



**HAL**  
open science

# Impact des sources de résistance variétale sur l'évolution du pouvoir pathogène des populations d'Aphanomyces euteiches dans des successions culturales de légumineuses

Théo Leprévost

## ► To cite this version:

Théo Leprévost. Impact des sources de résistance variétale sur l'évolution du pouvoir pathogène des populations d'Aphanomyces euteiches dans des successions culturales de légumineuses. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02496518

**HAL Id: dumas-02496518**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02496518v1>

Submitted on 3 Mar 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



**Mémoire de stage**  
**Présenté pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome, option Inter-Etablissement**  
**Protection des Plantes et Environnement**

**Sur le thème**

**Impact des sources de résistance variétale sur l'évolution du pouvoir pathogène des populations d'*Aphanomyces euteiches* dans des successions culturales de légumineuses**

**Par**  
**Théo LEPREVOST**  
**Ecole de rattachement : Agrocampus Ouest**

**Stage réalisé à : INRA – UMR IGEPP**  
**Domaine de la Motte**  
**35653 LE RHEU Cedex**

**Sous la Direction de :**  
**Marie-Laure PILET-NAYEL**  
**Christophe LE MAY**

**Soutenu le 25 septembre 2019 à Montpellier, devant le jury composé de :**

**Président: Ivan SACHE**  
**Membres: Claire NEEMA**  
**Emmanuel WICKER**



UNION EUROPÉENNE  
UNANIEZH EUROPA



**L'Europe s'engage  
en Bretagne** / Avec le Fonds européen agricole pour le développement rural :  
l'Europe investit dans les zones rurales



CE PROJET EST COFINANCÉ PAR LE FONDS EUROPÉEN AGRICOLE  
POUR LE DÉVELOPPEMENT RURAL. L'EUROPE INVESTIT DANS LES ZONES RURALES

## Remerciements

---

Ce rapport de stage de fin d'études vient clôturer ma formation d'ingénieur agronome spécialisé en Protection des Plantes et Environnement. Ce travail a été mené dans le cadre du projet PROGRAILIVE, co-financé par l'Union européenne ainsi que les régions Bretagne et Pays de la Loire, que je souhaite remercier. Je tiens, de plus, à remercier mes encadrants Marie-Laure Pilet-Nayel et Christophe Le May pour leur confiance, leur disponibilité et leur bienveillance au cours de ces 6 mois de stage à l'UMR IGEPP. Je souhaite également remercier Gwenola Le Roy et Jean-Philippe Rivière pour leur sympathie, leur aide et leur implication pendant les différentes manipulations au laboratoire et aussi au champ. Effectuer des études supérieures est un privilège et en offrir la possibilité implique des sacrifices. Je souhaite donc remercier mes parents, ma sœur et mes grands-parents pour leur soutien sans faille.

## Table des matières

---

<b>I.</b>	<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Introduction bibliographique</b> .....	<b>3</b>
II.1	Description du pathosystème <i>Pisum sativum</i> – <i>Aphanomyces euteiches</i> .....	3
II.2	QTL de résistance à <i>A. euteiches</i> chez le pois.....	6
II.3	Risque de contournement des QTL de résistance par les populations d' <i>A. euteiches</i> .....	8
II.4	Stratégie de recherche déployée au cours du stage.....	9
<b>III.</b>	<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>10</b>
III.1	Dispositif d'évolution expérimentale au champ.....	10
III.2	Test de potentiel infectieux en conditions contrôlées et prélèvement d'isolats d' <i>A. euteiches</i> .....	11
III.3	Diagnostic moléculaire des isolats d' <i>A. euteiches</i> .....	12
III.4	Test d'agressivité des isolats d' <i>A. euteiches</i> sur pois en conditions contrôlées.....	13
III.5	Analyses statistiques des données.....	15
<b>IV.</b>	<b>Résultats</b> .....	<b>17</b>
IV.1	Evolution du PI dans différentes modalités de successions au champ entre 2016 et 2019.....	17
IV.2	Evolution de l'agressivité des isolats d' <i>A. euteiches</i> après 4 ans de monoculture d'une NIL de pois porteuse de QTL de résistance.....	18
<b>V.</b>	<b>Discussion</b> .....	<b>21</b>
V.1	Méthodologie et dispositif de test.....	21
V.2	Effet du niveau de résistance chez le pois et de l'usage de la féverole en rotation pour limiter le potentiel infectieux du sol.....	21
V.3	Evolution de l'agressivité des isolats d' <i>A. euteiches</i> dans une succession de la NIL A en monoculture.....	23
<b>VI.</b>	<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>24</b>
	<b>Bibliographie</b> .....	
	<b>Annexes</b> .....	
	<b>Résumé</b> .....	



## Liste des abréviations

---

**BAM** : Back-cross Assisté par Marqueur

**CLMM** : Cumulative Link Mixed Model

**CMA** : Corn Meal Agar

**GSP** : Groupement des Sélectionneurs de Protéagineux

**IDA** : Indice de Dépérissement Aérien

**INR** : Indice de Nécrose Racinaire

**INRA** : Institut National de la Recherche Agronomique

**MAR** : Missing at Random

**NILs** : Near-Isogenic Lines

**OGM** : Organisme Génétiquement Modifié

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PFC** : Proportion of Falsely Classified entries

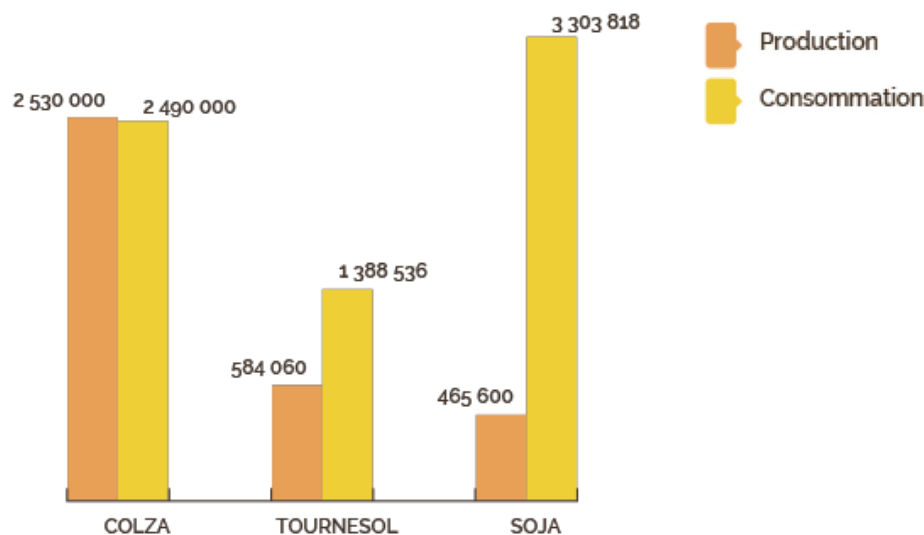
**PG** : Peptone Glucose

**PI** : Potentiel Infectieux

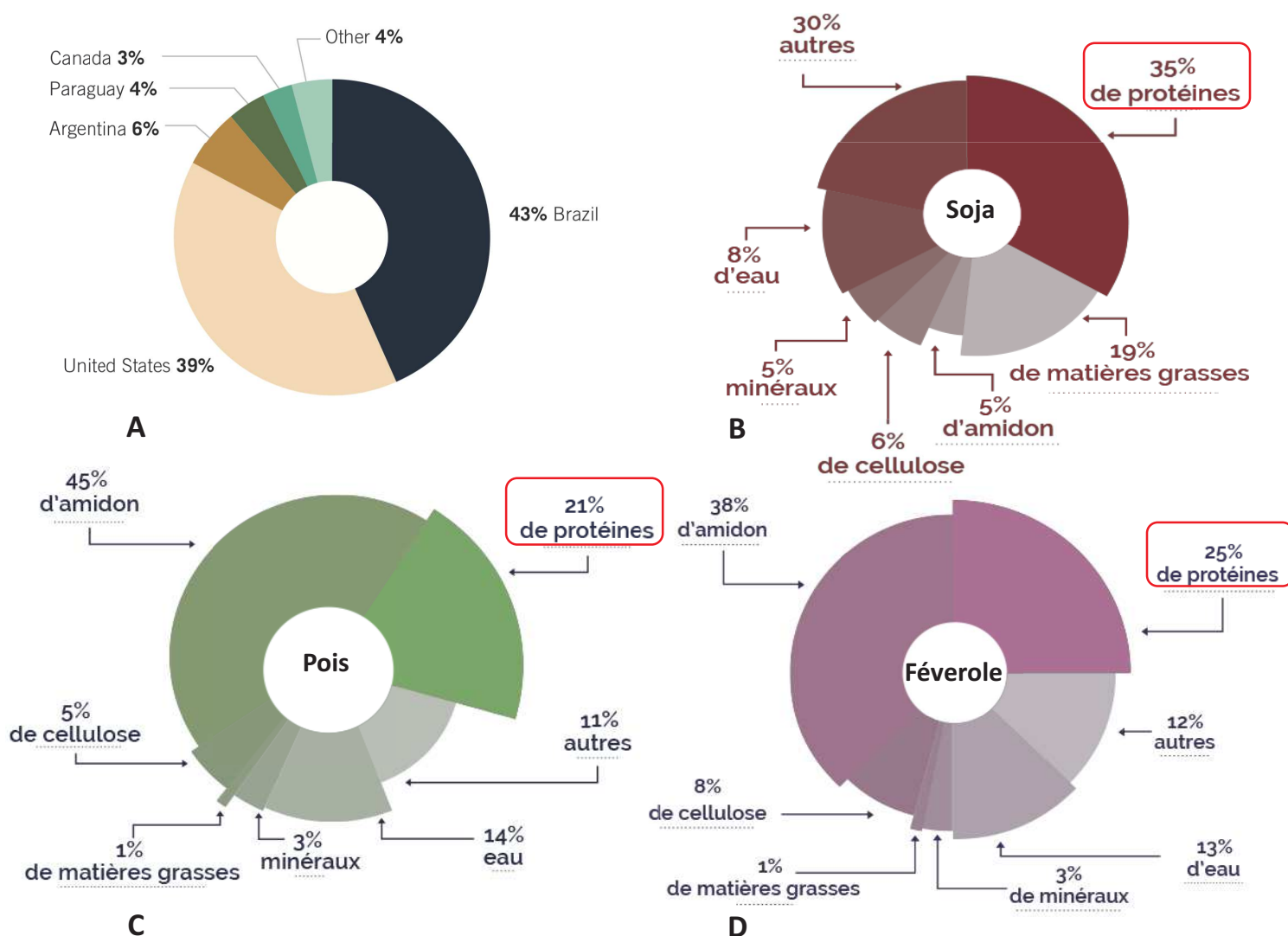
**QTL** : Quantitative Trait Locus

**RILs** : Recombinant Inbred Lines

**UNIP** : Union Nationale Interprofessionnelle des plantes riches en Protéines



**Figure 1 :** Production et consommation en tonnes de tourteaux en France (années 2012/2013).  
Source : modifiée d'après Terres Univia<sup>1</sup>.



**Figure 2 :** Origine des importations des graines de soja et valeur zootechnique de la féverole, du pois et du soja. **A.** Principaux pays exportateurs de graines de soja en 2016. Source : [Soystats, 2017<sup>2</sup>](#). **B.** Composition moyenne de la graine de soja<sup>3</sup>. **C.** Composition moyenne de la graine de pois<sup>4</sup>. **D.** Composition moyenne de la graine de féverole<sup>4</sup>. Source : modifiée d'après Terres Univia

<sup>1</sup> Terres Univia. Tourteaux d'oléagineux. [En ligne] Disponible sur : <http://www.terresunivia.fr/produitsdebouches/alimentation-animale/tourteaux-d-oleagineux> (consultée le 29 avril 2019)

<sup>2</sup> Soystats. (2017). A reference guide to important soybean facts and figures. American Soybean Association. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.agri-pulse.com/ext/resources/AgSummit/2017-SoyStats.pdf> (consultée le 16 mai 2019).

<sup>3</sup> Terres Univia. Soja. [En ligne] Disponible sur : <http://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees/soja> (consultée le 29 avril 2019).

<sup>4</sup> Terres Univia. Protéagineux. [En ligne] Disponible sur : <http://www.terresunivia.fr/produitsdebouches/alimentation-animale/protéagineux> (consultée le 29 avril 2019).

## Introduction générale

---

La France subit une dépendance par rapport aux approvisionnements agricoles mondiaux et plus particulièrement vis-à-vis des tourteaux de soja importés afin de composer les rations alimentaires en protéines des élevages nationaux (Dronne, 2003 ; Figure 1). Les principaux pays producteurs de soja (*Glycine max*) à l'échelle mondiale sont le Brésil et les Etats-Unis, partageant à eux deux 82% des exportations mondiales de graines en 2017 (Figure 2.A) et assumant un mode de production divergeant des réglementations européennes que ce soit en termes d'usage d'intrants ou d'utilisation d'Organisme Génétiquement Modifié (OGM). Face à cette dépendance en matières protéiques importées, le plan d'action, « SOS PROTEIN »<sup>1</sup>, soutenu par l'Union européenne, a été développé par les régions Bretagne et Pays de la Loire pour plus d'autonomie dans les élevages de l'Ouest. Ce programme se divise en 4 projets (4AGEPROD, DY+, PROGRAILIVE et TERUnic), ce travail de stage de fin d'études s'inscrivant dans le projet PROGRAILIVE (PROduction protein GRAin for LIVEstock)<sup>2</sup>, projet visant à sécuriser les cultures de pois, lupin et féverole.

La composition moyenne en protéines des graines du pois protéagineux (*Pisum sativum*) et de la féverole (*Vicia Faba*) est respectivement de 21 % et 25%, ceci représentant une valeur alimentaire élevée et un potentiel zootechnique pouvant concurrencer les graines de soja, composées en moyenne de 35% de protéines (Figure 2.B.C.D). Le pois et la féverole possèdent de plus des caractéristiques agronomiques avantageuses (i) en tant que source de diversification des assolements au sein des rotations favorisant la régulation des bioagresseurs des cultures, par exemple en facilitant l'établissement d'auxiliaires des cultures, et en limitant l'usage de produits phytosanitaires, (ii) en tant qu'espèces capables de fixer l'azote atmosphérique grâce à leur interaction avec des bactéries symbiotiques au sein de nodosités racinaires, ceci permettant de réduire les intrants azotés industriels à l'échelle des systèmes de culture (Schneider et Huygue, 2015).

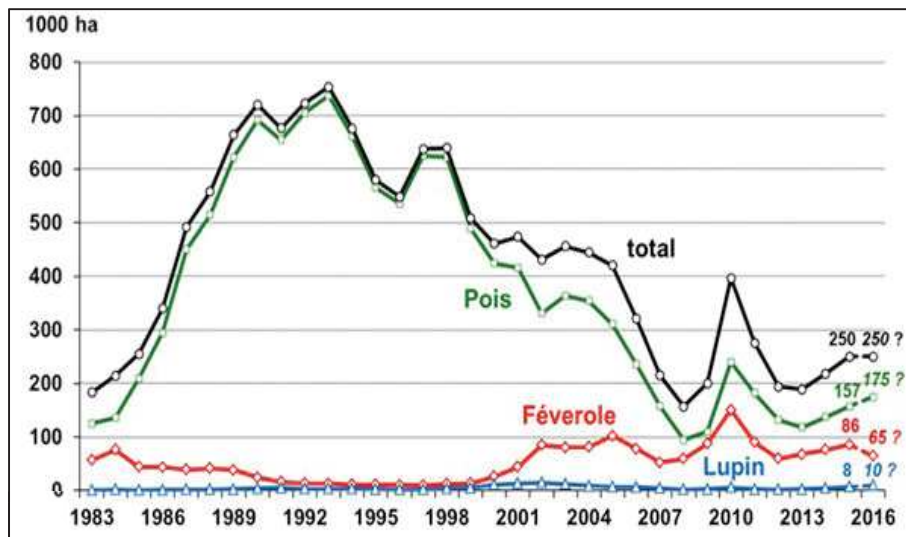
Dans les années 1980-1990, les surfaces cultivées de pois protéagineux ont augmenté considérablement en France, passant de 150 000 ha à plus de 700 000 ha (Figure 3.A). Cependant, l'instabilité inter-annuelle des rendements due à des contraintes biotiques et abiotiques a constitué une contrainte majeure pour les agriculteurs (Figure 3.B), engendrant la chute des surfaces cultivées et de la production de pois en France (Figure 3.C), ayant atteint respectivement 167 100 ha et 589 000 tonnes au 1<sup>er</sup> mai 2019<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Vegepolys. Plaquette de présentation du programme SOS PROTEIN. [En ligne] Disponible sur : <https://www.vegepolys.eu/les-projets-innovants/les-projets-precompetitifs/les-projets-en-cours/sos-protein/> (consultée le 28 mai 2019).

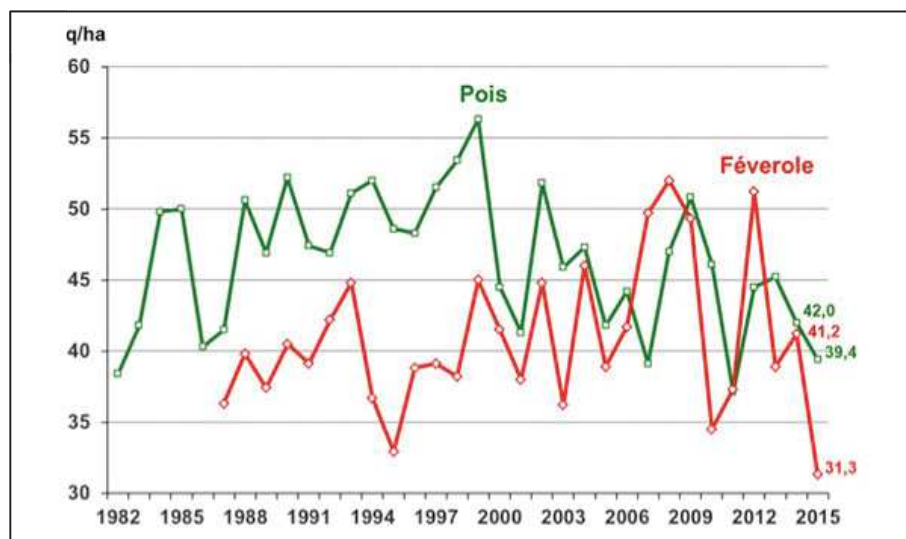
<sup>2</sup>Vegenov. Plaquette de présentation PROGRAILIVE. [En ligne] Disponible sur : <https://www.vegenov.com/vars/fichiers/Plaquette%20PROGRAILIVE-1.pdf> (consultée le 28 mai 2019).

<sup>3</sup>Agreste. Données de production Grandes Cultures (national + régions) au 01/06/2019. [En ligne] Disponible sur <http://agreste.agriculture.gouv.fr/conjoncture/grandes-cultures-et-fourrages/> (consultée le 11 juin 2019).

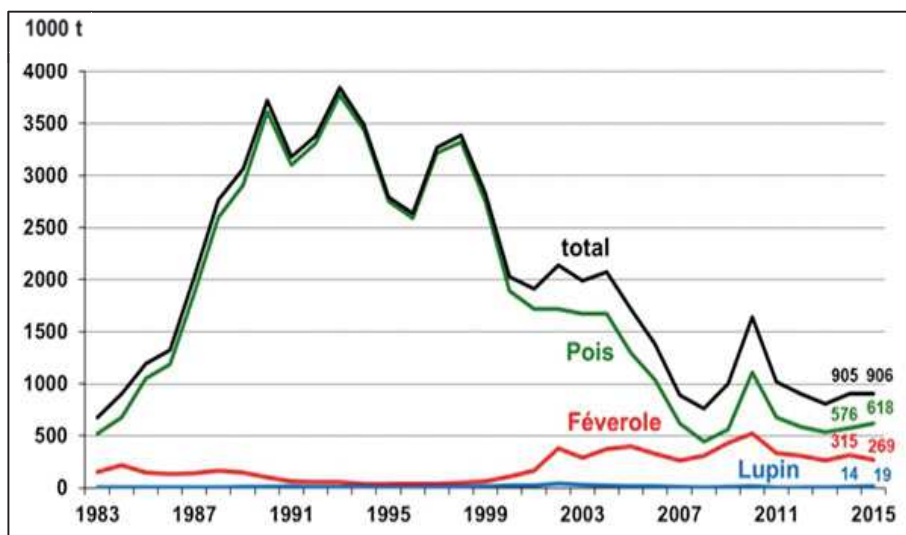




A



B



C

**Figure 3** : Évolution des cultures de protéagineux en France. Source : [Terres Univia](http://www.terresuniviva.fr)<sup>1</sup>. **A.** Surface de protéagineux en France de 1983 à 2016. **B.** Instabilité des rendements de pois et de féverole en France de 1982 à 2015. **C.** Production de protéagineux en France de 1983 à 2015.

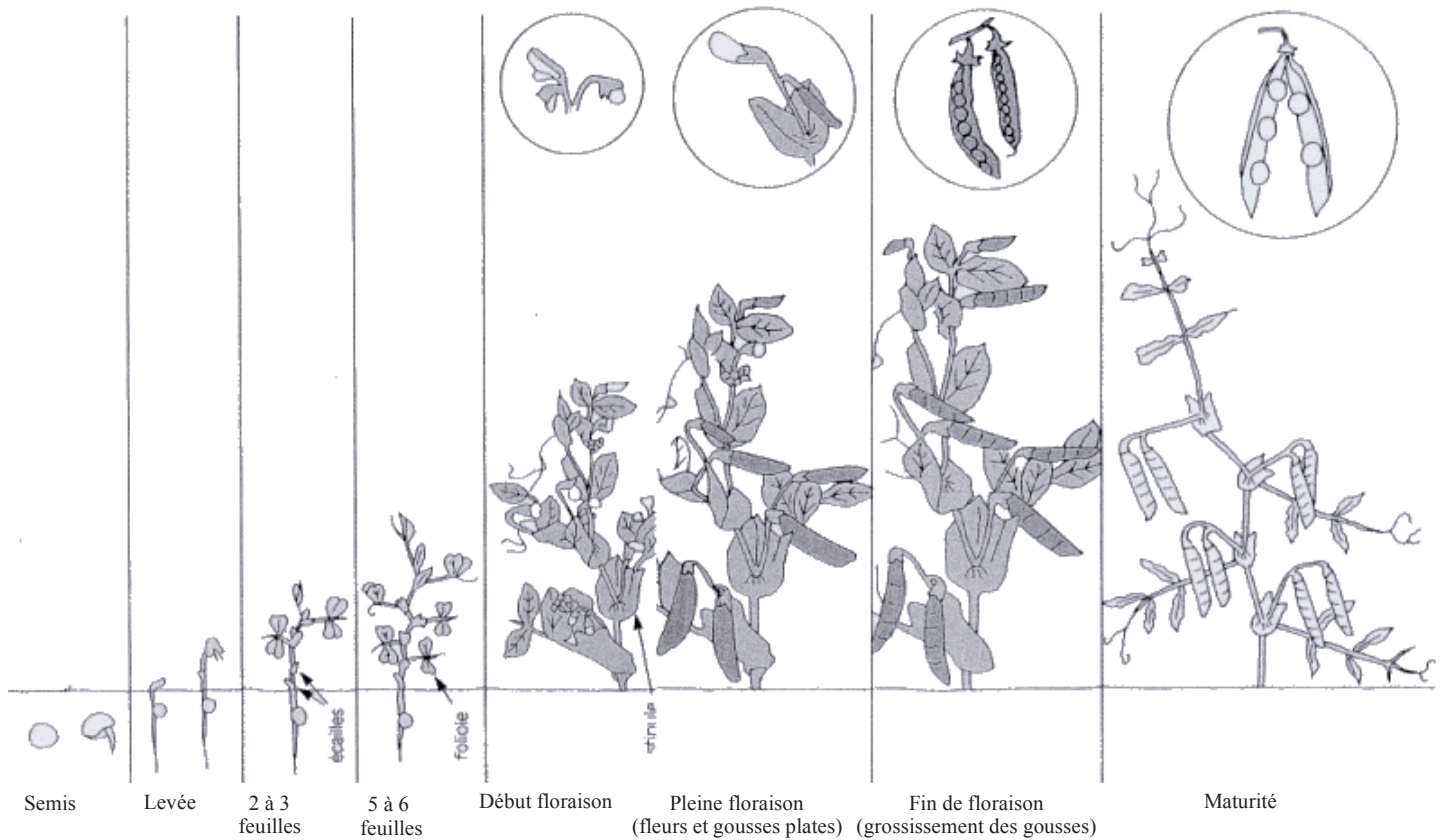
<sup>1</sup>Terres Univia. Surfaces, rendements, productions et débouchés. [En ligne]. Disponible sur : <http://www.terresuniviva.fr/reglementation-marches/statistiques/surfaces-rendements-et-productions> (consultée le 29 avril 2019).

