++ | ± | ++ |
| Rochebrune | sauvage | non | ND | ND | ND | - | +++ | - | + |
| Monetier | sauvage | non | ND | ND | ND | - | +++ | - | + |
| Valernes | sauvage | non | ND | ND | ND | - | +++ | ± | +++ |
| Les Mées | sauvage | non | ND | ND | ND | - | + | ++ | +++ |
| La Brillanne | sauvage | non | ND | + | ND | - | + | - | - |
| Manosque | sauvage | non | ND | ND | ND | - | + | - | ± |
| Pont Mirabeau | sauvage | non | ND | ND | ND | - | + | - | - |

- : absent, ± : très rare, + rare, ++ : présent, +++ : abondant, ND : pas de données.

* Le site de St Vallier avait été retenu en 2001 comme un site sans mélèzes à proximité, mais des mélèzes ont été trouvés en octobre 2002, distants de 750 m de la parcelle de peupliers étudiée.

Tableau II : Paramètres descriptifs des 54 populations de *M. larici-populina* étudiées de 2001 à 2003.

| Site | compart. | mélèzes | date | code | N | Np | Complexité | | Richesse | | | | | Equitabilité | | | |
|--------------|----------|---------|---------|-----------|-----|----|------------|------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|------|--------------|------|----------------|--|
| | | | | | | | Ci | a | H _s | H _{SR} | H _G | H _{GR} | D | 1/D | 1-D | H _E | |
| Le Tremblois | cultivé | oui | sep-01 | TRE-09-01 | 106 | 18 | 3.51 | 6.18 | 2.12 | 0.45 | 3.65 | 0.16 | 0.19 | 5.34 | 0.81 | 0.73 | |
| | | | mai-02 | TRE-05-02 | 113 | 18 | 3.49 | 6.03 | 2.18 | 0.46 | 3.60 | 0.15 | 0.15 | 6.44 | 0.85 | 0.75 | |
| | | | juil-02 | TRE-07-02 | 95 | 18 | 3.44 | 6.58 | 2.07 | 0.45 | 3.73 | 0.18 | 0.20 | 4.99 | 0.80 | 0.71 | |
| | | | sep-02 | TRE-09-02 | 94 | 9 | 2.83 | 2.46 | 1.63 | 0.36 | 1.76 | 0.09 | 0.26 | 3.9 | 0.74 | 0.74 | |
| St Vallier | cultivé | non* | sep-01 | VAL-09-01 | 99 | 13 | 2.82 | 4.01 | 1.80 | 0.39 | 2.61 | 0.12 | 0.23 | 4.44 | 0.77 | 0.70 | |
| | | | juil-02 | VAL-07-02 | 106 | 18 | 3.74 | 6.23 | 2.06 | 0.45 | 3.65 | 0.16 | 0.22 | 4.46 | 0.78 | 0.71 | |
| La Quincy | cultivé | oui | sep-01 | QUI-09-01 | 105 | 12 | 3.95 | 3.50 | 1.66 | 0.36 | 2.36 | 0.11 | 0.28 | 3.63 | 0.72 | 0.67 | |
| | | | mai-02 | QUI-05-02 | 110 | 15 | 4.00 | 4.72 | 1.81 | 0.38 | 2.98 | 0.13 | 0.26 | 3.86 | 0.74 | 0.67 | |
| | | | juil-02 | QUI-07-02 | 109 | 14 | 3.08 | 4.27 | 1.93 | 0.41 | 2.77 | 0.12 | 0.19 | 5.28 | 0.81 | 0.73 | |
| | | | sep-02 | QUI-09-02 | 104 | 8 | 3.25 | 2.03 | 1.59 | 0.34 | 1.51 | 0.07 | 0.25 | 4.02 | 0.75 | 0.76 | |
| Blanzy | cultivé | non | sep-01 | BLA-09-01 | 103 | 12 | 3.34 | 3.52 | 1.77 | 0.38 | 2.37 | 0.11 | 0.23 | 4.31 | 0.77 | 0.71 | |
| | | | juil-02 | BLA-07-02 | 113 | 4 | 3.72 | 0.82 | 1.16 | 0.25 | 0.63 | 0.03 | 0.34 | 2.97 | 0.66 | 0.72 | |
| | | | sep-02 | BLA-09-02 | 98 | 6 | 3.31 | 1.43 | 1.22 | 0.27 | 1.09 | 0.05 | 0.32 | 3.13 | 0.68 | 0.68 | |
| | | | sep-03 | BLA-09-03 | 106 | 13 | 3.05 | 3.9 | 1.92 | 0.41 | 2.57 | 0.11 | 0.2 | 5.07 | 0.8 | 0.75 | |
| Siguret | sauvage | oui | sep-01 | SIG-09-01 | 90 | 6 | 0.38 | 1.44 | 0.94 | 0.21 | 1.11 | 0.06 | 0.53 | 1.88 | 0.47 | 0.52 | |
| | | | mai-02 | SIG-05-02 | 86 | 4 | 0.52 | 0.87 | 0.88 | 0.20 | 0.67 | 0.04 | 0.45 | 2.22 | 0.55 | 0.63 | |
| | | | juil-02 | SIG-07-02 | 104 | 6 | 0.86 | 1.39 | 1.11 | 0.24 | 1.08 | 0.05 | 0.42 | 2.37 | 0.58 | 0.62 | |
| | | | sep-02 | SIG-09-02 | 96 | 5 | 0.58 | 1.14 | 1 | 0.22 | 0.88 | 0.04 | 0.42 | 2.37 | 0.58 | 0.62 | |
| | | | juil-03 | SIG-07-03 | 70 | 5 | 0.66 | 1.23 | 0.92 | 0.22 | 0.94 | 0.06 | 0.45 | 2.21 | 0.55 | 0.57 | |
| | | | sep-03 | SIG-09-03 | 105 | 5 | 0.53 | 1.1 | 0.97 | 0.21 | 0.86 | 0.04 | 0.43 | 2.35 | 0.57 | 0.6 | |
| Prelles | sauvage | oui | mai-02 | PRE-05-02 | 85 | 5 | 0.38 | 1.18 | 0.98 | 0.22 | 0.90 | 0.05 | 0.46 | 2.17 | 0.54 | 0.61 | |
