

Faculté des bioingénieurs

Étude de l'interaction entre
Phytophthora infestans et *Solanum
tuberosum*

Auteur : Lore-Anne Bastin

Promotrice : Anne Legrève

Co-promoteur : Gil Colau

Lecteurs : Stanley Lutts - Vincent César

Année académique 2019-2020

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du diplôme de bioingénieur :
master en sciences agronomiques

Remerciements

Au terme de la réalisation de ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à son aboutissement.

Je remercie tout d'abord chaleureusement ma promotrice, Anne Legrève, pour le suivi de mon mémoire, ses nombreux conseils avisés, ainsi que sa disponibilité tout au long de l'année académique. J'espère que cette année sabbatique, même fort remplie, aura pu lui être bénéfique.

Je remercie sincèrement mon co-promoteur, Gil Colau, pour sa patience et ses remarques constructives à la réalisation de ce travail. J'espère de tout cœur que la remise de sa thèse se passera pour le mieux.

Un grand merci à Vivien Le Vourch qui a également apporté ses conseils et encouragements utiles.

Mes remerciements vont ensuite à mes lecteurs, Stanley Lutts et Vincent César. En espérant que la lecture de ce mémoire leur sera agréable et qu'ils apprécieront son contenu.

Une nouvelle fois, merci à Vincent César, pour toutes les données, informations et matériel fournis par le CRA-W. Ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire mildiou à Libramont, pour l'accueil dont ils ont fait preuve. Merci à Véronique Labbé pour ses explications et accompagnement dans la réalisation des protocoles de caractérisation et d'isolation des souches de mildiou.

Je suis reconnaissante envers les membres du laboratoire de phytopathologie à l'UCLouvain. Particulièrement envers Marie Goormans, pour son aide au long de cette année et Simon Caulier, pour ses conseils avisés et son aide dans l'analyse d'une partie de mes résultats. Je remercie également Brigitte Vanpee et Marc Migon, pour leur aide et travail apportés en serre.

Je tiens particulièrement à remercier mes parents, qui m'ont offert l'opportunité de poursuivre les études de mon choix. Merci à ma maman, Nicole, pour la relecture attentive de ce travail.

Je remercie également mon ami, José Wavreille, qui m'a influencé et conforté dans mon choix d'études.

Finalement, merci à tous mes proches, dont le soutien a été indispensable à mes yeux.



Table des matières

Remerciements.....	3
Table des figures.....	6
Liste des tableaux	7
Table des abréviations	8
Introduction.....	9
I. Revue Bibliographique	13
1. La culture de la pomme de terre	13
1.1. Généralités.....	13
1.2. Les principaux agents pathogènes et ravageurs de la pomme de terre.....	15
2. L'agent du mildiou de la pomme de terre : <i>Phytophthora infestans</i>	21
2.1. Généralités et classification	21
2.2. Impacts culturaux	22
2.3. Symptômes	23
2.4. Modes de reproduction	24
2.5. Cycle épidémiologique.....	25
2.6. Caractérisation des populations européennes de <i>P. infestans</i>	28
2.7. Lutte contre <i>P. infestans</i> en Wallonie	32
3. Interaction entre <i>P. infestans</i> et <i>S. tuberosum</i>	35
3.1. Gènes de virulence - Gènes de résistance	35
3.2. L'interface haustoriale de <i>P. infestans</i>	37
3.3. Les échanges moléculaires au sein de l'interface haustoriale	38
3.4. Les effecteurs RXLR-dEER	40
4. Techniques d'imagerie pour l'évaluation des maladies foliaires	43
4.1. Imagerie hyperspectrale.....	43
4.2. Capteurs thermiques	44
4.3. Imagerie par fluorescence chlorophyllienne	44
4.4. Imagerie RVB.....	45
4.5. Considérations	46
II. Démarches expérimentales réalisées	48
1. Caractérisation et isolation de souches de <i>P. infestans</i> à partir de matériel frais.....	48
1.1. Contexte et objectif	48
1.2. Méthodologie.....	48
1.3. Résultats des isolements et caractérisation SSR 2019	50
1.4. Discussion	54

2. Manipulations préliminaires au développement protocolaire.....	58
2.1. Contexte.....	58
2.2. Méthodologies	58
2.3. Résultats	64
2.4. Discussions.....	69
III. Développement protocolaire	74
1. Mise au point d'un protocole visant à caractériser l'interaction plante-pathogène selon le type de cultivar et la souche de <i>P. infestans</i>	74
1.1. Contexte.....	74
1.2. Méthodologie.....	76
1.3. Discussion	79
IV. Conclusions et perspectives	83
Références.....	87
Annexes.....	97