La pourriture racinaire molle du pois causée par l'oomycète *Aphanomyces euteiches* est considérée actuellement comme la maladie tellurique la plus préjudiciable sur culture de pois. En cas de forte pression, les dommages occasionnés peuvent engendrer la perte totale d'une parcelle. Actuellement, aucune solution de lutte n'est disponible (Moussart et al., 2018). L'utilisation de sources de résistance génétique au sein de nouveaux cultivars est la solution considérée comme la plus prometteuse actuellement. Des locus de résistance quantitative (ou QTL, Quantitative Trait Locus) ont été déterminés, introgressés et validés dans des NILs (Near-Isogenic Lines) de pois ces 15 dernières années (Hamon, 2010 ; Lavaud, 2015).

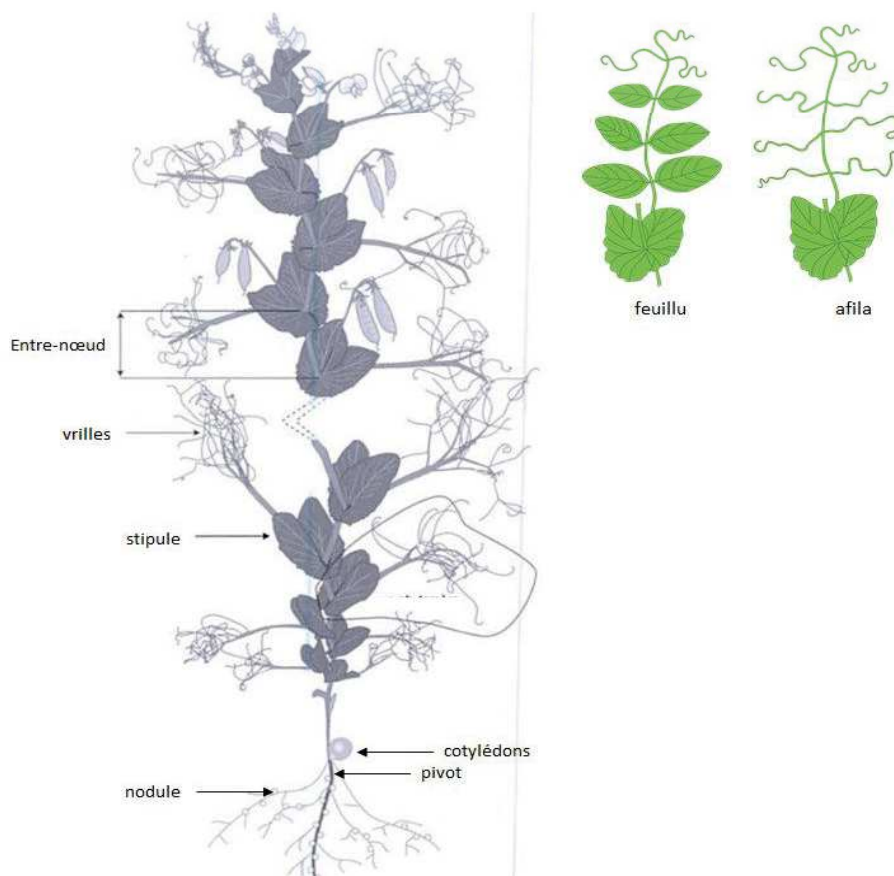
Une résistance est dite durable si elle reste effective dans des variétés cultivées sur de larges surfaces durant une longue période dans un environnement favorisant l'apparition de la maladie (Johnson, 1981). La pathogénicité est la capacité d'un agent pathogène à causer une maladie chez son hôte et donc à affecter la durabilité d'une résistance (Agrios, 2005). La pathogénicité comprend deux caractéristiques principales : la virulence qui est la capacité d'un agent pathogène à induire une réponse de sensibilité chez une plante et l'agressivité qui correspond à une variation quantitative observée sur la plante hôte sensible (Parlevliet, 2002). Des modifications majeures de structure populationnelle d'un agent pathogène peuvent être liées à la sélection de souches agressives menant à l'érosion d'une nouvelle source de résistance (Pariaud et al., 2009). À ce jour, les capacités d'évolution des populations d'*A. euteiches* restent peu documentées (Le May et al., 2017). De même, peu de connaissances sont actuellement disponibles sur les capacités d'évolution des agents pathogènes telluriques comparées aux agents pathogènes aériens. Les résistances quantitatives, le plus souvent à efficacité partielle et contrôlées par des QTL à effets variables, sont considérées comme plus durables que les résistances qualitatives, contrôlées par des gènes majeurs à forts effets (Parlevliet, 2002). Cependant, dans certains pathosystèmes, des sources de résistance quantitative ont déjà été « érodées » par les populations d'agents pathogènes (Do Vale et al., 2001). Il est donc crucial d'étudier les capacités d'évolution des populations d'*A. euteiches* sous pression de sélection exercée par des sources de résistance quantitative, afin d'anticiper le déploiement durable des QTL dans des nouveaux cultivars et ainsi de faciliter le retour du pois dans les assolements français.

Fin janvier  
-  
Mi-mars

Juillet  
-  
Août



**Figure 4 :** Cycle de développement de la culture de pois de printemps. Source : [modifiée d'après Boyeldieu, 1991](#).



**Figure 5 :** Organisation d'une plante de pois. Source : [Lecoeur, 2005](#).

## Introduction bibliographique

---

### II.1 Description du pathosystème *Pisum sativum* – *Aphanomyces euteiches*

#### II.1.a Le pois *P. sativum*

Le pois, *Pisum sativum*, est une plante annuelle autogame de la famille des Fabaceae, qui est cultivée en France afin de compléter en protéines les rations alimentaires du bétail. Elle est aussi consommée sous forme de légume vert pour l'alimentation humaine (Munier-Jolain et al., 2005). Le pois est majoritairement produit sous forme de pois de printemps, avec environ 80% des surfaces françaises cultivées en 2015 contre 20% pour le pois d'hiver (Schneider et Huyghe, 2015). Dans l'Ouest de la France, le pois de printemps est semé entre fin janvier et mi-mars, et la récolte s'effectue au cours de l'été (Figure 4). D'après une évaluation nationale de Terres Inovia sur l'année 2018, le rendement moyen des variétés cultivées à graines jaunes a été de 44,4 q/ha.

Les progrès concernant l'amélioration génétique du pois ont débuté en 1980 (Schneider et Huyghe, 2015). Le travail de sélection a été limité par la taille élevée du génome de la plante ( $2n=14$ ), estimée entre 3 947 et 4 397 Mpb pour un génome haploïde, ainsi que par la dominance d'éléments répétés, représentant environ 85% du génome (Gali et al., 2019). Actuellement, toutes variétés de pois inscrites au catalogue national possèdent les caractères « afile » (transformation des folioles en vrilles) et fleurs blanches (graines sans tanin) (Figure 5). Durant les 20 dernières années, les travaux de sélection génétique ont permis d'améliorer la tenue de la tige, afin d'éviter les problèmes de verse, mais n'ont pas permis d'améliorer suffisamment la résistance face aux facteurs biotiques tels que les maladies cryptogamiques (Schneider et Huyghe, 2015). Néanmoins, la large diversité génétique et phénotypique existant chez l'espèce *P. sativum* a permis d'identifier des sources de résistance aux principales maladies, spécialement la maladie de la pourriture racinaire molle due à *A. euteiches*.

#### II.1.b L'agent pathogène *A. euteiches*

*Aphanomyces euteiches* Drechs. est un oomycète de la famille des Saprolegniaceae décrit pour la première fois en 1925 par Jones et Drechsler dans l'État du Wisconsin aux Etats-Unis (Jones et Drechsler, 1925). L'agent pathogène est aujourd'hui présent dans divers pays producteurs de pois tels que l'Australie, les Etats-Unis, le Canada, le Japon, la France ou encore la Suède (Wicker, 2001). *A. euteiches* est capable d'infecter en milieu naturel plusieurs espèces de légumineuses, telles que le lupin (*Lupinus luteus*), la luzerne (*Medicago sativa*), le pois



**A**



**B**



**C**

**Figure 6 :** Dégâts primaires et secondaires causés par *A. euteiches* sur culture de pois. **A.** Racine saine (INR=0) et racine nécrosée (INR=5). Source : modifiée d'après Terres Inovia<sup>1</sup>. **B.** Culture saine (IDA=1). **C.** Chlorose aérienne (IDA=5). Source : INRA - Chambre d'Agriculture de Bretagne de Bignan (56).

INR : Indice de Nécrose Racinaire (symptômes primaires). Notes comprises entre 0 et 5. Plus la note est élevée et plus la nécrose racinaire est prononcée.

IDA : Indice de Dépérissement Aérien (symptômes secondaires). Notes comprises entre 1 et 8. Plus la note est élevée et plus la chlorose aérienne est prononcée.

<sup>1</sup>Terres Univia. *Aphanomyces* : vérifier le potentiel infectieux de la parcelle avant l'implantation du pois. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.terresinovia.fr/-/aphanomyces-verifier-le-potentiel-infectieux-de-la-parcelle-avant-l-implantation-du-pois> (consultée le 02 septembre 2019).

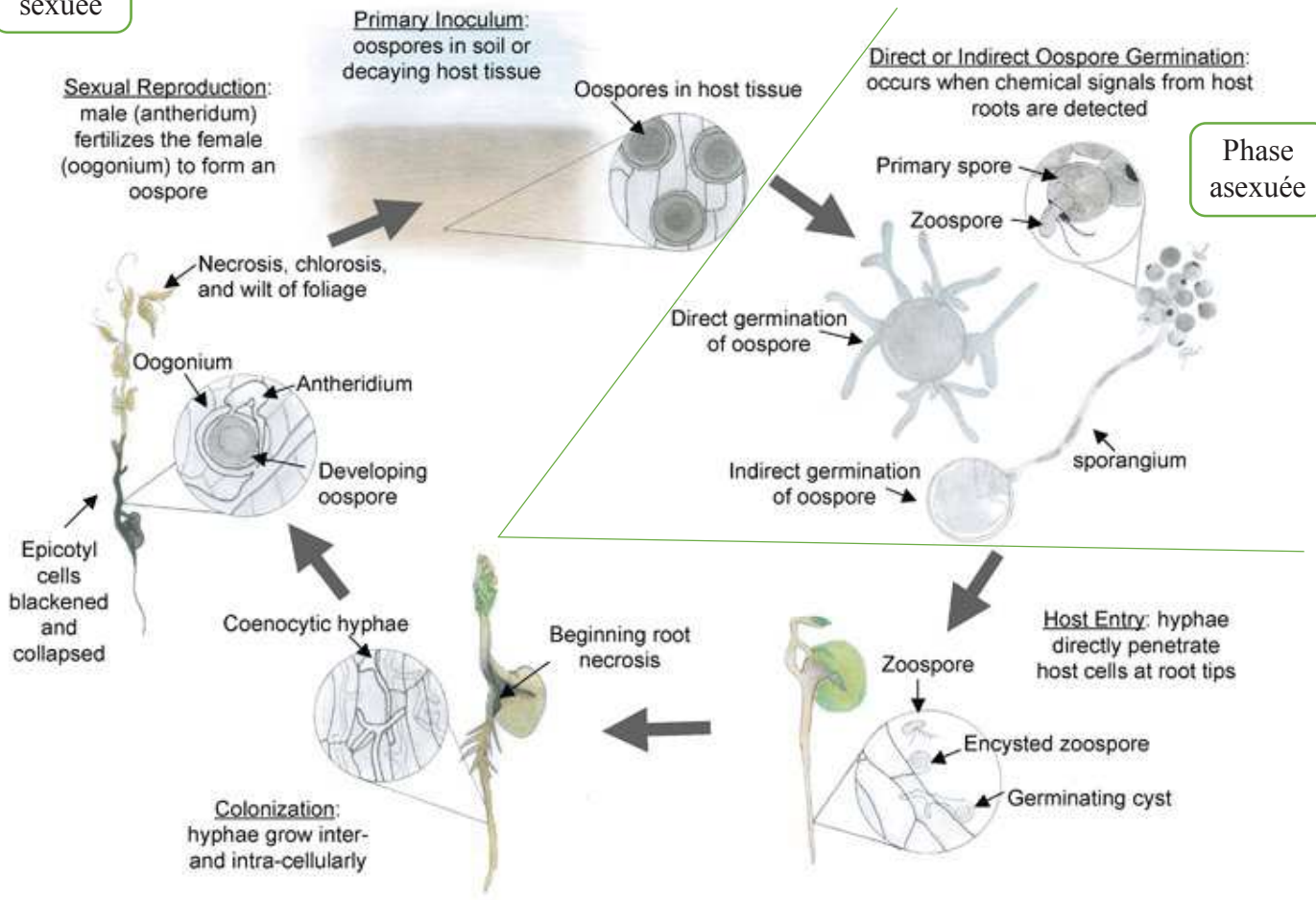
(*Pisum sativum*) ou encore la féverole (*Vicia faba*), identifiée plus récemment (Van Leur et al., 2008 ; Lavaud, 2015). Les dégâts primaires causés par *A. euteiches* sont une pourriture molle de l'appareil racinaire principal et secondaire caractérisée par une couleur allant du brun miel au marron foncé ainsi qu'un ramollissement de l'épicotyle. Les dégâts secondaires sont une chlorose aérienne accompagnée d'un flétrissement du feuillage et une diminution de la capacité de nutrition et de nodulation de la plante (Hughes et Grau, 2007 ; Figure 6). Les symptômes racinaires peuvent être confondus avec ceux causés par *Pythium* ou *Fusarium* (Gaulin et al., 2018). Des marqueurs moléculaires spécifiques d'*A. euteiches* permettent néanmoins d'affiner le diagnostic (Vandemark, 2000 ; Le May et al., 2017). Les dommages causés par la maladie sur la culture varient de 20 à 50 q/ha (Desgroux, 2016), conduisant à des pertes de récolte pouvant être totales. La pourriture racinaire molle est la maladie la plus dommageable sur culture de pois en France (Moussart et al., 2018).

*A. euteiches* est un agent pathogène homothallique capable de réaliser la reproduction asexuée (zoospores) et sexuée (formation d'oospores). La reproduction sexuée s'effectue à partir de la fécondation du gamétocyste femelle (l'oogone) par le gamétocyste mâle (l'anthéridie) au sein du même hyphe (Gaulin et al., 2007). Cependant, des inter-croisements entre hyphes de différentes souches peuvent être observés à faible fréquence au sein d'une même population. Bien que biotrophe dans sa colonisation des tissus vivants, l'agent pathogène réalise sa reproduction sexuée dans des tissus nécrosés (Figure 7). La dissémination est effectuée principalement par l'eau du sol, les zoospores pouvant se déplacer dans l'eau libre via leurs flagelles. Les racines de l'hôte sont reconnues par chimiotactisme par l'agent pathogène grâce aux exsudats racinaires produits à proximité. Les symptômes sont observables dans les 10 jours suivant l'infection, la plante est susceptible d'être attaquée à n'importe quel stade de son développement (Hughes et Grau, 2007).

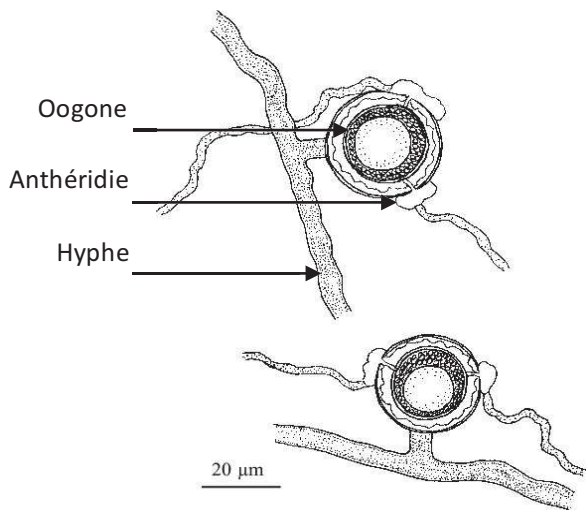
*A. euteiches* présente un large spectre d'hôte chez les légumineuses. Wicker et al., (2001) ont déterminé le phénotype de virulence de 91 isolats d'*A. euteiches* provenant de différentes régions françaises sur plusieurs légumineuses. La plupart des isolats ont été capables d'infecter le pois, la vesce, la luzerne et la féverole, avec des niveaux d'agressivité différents selon les hôtes (Wicker et al., 2001). Chez le pois, Wicker et Rouxel, (2001) ont observé deux pathotypes principaux après le test du pouvoir pathogène de 109 souches d'origine française et américaine sur une gamme différentielle de 6 génotypes, incluant (i) le pathotype I regroupant la totalité des souches françaises testées ainsi que des souches étrangères, (ii) le pathotype III regroupant spécifiquement des souches américaines (Wicker et Rouxel, 2001).

Phase  
sexuée

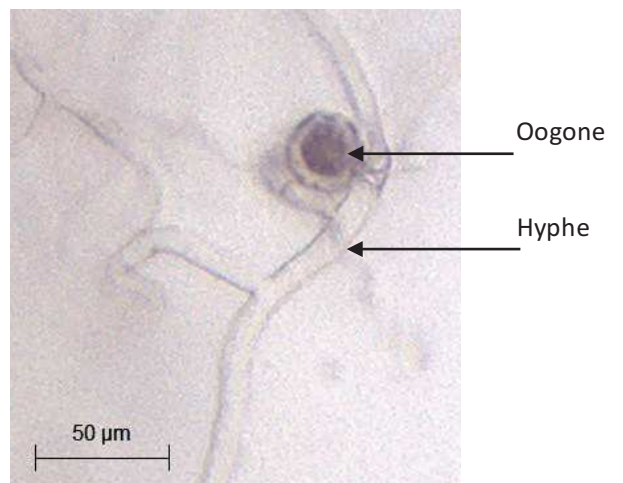
Phase  
asexuée



A



B



C

**Figure 7 :** Cycle de vie et organes de la reproduction sexuée de l'agent pathogène *A. euteiches*.  
**A.** Cycle infectieux d'*A. euteiches*. Source : modifiée d'après [Hugues et Grau, 2007](#). **B.** Gamètes mâles (anthéridie) et gamètes femelles (oogone). Source : modifiée d'après [Treigien et Markovskaja, 2007](#). **C.** Cliché d'*A. euteiches* pris à la loupe binoculaire après isolement de l'agent pathogène sur milieu CMA à partir de racines nécrosées de pois de printemps puis repiquage à nouveau sur milieu CMA. Source : [Production personnelle](#).

Plus récemment, une analyse de 205 isolats d'*A. euteiches* provenant des principales régions françaises de production de pois a permis de mettre en évidence une faible diversité génétique et trois groupes d'agressivité sur des lignées de pois résistantes ou sensibles de quatre légumineuses hôtes (pois, féverole, vesce, luzerne), au sein des populations d'*A. euteiches* à l'échelle nationale (Quillévéré-Hamard et al., 2018). Le génome d'*A. euteiches* (souche ATCC201684, pathotype I) récemment séquencé, présente une taille estimée de 61 Mb avec une densité de 343 gènes/Mb (Gaulin et al., 2018).

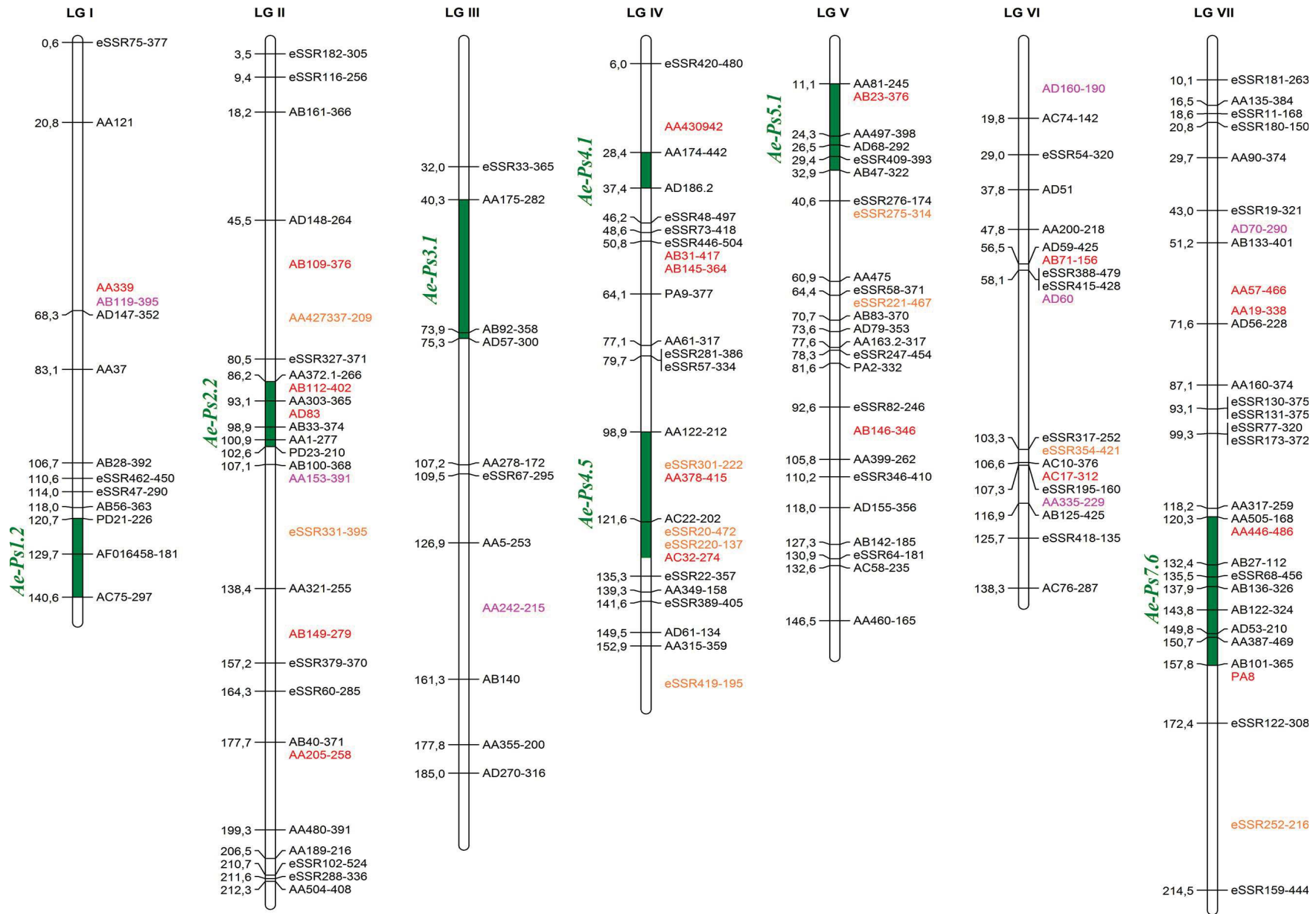
### II.1.c Les méthodes de lutte contre *A. euteiches*

Aucun moyen de lutte biologique, chimique ou génétique n'est actuellement efficace au champ contre *A. euteiches* (Wicker, 2001 ; Wu et al., 2018). L'allongement de la fréquence de retour du pois dans une parcelle (au moins 6 ans) et l'introduction d'espèces de légumineuses résistantes ou non hôtes dans l'assolement sont des pratiques prophylactiques recommandées pour réduire l'inoculum persistant dans le sol, la longévité des oospores pouvant dépasser 10 ans (Hughes et Grau, 2007). Un meilleur drainage et une meilleure gestion de l'humidité du sol permettent également de limiter la dissémination de l'oomycète au sein de la parcelle (Allmaras et al., 2003). Les semis d'hiver permettraient l'échappement du pois à la maladie du fait de son stade plus avancé au printemps où les conditions climatiques deviennent plus favorables à la maladie (Moussart et al., 2018).