| | | | juil-02 | PRE-07-02 | 98 | 6 | 0.85 | 1.43 | 0.81 | 0.18 | 1.09 | 0.05 | 0.59 | 1.71 | 0.41 | 0.45 | |
| | | | sep-02 | PRE-09-02 | 95 | 5 | 0.41 | 1.15 | 0.99 | 0.22 | 0.88 | 0.04 | 0.46 | 2.17 | 0.54 | 0.62 | |
| | | | juil-03 | PRE-07-03 | 100 | 5 | 0.62 | 1.11 | 0.96 | 0.21 | 0.87 | 0.04 | 0.43 | 2.3 | 0.57 | 0.6 | |
| | | | sep-03 | PRE-09-03 | 102 | 5 | 0.26 | 1.1 | 0.8 | 0.17 | 0.86 | 0.04 | 0.58 | 1.72 | 0.42 | 0.5 | |
| Embrun | sauvage | non | sep-01 | EMB-09-01 | 100 | 3 | 0.31 | 0.59 | 0.81 | 0.18 | 0.43 | 0.02 | 0.53 | 1.90 | 0.47 | 0.74 | |
| | | | juil-02 | EMB-07-02 | 107 | 3 | 0.35 | 0.58 | 0.74 | 0.16 | 0.43 | 0.02 | 0.53 | 1.90 | 0.47 | 0.68 | |
| | | | sep-02 | EMB-09-02 | 92 | 5 | 0.86 | 1.15 | 0.76 | 0.17 | 0.88 | 0.04 | 0.61 | 1.65 | 0.39 | 0.47 | |
| | | | juil-03 | EMB-07-03 | 96 | 3 | 0.29 | 0.57 | 0.67 | 0.15 | 0.44 | 0.02 | 0.6 | 1.67 | 0.4 | 0.61 | |
| | | | sep-03 | EMB-09-03 | 104 | 8 | 0.4 | 2.03 | 0.98 | 0.21 | 1.51 | 0.07 | 0.51 | 1.95 | 0.49 | 0.47 | |
| La Brillanne | sauvage | non | sep-01 | BRI-09-01 | 104 | 2 | 0.15 | 0.36 | 0.43 | 0.09 | 0.22 | 0.01 | 0.74 | 1.36 | 0.26 | 0.62 | |
| | | | sep-02 | BRI-09-02 | 99 | 3 | 0.04 | 0.6 | 0.11 | 0.02 | 0.44 | 0.02 | 0.96 | 1.04 | 0.04 | 0.1 | |
| Champoléon | sauvage | oui | sep-01 | CHA-09-01 | 101 | 8 | 0.45 | 2.06 | 1.07 | 0.23 | 1.52 | 0.07 | 0.49 | 2.05 | 0.51 | 0.51 | |
| | | | mai-02 | CHA-05-02 | 25 | 4 | 0.38 | 1.32 | 0.88 | 0.27 | 0.92 | 0.12 | 0.52 | 1.91 | 0.48 | 0.63 | |
| | | | juil-02 | CHA-07-02 | 50 | 3 | 1.06 | 0.71 | 0.81 | 0.21 | 0.51 | 0.04 | 0.53 | 1.90 | 0.47 | 0.74 | |
| | | | sep-02 | CHA-09-02 | 76 | 10 | 0.88 | 3.08 | 1.51 | 0.35 | 2.08 | 0.12 | 0.3 | 3.37 | 0.7 | 0.66 | |
| | | | juil-03 | CHA-07-03 | 78 | 7 | 0.46 | 1.87 | 0.99 | 0.23 | 1.38 | 0.08 | 0.45 | 2.21 | 0.55 | 0.51 | |
| | | | sep-03 | CHA-09-03 | 105 | 7 | 0.5 | 1.71 | 1.05 | 0.23 | 1.29 | 0.06 | 0.44 | 2.28 | 0.56 | 0.54 | |
| La Rochette | sauvage | non | sep-01 | ROC-09-01 | 65 | 6 | 1.60 | 1.61 | 1.11 | 0.27 | 1.20 | 0.08 | 0.42 | 2.35 | 0.58 | 0.62 | |
| | | | sep-02 | ROC-09-02 | 103 | 7 | 0.56 | 1.71 | 1 | 0.22 | 1.29 | 0.06 | 0.57 | 1.76 | 0.43 | 0.51 | |
| Rochebrune | sauvage | non | sep-02 | RCB-09-02 | 96 | 6 | 0.85 | 1.44 | 1.16 | 0.25 | 1.1 | 0.05 | 0.4 | 2.51 | 0.6 | 0.65 | |
| | | | sep-03 | RCB-09-03 | 97 | 4 | 0.18 | 0.83 | 0.58 | 0.13 | 0.66 | 0.03 | 0.7 | 1.44 | 0.3 | 0.42 | |
| Monetier | sauvage | - | sep-02 | MON-09-02 | 90 | 7 | 0.92 | 1.79 | 1.34 | 0.3 | 1.33 | 0.07 | 0.31 | 3.18 | 0.69 | 0.69 | |
| | | | sep-03 | MON-09-03 | 105 | 4 | 0.61 | 0.83 | 0.88 | 0.19 | 0.64 | 0.03 | 0.45 | 2.22 | 0.55 | 0.63 | |
| Valernes | sauvage | - | sep-02 | VLR-09-02 | 86 | 8 | 2.9 | 2.17 | 1.56 | 0.35 | 1.57 | 0.08 | 0.27 | 3.7 | 0.73 | 0.75 | |
| | | | juil-03 | VLR-07-03 | 11 | 2 | 0.27 | 0.71 | 0.59 | 0.25 | 0.42 | 0.1 | 0.52 | 1.94 | 0.48 | 0.85 | |
| | | | sep-03 | VLR-09-03 | 102 | 6 | 0.44 | 1.42 | 0.94 | 0.2 | 1.08 | 0.05 | 0.49 | 2.02 | 0.51 | 0.52 | |
| Les Mées | sauvage | - | sep-02 | MEE-09-02 | 100 | 2 | 0.01 | 0.35 | 0.06 | 0.01 | 0.22 | 0.01 | 0.98 | 1.02 | 0.02 | 0.09 | |
| | | | juil-03 | MEE-07-03 | 11 | 2 | 0.09 | 0.71 | 0.3 | 0.13 | 0.42 | 0.1 | 0.75 | 1.33 | 0.25 | 0.43 | |
| | | | sep-03 | MEE-09-03 | 99 | 2 | 0.03 | 0.35 | 0.14 | 0.03 | 0.22 | 0.01 | 0.94 | 1.06 | 0.06 | 0.2 | |
| Manosque | sauvage | - | sep-02 | MAN-09-02 | 100 | 5 | 0.28 | 1.13 | 0.41 | 0.09 | 0.87 | 0.04 | 0.83 | 1.21 | 0.17 | 0.25 | |
| | | | sep-03 | MAN-09-03 | 17 | 1 | 1 | 0.23 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | |
| Pt Mirabeau | sauvage | - | sep-02 | MIR-09-02 | 84 | 13 | 2.48 | 4.34 | 1.81 | 0.41 | 2.71 | 0.14 | 0.22 | 4.56 | 0.78 | 0.71 | |