Le test de Potentiel Infectieux (PI) est une méthode prophylactique mise au point pour gérer le risque de présence d'*A. euteiches* et éviter la culture sur les sols contaminés. Ce test consiste à évaluer, en conditions contrôlées favorables au développement de l'agent pathogène, la sévérité de la maladie observée sur une variété de pois sensible cultivé sur un échantillon de sol prélevé dans une parcelle au champ. L'évaluation est effectuée par la notation d'un Indice de Nécrose Racinaire (INR). Les notes d'INR, c'est à dire de PI, sont comprises entre 0 et 5. Si le PI est inférieur à 1, la culture du pois est possible, si le PI est compris entre 1 et 2,5, seule la culture du pois d'hiver peut être envisagée, si le PI est supérieur à 2,5, la culture du pois est déconseillée (Crosson et Moussart, 2011). Par ailleurs, un test PCR a été développé, afin de détecter et de quantifier *A. euteiches* dans le sol (Sauvage, 2007, Gangneux et al., 2014).

Il n'existe à ce jour aucune variété résistante à la maladie. Néanmoins, au cours des 20 dernières années, les recherches à l'INRA ont permis d'identifier des sources de résistance quantitative (ou QTL, Quantitative Trait Locus) à *A. euteiches* (Pilet-Nayel et al., 2002).





**Figure 8 :** Carte génétique représentant en vert les 7 principaux QTL de résistance à *A. euteiches* identifiés chez le pois. La carte a été construite à partir du génotypage et du phénotypage des 4 populations de RILs provenant des croisements Baccara x PI180693, Baccara x 552, DSP x 90-2131 et Puget x 90-2079. Distances génétiques données en cM Kosambi. Source : Lavaud et al., 2015.

Ces QTL sont en cours d'intégration dans les programmes de sélection privée, pour l'inscription à venir de variétés partiellement résistantes à la maladie (Moussart et al., 2018).

## II.2 QTL de résistance à *A. euteiches* chez le pois

### II.2.a Identification de QTL de résistance à *A. euteiches*

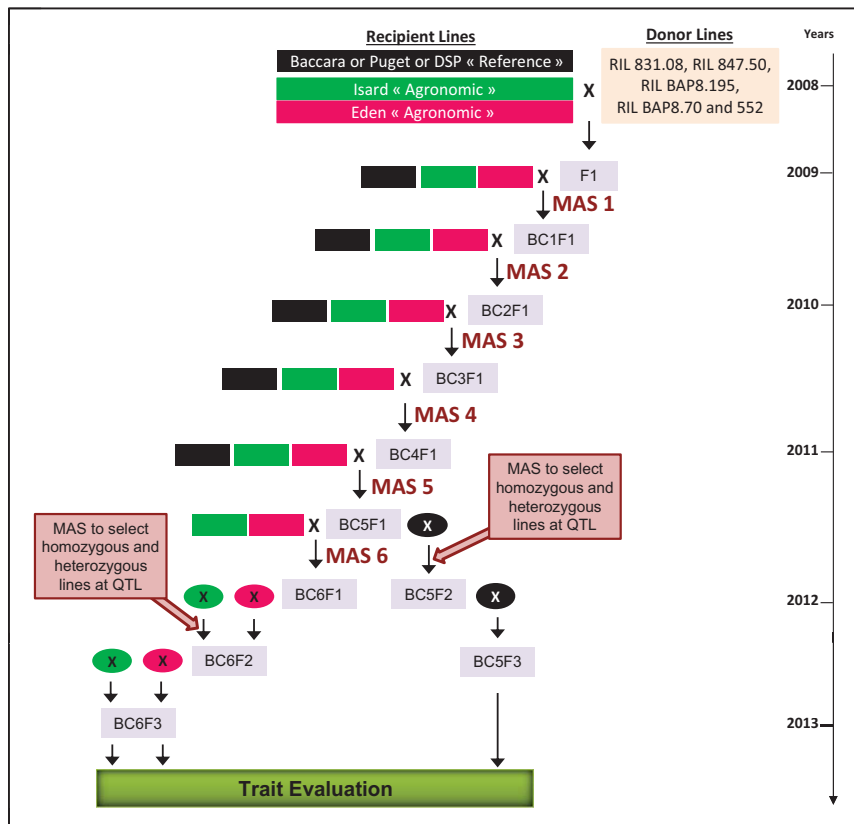
Entre 1950 et 2000, le travail de sélection pour la résistance à *A. euteiches* s'est heurté (i) au caractère polygénique de la résistance à faible héritabilité et à sa liaison à des caractères défavorables, (ii) à la méconnaissance des agents pathogènes racinaires dommageables sur pois au champ, (iii) à l'indisponibilité de méthodes de phénotypage efficace (Pilet-Nayel et al., 2002 ; Hamon, 2010). Depuis 2000, le développement de tests de criblage de larges populations de pois et de collections de souches a permis la mise en place d'un programme de recherche de QTL à l'INRA, en étroite collaboration avec l'USDA, USA. Ainsi, 7 principaux QTL de résistance à *A. euteiches* ont été identifiés (Pilet-Nayel et al., 2002, 2005 ; Hamon et al., 2011, 2013), à partir de l'analyse de 4 populations de lignées recombinantes (ou RILs, Recombinant Inbred Lines) issues de croisements biparentaux incluant 4 sources de résistance, *i.e.* 90-2079, 90-2131 (Kraft, 1992), PI180693 (Lockwood, 1960) et 552 (Lewis et Gritton, 1992) (Figure 8). Les 7 QTL ont été nommés *Ae-Ps1.2*, *Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1*, *Ae-Ps4.1*, *Ae-Ps4.5*, *Ae-Ps5.1* et *Ae-Ps7.6* avec *Ae-Ps* pour *Aphanomyces euteiches Pisum sativum* suivi du numéro du groupe de liaison et du numéro du QTL au sein du groupe de liaison. Les QTL *Ae-Ps4.5* et *Ae-Ps7.6* ont été identifiés, respectivement, comme à effets majeurs vis-à-vis des souches appartenant aux pathotypes III et I (Hamon et al., 2011 ; Hamon et al., 2013).

### II.2.b Création de lignées quasi-isogéniques aux QTL

Cinq programmes parallèles de Back-cross Assisté par Marqueur (BAM) ont été développés chez le pois de 2008 à 2013 dans le cadre du projet SAMAPH par l'INRA, l'UNIP et le GSP dans l'objectif de valider les QTL identifiés. Différentes combinaisons d'allèles de résistance à un à 3 des 7 principaux QTL identifiés ont été introgressés simultanément dans 2 fonds génétiques élités (Eden, variétés de pois de printemps ; Isard, variété de pois d'hiver) et une lignée de référence constituant le parent sensible de la population RIL d'origine des QTL détectés (Baccara, DSP ou Puget, variétés de pois de printemps) (Lavaud, 2015 ; Figure 9A-B).

Lignée RILs donneuse	RIL 831.08	RIL 847.50	RIL BAP8.70	RIL BAP8.195	552
Croisement d'origine	Puget x 90-2079	DSP x 90-2131	Baccara x PI180693	Baccara x PI180693	Baccara x 552
QTL introgressé	<i>Ae-Ps4.5</i>	<i>Ae-Ps5.1</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	<i>Ae-Ps4.1</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	<i>Ae-Ps1.2</i> + <i>Ae-Ps2.2</i> + <i>Ae-Ps3.1</i>	<i>Ae-Ps2.2</i> + <i>Ae-Ps3.1</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>

A



B

QTL	Allèle de résistance	Génotypage SNP (DGC % - Min / Max) <sup>a</sup>				Validation des effets des QTL <sup>b</sup>				
		Reference (R)	Elite			Conditions contrôlées		Champ		
		Puget/DSP/Baccara	Isard (I)	Eden (E)	Enduro (En)	Souche RB84	Souche Ae109	Riec-sur-Belton	Dijon	
<i>Ae-Ps1.2</i>	PI180693	100	100	100	-			R	E	E
<i>Ae-Ps2.2</i>	PI180693	100	100	100	-	R	R	I	E	
<i>Ae-Ps2.2</i>	552	100	100	100	-					I
<i>Ae-Ps3.1</i>	PI180693	100	15,2	100	-				E	
<i>Ae-Ps3.1</i>	552	100	0	6,4	-					
<i>Ae-Ps4.1</i>	PI180693	100	100	100	-			R	I	R I E
<i>Ae-Ps4.5</i>	90-2079	100	100	100	-			R	I E	R
<i>Ae-Ps5.1</i>	90-2131	100	100	100	100	R		R		
<i>Ae-Ps7.6</i>	PI180693	98,6	100	100	-	R	I	I	I E	R E
<i>Ae-Ps7.6</i>	90-2131	100	100	100	100	R	I E En		R	E E
<i>Ae-Ps7.6</i>	552	59,2/98,1	64,9	90,5	-					
<i>Ae-Ps1.2</i> + <i>Ae-Ps2.2</i>	PI180693	100	100	100	-			R	I E	
<i>Ae-Ps1.2</i> + <i>Ae-Ps3.1</i>	PI180693	-	41,8	100	-				E	
<i>Ae-Ps2.2</i> + <i>Ae-Ps3.1</i>	PI180693	-	37	100	-					E
<i>Ae-Ps1.2</i> + <i>Ae-Ps2.2</i> + <i>Ae-Ps3.1</i>	PI180693	-	52,9/53,1	81,1/94,3	-				E	E
<i>Ae-Ps2.2</i> + <i>Ae-Ps3.1</i>	552	-	11,2	19,5	-					
<i>Ae-Ps2.2</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	552	66,7/98,4	69,9	91,7	-					
<i>Ae-Ps3.1</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	552	57,2/99,2	27,5	52,3	-					
<i>Ae-Ps2.2</i> + <i>Ae-Ps3.1</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	552	84,2/99,2	32,7	55,6	-			I		R I E
<i>Ae-Ps4.1</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	PI180693	98,9	100	100	-	R	I E		R	I E R E
<i>Ae-Ps5.1</i> + <i>Ae-Ps7.6</i>	90-2131	100	100	100	100	R	I E En		R	I E E

C

<sup>a</sup> : Pourcentages minimum et maximum de retour au génome donneur (DGC) obtenus pour chaque set de NILs sœurs.

<sup>b</sup> : Effet significatif pour au moins l'une des NIL sœur possédant un ou plusieurs QTL, par rapport à au moins l'une des NIL sans QTL du même set, pour au moins une année dans chaque lieu au champ. R, I, E et En : fonds « receveur » de Reference (DSP/Puget/Baccara), Isard, Eden et Enduro. En Gris : QTL détecté par Hamon et al. (2011 et 2013) dans au moins l'une des quatre populations de RILs.

- : NIL non testée pour les modes d'action ou non créée pendant la SAM.

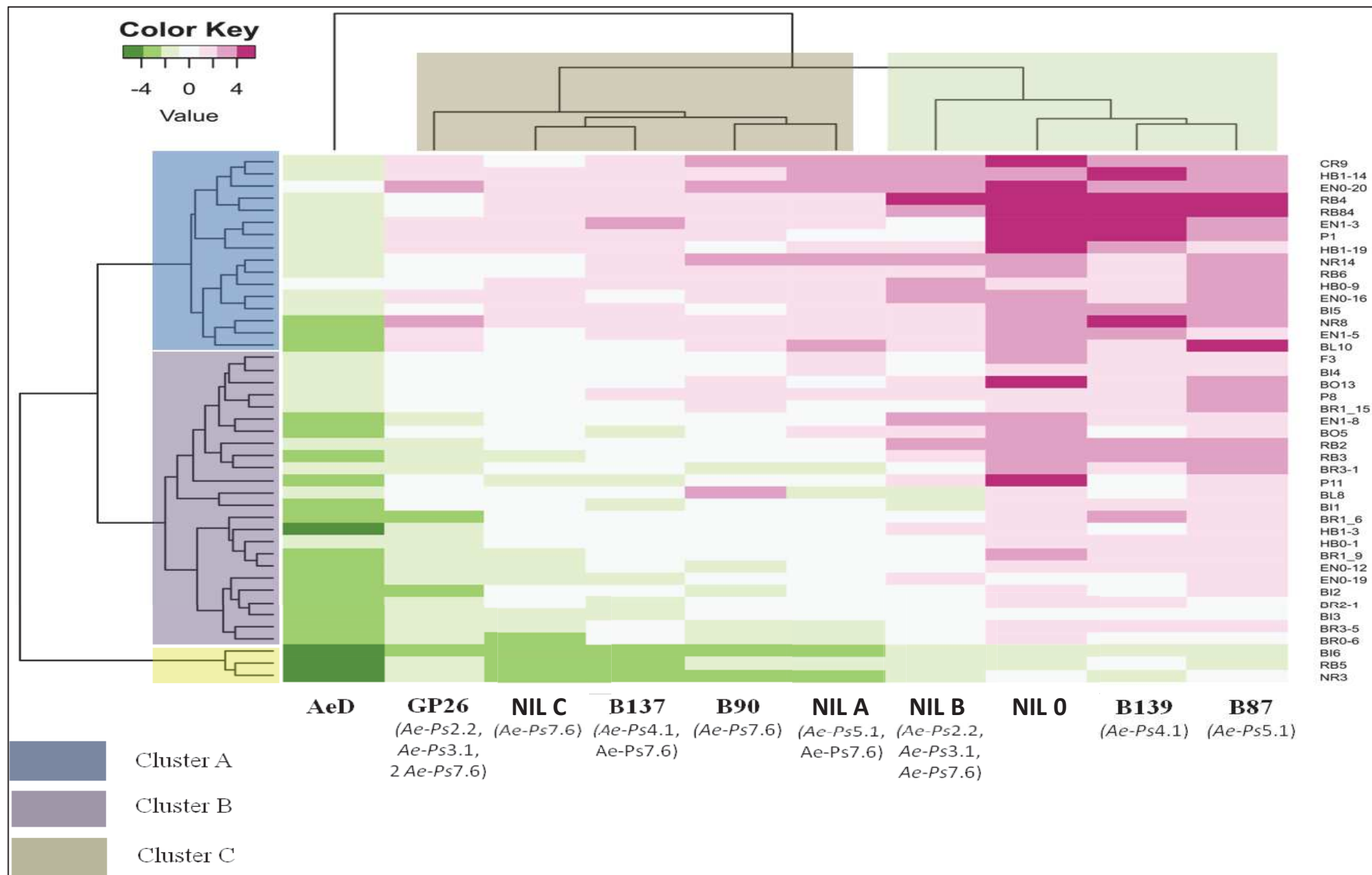
**Figure 9 :** Création de lignées quasi-isogéniques aux QTL identifiés et validation de l'effet des QTL au champ et en conditions contrôlées. **A.** Caractéristiques des lignées donneuses, des croisements d'origine et des QTL introgressés aux différents génotypes de la population de 157 NILs. **B.** Description du programme de back-cross assisté par marqueur. **C.** Synthèse des résultats de thèse de Lavaud, 2015 : validation individuelle ou en combinaison des effets des QTL au sein d'une population de 157 NILs. Source : modifiée d'après [Lavaud et al., 2015](#) ; [Lavaud, 2015](#).

Ces programmes ont permis la création de 157 lignées quasi-isogéniques (NILs, ou Near-Isogenic Lines) homozygotes pour les allèles de résistance introgressés. L'effet d'un QTL peut être réduit ou perdu après introgression dans le cas (i) de faux positifs, (ii) de la présence de différents gènes ou de recombinaisons entre QTL au sein de segments introgressés, (iii) d'interactions épistatiques avec d'autres QTL ou avec le fond génétique, (iiii) d'interactions entre les gènes d'intérêt et l'environnement (Hospital, 2005 ; Lavaud et al., 2015). Il devenait alors nécessaire de valider l'effet des QTL introgressés au sein de la population de NILs produite.

### II.2.c Validation de combinaisons de QTL dans les lignées quasi-isogéniques

L'efficacité des QTL de résistance introgressés dans les NILs a été étudiée en conditions contrôlées vis-à-vis des souches RB84 (pathotype I, origine France) et Ae109 (pathotype III, origine Etats-Unis), ainsi qu'en pépinières infestées au champ au cours de deux années en France (Riec-sur-Belon, Bretagne ; Dijon-Epoisses, Côtes d'Or). Le QTL *Ae-Ps7.6* a montré individuellement un effet de résistance partielle majeur à *A. euteiches* en conditions contrôlées vis-à-vis des deux pathotypes et au champ. Les six autres QTL ont présenté individuellement des efficacités variables en fonction des souches testées en environnement contrôlé et en fonction du lieu et de l'année de l'expérimentation au champ. Les combinaisons *Ae-Ps7.6* + *Ae-Ps5.1* et *Ae-Ps7.6* + *Ae-Ps4.1* ont montré une efficacité plus élevée que les autres combinaisons au champ et en conditions contrôlées vis-à-vis de la souche RB84. Le pyramidage *Ae-Ps2.2* + *Ae-Ps3.1* + *Ae-Ps7.6* a montré une efficacité, sur un lieu, au champ (Dijon) et vis-à-vis de la souche Ae109 en conditions contrôlées. Les autres combinaisons de QTL testées n'ont pas montré d'efficacité significative pour la résistance à *A. euteiches* en environnement contrôlé (Lavaud, 2015 ; Figure 9.C).

Des études récentes ont permis d'analyser les modes d'actions des QTL de résistance sur le développement d'*A. euteiches*, et la relation entre la résistance à *A. euteiches* et l'architecture racinaire. Lavaud et al., (2016) ont montré que certains QTL introgressés individuellement ou en combinaison permettaient de retarder l'apparition des symptômes et de ralentir la colonisation du système racinaire par l'agent pathogène (Lavaud et al., 2016). Desgroux et al., (2018) ont mis en évidence que le QTL majeur *Ae-Ps7.6* était associé à l'architecture racinaire, l'allèle sous-jacent conférant la résistance en conditions contrôlées étant associé à un système racinaire plus dense (Desgroux, 2016). Cependant, les mécanismes biologiques associés aux QTL de résistance à *A. euteiches* chez le pois restent actuellement peu documentés.



**Figure 10 :** Heatmap et analyse cluster de 43 isolats provenant de différentes localisations françaises et inoculés sur 10 NILs porteuses des QTL d'intérêt, introgressés individuellement ou en combinaison. Une couleur verte indique une faible agressivité de l'isolat tandis qu'une couleur rouge indique une forte agressivité. Chaque cluster est représenté par une couleur différente, bleu : cluster A, violet : cluster B, jaune : cluster C. Source : modifiée d'après [Quillévéré-Hamard et al., soumis](#).

Un programme de cartographie fine du QTL majeur *Ae-Ps7.6* et d'identification de gènes candidats sous-jacents est en cours à l'INRA.

Bien que les résistances polygéniques contrôlées par des QTL semblent aujourd'hui plus durables que les résistances monogéniques (Parlevliet, 2002), les locus de résistance partielle sont néanmoins susceptibles d'être « érodés » par les populations de bioagresseurs au cours du temps (Pilet-Nayel et al., 2017).

### II.3 Risque de contournement des QTL de résistance par les populations d'*A. euteiches*

Dans un contexte où de nombreux contournements de résistances génétiques ont été observés chez les plantes, spécialement dans le cas de la résistance de la luzerne au pathotype I d'*A. euteiches* aux USA (Grau et al., 1991), préserver l'efficacité des QTL de résistance à *A. euteiches* dans les futures variétés de pois constituera un objectif incontournable pour maintenir le pois dans les assolements céréaliers. Afin d'anticiper cet objectif, des programmes ont été initiés à l'INRA pour développer des connaissances sur les capacités adaptatives des populations d'*A. euteiches* aux QTL de résistance.

Quillévéré-Hamard et al., (soumis) ont évalué le niveau d'agressivité de 43 isolats français sur un set de 8 NILs (fond génétique Isard) porteuses de QTL individuels ou en combinaison. Les isolats n'ont jamais été confrontés à ces sources de résistance auparavant. Les résultats ont montré une diversité d'agressivité des différents isolats, répartis dans 3 clusters de souches de niveau d'agressivité élevé, moyen et faible en moyenne sur le set de NILs étudié. Ils ont suggéré un risque potentiel d'érosion des QTL de résistance, par sélection au cours du temps d'isolats plus agressifs sur les génotypes de pois porteurs de QTL (Quillévéré-Hamard et al., soumis ; Figure 10).

Wicker, (2001) a suggéré une absence de structuration génétique des populations françaises d'*A. euteiches* liée (i) à l'absence de pression de sélection exercée par des cultures de pois hôtes résistantes, (ii) au caractère polyphage, non sélectif, de l'agent pathogène, (iii) à la faible capacité de dissémination du bioagresseur dans le sol, (iv) au caractère homothallique et à la reproduction clonale de l'oomycète (Wicker, 2001). Néanmoins, la possibilité d'intercroisements entre souches d'*A. euteiches* (Grunwald et Hoheisel, 2006) et l'intégration de QTL de résistance dans les futures variétés, constituent des facteurs susceptibles de faire évoluer les populations d'*A. euteiches*.



## II.4 Stratégie de recherche déployée au cours du stage

Les agriculteurs français attendent des solutions de lutte efficaces et durables face à la pourriture racinaire molle afin d'introduire ou de réintroduire le pois protéagineux dans leur rotation. La durabilité de l'effet des QTL vis-à-vis des populations d'*A. euteiches* est questionnée en anticipation au déploiement sur de larges surfaces, des futures variétés porteuses de ces QTL. Des stratégies de pyramidage de QTL et de culture alternée du pois avec la féverole (plante hôte, variétés résistantes) constituent des solutions envisagées pour limiter la taille des populations d'agents pathogènes et leur adaptation aux QTL de résistance. Afin de tester l'effet de ces stratégies, un essai d'évolution expérimentale au champ, a été mis en place depuis 2016 à l'INRA en collaboration avec la Chambre d'Agriculture de Bretagne sur une parcelle expérimentale naturellement infestée à Bignan (56), dans le cadre du projet FEADER-Bretagne PROGRAILIVE. L'essai vise à analyser l'évolution du potentiel infectieux et des populations d'*A. euteiches* dans des rotations incluant des NILs de pois porteuses de QTL et de la féverole, cultivées en monoculture ou en alternance. J'ai contribué à l'analyse des données de cet essai dans le cadre de mon stage de fin d'études.

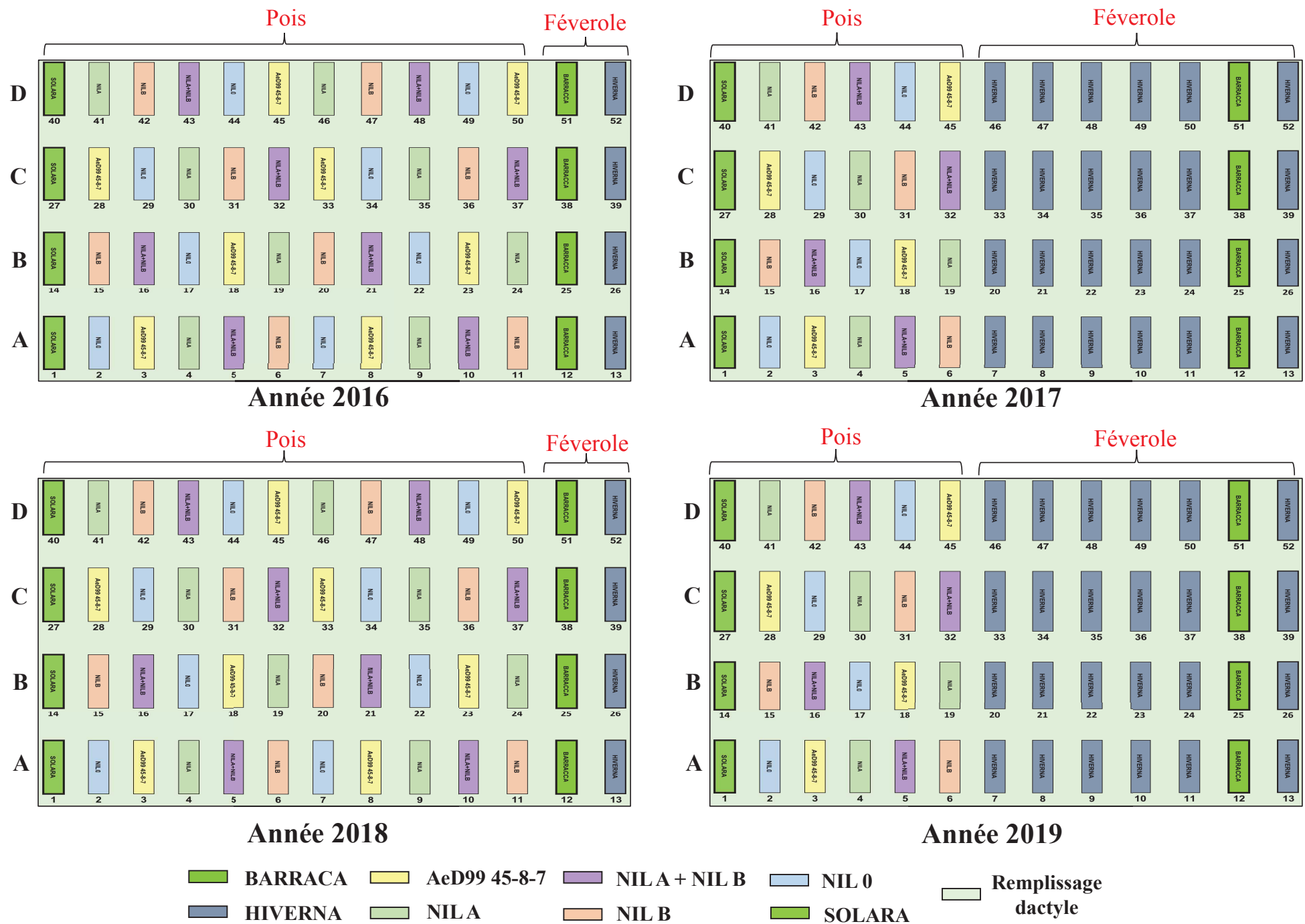
Mon sujet de stage a ainsi contribué à tester les hypothèses suivantes :

- La combinaison de QTL de résistance et l'usage de la féverole en alternance avec le pois dans des successions de culture de légumineuses permettent de limiter le potentiel infectieux du sol dû à *A. euteiches*.
- La culture récurrente de lignées de pois porteuses de QTL conférant une résistance partielle augmente le risque d'érosion de QTL de résistance par sélection de souches d'*A. euteiches* plus agressives, et affecte ainsi la durabilité de leurs effets.