N : nombre d'isolats ; Np : nombre de pathotypes ; Ci : complexité moyenne des isolats (nombre moyen de virulence par isolat) ; α : indice alpha ; H_s : indice de Shannon ; H_{SR} : indice relatif de Shannon ; H_G : indice de Gleason ; H_{GR} : indice relatif de Gleason ; D : indice de Simpson ; 1/D : indice inverse de Simpson ; 1-D : indice complément de Simpson ; H_E : indice de Shannon Evenness.

* Le site de St Vallier avait été retenu en 2001 comme un site sans mélèzes à proximité, mais des mélèzes ont été trouvés en octobre 2002, distants de 750 m de la parcelle de peupliers étudiée.

Nombre de pathotypes (Np) :

| | Cultivé | Sauvage | |
|----------------|--------------------------|-------------------------|------------------|
| avec mélèzes | 14,73 ± 3,87 (n = 11) | 5,65 ± 1,66 (n = 17) | ** p = 0.0015 |
| sans mélèzes | 8,75 ± 4,42 (n = 4) | 5,10 ± 2,77 (n = 19) | |
| *** p = 0.0001 | | | |

Complexité (Ci) :

| | Cultivé | Sauvage | |
|----------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| avec mélèzes | 3,42 ± 0,40 (n = 11) | 0,57 ± 0,22 (n = 17) | NS p = 0.87 |
| sans mélèzes | 3,35 ± 0,28 (n = 4) | 0,70 ± 0,80 (n = 19) | |
| *** p = 0.0001 | | | |

Indice Alpha (α) :

| | Cultivé | Sauvage | |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| avec mélèzes | 4,79 ± 1,68 (n = 11) | 1,40 ± 0,55 (n = 17) | ** p = 0.001 |
| sans mélèzes | 2,42 ± 1,52 (n = 4) | 1,25 ± 0,95 (n = 19) | |
| *** p = 0.0001 | | | |

Indice de Shannon (Hs):

| | Cultivé | Sauvage | |
|----------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| avec mélèzes | 1,92 ± 0,23 (n = 11) | 0,98 ± 0,16 (n = 17) | * p = 0.017 |
| sans mélèzes | 1,52 ± 0,38 (n = 4) | 0,81 ± 0,47 (n = 19) | |
| *** p = 0.0001 | | | |

Tableau III : Analyse de variance à deux facteurs "compartiment" et "présence de mélèzes" effectuée sur les paramètres nombre de pathotypes, complexité, indice Alpha et indice de Shannon, sur 51 populations de *M. larici-populina* étudiées de 2001 à 2003 (NS : non significatif ; * P < 0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001).

Fréquence des 10 principaux pathotypes en septembre 2001

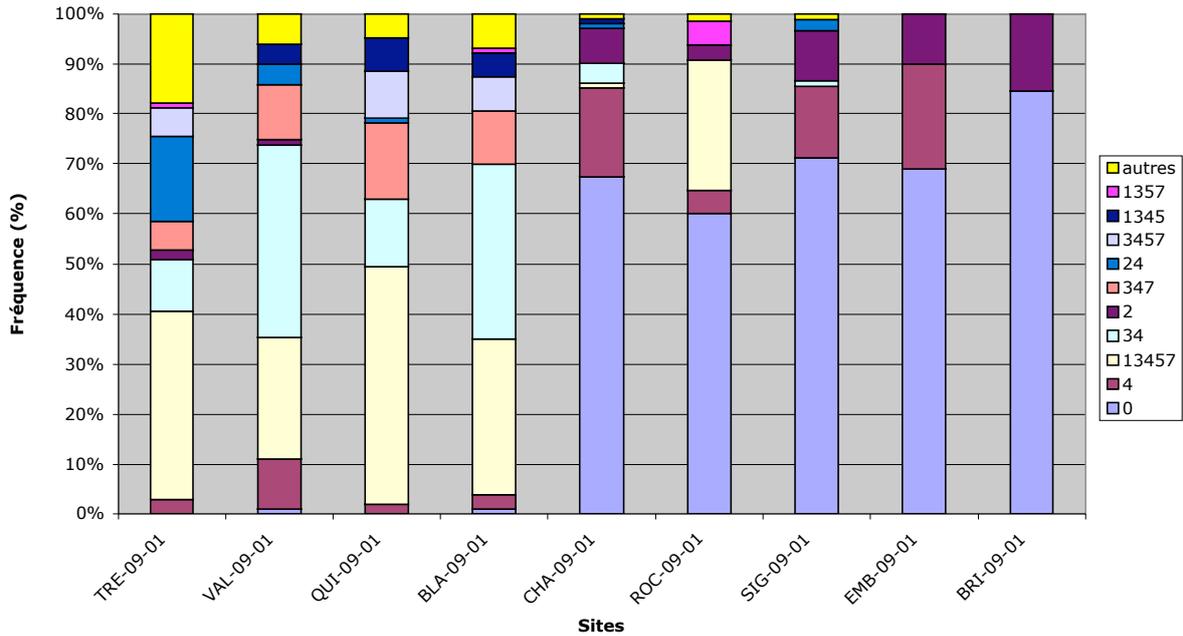


Figure 5 : Fréquence des 10 principaux pathotypes dans les 9 populations de septembre 2001. La catégorie "autres" regroupe les pathotypes dont la fréquence est inférieure à 5% dans toutes les populations. Les codes des sites sont explicités dans le tableau II.

Fréquence des 10 principaux pathotypes en septembre 2002

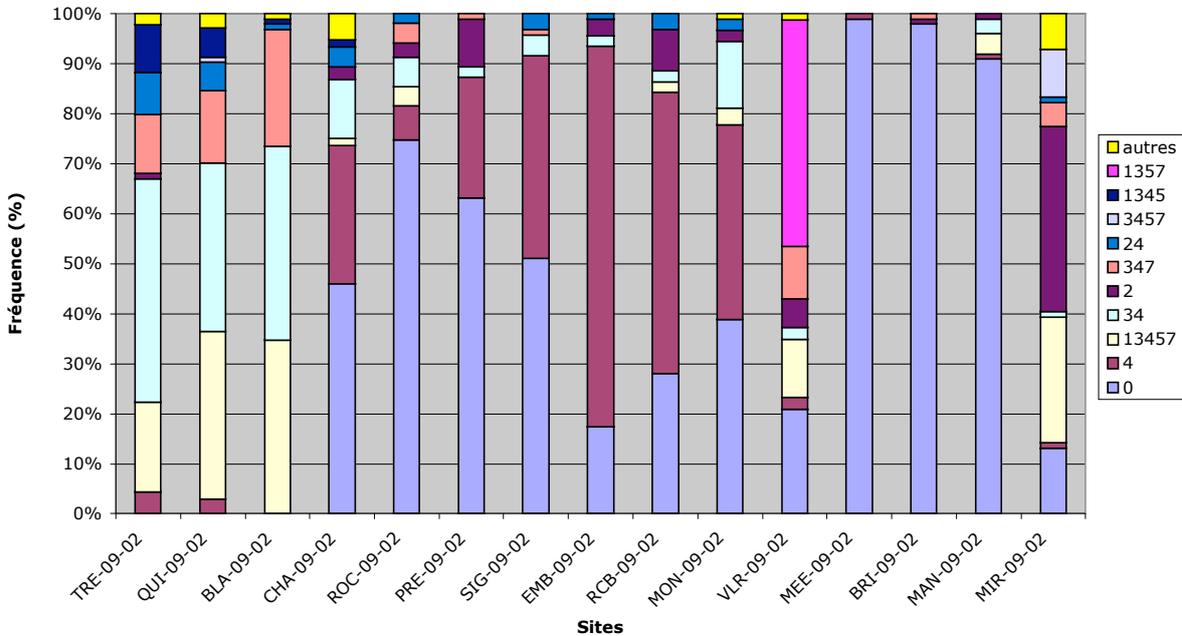


Figure 6 : Fréquence des 10 principaux pathotypes dans les 15 populations de septembre 2002. La catégorie "autres" regroupe les pathotypes dont la fréquence est inférieure à 5% dans toutes les populations. Les codes des sites sont explicités dans le tableau II.

Fréquence des 10 principaux pathotypes en septembre 2003

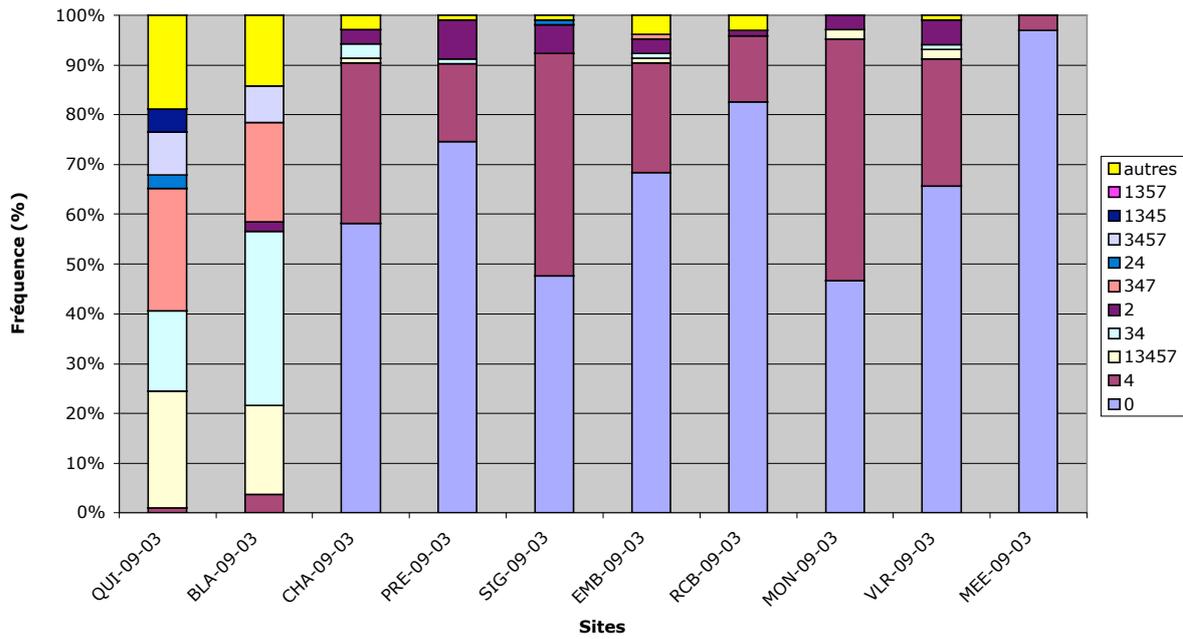


Figure 7 : Fréquence des 10 principaux pathotypes dans les 10 populations de septembre 2003. La catégorie "autres" regroupe les pathotypes dont la fréquence est inférieure à 5% dans toutes les populations. Les codes des sites sont explicités dans le tableau II.