Les objectifs de mon stage ont donc été : (i) d'analyser l'évolution du PI du sol entre 2016 et 2019 sur différentes modalités de successions de culture de NILs de pois et de féverole et (ii) d'analyser l'évolution de l'agressivité des souches d'*A. euteiches* entre 2016 et 2019 sur une modalité de succession choisie.

Pour cela, j'ai réalisé mes travaux en deux étapes : (i) tests de potentiel infectieux sur différents sols et analyse statistique comparative des données 2016-2019 ; (ii) tests d'agressivité d'isolats prélevés en 2016 et en 2019 sur les micro-parcelles d'une modalité de succession choisie et analyse comparative 2016-2019 de l'évolution du niveau d'agressivité des populations.





**Figure 11 :** Évolution du dispositif expérimental de l’essai de 2016 à 2019. Organisation parcellaire des différentes modalités de génotype (Pois : AeD, NIL 0, NIL A, NIL A + NIL B, NIL B, Solara ; Féverole : Barraca, Hiverna,) en fonction de l’année (2016, 2017, 2018, 2019), du bloc (A, B, C, D) et du système de culture (monoculture pois ; alternance pois-féverole). Les différents sols sont numérotés de 1 à 52.

## Matériel et méthodes

---

### III.1 Dispositif d'évolution expérimentale au champ

#### III.1.a Dispositif de l'essai

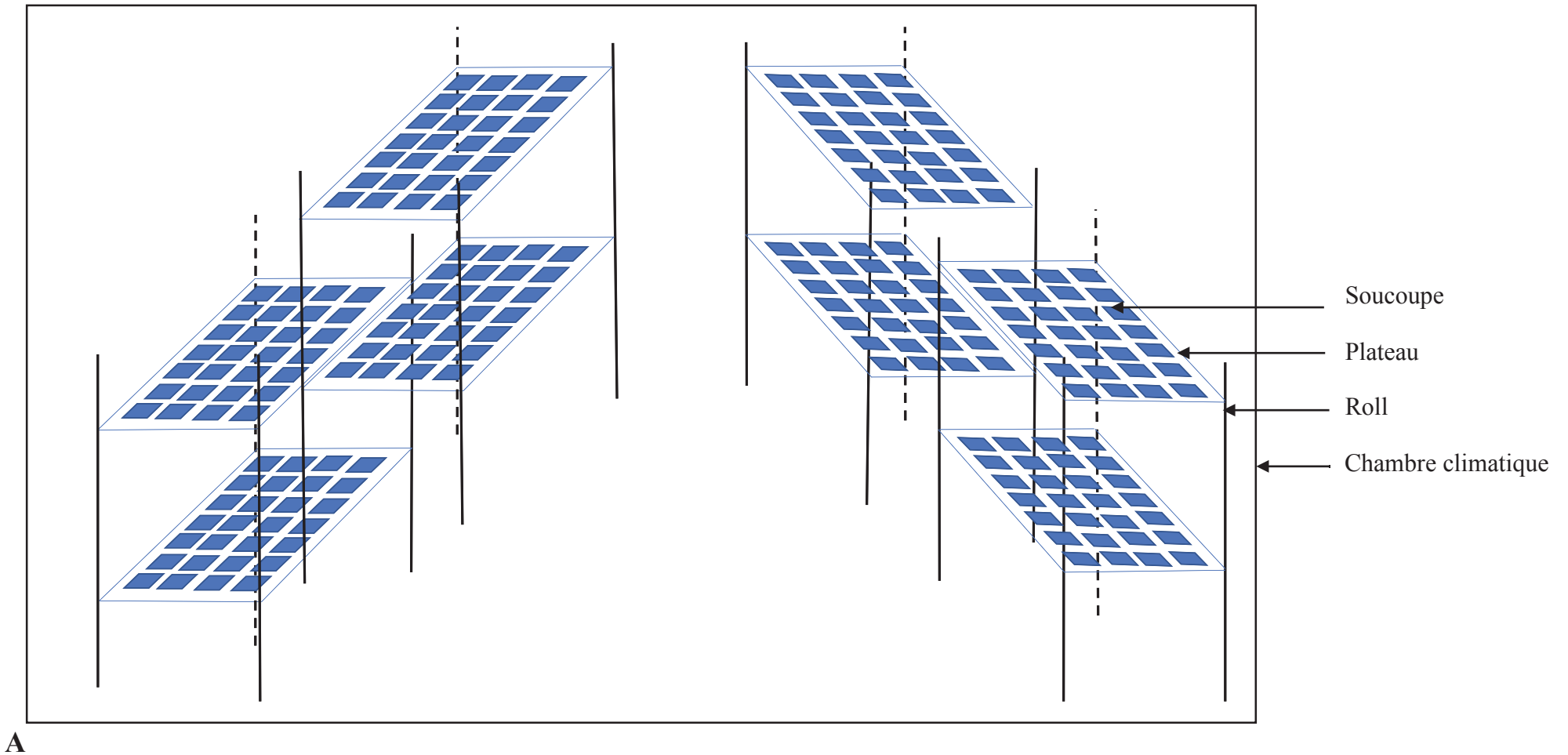
L'essai, implanté sur le domaine de Kerguehenec (Bignan, 56), comprend 13 modalités de différentes successions de NILs de pois et de variétés de féverole cultivées depuis 2016 en monocultures ou en alternance, et répétées sur 4 blocs. Chaque année, l'essai a donc inclus un total de 52 parcelles élémentaires de 2 x 8 m<sup>2</sup>, isolées les unes des autres par un remplissage de dactyle (*Dactylis glomerata*) (Figure 11).

Les modalités « blocs » sont (i) A, bloc à faible potentiel infectieux, (ii) B et C, blocs à potentiel infectieux intermédiaire, (iii) D, bloc à potentiel infectieux élevé.

Les modalités « succession » comportent des monocultures de 6 géotypes de pois, incluant (1) le témoin pois sensible Solara, (2) un témoin NIL 0 sur fond génétique Isard sans QTL, (3) une NIL A sur fond génétique Isard comportant des allèles d'origine 90-2131 aux 2 QTL *Ae-Ps5.1* et *Ae-Ps7.6*, (4) une NIL B sur fond génétique Isard, comportant des allèles d'origine 552 aux 3 QTL *Ae-Ps2.2*, *Ae-Ps3.1*, et *Ae-Ps7.6*, (5) le mélange des NIL A et NIL B à 50%-50% et (6) le témoin pois non agronomique partiellement résistant AeD99 45-8-7, ou encore nommé « AeD » dans ce rapport. Cinq autres modalités de successions incluent les géotypes de pois (2) à (6) précités, cultivés en alternance avec la variété de féverole résistante Hiverna. Enfin, 2 modalités de monoculture de géotypes de féverole, incluant la variété sensible Barraca et la variété résistante Hiverna, ont également été implantées.

#### III.1.b Suivi de l'essai

Le semis de l'essai est réalisé sur une journée à la fin du mois de mars. Dans les 24h suivant le semis, 10 points de prélèvement de sol, situés entre 0 et 20 cm de profondeur, soit environ 3 à 4 litres de sol par parcelle élémentaire, sont effectués à la tarière manuelle sur chacune des 52 parcelles élémentaires de l'essai, pour les tests de potentiel infectieux. Les 10 prélèvements sont espacés de manière à couvrir la surface de la parcelle élémentaire, tout en évitant soigneusement les bordures. Pour les sols des blocs C et D, 15 points de prélèvement, soit 5 à 6 litres de sol par parcelle élémentaire, ont été effectués spécifiquement en 2016 et 2019 pour les tests de potentiel infectieux et l'obtention d'isolats d'*A. euteiches*.



**Figure 12 :** Schéma du dispositif utilisé en chambre climatisée pour les tests de potentiel infectieux et d'agressivité des souches d'*A. euteiches*. **A.** Schéma de la chambre climatisée. La chambre est composée de 4 rolls contenant chacun 2 plateaux. La capacité d'un plateau est de 28 soucoupes. Pour un même test, les soucoupes sont positionnées à la même hauteur et de manière aléatoire. **B.** Schéma d'une soucoupe contenant 4 godets de 5 plantes.

Un désherbage est appliqué quelques jours après les prélèvements de sol. Des notations de sévérité de la maladie sont réalisées sur racines entre fin mai et début juin (INR, Indice de Nécrose Racinaire), puis sur parties aériennes entre fin juin et début juillet (IDA, Indice de Dépérissement Aérien), selon les échelles décrites dans Hamon et al., (2011) (Figure 12). Ces données ne seront pas analysées dans ce rapport. Le pois et la féverole sont non récoltés et détruits en juillet. Une inter-culture d'avoine (*Avena sativa*) est implantée entre deux cultures de légumineuses pour protéger les sols au cours de l'hiver.

### **III.2 Test de potentiel infectieux en conditions contrôlées et prélèvement d'isolats d'*A. euteiches***

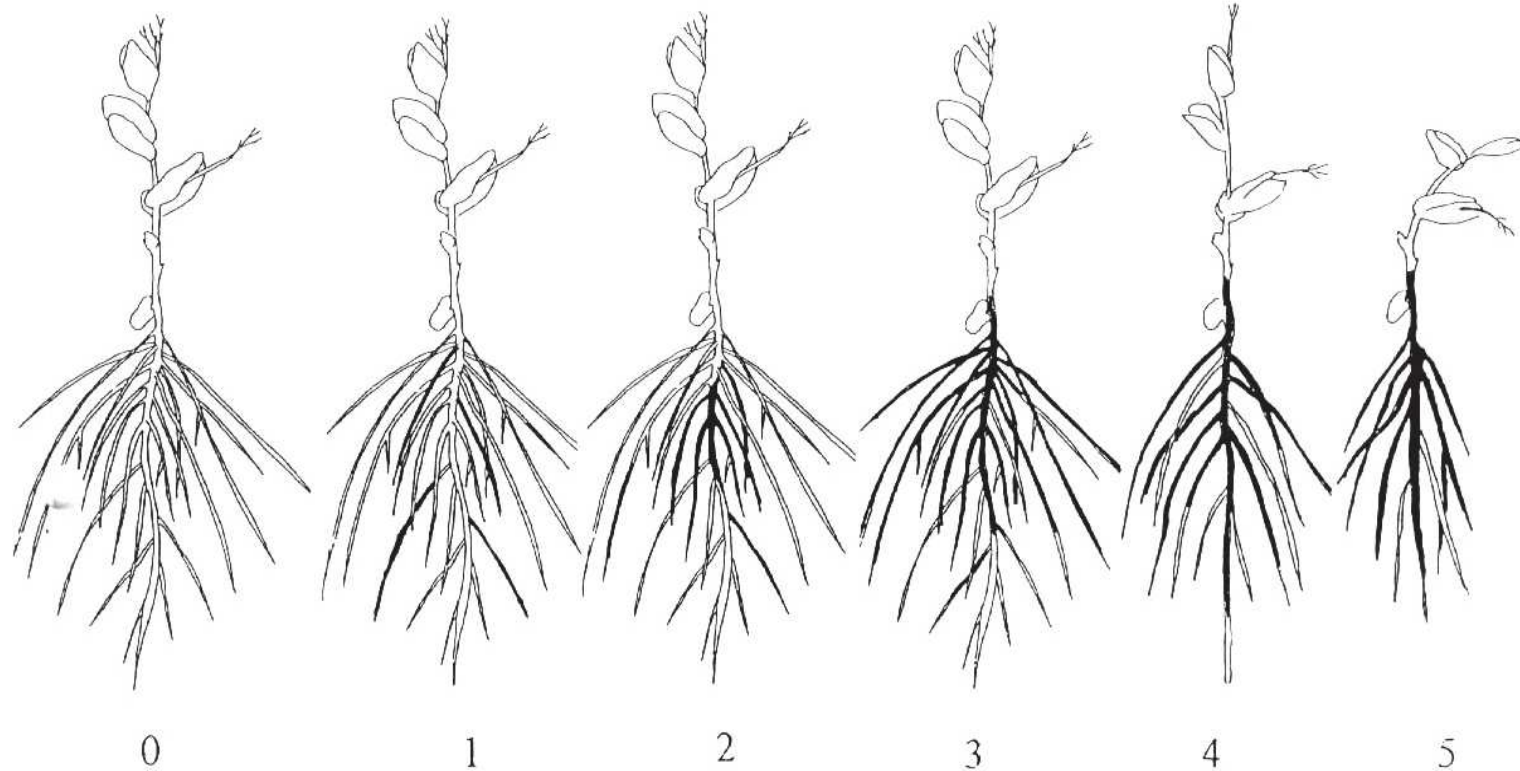
#### **III.2.a Sols et dispositif expérimental**

Les 52 échantillons de sol sont stockés en chambre froide à 5°C après prélèvement et avant utilisation. Chaque année de 2016 à 2019, les différents sols sont homogénéisés manuellement et nettoyés de tous débris minéraux et végétaux. Pour le test de potentiel infectieux, chaque échantillon de sol est réparti dans 4 godets en plastique de 590 cm<sup>3</sup>, remplis à environ 90% de terre. Cinq graines de pois (variété sensible de référence Lumina) sont semées à 1,5 cm de profondeur dans chaque godet, puis les 4 godets sont placés dans une soucoupe carrée plastique de 19,5 x 19,5 cm<sup>2</sup> (1 soucoupe par sol). Les soucoupes sont remplies d'eau après le semis. Les 52 soucoupes sont réparties de façon aléatoire dans une chambre climatisée (25 +/- 2°C jour ; 23 +/- 2°C nuit ; 14h de photopériode journalière) au sein de 4 plateaux positionnés à hauteur égale (Figure 12).

#### **III.2.b Déroulement du test, notations et prélèvement d'isolats à partir de tissus symptomatiques**

Treize jours après le semis, les racines sont prélevées et l'INR de chacune des 20 plantes cultivées sur chaque sol est noté avec une échelle de notation allant de 0 à 5 (Moussart et al., 2001 ; Figure 13).

Les parties racinaires symptomatiques des plantes infectées sont ensuite prélevées puis (i) désinfectées dans un bain d'eau de javel et rincées dans 3 bains différents d'eau stérile avec une durée de 27 secondes par bain, (ii) séchées entre deux papiers filtres stériles et déposées sur boîte de milieu gélosé de 90 mm de diamètre (CMA, ou Corn Meal Agar) contenant un antibiotique (rifampicine) permettant de limiter les contaminations externes, (iii) placées en étuve à 25°C pendant 1 semaine.



- 0- Plante saine
- 1- Traces translucides à beiges sur les racinelles, molles au toucher
- 2- Zones beiges à brunâtres, molles, couvrant le quart du système racinaire. La radicule est touchée. L'épicotyle est sain.
- 3- Zones beiges à brunâtres, molles, couvrant au moins la moitié du système racinaire. L'épicotyle peut tourner au beige mais reste ferme.
- 4- Le système racinaire est au 3/4 clair et mou. L'épicotyle de couleur brune est mou et paraît étranglé. Les premières feuilles peuvent être flétries.
- 5- Les parties aériennes sont flétries et jaunissantes : la plante est morte.

**Figure 13 :** Echelle de notation de la pourriture racinaire du pois due à *A. euteiches*. Source : adaptée de [Moussart et al., 2001](#).

Après développement, un explanta de 5 mm de diamètre est prélevé en front de croissance de la colonie puis repiqué dans un tube de 3,5 ml de CMA. Le tube est ensuite placé à l'étuve à 25°C pendant une semaine pour être ensuite conservé en mycothèque entre 10 et 11°C. Au minimum, 25 isolats ont été prélevés en 2016 et en 2019 à partir de chaque sol échantillonné dans les blocs C et D. Des semis supplémentaires de graines sur terres contaminées ont été nécessaires afin d'obtenir un nombre d'isolats satisfaisant à partir des racines nécrosées.

### III.3 Diagnostic moléculaire des isolats d'*A. euteiches*

#### III.3.a Extraction d'ADN d'isolats d'*A. euteiches*

Après repiquage et développement sur boîte de CMA d'isolats provenant de chaque tube conservé en mycothèque (1 explanta par tube et pour une boîte), 20 explantas sont prélevés par boîte puis sont placés en milieu de culture liquide (PG, ou Peptone Glucose). Après 3 semaines de croissance, les milieux PG sont filtrés sur papier Whatman avec une pompe à vide, le mycélium obtenu est ensuite nettoyé avec de l'eau stérile avant d'être lyophilisé dans des tubes de 1,5 ml avec des billes de verre siliconé (lyophilisateur Heto PowerDry<sup>®</sup> LL3000 ; -56°C ; 48h), puis, d'être broyé (broyeur FastPrep<sup>®</sup> ; 4,5 tours/s ; 30 s/isolat). L'ADN de chaque isolat est extrait avec le kit NucleoSpin<sup>®</sup> Plant II de Macherey-Nagel en respectant la méthodologie recommandée par le fabricant. Enfin, l'ADN est quantifié au spectrophotomètre (NanoDrop<sup>®</sup> 1000) afin d'être concentré à 10 ng/μl par dilution à l'eau pure stérile.

#### III.3.b Révélation d'*A. euteiches* par PCR

Le mix PCR, d'un volume total de 50 μl pour un échantillon, est composé de (1) 5 μl d'ADN à 10 ng/μl de mycélium extrait (partie III.3.a), (2) 5 μl de 5X Green GoTaq<sup>®</sup> Flexi Buffer (1X/μl), (3) 5 μl de MgCl<sub>2</sub> (2,5 mmol/μl) et 0.25 μl de Taq polymérase (1,25 U/μl) du kit GoTaq<sup>®</sup> G2 Hot Start Polymerase de Promega, (4) 1 μl de dNTP (0,2 mmol/μl), (5) 5 μl de chacune des amorces 136F et 588R spécifiques à *A. euteiches* (0,2 μmol/μl chacune ; Vandemark et al., 2002) et (6) 23,75 μl d'eau stérile pure. Le programme d'amplification d'ADN effectué au thermocycleur (Bio-Rad<sup>®</sup> C1000 Touch) est de (i) 95°C pendant 3 min, puis, (ii) 40 cycles à 95°C, 56°C et 72°C pendant, respectivement, 30s, et enfin, (iii) 72°C pendant 7 minutes.

La migration des produits PCR est effectuée par électrophorèse (Bio-Rad<sup>®</sup> PowerPac 300 ; 1h20 ; 100V) sur un gel d'agarose à 1,5% avec du tampon de migration TAE (Tris, Acétate, EDTA). Un marqueur de taille (Promega<sup>®</sup> 25bp DNA Step Ladder) est utilisé, à raison de 4 μl



dans les puits attribués. De l'eau pure stérile et l'ADN de la souche de référence française RB84 (Moussart et al., 2008) servent, respectivement, de témoins négatif et positif à l'expérience. Les volumes d'eau pure stérile et de produit d'amplification d'ADN déposés sur gel sont de 5 µl/puit. Enfin, les gels sont plongés dans un intercalant de bromure d'éthidium (BET) pendant 20 minutes, puis, sont rincés à l'eau stérile afin de révéler les différentes bandes.

### **III.4 Test d'agressivité des isolats d'*A. euteiches* sur pois en conditions contrôlées**

#### III.4.a Gamme différentielle de lignées de pois

L'agressivité de 84 isolats d'*A. euteiches* provenant des blocs C et D de la parcelle de Bignan et de la souche témoin de référence RB84 a été testée sur un set de 5 géotypes de pois, incluant le témoin AeD, la NIL A, la NIL B, une NIL C sur fond génétique Isard portant l'allèle d'origine 90-2131 uniquement au QTL *Ae-Ps7.6*, et le témoin NIL 0. Pour chaque isolat et géotype, 4 godets en plastique de 590 cm<sup>3</sup> sont remplis à environ 90% de vermiculite, 5 graines de pois sont semées à 1,5 cm de profondeur dans chaque godet, puis les 4 godets sont placés dans une soucoupe carrée plastique de 19,5 x 19,5 cm<sup>2</sup> (1 soucoupe par géotype). Les soucoupes sont remplies d'eau après le semis.

#### III.4.b Préparation des suspensions de spores et inoculation

Les isolats provenant des tubes CMA sont repiqués sur boîte de milieu CMA (un isolat par boîte). Après 5 à 6 jours, 25 explantas par boîte sont transférés dans un erlenmeyer de 300 ml contenant 50 ml de milieu PG liquide et sont laissés à incuber pendant 3 jours à 25°C à l'étuve (un erlenmeyer pour 25 explantas). Après développement du mycélium, 3 rinçages successifs à l'eau de Volvic sont effectués à 2 heures d'intervalle pour chaque erlenmeyer, l'eau de Volvic comportant des minéraux nécessaires au développement des sporanges et à la libération des zoospores. Les solutions sont conservées à l'étuve à 25°C pendant 16 heures. Après un choc mécanique permettant d'enkyster les zoospores nageuses, un ml de chaque suspension est déposé sur cellule de Malassez entre lame et lamelle pour comptage des zoospores au microscope et détermination de la concentration de l'inoculum mère.





Pour chaque isolat, le volume de suspension de spores  $V$  à préparer afin d'inoculer l'ensemble des lignées de pois est :

$$V = N_{lp} \times N_{pl} \times V_p = 5 \times 20 \times 5 = 500 \text{ ml}$$

Avec  $N_{lp}$  : Nombre de lignées de pois à cribler

$N_{pl}$  : Nombre de plante par lignée de pois à cribler

$V_p$  : Volume à inoculer par plante

Le volume final  $V_f$  est légèrement supérieur pour faciliter l'inoculation soit  $V_f = 650 \text{ ml}$ .