Fréquence des 10 principaux pathotypes de 2001 à 2003

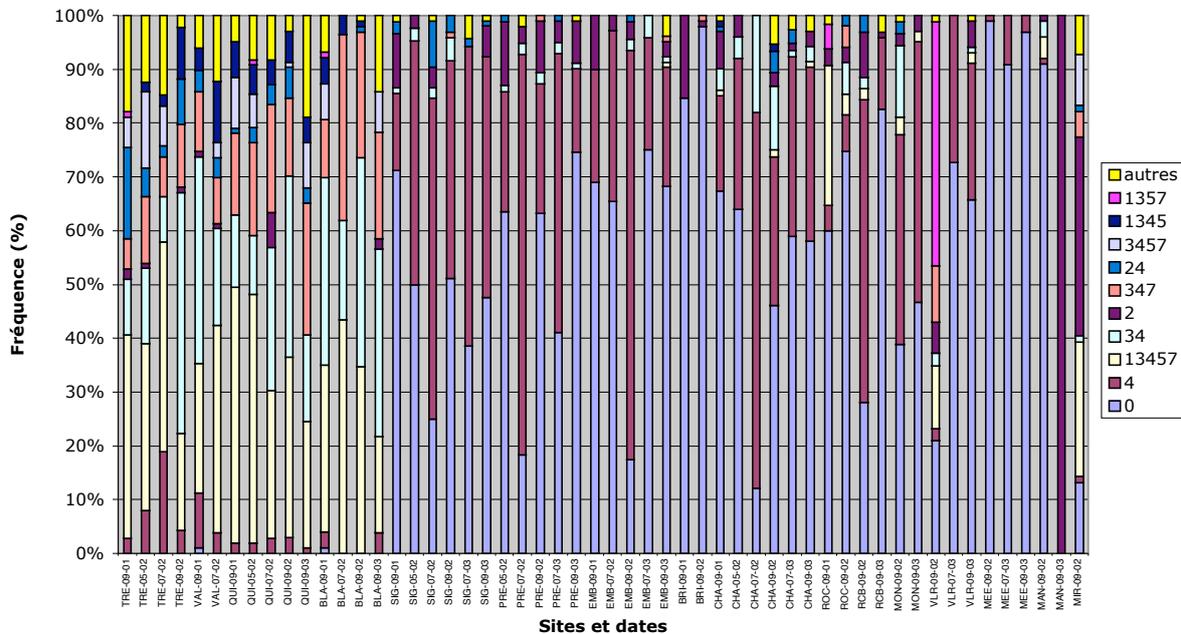


Figure 8 : Fréquence des 10 principaux pathotypes dans les 54 populations étudiées entre 2001 et 2003. La catégorie "autres" regroupe les pathotypes dont la fréquence est inférieure à 5% dans toutes les populations. Les codes des sites sont explicités dans le tableau II.

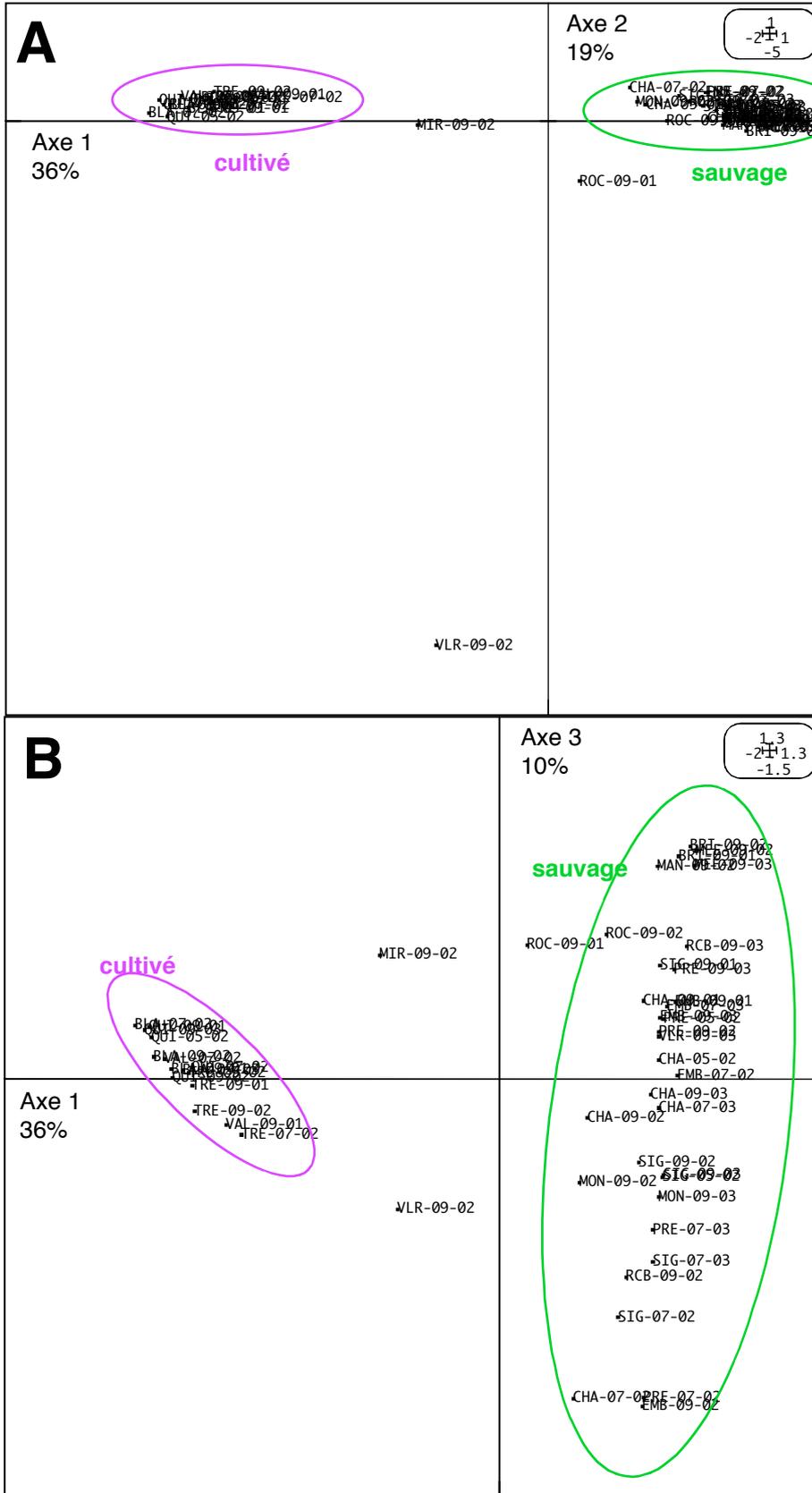


Figure 9 : AFC sur les fréquences des pathotypes dans les 51 populations étudiées entre 2001 et 2003. **A** : plan défini par les axes 1 et 2, **B** : plan défini par les axes 1 et 3. Les codes des sites sont explicités dans le tableau II.

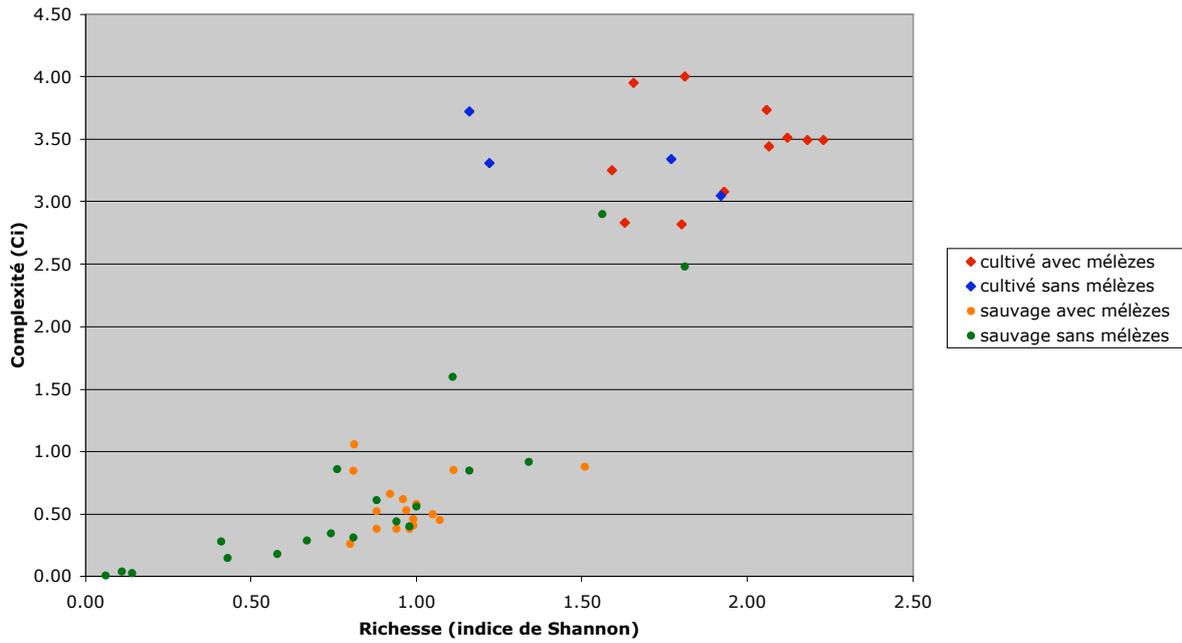


Figure 10 : Répartition des 51 populations étudiées entre 2001 et 2003 selon leur richesse (indice de Shannon) et leur complexité.

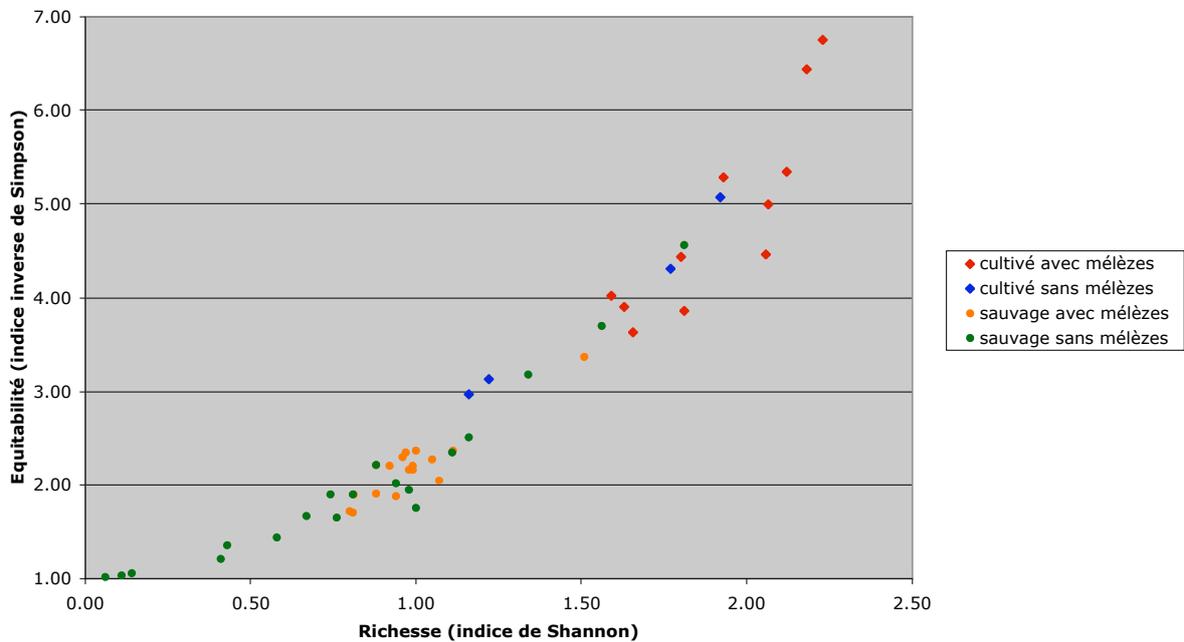


Figure 11 : Répartition des 51 populations étudiées entre 2001 et 2003 selon leur richesse (indice de Shannon) et leur équitabilité (indice inverse de Simpson).

Tableau IV : Différenciation dans l'espace : indice de différenciation phénotypique (indice de Rogers) calculé sur les fréquences des pathotypes pour chaque paire de populations, pour les 9 populations de septembre 2001. En jaune, les valeurs entre deux populations du compartiment cultivé, en bleu, les valeurs entre deux populations du compartiment sauvage, et en vert, les valeurs entre une population du compartiment cultivé et une population du compartiment sauvage.

| | La Quincy | St Vallier | Le Tremblois | La Rochette | Champoléon | Embrun | Siguret | La Brillanne |
|--------------|-----------|------------|--------------|-------------|------------|--------|---------|--------------|
| Blanzy | 0.30 | 0.21 | 0.39 | 0.69 | 0.90 | 0.96 | 0.94 | 0.99 |
| La Quincy | | 0.44 | 0.36 | 0.72 | 0.90 | 0.98 | 0.96 | 1.00 |
| St Vallier | | | 0.48 | 0.69 | 0.81 | 0.88 | 0.85 | 0.98 |
| Le Tremblois | | | | 0.68 | 0.89 | 0.95 | 0.91 | 0.98 |
| La Rochette | | | | | 0.31 | 0.32 | 0.32 | 0.37 |
| Champoléon | | | | | | 0.08 | 0.09 | 0.26 |
| Embrun | | | | | | | 0.07 | 0.21 |
| Siguret | | | | | | | | 0.19 |