Le volume de spores  $V_s$  à diluer dans  $V_f$  correspond à :

$$V_s = \frac{V_f \times C_{ss}}{C_{sm}}$$

Avec  $C_{ss}$  : Concentration de la suspension de spores à préparer

$C_{sm}$  : Concentration de la suspension de spores mère

Où  $C_{ss} = 200 \text{ spores/ml}$

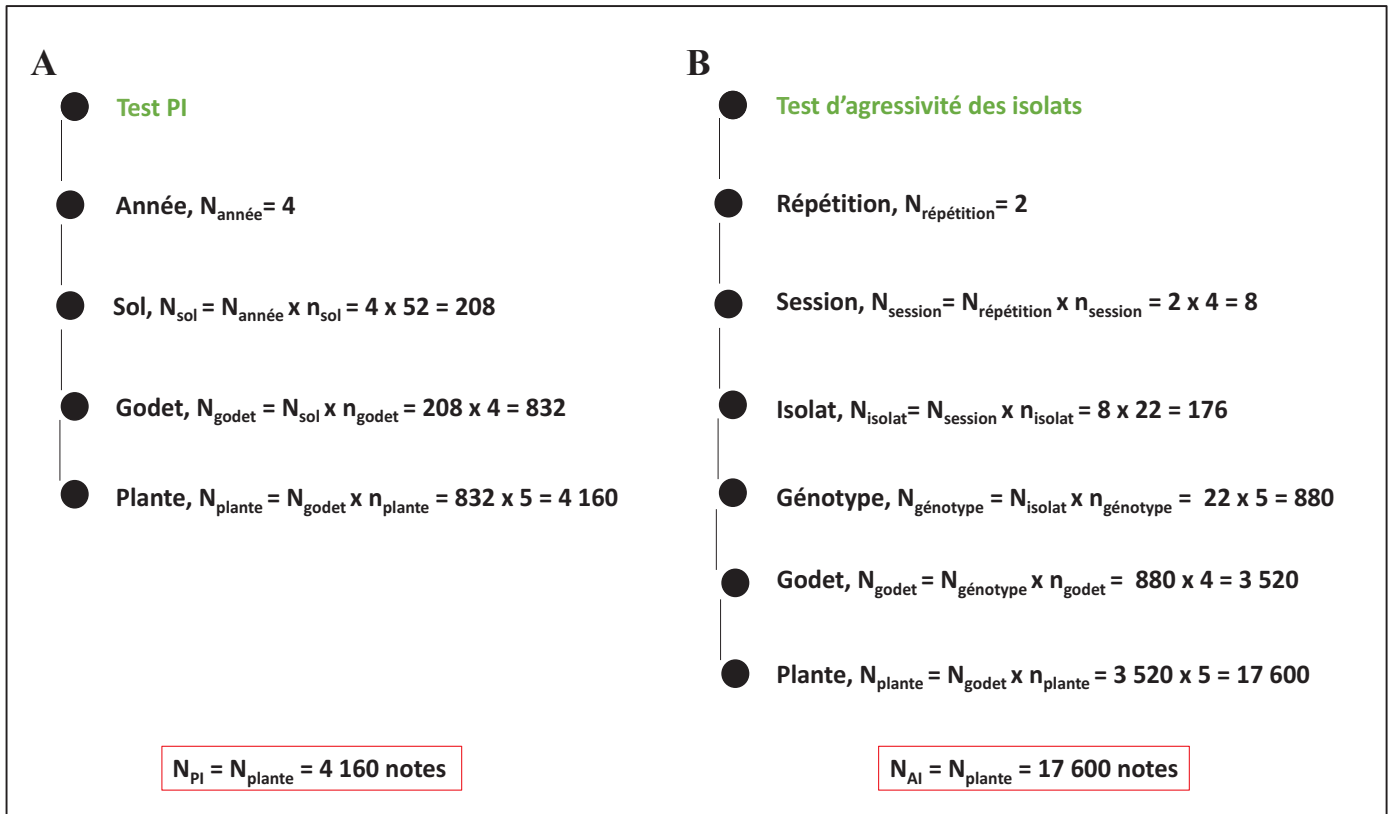
$C_{sm} = \left(\frac{1}{n} \times \sum_{k=1}^n x_k\right) \times 10^5$ ,  $x_k$  : nombre de spores compté au sein de l'ensemble  $k$  de 10 surfaces de  $10^{-5} \text{ ml}$  de la cellule de Malassez et  $n=10$  répétitions

L'ensemble des plantes du set de lignées de pois est inoculé 7 jours après le semis avec la suspension de spores produite, à raison de 5 ml par plante. Les soucoupes sont remplies d'eau après inoculation.

#### III.4.c Dispositif expérimental du test et notations

Les soucoupes sont réparties de façon aléatoire dans une chambre climatisée ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$  de jour ;  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  de nuit ; 14h de photopériode journalière) au sein de 4 plateaux positionnés à hauteur égale comme pour les tests de PI (Figure 12). Une session de phénotypage est composée de 4 plateaux. L'ensemble des isolats a été évalué pour l'agressivité sur les 5 génotypes de pois au sein de 4 sessions de phénotypage en chambre climatique, 2 sessions pouvant avoir lieu simultanément au sein de la même chambre. La souche témoin RB84 est utilisée comme témoin dans chaque session de phénotypage. Le criblage de l'ensemble des isolats est répété 2 fois.

Sept jours après l'inoculation, les racines sont extraites de la vermiculite et l'INR de chacune des 20 plantes par génotype de pois est noté selon la même échelle de notation de 0 à 5 que celle utilisée pour le test de PI (Moussart et al., 2001 ; Figure 13).



**Figure 14 :** Design expérimental complet montrant les différentes strates structurales des tests PI et d'agressivité des isolats. **N** représente le nombre total et **n** représente le nombre unitaire. **A.** Design expérimental du test PI. **N<sub>PI</sub>** est le nombre total de notes d'INR. **B.** Design expérimental du test d'agressivité des isolats. **N<sub>AI</sub>** est le nombre total de notes d'INR. Seuls 21 isolats et la souche témoin RB84 peuvent être inoculés à chaque session du fait de la capacité limitée de la chambre climatique et de la pénibilité du test. Deux sessions peuvent être organisées simultanément dans la chambre.

### III.5 Analyses statistiques des données

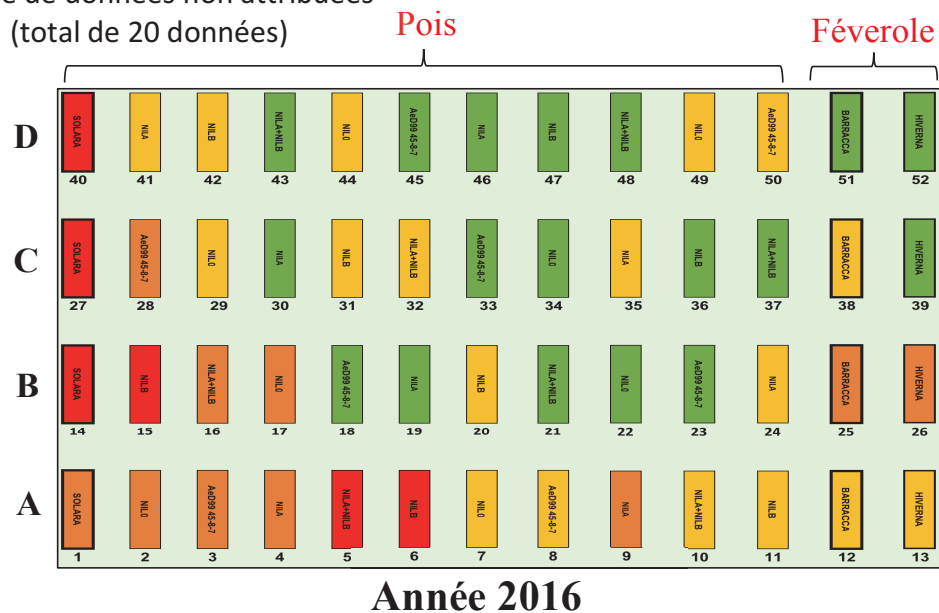
L'ensemble des analyses statistiques a été effectué avec le logiciel R version 3.4.3 (R Core Team 2017).

#### III.5.a Données de test de potentiel infectieux

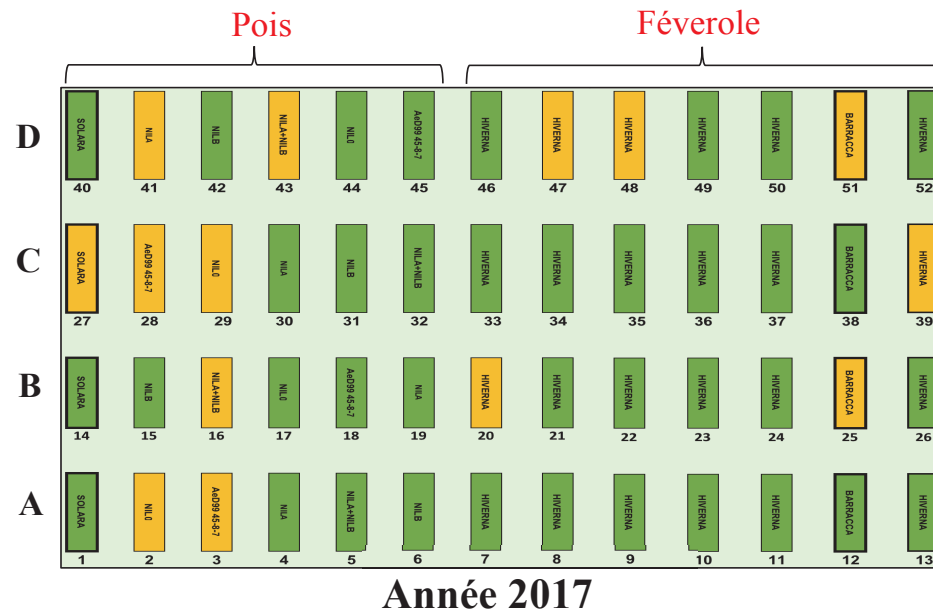
Quatre variables principales ont été analysées lors du test, (i) une variable qualitative ordinale à expliquer, « INR », (ii) quatre variables qualitatives explicatives, « Année », « Bloc », « Génotype » et « Système de culture ».

L'ensemble du jeu de données contient  $N_{PI} = 4\ 160$  individus statistiques (Figure 14). Parmi  $N_{PI}$ , 34,4% des données d'INR sont non attribuées du fait d'un défaut de germination en conditions contrôlées (Figure 15). Les données manquantes sont dites de façon pragmatique, aléatoires (MAR, ou Missing at Random), et une méthode d'imputation peut être effectuée avec la fonction et le package, respectivement, nommés « missForest » (Stekhoven et Bühlmann, 2012). Cette méthode est basée sur la construction de forêts aléatoires ajustées jusqu'à la première dégradation du modèle de complétion. Le nombre d'itération et de forêts aléatoires à exécuter sont respectivement fixés à 10 et 200. Les imputations sont effectuées en séparant les notes d'INR par année, afin d'éviter un biais.

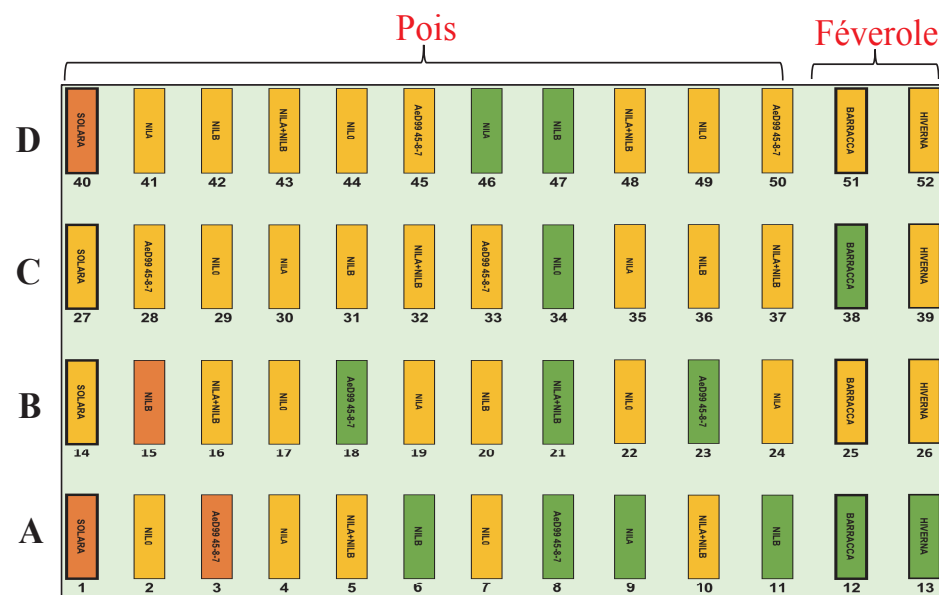
L'analyse de la variable qualitative ordinale « INR » est effectuée avec la fonction « cmm » du package « ordinal » par le biais d'un modèle linéaire cumulatif à effet mixte (CLMM, ou Cumulative Link Mixed Model) spécifiquement adapté à la complexité du traitement de données semi-quantitatives par l'ajustement de probabilités pour chaque modalité d'intérêt (Christensen, 2019). Les variables « Année », « Bloc », « Génotype » et « Système de culture » sont placées en effet fixe et les interactions multiples « Génotype\*Système de culture\*Bloc\*Année » significatives en effet fixe ( $p\text{-value} < 0,05$ ), sont placées en effet aléatoire. L'adéquation du modèle aux données est mesurée avec la matrice de conditionnement hessienne (modèle adéquat pour  $\text{cond.H} < 10^5$ ). Les effets des facteurs sont testés par un test du rapport des vraisemblances au seuil de risque  $\alpha=5\%$  avec la fonction « Anova » en utilisant les packages « car » et « RVAideMemoire » (Fox et Weisberg, 2011 ; Hervé, 2019). Enfin avec le package « emmeans », la probabilité moyenne de chaque note par génotype au sein d'un système de culture d'un bloc et d'une année est ajustée et les moyennes obtenues sont comparées par un test de Tukey au seuil de risque  $\alpha=5\%$  (Lenth, 2019).



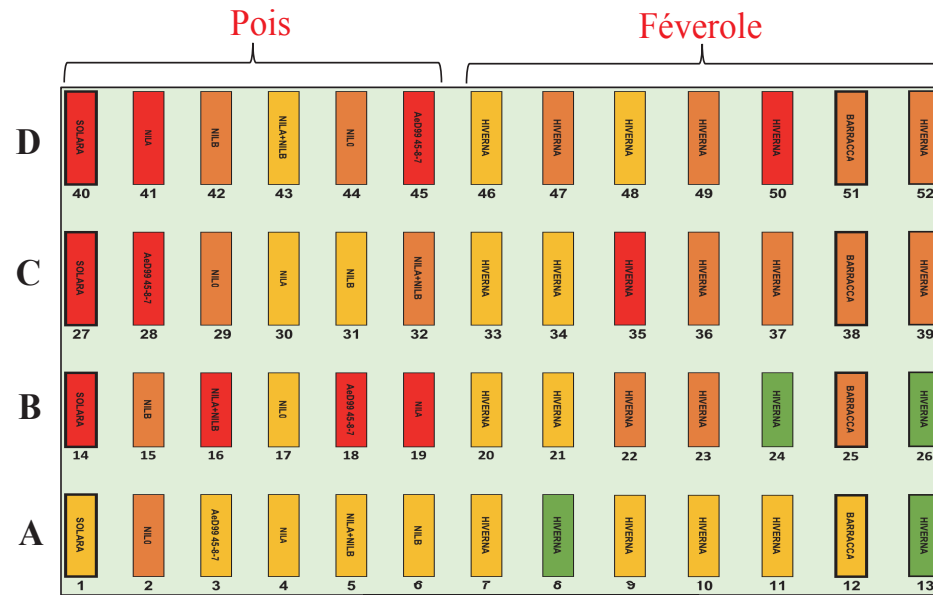
Année 2016



Année 2017



Année 2018



Année 2019

Figure 15 : Représentation des données de PI non attribuées au sein du dispositif expérimental de 2016 à 2019. Données non attribuées au sein des différentes modalités de génotype (AeD, Barraca, Hiverna, NIL 0, NIL A, NIL A + NIL B, NIL B, Solara) en fonction de l'année (2016, 2017, 2018, 2019), du bloc (A, B, C, D) et du système de culture (monoculture pois ; alternance pois-féverole). Les différents sols sont numérotés de 1 à 52.

### III.5.b Données de test d'agressivité des isolats

Cinq variables principales ont été analysées lors du test, (i) une variable qualitative ordinale à expliquer, « INR », (ii) quatre variables qualitatives explicatives, « Année », « Sol », « Génotype » et « Isolat ». Une variable qualitative supplémentaire « Plateau » correspondant au plateau d'appartenance d'un génotype testé au sein d'une session de chambre climatique et au sein d'une répétition.

L'ensemble du jeu de données contient  $N_{AI} = 17\ 600$  individus statistiques (Figure 14). La vermiculite est un substrat permettant une meilleure germination des graines de pois comparée aux sols prélevés dans les parcelles de Bignan, la proportion de données non attribuées est donc moins importante au sein du test d'agressivité des isolats (moins de 5% parmi  $N_{AI}$ ) comparée au test de PI (34,4% parmi  $N_{PI}$ ). Une méthode d'imputation des données manquantes n'est donc pas nécessaire pour l'analyse statistique du test d'agressivité des isolats d'*A. euteiches*.

L'analyse de la variable qualitative ordinale « INR » est effectuée avec le modèle CLMM de la manière décrite précédemment (partie III.5.a).

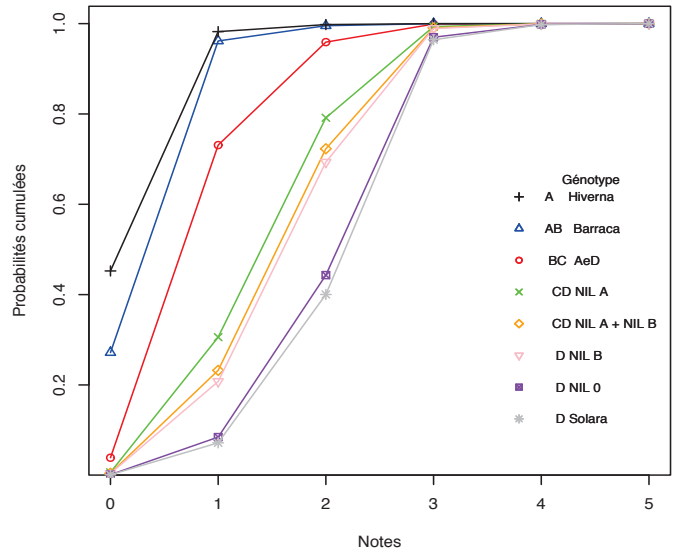
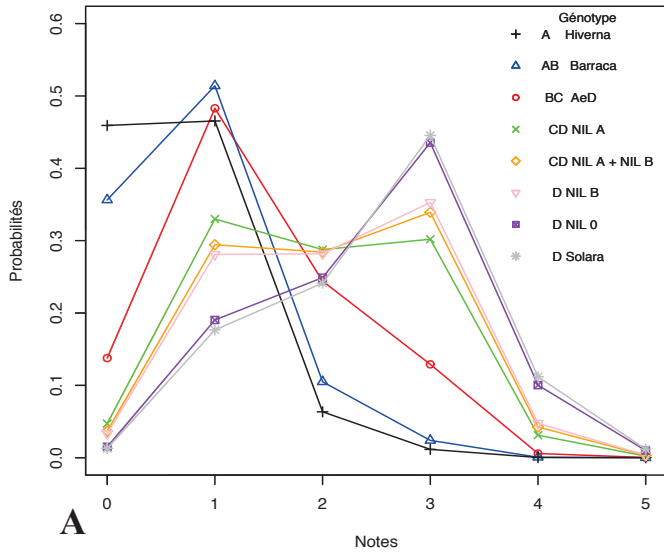
Les populations d'isolats prélevées au sein des sols 30 et 41 de la parcelle de Bignan lors de l'année 2019 sont différentes de celles prélevées en 2016. Un test de comparaison de moyenne ne peut donc pas être effectué pour un même isolat pour les années 2016 et 2019. Deux modèles différents facilitent l'analyse des données :

Un premier modèle où les variables « Génotype » et « Isolat » sont placées en effet fixe. La variable « Plateau » et les interactions multiples « Génotype\*Plateau\*Isolat » significatives en effet fixe (p-value < 0,05), sont placées en effet aléatoire. La probabilité moyenne de chaque note par isolat au sein d'un génotype testé est ajustée et les moyennes obtenues sont comparées au seuil de risque  $\alpha=0,5\%$  afin de souligner plus précisément les tendances observées. De plus, une échelle d'indice d'agressivité est construite au sein d'un heatmap en utilisant la distribution des moyennes ajustées (emmeans), obtenues pour l'ensemble des 84 isolats d'*A. euteiches* et la souche témoin RB84.

Un second modèle où les variables « Année », « Génotype » et « Sol » sont placées en effet fixe et les interactions multiples « Année\*Génotype\*Sol » significatives en effet fixe (p-value < 0,05), sont placées en effet aléatoire. La probabilité moyenne de chaque note de génotype testé au sein d'un sol et au cours d'une année est ajustée et les moyennes obtenues sont comparées au seuil de risque  $\alpha=5\%$ .

Probabilités d'obtenir une note en fonction du génotype

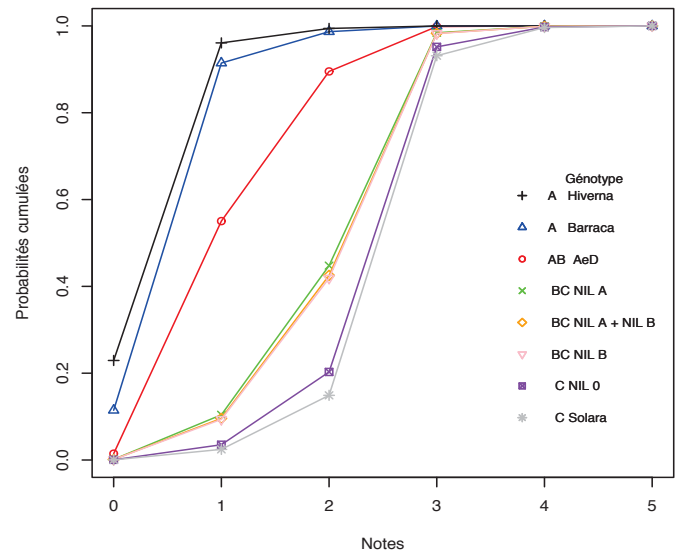
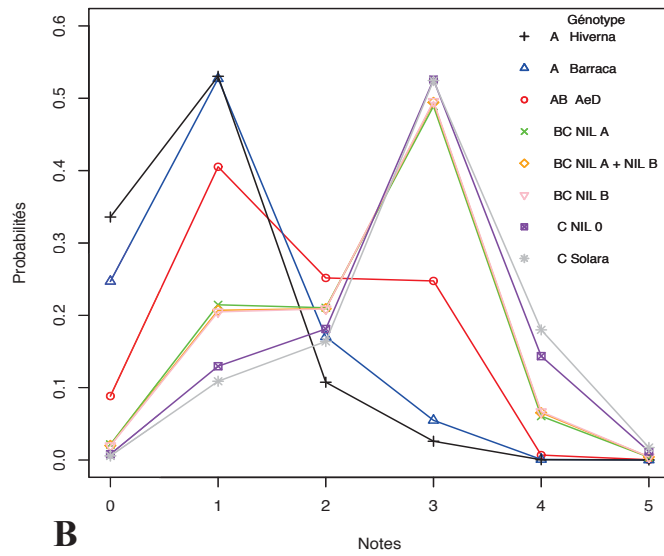
Probabilités cumulées d'obtenir une note en fonction du génotype



A

Probabilités d'obtenir une note en fonction du génotype en système de monoculture

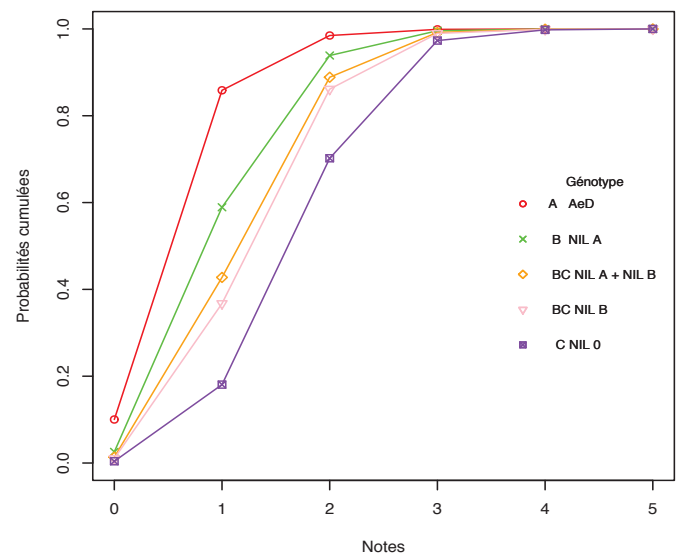
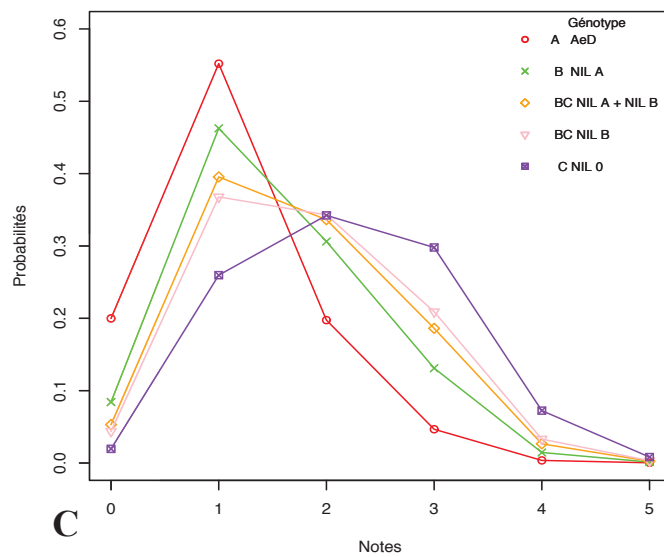
Probabilités cumulées d'obtenir une note en fonction du génotype en système de monoculture



B

Probabilités d'obtenir une note en fonction du génotype en système de culture alterne

Probabilités cumulées d'obtenir une note en fonction du génotype en système de culture alterne



C

**Figure 16 :** Probabilités ajustées de valeurs de PI de sols collectés pendant 4 années (2016 à 2019) sur des micro-parcelles cultivées avec 6 génotypes de pois (témoin AeD, NIL A, NIL B, NIL A + NIL B, témoin NIL 0 et témoin Solara), en monoculture ou en alternance avec la variété de féverole Hiverna, et de 2 génotypes de féverole (Barraca et Hiverna) cultivés en monoculture, sur la parcelle expérimentale de Bignan. Probabilités simples et cumulées des valeurs de PI des sols issus de micro-parcelles cultivées avec les différents génotypes en systèmes de monoculture ou d'alternance (A), de monoculture uniquement (B) et d'alternance uniquement (C). Les tests de comparaison de moyennes des valeurs de PI sont effectués au seuil de risque  $\alpha=5\%$  et sont associés aux lettres A, B, C et D.