Tableau V : Différenciation dans le temps : indice de différenciation phénotypique (indice de Rogers) calculé sur les fréquences des pathotypes pour chaque paire de populations, pour les 51 populations de 2001 à 2003. En vert, les valeurs calculées entre deux dates de récolte successives, en jaune, les valeurs calculées entre deux années successives. La significativité a été testée par un test du χ^2 sur les fréquences des pathotypes (NS : non significatif ; * P < 0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001).

| | sep-01 mai-02 | mai-02 juil-02 | juil-02 sep-02 | sep-02 juil-03 | juil-03 sep-03 | sep-01 juil-02 | sep-01 sep-02 | sep-02 sep-03 |
|--------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| La Quincy | 0.11 NS | 0.33 *** | 0.2 * | | | 0.36 *** | 0.29 *** | 0.35 *** |
| Blanzy | | | 0.22 ** | | | 0.36 *** | 0.22 *** | 0.27 *** |
| Le Tremblois | 0.3 * | 0.27 NS | 0.56 *** | | | 0.31 *** | 0.52 *** | |
| Champoléon | 0.1 NS | 0.56 *** | 0.49 *** | 0.2 NS | 0.53 NS | 0.65 *** | 0.26 NS | 0.18 * |
| Prelles | | 0.55 *** | 0.52 *** | 0.29 ** | 0.38 *** | | | 0.12 NS |
| Siguret | 0.32 *** | 0.26 *** | 0.29 *** | 0.19 * | 0.15 * | 0.53 *** | 0.31 *** | 0.11 ** |
| Embrun | | | 0.48 *** | 0.6 *** | 0.1 * | 0.11 * | | 0.57 *** |
| Rochebrune | | | | | | | | 0.57 *** |
| Monetier | | | | | | | | 0.18 *** |
| Valernes | | | | | | | | 0.69 *** |
| Les Mées | | | | | | | | 0.02 NS |
| La Brillanne | | | | | | | 0.14 *** | |

Tableau VI : Hétérozygoties attendues de Nei (1978) estimée par la méthode de Lynch et Milligan (1994) au sein des 9 populations de septembre 2001 analysées à l'aide de marqueurs RAPD.

| Population | Blanzy | La Quincy | St Vallier | Le Tremblois | |
|------------|-------------|------------|------------|--------------|--------------|
| H | 0,379 | 0,394 | 0,321 | 0,335 | |
| Population | La Rochette | Champoléon | Embrun | Siguret | La Brillanne |
| H | 0,328 | 0,347 | 0,344 | 0,370 | 0,289 |

Tableau VII : Distances génétiques non biaisées de Nei (1978) entre chaque paire de populations, estimées par la méthode de Lynch et Milligan (1994) pour les 9 populations de septembre 2001 analysées à l'aide de marqueurs RAPD. En jaune, les distances entre deux populations du compartiment cultivé, en bleu, les distances entre deux populations du compartiment sauvage, et en vert, les distances entre une population du compartiment cultivé et une population du compartiment sauvage.

| | La Quincy | St Vallier | Le Tremblois | La Rochette | Champoléon | Embrun | Siguret | La Brillanne |
|--------------|-----------|------------|--------------|-------------|------------|--------|---------|--------------|
| Blanzly | 0,011 | 0,053 | 0,043 | 0,028 | 0,012 | 0,036 | 0,018 | 0,055 |
| La Quincy | | 0,046 | 0,032 | 0,057 | 0,018 | 0,027 | 0,022 | 0,074 |
| St Vallier | | | 0,009 | 0,087 | 0,030 | 0,032 | 0,066 | 0,092 |
| Le Tremblois | | | | 0,084 | 0,029 | 0,032 | 0,062 | 0,094 |
| La Rochette | | | | | 0,053 | 0,093 | 0,072 | 0,051 |
| Champoléon | | | | | | 0,021 | 0,021 | 0,048 |
| Embrun | | | | | | | 0,019 | 0,067 |
| Siguret | | | | | | | | 0,055 |

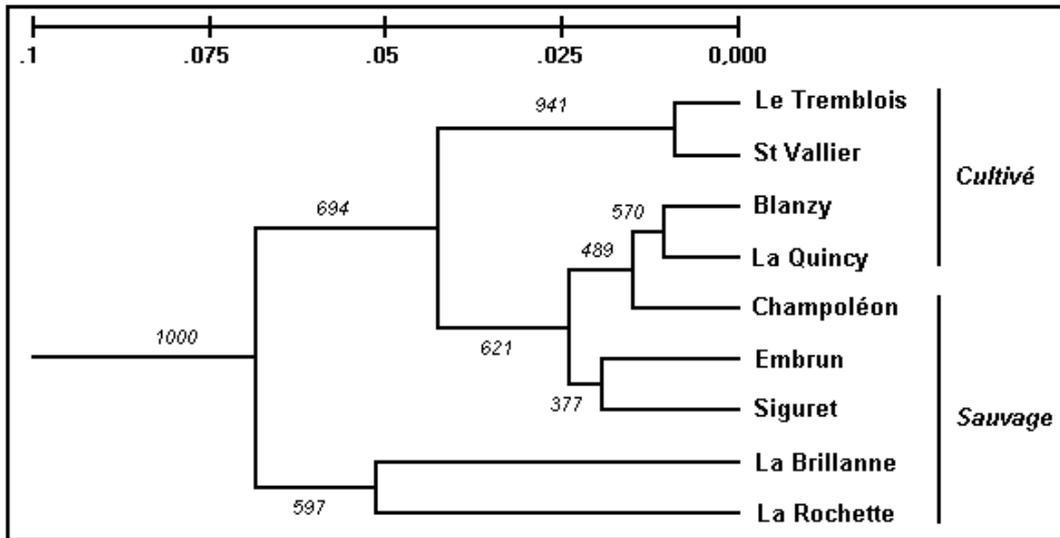


Figure 12 : Dendrogramme construit par la méthode UPGMA à partir des distances génétiques non biaisées de Nei (1978) entre les 9 populations de septembre 2001 analysées à l'aide de marqueurs RAPD. Les nombres sur les branches représentent le nombre de réplifications de bootstrap parmi 1000 testées sur tous les loci.