## Résultats

---

### IV.1 Evolution du PI dans différentes modalités de successions au champ entre 2016 et 2019

#### IV.1.a Validation des données phénotypiques de test de PI

L'analyse de l'ensemble des notes de PI, correspondant aux notes d'INR observées sur la variété sensible Lumina cultivée sur 52 sols échantillonnés sur l'essai pendant 4 ans, a mis en évidence une faible proportion (5,1%) de données mal classifiées (PFC) après imputation des données manquantes. Une probabilité élevée d'obtenir une note d'INR proche de 0 et de 5 traduit, respectivement, un phénotype de résistance et un phénotype de sensibilité à *A. euteiches*. Une probabilité cumulée élevée d'obtenir une note d'INR proche de 0 indique un phénotype de résistance à *A. euteiches*. Une valeur de moyenne ajustée (emmean) élevée d'INR correspond à un PI élevé et inversement. L'analyse de l'ensemble du jeu de données de PI avec le modèle CLMM a montré (i) une adéquation satisfaisante du modèle aux données (valeur cond.H.  $< 10^5$ ) et (ii) des effets significatifs des facteurs à effets fixes « Année », « Bloc », « Génotype » et « Système de culture » (p-value  $< 0,05$ ).

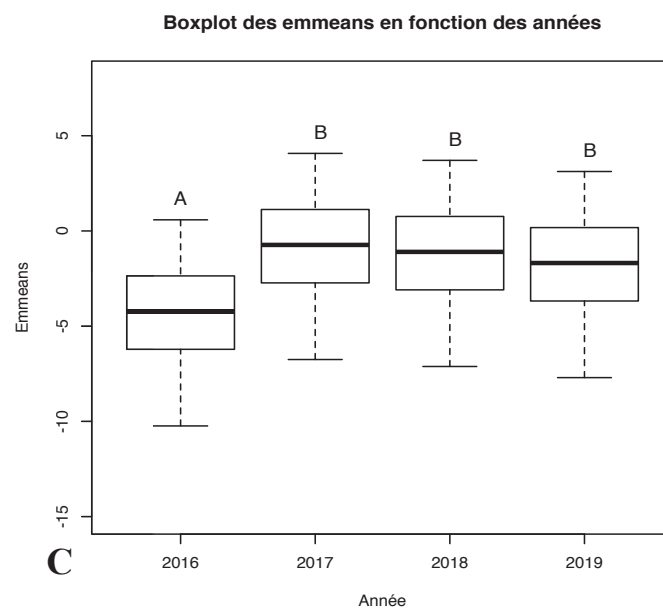
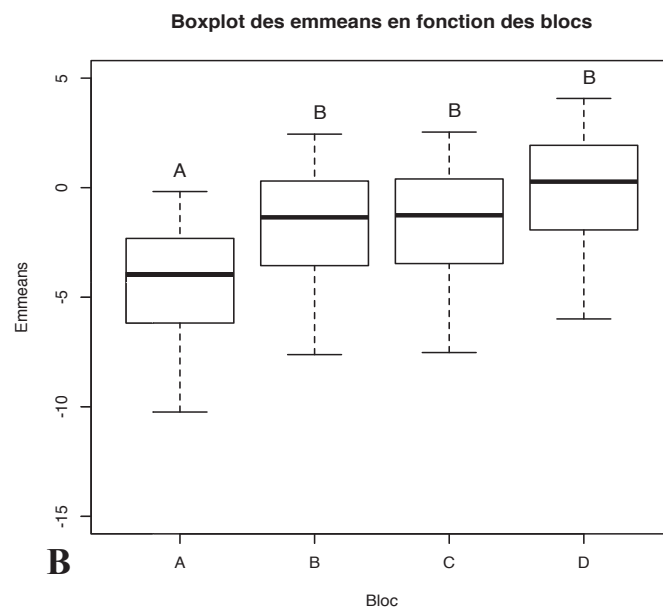
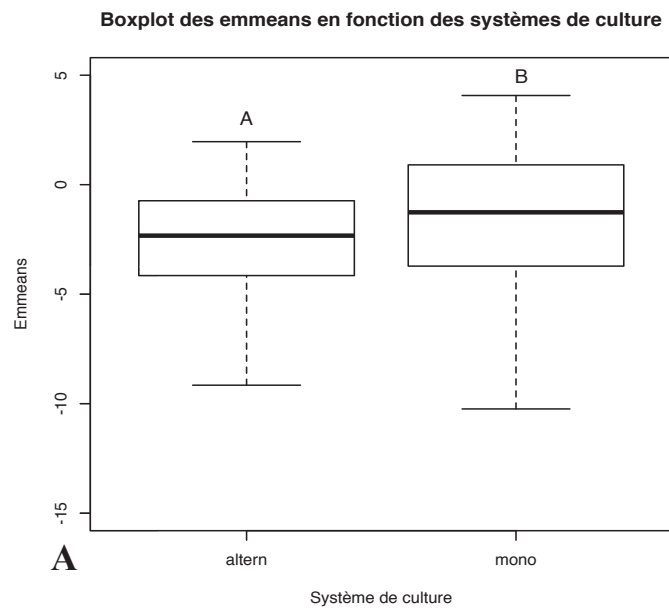
#### IV.1.b Effet du niveau de résistance des génotypes cultivés sur le potentiel infectieux du sol

Le classement des moyennes ajustées des PI des sols cultivés avec les différents génotypes est cohérent avec le niveau de résistance de ces génotypes, *i.e.* élevé pour les variétés de féverole, Hiverna et Barraca, et la lignée de pois AeD, partiel pour les NIL A et NIL B, faible à nul pour la NIL 0 et Solara (Figure 16.A).

Les tests de comparaison de moyennes ( $\alpha=5\%$ ) ont permis d'identifier des différences significatives entre les valeurs de PI des sols cultivés en féverole et celles de sols cultivés en pois, sauf avec AeD, quel que soit le système de culture (groupes de Tuckey différents ; Figure 16.A). Le PI des sols cultivés avec le génotype de pois AeD a été significativement différent des PI des sols cultivés avec les génotypes sensibles Solara, NIL 0 en système monoculture ou alterne (Figure 16.B.C) ainsi qu'avec la NIL B en système alterne (Figure 16.C).

Parmi les sols cultivés avec les différentes NILs, ceux associés à la NIL A ont montré des valeurs de PI plus élevées, en cohérence avec le niveau de résistance partiel plus élevé de la





**Figure 17 :** Boxplot des moyennes ajustées (emmeans) des valeurs de PI obtenues pour les 52 sols de la parcelle expérimentale de Bignan, sur 4 années. **A.** Boxplot des emmeans en fonction du système de culture. **B.** Boxplot des emmeans en fonction des blocs. **C.** Boxplot des emmeans en fonction des années. Une valeur élevée de emmean correspond à un PI élevé et inversement. Les tests de comparaison de moyennes sont effectués au seuil de risque  $\alpha=5\%$  et sont représentés par les lettres A et B.

NIL A, malgré l'absence de différences significatives au cours du test de comparaison de moyenne. Les sols cultivés avec la NIL A et la NIL B en mélange n'ont pas présenté une valeur de PI plus élevée que ceux cultivés avec la NIL A seule.

#### IV.1.c Effet de l'usage de la féverole en alternance avec le pois, de l'année et du bloc sur le potentiel infectieux du sol

Les sols cultivés en monoculture de pois ont montré des valeurs de PI significativement plus élevées que ceux cultivés en système de culture alterne (rotation pois – féverole résistante) (Figure 17.A).

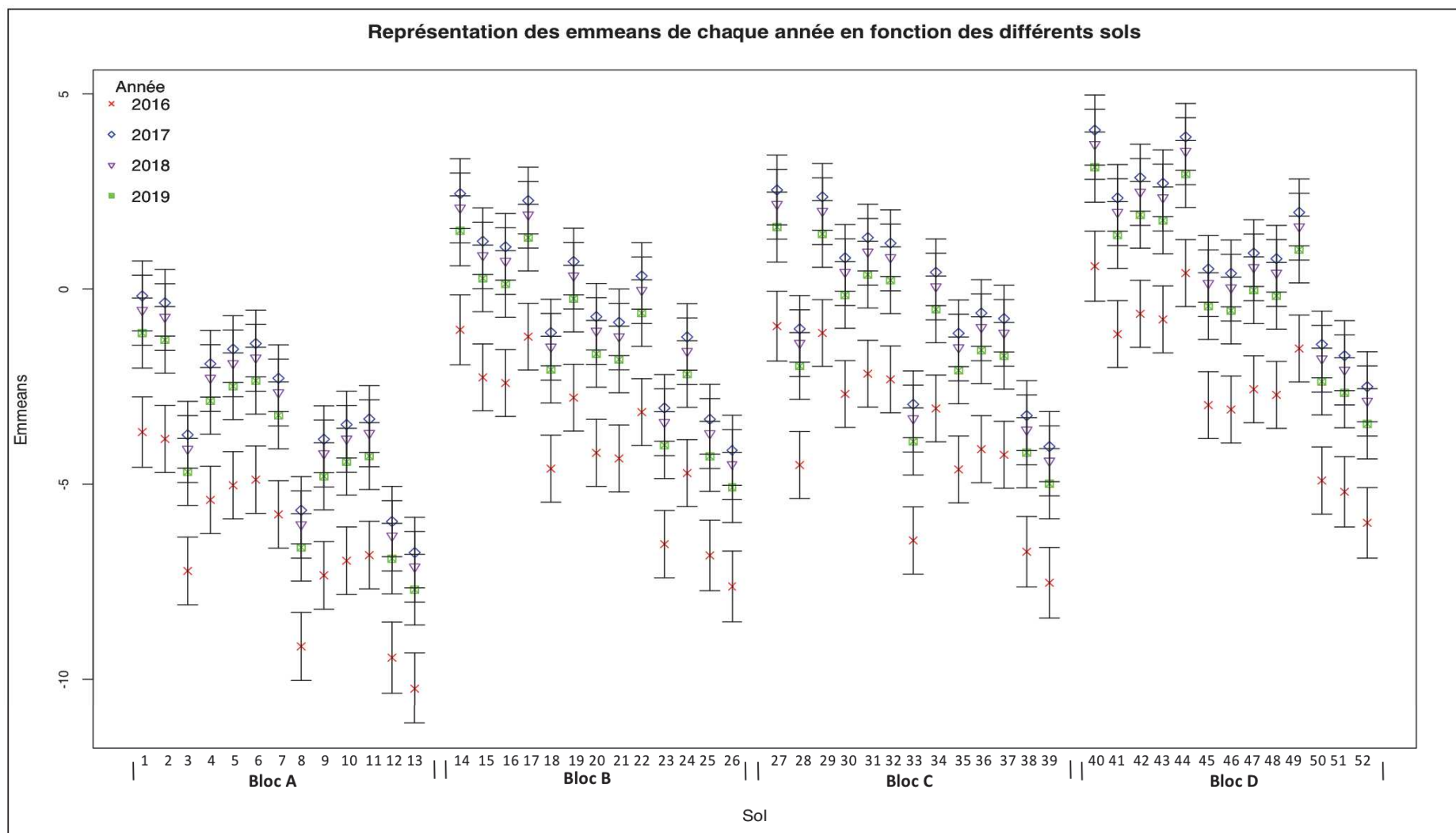
Le PI des 52 sols a significativement augmenté en moyenne de 2016 à 2017 avant de diminuer légèrement et de façon non significative entre 2017 et 2019. Cette tendance est contraire à l'hypothèse d'une évolution croissante du PI au cours du temps sur les 4 années étudiées (Figure 17.C ; Figure 18).

Les blocs de la parcelle se classent selon 3 niveaux de PI, conformément à l'état des lieux effectué au début de l'expérimentation sur le site de Bignan en 2016, incluant (i) le bloc A à faible PI, (ii) les blocs B et C à PI intermédiaires, (iii) le bloc D à PI élevé. Cependant, les PI des blocs B, C et D ne sont pas significativement différents (Figure 17.B).

La NIL A a montré le niveau de résistance partielle à *A. euteiches* le plus élevé au sein du set de NILs testées (données non montrées de sévérité de la maladie sur plantes au champ), que ce soit en système de monoculture ou en système de culture alterne. Afin d'analyser l'évolution de l'agressivité des populations d'*A. euteiches* de 2016 à 2019 vis-à-vis de la résistance conférée par la combinaison QTL *Ae-Ps7.6 + Ae-Ps5.1* dans le fond génétique Isard, les isolats collectés de sols échantillonnés en 2016 et 2019 dans 2 blocs de la succession de monoculture de la NIL A ont été choisis comme matériel d'étude pour la partie IV.2 de ce rapport.

#### **IV.2 Evolution de l'agressivité des isolats d'*A. euteiches* après 4 ans de monoculture d'une NIL de pois porteuse de QTL de résistance**

Un total de 84 isolats prélevés au sein des sols 30 (bloc C) et 41 (bloc D) en 2016 et en 2019, à raison de 21 isolats par combinaison sol\*année, ont été phénotypés pour leur agressivité sur un set différentiel de 5 génotypes de pois incluant 4 génotypes présents sur la parcelle de Bignan (AeD, NIL A, NIL B, NIL 0) ainsi que la NIL C porteuse du QTL *Ae-Ps7.6* seul sur fond Isard.



**Figure 18 :** Représentation des moyennes ajustées (emmeans du modèle CLMM) de chaque année, obtenues à partir des notes d'INR représentant le potentiel infectieux des 52 sols provenant de la parcelle expérimentale de Bignan. Une valeur de emmean élevée correspond à un PI élevé et inversement. Les erreurs standards des emmeans sont associées.

#### IV.2.a Validation moléculaire des isolats d'*A. euteiches*

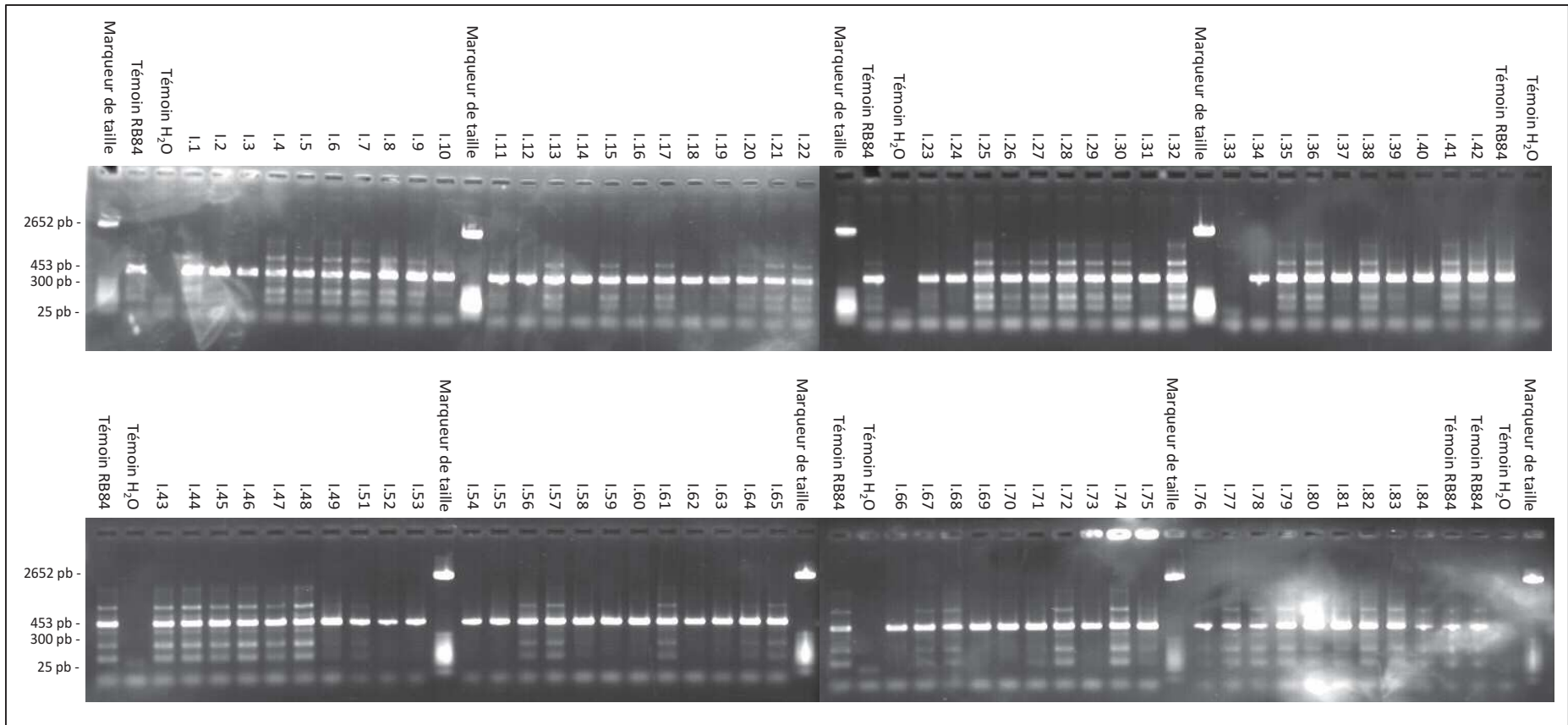
Le test PCR a révélé l'amplification d'ADN d'*A. euteiches* dans 82 des 84 isolats, par une bande nette située à 453 pb, confirmant l'identité d'*A. euteiches*. L'isolat I.50 fut manquant du fait d'une contamination du milieu PG lors de la production du mycélium. L'identité de l'isolat I.33 n'a pas pu être confirmée car aucun produit PCR n'a pu être révélé. Le témoin négatif H<sub>2</sub>O ainsi que le témoin positif RB84 ont permis de confirmer la validité du test PCR par, respectivement, l'absence et la présence de la bande amplifiée (Figure 19). Le couple d'amorces 136F - 588R est spécifique d'*A. euteiches*, la présence d'autres agents pathogènes du complexe racinaire au sein des isolats ne peut donc être infirmée.

#### IV.2.b Validation des données phénotypiques de test d'agressivité des isolats d'*A. euteiches*

Les notes d'INR attribuées au cours de l'expérience de phénotypage des 4 populations de 21 isolats ont été majoritairement comprises entre 0 et 3. Aucune note d'INR de 5 n'a été donnée (Figure 20.A). Une valeur de moyenne ajustée (emmean) élevée correspond à un INR élevé, *i.e.* une agressivité élevée d'un isolat, d'une population d'*A. euteiches* sur un génotype ou le set de génotypes de pois testés, et inversement. L'analyse de l'ensemble du jeu de données de test d'agressivité a montré (i) une adéquation satisfaisante des deux modèles CLMM aux données (valeur cond.H. < 10<sup>5</sup>), (ii) des effets significatifs des facteurs à effets fixes « Génotype » et « Isolat » (p-value < 0,05) pour le premier modèle, (iii) des effets significatifs des facteurs à effets fixes « Année » et « Génotype » (p-value < 0,05), un effet non significatif du facteur à effet fixe « Sol » (p-value > 0,05) pour le second modèle.

#### IV.2.c Effet de l'année et du sol sur l'agressivité des populations d'*A. euteiches*

Conformément à l'analyse précédente de l'effet de l'année et du bloc sur le PI (partie IV.1.c), les populations d'*A. euteiches* présentes au sein des sols 30 et 41 sont significativement plus agressives sur les génotypes de pois testés pour l'année 2019 comparées à 2016 (Figure 20.C). De plus, les populations d'*A. euteiches* sont plus agressives au sein du sol 41 comparées au sol 30 sans que la différence de moyenne soit significativement différente (Figure 20.D). Les variations d'agressivité des isolats au sein des années ou des blocs sont homogènes. L'évolution du PI du sol et l'évolution de l'agressivité des populations d'*A. euteiches* ont été davantage liées à l'échelle du temps au sein d'une parcelle infestée.



**Figure 19 :** Révélation sur gel d'agarose des produits d'amplification d'ADN génomique de 83 isolats d'*A. euteiches* (numérotés entre 1 et 84) issus des sols 30 et 41 échantillonnés en 2016 et 2019 sur la parcelle de Bignan. L'isolat I.50 est manquant du fait d'une contamination du milieu PG lors de la production du mycélium. Les échantillons d'ADN ont été amplifiés par PCR à partir du couple d'amorces sélectif 136F - 588R. Un marqueur de taille (ou marqueur de poids moléculaire) défini de 25 pb à 2 652 pb a été utilisé lors de l'expérience. Une bande située à 453 paires de bases (pb) pour un isolat indique la présence d'ADN d'*A. euteiches* lors de la révélation. Les témoins H<sub>2</sub>O et RB84 sont respectivement des témoins négatifs et positifs à la présence d'ADN d'*A. euteiches* au sein des échantillons.

Séquence (5' - 3') de l'amorce 136F : GACTGCAATGTCGTCCAAGACTT

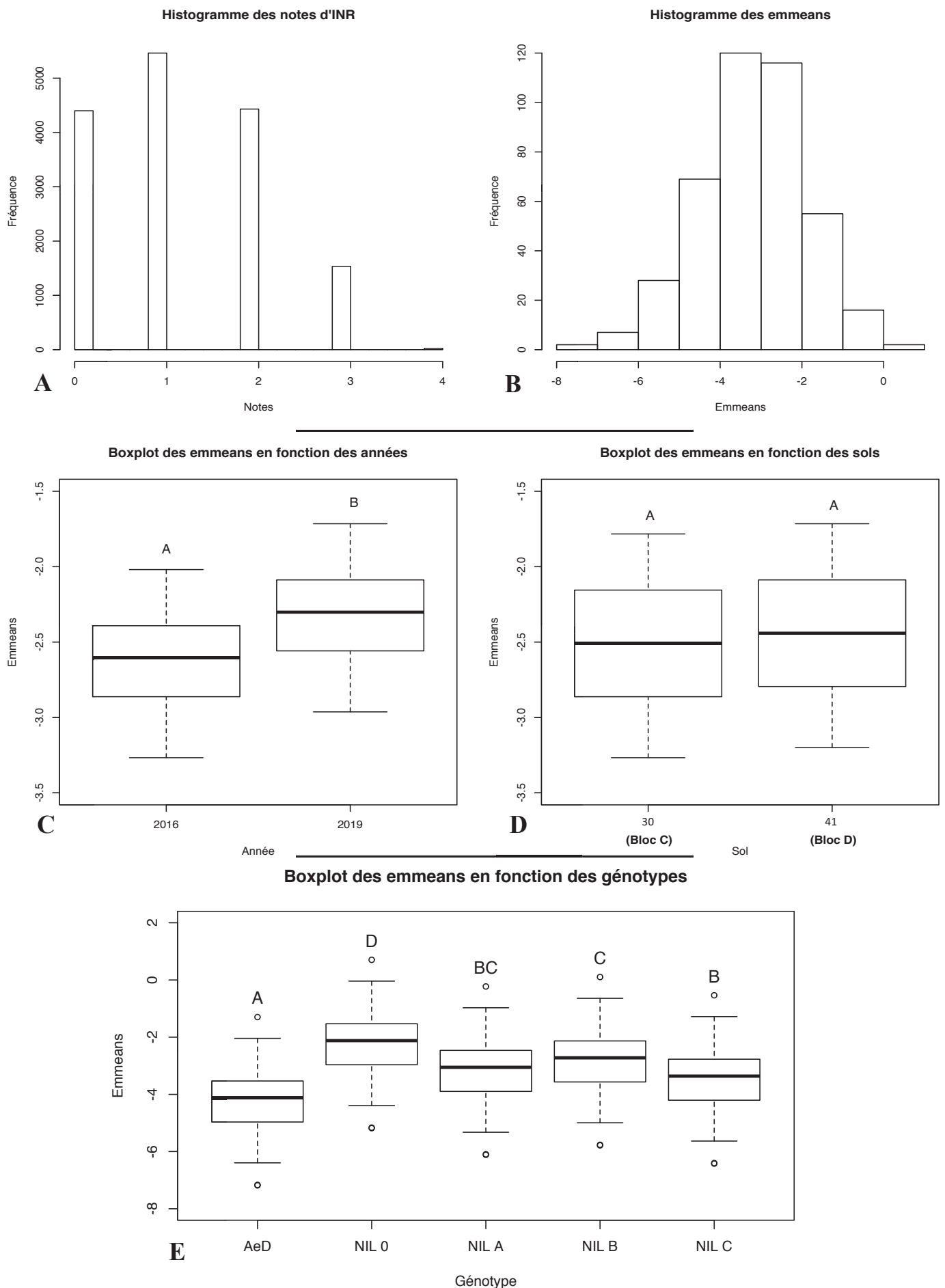
Séquence (5' - 3') de l'amorce 588R : TTGTTCTCAGCGAGGTTGTCGT

#### IV.2.d Classement des géotypes étudiés en fonction de leur niveau de résistance

Le classement du set de géotypes de pois testés pour la résistance/sensibilité aux populations d'*A. euteiches* étudiées est cohérent avec le classement obtenu précédemment au cours de l'étude du PI. Ce classement, du géotype le plus résistant au plus sensible, est : (1) AeD, (2) NIL C, (3) NIL A, (4) NIL B, (5) NIL 0 (Figure 20.E), la NIL C n'étant pas étudiée précédemment (partie IV.1.b). Les géotypes AeD et NIL 0 ont présenté des moyennes ajustées d'INR significativement différentes entre elles et de celles des NILs testées.

#### IV.2.e Profil d'agressivité des différentes souches d'*A. euteiches*

Les isolats I.61 et I.69 prélevés en 2019 n'ont pas pu être inoculés du fait d'un défaut de développement du mycélium dans le milieu PG au cours des deux réplifications. L'identification d'*A. euteiches* (partie IV.2.a) a néanmoins été effectuée par PCR pour ces 2 isolats. Les moyennes ajustées d'INR, obtenues pour l'ensemble des 82 isolats d'*A. euteiches* et la souche témoin RB84 inoculés sur le set différentiel de 5 géotypes, présentent une distribution gaussienne (Figure 20.B). Le heatmap établi à partir de ces moyennes ajustées, regroupées en classe d'agressivité, permet de visualiser la variabilité des isolats pour leur agressivité sur les géotypes étudiés et de la comparer entre les sols et les années (Figure 21). Le heatmap confirme que les populations d'*A. euteiches* sont plus agressives en 2019 au sein des sols 30 et 41 comparées à l'année 2016. La souche témoin RB84 possède l'agressivité la plus élevée. La proportion d'isolats agressifs, *i.e.* sans différence significative avec l'agressivité de la souche témoin RB84 ( $\alpha=0,5\%$ ), augmente de 71% à 80% pour le sol 30 et de 67% à 85% pour le sol 41, entre 2016 et 2019. Les isolats présentent une agressivité significativement peu différente entre eux sur l'ensemble du set de géotypes testés. Le témoin pois AeD a conservé une résistance efficace tandis que le témoin pois NIL 0 sur fond génétique Isard sans QTL est resté très sensible en 2019 comparé à 2016. La monoculture de la NIL A de pois sur 4 ans au sein des sols 30 et 41 de la parcelle de Bignan a augmenté la proportion d'isolats agressifs sur les NIL A, NIL B et NIL C au sein des différentes populations d'*A. euteiches*. La résistance partielle de la NIL A à l'agent pathogène est restée néanmoins plus efficace que celle de la NIL B malgré son exposition à l'agent pathogène au cours des 4 années.



**Figure 20 :** Boxplot des valeurs de moyennes ajustées (emmeans) obtenues à partir de notes d'INR sur un set différentiel de 5 géotypes de pois (AeD, NIL A, NIL B, NIL C et NIL 0) pour 84 isolats (21 isolats provenant respectivement des sols 30 et 41 des années 2016 et 2019 de la parcelle expérimentale de Bignan) et la souche témoin RB84. **A.** Histogramme des notes d'INR. **B.** Histogramme des emmeans. **C.** Boxplot des emmeans en fonction des années. **D.** Boxplot des emmeans en fonction des sols. **E.** Boxplot des emmeans en fonction des géotypes. Une valeur de emmean élevée correspond à un INR élevé et inversement. Les tests de comparaison de moyennes sont effectués au seuil de risque  $\alpha=5\%$  et sont représentés par les lettres A, B, C et D.

## Discussion

---

L'étude de l'évolution du PI de sols infestés par *A. euteiches* ainsi que l'évolution de l'agressivité des populations du bioagresseur au cours du temps face à des sources de résistance quantitative est primordiale afin d'espérer un déploiement efficace et durable des QTL au sein de nouvelles variétés. Les résultats obtenus ont souligné ces évolutions et donnent lieu à différents points de discussion concernant, (i) la qualité du dispositif de phénotypage et de la méthodologie expérimentale, (ii) la limitation du PI du sol par l'usage de rotation pois-féverole et de différents niveaux de résistance chez le pois, (iii) l'évolution de l'agressivité des populations d'*A. euteiches* après une monoculture de 4 années de la succession de la NIL A.

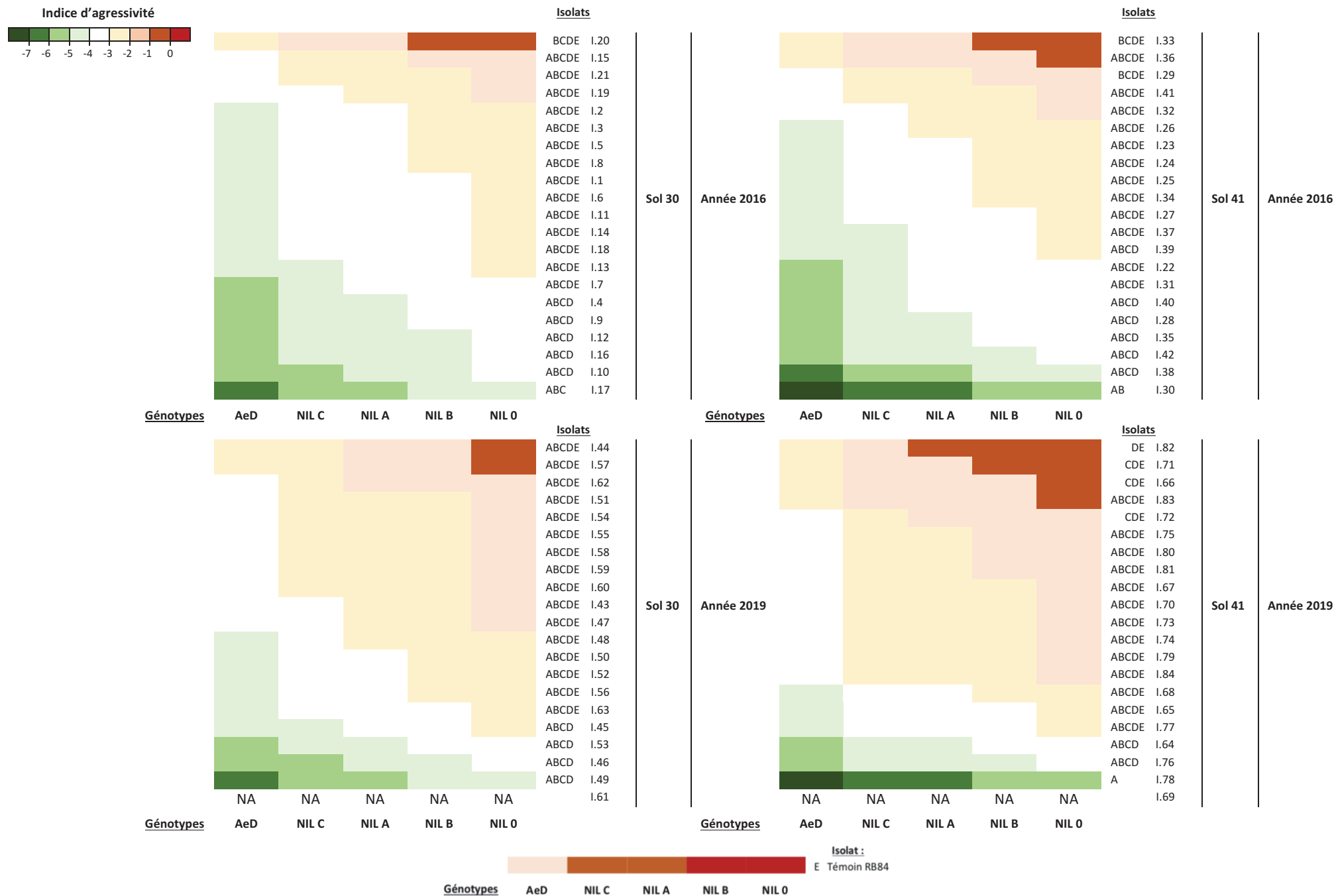
### V.1 Méthodologie et dispositif de test

L'utilisation d'une échelle de notation d'INR dans l'analyse du niveau de PI du sol ou de l'agressivité des isolats peut apporter un biais lié à l'effet du notateur qui peut être plus ou moins important en fonction de son expérience et de sa régularité au cours des sessions de phénotypage. Dans cette étude, un même notateur a réalisé l'ensemble des notations pour le test de PI ce qui a limité ce biais. Concernant le test d'agressivité des populations d'*A. euteiches*, deux notateurs ont réalisé les notations d'INR et la quasi-totalité des plantes de chaque plateau a été notée par le même notateur, ce qui a confondu l'effet notateur avec celui des plateaux. La variabilité liée aux différentes modalités de la variable « Plateau » a été observée dans le test de criblage des isolats ( $p\text{-value} < 0,05$ ) puis placée en effet aléatoire dans le modèle d'analyse des données, comme décrit dans la partie III.5.b. Cette variabilité a concerné (i) la température et l'humidité, qui ont été différentes en fonction de la position du plateau dans la chambre, (ii) l'effet du notateur pour chaque plateau, (iii) les interactions entre les différents plateaux, les génotypes et les isolats. Les plateaux n'ayant pas été considérés dans le dispositif des tests de PI des années 2016, 2017 et 2018, cette variable n'a pas été étudiée dans le modèle d'analyse du PI.

### V.2 Effet du niveau de résistance chez le pois et de l'usage de la féverole en rotation pour limiter le potentiel infectieux du sol

Dans cette étude, les niveaux de PI observés dans les sols des différentes successions ont évolué dans le temps, selon différents facteurs environnementaux, l'usage ou non de la féverole résistante dans la rotation et le niveau de résistance des génotypes de pois utilisés dans les successions.





**Figure 21 :** Heatmap du profil d'agressivité de 84 isolats d'*A. euteiches* inoculés chacun sur un set différentiel de 5 génotypes de pois (AeD, NIL A, NIL B, NIL C et NIL 0). Les isolats ont été prélevés dans les sols 30 et 41 de la parcelle de Bignan en 2016 et 2019. L'indice d'agressivité correspond aux emmeans du modèle CLMM. La couleur verte indique une agressivité faible et la couleur rouge indique une agressivité élevée. Les tests de comparaison de moyennes sont effectués au seuil de risque  $\alpha=0,5\%$  et sont représentés par les lettres A, B, C, D et E.

### V.2.a Facteurs environnementaux influençant l'évolution du potentiel infectieux du sol

Il est communément admis que le PI d'une parcelle initialement saine, puis infestée par *A. euteiches*, augmente de façon croissante avec le temps si cette parcelle est régulièrement cultivée avec des variétés sensibles (Marie-Laure Pilet-Nayel, INRA, communication personnelle 2019). La diminution du PI des sols de la parcelle de Bignan entre 2017 et 2019 peut être liée à la variabilité inter-annuelle des conditions de test PI en chambre climatique et/ou des facteurs climatiques (température et pluviométrie) impactant le développement de l'agent pathogène au champ. Il serait donc intéressant d'étudier le PI de la parcelle sur une période plus longue de 15 à 20 ans.

### V.2.b Usage de la féverole en alternance avec le pois pour limiter l'évolution du potentiel infectieux du sol

Les successions menées au sein des différents sols de la parcelle, *i.e.* monoculture pois-pois ou rotation pois-féverole pendant 4 ans, ne sont pas représentatives des itinéraires techniques les plus communs des exploitations agricoles françaises. Environ 10% des rotations des grandes cultures intègrent une légumineuse avec un retour moyen tous les 3 ans<sup>1</sup>. Néanmoins, dans cette étude, l'augmentation du PI du sol dans les successions alternant pois et féverole résistante a été en moyenne moins élevée que dans les monocultures de pois. Ces résultats appuient de façon stéréotypée, l'hypothèse d'une meilleure efficacité d'un système de culture alterne avec un hôte résistant dans la gestion du risque *A. euteiches* comparé à un système de monoculture.

### V.2.c Niveau de résistance du pois et effet des QTL pour limiter l'évolution du potentiel infectieux du sol

Sur les 4 années étudiées, les niveaux de PI des sols ont montré des différences marquées en fonction du niveau de résistance/sensibilité des géotypes de pois cultivés dans ces sols. L'usage original de NILs, dont les génomes ne diffèrent que par les QTL, a permis d'inféoder les différences de PI des sols aux QTL portés dans les NILs cultivées dans ces sols. Dans cette étude, le géotype AeD présente un niveau élevé de résistance, conféré par le cumul d'un grand nombre de facteurs génétiques associés à la résistance (Desgroux et al., 2016). La combinaison de QTL est une stratégie pour augmenter le niveau de résistance partielle des plantes et sa durabilité (Pilet-Nayel et al., 2017). La NIL A et la NIL B implantées dans le

<sup>1</sup>Agreste. Pratiques culturales 2011, principaux résultats. [En ligne] Disponible sur : [http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/dossier21\\_integral.pdf](http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/dossier21_integral.pdf) (consultée le 21 août 2019).



dispositif présentent des niveaux différents de résistance partielle, conférés par différentes combinaisons de QTL. Après la mise en place du dispositif expérimental de Bignan, Lavaud, (2015) a montré que la NIL B avait perdu l'introgression ciblée au QTL *Ae-Ps3.1* dans le processus de sélection et a confirmé les effets faibles des allèles d'origine 552 présents dans cette NIL aux QTL *Ae-Ps2.2* et *Ae-Ps7.6* (Lavaud, 2015). En revanche, l'effet des allèles d'origine 90-2131 aux QTL *Ae-Ps7.6* et *Ae-Ps5.1* dans la NIL A a été validé, spécialement l'effet plus élevé de l'allèle 90-2131 au QTL *Ae-Ps7.6*. Ceci explique les valeurs de PI inférieures observées pour les sols cultivés avec la NIL A comparées aux sols cultivés avec la NIL B, dans les différents systèmes.

L'association des deux NILs A et B en mélange dans une modalité de succession visait à tester l'hypothèse d'un effet accru de l'association de combinaison de QTL sur la limitation du PI. Cette hypothèse n'a pas été confirmée, les valeurs de PI des sols issus des micro-parcelles cultivées en mélange NIL A + NIL B étant intermédiaires entre celles des sols issus des NIL A et NIL B. La combinaison d'allèles mineurs à un QTL majeur peut ne pas avoir un effet suffisant pour contre-balancer l'effet du QTL majeur. Cependant, le lieu d'expérimentation peut également faire varier l'effet des QTL.

### **V.3 Evolution de l'agressivité des isolats d'*A. euteiches* dans une succession de la NIL A en monoculture**

L'agressivité des populations d'isolats isolés de sols cultivés avec une monoculture de la NIL A a augmenté entre 2016 et 2019.

Cette observation a été réalisée à partir de sols localisés dans des blocs de la parcelle de PI plus élevé (C et D), afin d'avoir deux répétitions de sol dans des conditions de contamination similaire et afin d'optimiser les chances de piéger le nombre d'isolats souhaité à partir de plantes symptomatiques issues des tests de PI.

Cette observation a également été réalisée de manière répétée sur un set de 5 génotypes de pois (1) AeD, (2) NIL C, (3) NIL A, (4) NIL B, (5) NIL 0, numérotés du plus résistant au plus sensible, après l'inoculation d'un nombre représentatif d'isolats d'*A. euteiches* (42 isolats en 2016 et 40 isolats en 2019) et du témoin RB84. Le set de génotypes fait partie des 10 génotypes de pois utilisés par Quillévéré-Hamard et al., (soumis) pour évaluer le niveau d'agressivité de 43 isolats d'origine française (Figure 10). La faible taille des micro-parcelles (16 m<sup>2</sup>) dans lesquelles les sols ont été échantillonnés offre a priori l'accès à une variabilité plus restreinte des populations échantillonnées au sein des micro-parcelles de l'essai, comparée à la



variabilité observée par Quillévéré-Hamard et al., (soumis) au sein de 43 isolats prélevés dans des parcelles provenant de différentes régions françaises.

Il semblerait que la NIL A, porteuse des QTL *Ae-Ps7.6* et *Ae-Ps5.1*, ait conduit à la sélection d'isolats plus agressifs au sein des populations d'*A. euteiches* des sols 30 et 41 au cours du temps. Ce résultat questionne donc quant à la durabilité de la résistance partielle conférée par la combinaison du QTL majeur *Ae-Ps7.6* et du QTL mineur *Ae-Ps5.1*, lors d'un déploiement non raisonné dans les futures variétés. Dans cette étude, le QTL *Ae-Ps7.6* seul dans la NIL C a présenté un effet plus élevé que l'effet de sa combinaison avec le QTL *Ae-Ps5.1* dans la NIL A et que l'effet de la combinaison des QTL introgressés dans la NIL B. Une interaction entre les QTL *Ae-Ps7.6* et le fond génétique Isard, augmentant le niveau de résistance de la NIL C, a été observé par Lavaud et al., (2015). Des interactions entre la combinaison des QTL *Ae-Ps7.6* et *Ae-Ps5.1* et le fond génétique Isard, limiteraient le niveau de résistance de la NIL A comparé à la NIL C. Le cumul d'allèles de résistance semble néanmoins être une stratégie prometteuse pour atteindre des niveaux de résistance élevés tel que celui du génotype AeD, qui dans cette étude a présenté une résistance partielle à la plupart des isolats prélevés en 2019.

## Conclusion et perspectives

---

Une meilleure connaissance de la capacité d'évolution des populations d'*A. euteiches* face aux sources de résistance quantitative caractérisées ces 20 dernières années est primordiale afin d'anticiper un déploiement durable des QTL au sein des futures variétés résistantes de pois inscrites au catalogue français. Limiter l'érosion de l'efficacité des sources de résistance est d'autant plus important que ces sources sont peu nombreuses dans la variabilité naturelle et que seulement 7 principaux QTL ont été identifiés dans les études génétiques menées depuis 20 ans (Pilet-Nayel et al., 2019).

Deux hypothèses de recherche ont fondé les travaux développés dans ce stage de fin d'études:

- La combinaison de QTL de résistance et l'usage de la féverole en alternance avec le pois dans des successions de culture de légumineuses permettent de limiter le potentiel infectieux du sol dû à *A. euteiches*.
- La culture récurrente de lignées de pois porteuses de QTL conférant une résistance partielle augmente le risque d'érosion de QTL de résistance par sélection de souches d'*A. euteiches* plus agressives, et affecte ainsi la durabilité de leurs effets.

Une première étude des 52 sols de la parcelle expérimentale de Bignan, menée entre 2016 et 2019, a montré l'efficacité de l'alternance pois – féverole pour limiter l'augmentation du PI



comparée à une monoculture de pois. De plus, la combinaison des QTL (*Ae-Ps5.1* + *Ae-Ps7.6*) introgressés au sein de la NIL A étudiée, a montré une efficacité supérieure pour limiter le PI du sol par rapport à la NIL B porteuses de 3 QTL (*Ae-Ps2.2* + *Ae-Ps3.1* + *Ae-Ps7.6*) et à l'association à 50% de la NIL A et de la NIL B. Le témoin AeD, cumulant un grand nombre d'allèles de résistance, a montré une efficacité accrue par rapport aux NILs et proche de celles des variétés de féverole étudiées, de limitation de l'augmentation du potentiel infectieux du sol.

Une seconde étude a souligné une augmentation de l'agressivité des populations d'*A. euteiches* entre 2016 et 2019 au sein de 2 sols de micro-parcelles (16 m<sup>2</sup>) cultivés en monoculture avec la NIL A. En relation, elle a mis en évidence une réduction du niveau moyen de résistance partielle du set de NILs étudié vis-à-vis des isolats des 2 sols prélevés en 2019 comparé à ceux prélevés en 2016. Les résultats obtenus en analysant l'évolution de l'agressivité des populations d'*A. euteiches* ont été cohérents à ceux obtenus dans l'analyse de l'évolution du PI du sol, suggérant une corrélation positive entre l'agressivité des populations d'*A. euteiches* et le PI du sol.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce stage seront poursuivis, d'une part, par une analyse de l'évolution du PI sur 4 années supplémentaires dans les successions étudiées, d'autre part, par une analyse comparative de l'évolution de l'agressivité de populations d'isolats issus de sols cultivés en monoculture avec la variété sensible Isard par rapport à celle observée dans cette étude dans les populations issus de sols cultivés avec la NIL A, dont le génome ne diffère de la variété Isard que par les 2 QTL *Ae-Ps5.1* et *Ae-Ps7.6*. Cette dernière analyse permettrait de vérifier si l'augmentation de l'agressivité des isolats observée dans cette étude est due à la pression exercée par les QTL sur les populations, ce qui constitue l'hypothèse de recherche. Par ailleurs, peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes moléculaires et biologiques de la résistance à *A. euteiches* conférée par les QTL identifiés chez le pois. Un approfondissement de ces connaissances permettrait d'envisager des stratégies de combinaison de QTL à mécanismes/modes d'action complémentaires, pour la création de variétés présentant des niveaux accrus de résistance potentiellement plus durables face aux populations d'*A. euteiches* (Hamon, 2010 ; Lavaud, 2015). Une caractérisation génomique plus précise des positions des locus de résistance au sein du génome du pois dans une diversité élargie de sources de résistance permettrait d'identifier des marqueurs étroitement liés aux QTL et de diversifier les allèles de résistance identifiés afin d'affiner les stratégies de sélection futures.