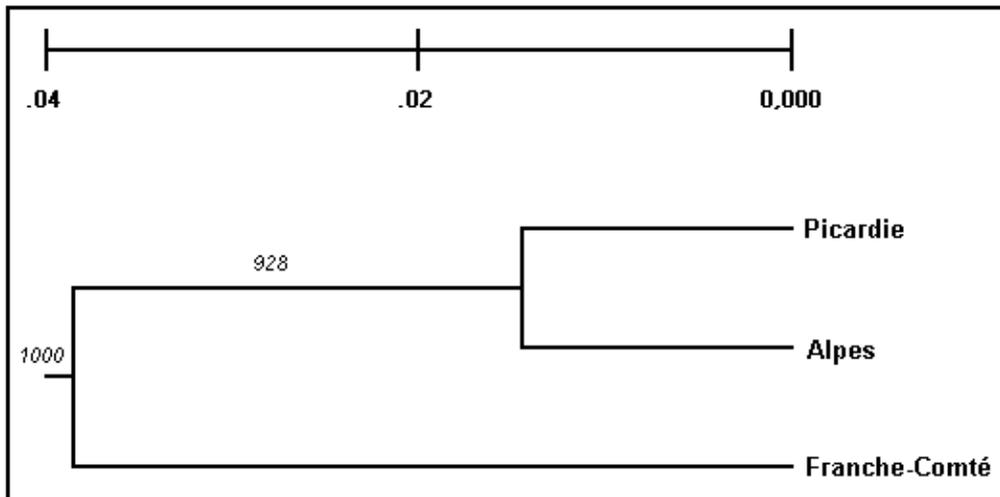


Figure 13 : Dendrogramme construit par la méthode UPGMA à partir des distances génétiques non biaisées de Nei (1978) entre les 9 populations de septembre 2001, regroupées en trois régions. Les nombres sur les branches représentent le nombre de réplifications de bootstrap parmi 1000 testées sur tous les loci.

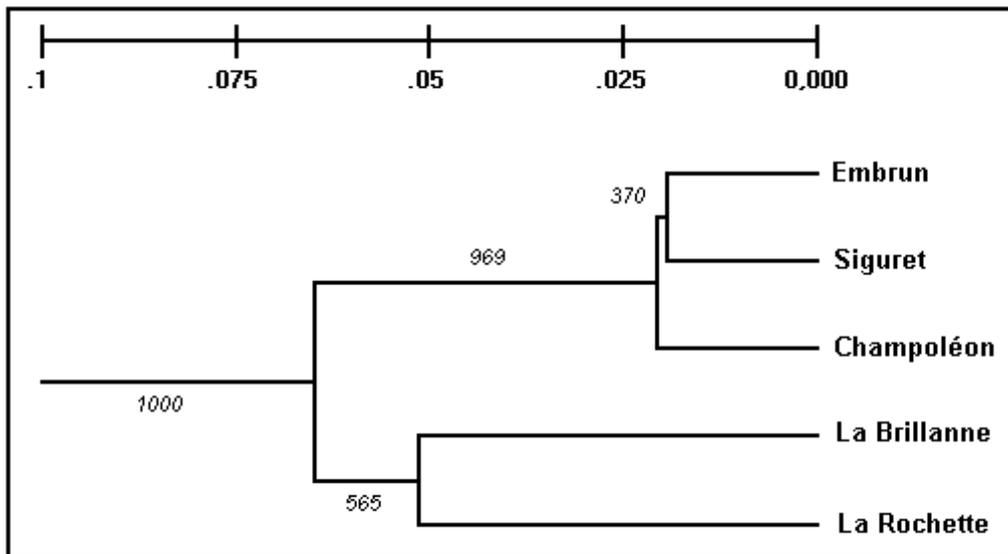


Figure 14 : Dendrogramme construit par la méthode UPGMA à partir des distances génétiques non biaisées de Nei (1978) entre les cinq populations alpines de septembre 2001. Les nombres sur les branches représentent le nombre de réplifications de bootstrap parmi 1000 testées sur tous les loci.

Tableau VIII: Analyse spatiale hiérarchisée de la différenciation entre les populations de septembre 2001 analysées à l'aide de marqueurs RAPD (F_{ST} de Weir et Cockerham, 1984).

| | N ^a | $F_{ST} \pm SE^b$ |
|---------------------------------|----------------|-----------------------|
| Ensemble des populations | 9 | 0,078 \pm 0,013 *** |
| Trois régions | 3 | 0,048 \pm 0,012 *** |
| Franche-Comté | 2 | 0,018 \pm 0,005 * |
| Picardie | 2 | 0,016 \pm 0,008 ** |
| Alpes | 5 | 0,088 \pm 0,020 *** |
| Compartiments sauvage / cultivé | 2 | 0,024 \pm 0,007 *** |

^anombre de populations analysées^berreur standard calculée par jackknifing

Significativité □ * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

Tableau IX : Tests de non-association au hasard des phénotypes RAPD au sein de chaque population de septembre 2001 et indices d'association.

| Population | Blanzay | La Quincy | St Vallier | Le Tremblois | |
|---|-------------|------------|------------|--------------|--------------|
| % déséquilibres de liaison significatifs ^a | 9,8% | 18,1% | 4,4% | 8,8% | |
| I_A^b | 0,438 | 0,533 | 0,242 | 0,459 | |
| I_{Acorr}^c | 0,402 | 0,432 | 0,182 | 0,219 | |
| $I_{Acorr}^S^d$ | 0,031 | 0,031 | 0,015 | 0,020 | |
| Population | La Rochette | Champoléon | Embrun | Siguret | La Brillanne |
| % déséquilibres de liaison significatifs | 14,3% | 5,1% | 8,5% | 8,5% | 14,0% |
| I_A | 0,677 | 0,402 | 0,237 | 0,200 | 0,881 |
| I_{Acorr} | 0,427 | 0,275 | 0,186 | 0,146 | 0,169 |
| I_{Acorr}^S | 0,039 | 0,020 | 0,014 | 0,011 | 0,019 |

^aSignificativité déterminée par un test exact de Fisher (P < 0.05)^bindice d'association calculé sur tous les loci^cindice d'association calculé sur les loci dont la fréquence de chaque marqueur est comprise entre 0,1 et 0,9^dindice d'association standardisé par rapport au nombre de loci analysés.