## Références bibliographiques

---

Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. 5th Edition, Academic Press. ISBN: 978-0-12-044565-3

Allmaras, R. (2003). Impaired internal drainage and *Aphanomyces euteiches* root rot of pea caused by soil compaction in a fine-textured soil. Soil and Tillage Research, 70(1), 41–52. doi:10.1016/s0167-1987(02)00117-4

Boyeldieu, J. (1991). Produire des grains oléagineux et protéagineux. Paris, Lavoisier Tec&Doc, p 256. ISBN: 978-2-8520-6763-9

Christensen, R. H. B. (2019). ordinal: regression models for ordinal data. R package version 2019.3-9. <http://www.cran.r-project.org/package=ordinal/>

Crosson, P., & Moussart, A. (2011). *Aphanomyces* - Un test pour cultiver du pois sans craintes. Perspectives agricoles, 378:68-71. ISSN:0399-8533

Desgroux, A. (2016). Rôle de l'architecture racinaire dans le contrôle génétique de la diminution des symptômes de pourriture racinaire dus à *Aphanomyces euteiches* chez le pois (*Pisum sativum*). Biologie végétale. Agrocampus Ouest. Français. <NNT : 2016NSARA076>. <tel-01615191v2>

Do Vale, F. X. R. D., Parlevliet, J. E., & Zambolim, L. (2001). Concepts in plant disease resistance. Fitopatologia Brasileira, 26(3), 577–589. doi:10.1590/s0100-41582001000300001

Dronne Y. (2003). L'approvisionnement en protéines de la France dans son contexte européen et mondial. Fourrages, Association Française pour la Production Fourragère, pp.107-128. hal-01931655

Fox, J., & Weisberg, S. (2011). An {R} companion to applied regression. Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>

Gali, K. K., Tar'an, B., Madoui, M.-A., van der Vossen, E., van Oeveren, J., Labadie, K., ... Warkentin, T. (2019). Development of a sequence-based reference physical map of pea (*Pisum sativum* L.). Frontiers in Plant Science, 10. doi:10.3389/fpls.2019.00323

Gangneux, C., Cannesan, M.-A., Bressan, M., Castel, L., Moussart, A., Vicré-Gibouin, M., ... Laval, K. (2014). A sensitive assay for rapid detection and quantification of *Aphanomyces euteiches* in soil. Phytopathology, 104(10), 1138–1147. doi:10.1094/phyto-09-13-0265-r

Gaulin, E., Jacquet, C., Bottin, A., & Dumas, B. (2007). Root rot disease of legumes caused by *Aphanomyces euteiches*. Molecular Plant Pathology, 8(5), 539–548. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00413.x

Gaulin, E., Pel, M. J. C., Camborde, L., San-Clemente, H., Courbier, S., Dupouy, M.-A., ... Dumas, B. (2018). Genomics analysis of *Aphanomyces* spp. identifies a new class of oomycete effector associated with host adaptation. BMC Biology, 16(1). doi:10.1186/s12915-018-0508-5

Grau, C. R., Muehlchen, A. M., & Tofte, J. E. (1991) Variability in virulence of *Aphanomyces euteiches*. *Plant Disease*, 75, 1153 – 1156. doi:10.1094/PD-75-1153

Grünwald, N. J., & Hoheisel, G.-A. (2006). Hierarchical analysis of diversity, selfing, and genetic differentiation in populations of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, 96(10), 1134–1141. doi:10.1094/phyto-96-1134

Hamon, C. (2010). Variabilité structurale des déterminants génétiques de la résistance à *Aphanomyces euteiches* chez le pois (*Pisum sativum* L.) et l'espèce légumineuse modèle, *Medicago truncatula*. *Biologie végétale. Agrocampus Ouest. Français*. N° ordre : 2010-3 N° Série : C-95

Hamon, C., Baranger, A., Coyne, C. J., McGee, R. J., Le Goff, I., L'Anthoëne, V., ... Pilet-Nayel, M.-L. (2011). New consistent QTL in pea associated with partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in multiple French and American environments. *Theoretical and Applied Genetics*, 123(2), 261–281. doi:10.1007/s00122-011-1582-z

Hamon, C., Coyne, C. J., McGee, R. J., Lesné, A., Esnault, R., Mangin, P., ... Pilet-Nayel, M.-L. (2013). QTL meta-analysis provides a comprehensive view of loci controlling partial resistance to *Aphanomyces euteiches* in four sources of resistance in pea. *BMC Plant Biology*, 13(1), 45. doi:10.1186/1471-2229-13-45

Hervé, M. (2019). RVAideMemoire: testing and plotting procedures for biostatistics. R package version 0.9-72. <https://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire>

Hospital, F. (2005). Selection in backcross programmes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1459), 1503–1511. doi:10.1098/rstb.2005.1670

Hughes, T., & Grau, G. (2007). *Aphanomyces* root rot or common root rot of legumes. *The Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-I-2007-0418-01

Johnson, R. (1981). Durable resistance: definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology* 71:567. doi: 10.1094/Phyto-71-567

Jones, F. R. & C. Drechsler. (1925). Root rot of peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches* (n.sp.). *J. Agr. Research*, 30, 293–325

Kraft, J. M. (1992). Registration of 90-2079, 90-2131, and 90-2322 pea germplasms. *Crop Sci*, 32:1076

Lavaud, C. (2015). Diversité et combinaison des modes d'actions des QTL de résistance à *Aphanomyces euteiches* chez le pois. *Biologie végétale. Agrocampus Ouest. Français*. <NNT: 2015NSARC121>. <tel-01493826>

Lavaud, C., Baviere, M., Le Roy, G., & Pilet-Nayel, M. L. (2016). Single and multiple resistance QTL delay symptom appearance and slow down root colonization by *Aphanomyces euteiches* in pea near isogenic lines. *BMC Plant Biology*, 16(1). doi: 10.1186/s12870-016-0822-4

Lavaud, C., Lesné, A., Piriou, C., Le Roy, G., Boutet, G., Moussart, A., ... Pilet-Nayel,

M.-L. (2015). Validation of QTL for resistance to *Aphanomyces euteiches* in different pea genetic backgrounds using near-isogenic lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(11), 2273–2288. doi:10.1007/s00122-015-2583-0

Lecoeur, J. (2005) Développement végétatif. In: Murier-Jolain N (ed) *Agrophysiologie du pois protéagineux*. QUAE, Paris, pp 27-36. ISBN(INRA):2-7380-1182-9

Le May, C., Onfroy, C., Moussart, A., Andrivon, D., Baranger, A., Pilet-Nayel, M. L., & Vandemark, G. (2017). Genetic structure of *Aphanomyces euteiches* populations sampled from United States and France pea nurseries. *European Journal of Plant Pathology*, 150(2), 275–286. doi:10.1007/s10658-017-1274-x

Lenth, R. (2019). Emmeans: estimated marginal means, aka least-squares means. R package version 1.3.3. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>

Lewis, M., Gritton, E. (1992). Use of one cycle of recurrent selection per year for increasing resistance to *Aphanomyces* root rot in peas. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 117(4):638-42. doi:10.21273/JASHS.117.4.638

Lockwood, J., Ballard, J. (1960). Evaluation of pea introductions for resistance to *Aphanomyces* and *Fusarium* root rots. *Michigan Quaterly Bulletin*. 42:704-713

Moussart, A., Pilet-Nayel, M. L., & Baranger, A. (2018). Gestion du risque *Aphanomyces* sur pois. 12<sup>ème</sup> conférence internationale sur les maladies des plantes. Végéphyl. Tours

Moussart, A., Wicker, E., Duparque, M., & Rouxel, F. (2001). Development of an efficient screening test for pea resistance to *Aphanomyces euteiches*. In: AEP (ed) 4th Eur Conf Grain Legumes. July 8-12th, Cracow, Poland

Munier-Jolain, N., Biarnès, V., Chaillet, I., Lecoeur, J., & Jeuffroy, M. H. (2005). Elaboration des composantes du rendement. In: INRA/ITCF/UNIP (ed) *Agrophysiologie du pois protéagineux*, p 281. ISBN(INRA):2-7380-1182-9

Pariaud, B., Robert, C., Goyeau, H., & Lannou, C. (2009). Aggressiveness components and adaptation to a host cultivar in wheat leaf rust. *Phytopathology*, 99(7), 869–878. doi:10.1094/phyto-99-7-0869

Parlevliet, J. E. (2002). Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica*, 124(2), 147–156. doi:10.1023/a:1015601731446

Pilet-Nayel, M. L., Moury, B., Caffier, V., Montarry, J., Kerlan, M.-C., Fournet, S., Durel, C.-E., & Delourme, R. (2017). Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 8. doi:10.3389/fpls.2017.01838

Pilet-Nayel, M. L., Moussart, A., & Le May, C. (2019). *Aphanomyces* du pois. Des avancées en génétique de la résistance. *Perspectives Agricoles*, n°469, pp 42-46

Pilet-Nayel, M. L., Muehlbauer, F., McGee, R., Kraft, J., Baranger, A., & Coyne, C.

(2002). Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(1), 28–39. doi:10.1007/s00122-002-0985-2

Pilet-Nayel, M. L., Muehlbauer, F. J., McGee, R. J., Kraft, J. M., Baranger, A., & Coyne, C. J. (2005). Consistent quantitative trait loci in pea for partial resistance to *Aphanomyces euteiches* isolates from the United States and France. *Phytopathology*, 95(11), 1287–1293. doi:10.1094/phyto-95-1287

Quillévéré-Hamard, A., Le Roy, G., Moussart, A., Baranger, A., Andrivon, D., Le May, C., & Pilet-Nayel, M-L. Aggressiveness diversity of *Aphanomyces euteiches* isolates from pea-growing regions in France on single and multiple resistance QTL in pea near isogenic lines. Submitted article

Quillévéré-Hamard, A., Le Roy, G., Moussart, A., Baranger, A., Andrivon, D., Pilet-Nayel, M.-L., & Le May, C. (2018). Genetic and pathogenicity diversity of *Aphanomyces euteiches* populations from pea-growing regions in France. *Frontiers in Plant Science*, 9. doi:10.3389/fpls.2018.01673

R Core Team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Sauvage, H., Moussart, A., Bois, F., Tivoli, B., Barray, S., & Laval, K. (2007). Development of a molecular method to detect and quantify *Aphanomyces euteiches* in soil. *FEMS Microbiology Letters*, 273(1), 64–69. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00784.x

Schneider, A., & Huyghe, C. (2015). Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables. Editions Quae, p 512. ISBN:978-2-7592-2334-3

Stekhoven, D. J., & Buehlmann, P. (2012). MissForest: non-parametric missing value imputation for mixed-type data. *Bioinformatics*, 28(1), 112-118

Treigien, A., & Markovskaja, S. (2007). Microscopic fungi on *Carpinus betulus* in Lithuania 2. Anamorphic Fungi *Botanica Lithuanica*, 13: 45–50

Van Leur, J. A. G., Southwell, R. J., & Mackie, J. M. (2008). *Aphanomyces* root rot on faba bean in northern NSW. *Australasian Plant Disease Notes*, 3(1), 8. doi:10.1071/dn08004

Vandemark, G. J., Barker, B. M., & Gritsenko, M. A. (2002). Quantifying *Aphanomyces euteiches* in alfalfa with a fluorescent polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 92(3), 265–272. doi:10.1094/phyto.2002.92.3.265

Vandemark, G. J., Kraft, J. M., Larsen, R. C., Gritsenko, M. A., & Boge, W. L. (2000). A PCR-based assay by sequence-characterized DNA markers for the identification and detection of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, 90(10), 1137–1144. doi:10.1094/phyto.2000.90.10.1137

Wicker, E. (2001). Diversité des populations françaises d'*Aphanomyces euteiches* Drechs., agent de la pourriture racinaire du pois: variabilité pathogène et moléculaire. Génétique des populations [q-bio.PE]. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de

Rennes. Français. <tel-01269995>

Wicker, E., Hulle, M., & Rouxel, F. (2001). Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology*, 50(4), 433–442. doi:10.1046/j.1365-3059.2001.00590.x

Wicker, E., & Rouxel, F. (2001). Specific behaviour of French *Aphanomyces euteiches* Drechs. Populations for virulence and aggressiveness on pea, related to isolates from Europe, America and New Zealand. *European Journal of Plant Pathology*, 107(9), 919–929. doi:10.1023/a:1013171217610

Wu, L., Chang, K.-F., Hwang, S.-F., Conner, R., Fredua-Agyeman, R., Feindel, D., & Strelkov, S. E. (2018). Evaluation of host resistance and fungicide application as tools for the management of root rot of field pea caused by *Aphanomyces euteiches*. *The Crop Journal*. doi:10.1016/j.cj.2018.07.005

### **Sites web :**

Agreste. Données de production grandes cultures (national + régions) au 01/06/2019. [En ligne] Disponible sur <http://agreste.agriculture.gouv.fr/conjoncture/grandes-cultures-et-fourrages/> (consultée le 11 juin 2019)

Agreste. Pratiques culturales 2011, principaux résultats. [En ligne] Disponible sur : [http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/dossier21\\_integral.pdf](http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/dossier21_integral.pdf) (consultée le 21 août 2019).

Soystats. (2017). A reference guide to important soybean facts and figures. American Soybean Association. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.agripulse.com/ext/resources/AgSummit/2017-SoyStats.pdf> (consultée le 16 mai 2019).

Terres Univia. *Aphanomyces* : vérifier le potentiel infectieux de la parcelle avant l'implantation du pois. [En ligne]. Disponible sur : <https://www.terresunivia.fr/-/aphanomyces-verifier-le-potentiel-infectieux-de-la-parcelle-avant-l-implantation-du-pois> (consultée le 02 septembre 2019).

Terres Univia. Protéagineux. [En ligne] Disponible sur : <http://www.terresunivia.fr/produitsdebouches/alimentation-animale/proteagineux> (consultée le 29 avril 2019).

Terres Univia. Soja. [En ligne] Disponible sur : <http://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees/soja> (consultée le 29 avril 2019)

Terres Univia. Surfaces, rendements, productions et débouchés. [En ligne] Disponible sur <http://www.terresunivia.fr/reglementation-marches/statistiques/surfaces-rendements-et-productions> (consultée le 29 avril 2019)

Terres Univia. Tourteaux d'oléagineux. [En ligne] Disponible sur : <http://www.terresunivia.fr/produitsdebouches/alimentation-animale/tourteaux-d-oleagineux> (consultée le 29 avril 2019)

Vegenov. Plaquette de présentation PROGRAILIVE. [En ligne] Disponible sur :

<https://www.vegenov.com/vars/fichiers/Plaquette%20PROGRAILIVE-1.pdf> (consultée le 28 mai 2019)

Vegepolys. Plaquette de présentation du programme SOS PROTEIN. [En ligne] Disponible sur : <https://www.vegepolys.eu/les-projets-innovants/les-projets-precompetitifs/les-projets-en-cours/sos-protein/> (consultée le 28 mai 2019)

## Annexes

---

### Itinéraire technique de la parcelle de Bignan de 2016 à 2019

Itinéraire technique de l'année 2016. Parcelle expérimentale « Charbonnerie », Domaine de Kerguéhennec. Chambre d'agriculture de Bretagne, 56500 Bignan.

Intervention	Date	Description
Piquetage, semis	17 mars 2016	Semoir expérimental
Prélèvements de sol	18 mars 2016	Objectif : Évaluation du potentiel infectieux de chaque parcelle de l'essai. Isolement d'isolats de chaque sol au laboratoire
Traitement désherbage	24 mars 2016	Pulvérisation manuelle NIRVANA <sup>®</sup> (Imazamox + Pendiméthaline ; 4,5 L/ha)
Prélèvements de plantes	3 mai, 12 mai, 18 mai 2016	Suivi de la maladie racinaire sur lignées sensibles et résistantes avant notation définitive de l'INR
Traitement désherbage	17 mai 2016	Pulvérisation manuelle CORUM <sup>®</sup> (Imazamox + Bentazone ; 1,2 L/ha) + DASH <sup>®</sup> (Acide oléique + Esters de phosphate d'alcools gras polyoxyalkylés + Esters méthyliques d'acides gras ; 1,2 L/ha)
Prélèvements pour notation INR	1 <sup>er</sup> juin 2016	Prélèvements de 20 plantes/parcelle
Notations INR	2, 3 juin 2016	Notations à l'INRA (Le Rheu)
Notations de la hauteur	23 juin 2016	Hauteur moyenne du couvert par parcelle
Notations IDA	12 juillet 2016	Pas de jaunissement observé, pas de notation
Implantation d'avoine en CIPAN	Début septembre 2016	Parcelles semées à environ 80 % de surface. Semis avec herse rotative

Itinéraire technique de l'année **2017**. Parcelle expérimentale « Charbonnerie », Domaine de Kerguéhennec. Chambre d'agriculture de Bretagne, 56500 Bignan.

<b>Intervention</b>	<b>Date</b>	<b>Description</b>
Piquetage, semis	20 mars 2017	Semoir expérimental combiné à une herse rotative
Prélèvements de sol	20 mars 2017	Objectif : Évaluation du potentiel infectieux de chaque parcelle de l'essai
Traitement désherbage	24 mars 2017	Pulvérisation manuelle CHALLENGE® (Aclonifène ; 2,5 L/ha) + CENTIUM® (Clomazone ; 0,2 L/ha)
Pose de filets lapins	25 mars 2017	Dégâts liés à la sitone du pois ( <i>Sitona lineatus</i> )
Prélèvements de plantes	4 mai, 11 mai 2017	Suivi de la maladie racinaire sur lignées sensibles et résistantes avant notation définitive de l'INR
Prélèvements pour notation INR	15 mai 2017	Prélèvements de 20 plantes/parcelle
Notations INR	16 mai 2017	Notations à l'INRA (Le Rheu)
Notations de l'état sanitaire des parcelles	9 juin 2017	Dégâts liés aux gibiers suite à l'enlèvement des filets et la coupe du dactyle
Notations IDA et hauteurs	22 juin 2017	IDA notable uniquement sur le pois
Dépiquetage	29 juin 2017	



Itinéraire technique de l'année **2018**. Parcelle expérimentale « Charbonnerie », Domaine de Kerguéhenec. Chambre d'agriculture de Bretagne, 56500 Bignan.

<b>Intervention</b>	<b>Date</b>	<b>Description</b>
Piquetage, semis	22 mars 2018	Semoir expérimental (sans herse rotative combinée)
Prélèvements de sol	22 mars 2018	Objectif : Évaluation du potentiel infectieux de chaque parcelle de l'essai
Traitement désherbage	26 mars 2018	Pulvérisation manuelle NIRVANA <sup>®</sup> (Imazamox + Pendiméthaline ; 3 L/ha) + CHALLENGE <sup>®</sup> (Aclonifène ; 2 L/ha) + TARTAN SUPER 360 <sup>®</sup> (Glyphosate ; 2 L/ha)
Traitement sitones	17 avril 2018	Pulvérisation manuelle DECIS PROTECH <sup>®</sup> (Deltaméthrine ; 0,4 L/ha) + HELIOSOL <sup>®</sup> (Alcools terpeniques ; 0,15 L/ha)
Prélèvements de plantes	3 mai, 15 mai 2018	Suivi de la maladie racinaire sur lignées sensibles et résistantes avant notation définitive de l'INR
Prélèvements pour notation INR	23 mai 2018	Prélèvements de 20 plantes/parcelle
Notations INR	24 mai 2018	Notations à l'INRA (Le Rheu)
Notations IDA	22 juin 2018	IDA
Dépiquetage	5 juillet 2018	
Traitement désherbage	27 août 2018	Pulvérisation manuelle TARTAN SUPER 360 <sup>®</sup> (Glyphosate ; 3 L/ha) + SILWET L 77 <sup>®</sup> (Heptamethyltrisiloxane modifié polyalkyleneoxide ; 0,1 L/ha)

Itinéraire technique de l'année **2019**. Parcelle expérimentale « Charbonnerie », Domaine de Kerguéhennec. Chambre d'agriculture de Bretagne, 56500 Bignan.

<b>Intervention</b>	<b>Date</b>	<b>Description</b>
Piquetage, semis	21 mars 2019	Semoir expérimental + Herse rotative combinée
Prélèvements de sol	21 mars 2019	Objectif : Évaluation du potentiel infectieux de chaque parcelle de l'essai. Isolement d'isolats de chaque sol des blocs C et D au laboratoire
Traitement désherbage	22 mars 2019	Pulvérisation manuelle CHALLENGE <sup>®</sup> (Aclonifène ; 2,5 L/ha) + CENTIUM <sup>®</sup> (Clomazone ; 0,8 L/ha)
Prélèvements de plantes	25 avril, 7 mai et 15 mai 2019	Suivi de la maladie racinaire sur lignées sensibles et résistantes avant notation définitive de l'INR
Traitement désherbage	7 mai 2019	Pulvérisation manuelle CORUM <sup>®</sup> (Imazamox + Bentazone ; 1 L/ha) + ADENDA <sup>®</sup> (Esters méthyliques d'acide gras, C16-C18 et C18 insaturés ; 1 L/ha)
Prélèvements et notation INR	27 mai 2019	Prélèvements de 20 plantes/parcelle et notations au champ
Notations IDA	19 juin 2019	Plantes non notées car dégradées par le gibier
Dépiquetage	4 juillet 2019	

**Nom et Prénom de l'auteur :** Leprévost Théo

**Année :** 2019

**Titre du mémoire :** Impact des sources de résistance variétale sur l'évolution du pouvoir pathogène des populations d'*Aphanomyces euteiches* dans des successions culturales de légumineuses.

**Ecole d'inscription :** Agrocampus Ouest

**Lieu du stage :** INRA – UMR IGEPP, Domaine de la Motte. 35653 LE RHEU Cedex.

## RESUME

Le pois protéagineux (*Pisum sativum*) est une plante de la famille des légumineuses possédant un haut potentiel en alimentation animale ou humaine ainsi que des intérêts agronomiques. La pourriture racinaire molle causée par l'agent pathogène tellurique *Aphanomyces euteiches* est une maladie majeure du pois. Aucun moyen de lutte n'est actuellement disponible, mais la création de variétés résistantes est une méthode prometteuse du fait des acquis de la recherche depuis les 20 dernières années sur l'identification et la validation de QTL, Quantitative Trait Locus, dans des lignées quasi-isogéniques (NILs). Afin d'anticiper un déploiement durable des QTL dans les futures variétés, cette étude a visé à évaluer l'évolution sur 4 ans du potentiel infectieux (PI) du sol et de l'agressivité des populations d'*A. euteiches* dans des successions de NILs de pois et de féverole, cultivées en monoculture ou en alternance, sur une parcelle expérimentale naturellement infestée. L'analyse du PI de 52 sols prélevés annuellement entre 2016 et 2019 dans des micro-parcelles de 13 modalités de successions différentes a montré que le PI était moins élevé dans des sols cultivés avec des génotypes de pois partiellement résistants, incluant notamment une NIL porteuse du QTL majeur *Ae-Ps7.6*, et dans des systèmes alternés pois-féverole. L'analyse de l'agressivité de 84 isolats d'*A. euteiches* isolés en 2016 et en 2019 sur des sols cultivés en monoculture d'une NIL porteuse du QTL *Ae-Ps7.6* en combinaison avec un QTL mineur, a montré une augmentation de la proportion d'individus agressifs au sein des populations d'isolats de 2019 comparée aux isolats de 2016.

**Mots-clés :** *Pisum sativum* – *Aphanomyces euteiches* – NILs – QTL – potentiel infectieux – rotation - agressivité – évolution – sélection.

## ABSTRACT

Pea (*Pisum sativum*) is a legume with high potential for animal and human nutrition as well as agronomic values. *Aphanomyces* root rot caused by *Aphanomyces euteiches* is a major disease of pea. No method of control is currently available but breeding for resistant varieties is promising since many advances have been made in the identification and validation of QTL, Quantitative Trait Locus, in the last twenty years. In order to anticipate the sustainable deployment of QTL in future pea varieties, this study aimed to evaluate in a 4 year-infested field assay the evolution of soil inoculum potential (IP) and aggressiveness of *A. euteiches* populations, in successions of pea NILs and fababean varieties grown in single or alternate cropping systems. The IP analysis of 52 soils annually sampled between 2016 and 2019 from micro-plots of 13 different successions showed that the IP was lower in soils cultivated with partially resistant peas genotypes, especially one NIL carrying the major QTL *Ae-Ps7.6*, and also in soils grown with alternating pea and fababean. The analysis of *A. euteiches* aggressiveness was carried out using 84 *A. euteiches* isolates isolated in 2016 and 2019 from a single crop succession of a pea NIL carrying a combination of the major QTL *Ae-Ps7.6* and a minor QTL. Results showed that the proportion of the most aggressive isolates identified was higher in *A. euteiches* populations isolated in 2019 than on populations isolated in 2016.

**Keywords :** *Pisum sativum* – *Aphanomyces euteiches* – NILs – QTL – infectious potential – rotation - aggressiveness – evolution – selection.