Table des figures

Figure 1 - Morphologie du plant de pomme de terre (<i>S. tuberosum</i> spp. <i>tuberosum</i>) (Vreugdenhil et al. 2007b).	14
Figure 2 – Cycle cultural et reproduction de la pomme de terre (Vreugdenhil et al. 2007b).	15
Figure 3 - Symptômes des principales maladies cryptogamiques de nos régions.	17
Figure 4 - Symptômes des principales maladies bactériennes de nos régions.	19
Figure 5 - Symptômes du PVY ₀ sur feuillage de pomme de terre (ASBL Corder 2017).....	20
Figure 6 - 1 : larve de doryphore, 2 : doryphores adultes (ASBL Corder 2017).....	20
Figure 7 – Gauche : nécrose foliaire cernée d'une zone verdâtre (ASBL Corder 2017) ; Milieu : mycélium en bordure de tache nécrotique (ASBL Corder 2017) ; Droite : Sporangies et sporangiophores (W. Fry 2008).	23
Figure 8 - Symptômes de <i>P. infestans</i> sur tubercule de pomme de terre (ASBL Corder 2017).	24
Figure 9 - Cycle épidémiologique de <i>P. infestans</i> (Tsedaley 2014; Bengtsson 2013) (illustration créée à partir de celles de P. Wharton et H. P. Havmalm).	26
Figure 10 - Cartes FTA et équipement d'échantillonnage (Grund, Darissa, et Adam 2010).	29
Figure 11 - Fréquences des distributions génotypiques de <i>P. infestans</i> en Europe, avec N = nombre d'échantillons (Euroblight 2019a).....	30
Figure 12 - Cartes des génotypes de <i>P. infestans</i> en Belgique de 2013 à 2018 (Euroblight 2019b).	31
Figure 13 - Triangle des maladies.	35
Figure 14 - Illustration de la théorie "gène-pour-gène" (Sayegh 2009).....	36
Figure 15 - Haustorium de <i>P. infestans</i> invaginé au sein des tissus hôte (image adaptée de (Bozkurt et Kamoun 2020)).	38
Figure 16 - Voies de translocation des effecteurs à travers l'EHMx et la EHM (Bozkurt et Kamoun 2020).	39
Figure 17 - Structure modulaire d'une protéine Avh chez un oomycète (Van Poppel et al. 2009).....	41
Figure 18 - Structure modulaire d'un effecteur AVR3a issu de <i>P. infestans</i> (Van Poppel et al. 2009). ..	42
Figure 19 - Image spectrale "hypercube" d'une feuille présentant des symptômes foliaires (bock et al. 2010).	44
Figure 20 - Symptôme sporulant de <i>P. infestans</i> sur une feuille de pomme de terre (Euroblight 2020b).	48
Figure 21 - Schématisation de la partie échantillonnage d'une carte FTA (Euroblight 2020).....	49
Figure 22 - Schématisation de la rondelle de pomme de terre incurvée (CRA-W 2003).....	50
Figure 23 – Résultats caractérisation échantillonnage Libramont essai MILVAR – saison 2019. A. Fréquences des mating type ; B. Fréquences des génotypes.....	51
Figure 24 – Résultats caractérisation échantillonnage wallon – saison 2019. A. Fréquences des mating type ; B. Fréquences des génotypes.	51
Figure 25 - Fréquences génotypiques des échantillons wallons - saison 2019, classées selon le lieu, la date de récolte et la variété de pomme de terre infectée.....	53

Figure 26 - Cartes des fréquences génotypiques des populations européennes de <i>P. infestans</i> (EuroBlight 2019a).	56
Figure 27 – Mycélium de <i>P. infestans</i> sur feuille de pomme de terre (Bastin 2020).....	60
Figure 28 - Goutte de suspension de zoospores avec cellophane (Bastin 2020).	61
Figure 29 - Construction de la chambre humide (Bastin 2020).....	61
Figure 30 - Foliole inoculée par une goutte de suspension de zoospore contenant 5% de gélatine (Bastin 2020).....	64
Figure 31 - Évolution de la sporulation moyenne de la souche 13_A2 de <i>P. infestans</i> en fonction du taux de sucrose contenu dans le milieu seigle.....	66
Figure 32 – Évolution du développement des symptômes de mildiou selon le type d'inoculum et le milieu de croissance.....	67
Figure 33 - Étapes du plan expérimental de l'étude de l'interaction entre <i>P. infestans</i> et <i>S. tuberosum</i>	77
Figure 34 - Plateforme de phénotypage à capteur hyperspectral (Thomas et al. 2018).	82

Liste des tableaux

Tableau 1 - Modes d'action et matières actives utilisées dans la lutte contre le mildiou de la pomme de terre (FRAC 2018).	33
Tableau 2 - Exemples de pathosystèmes plante-pathogène évalués au moyen de capteurs optiques (Mahlein 2016).	47
Tableau 3 - Préparation des suspensions de sporanges.	60
Tableau 4 – Traitements des plants de Bintje.	60
Tableau 5 - Préparation des suspensions d'inoculum.....	62
Tableau 6 - Développement du mildiou selon la méthode d'inoculation et la concentration en inoculum.....	64
Tableau 7 – Symptômes observés au jour 10 après inoculation pour deux concentrations en inoculum.	65
Tableau 8 - Moyennes du nombre de sporanges selon le type de milieu de croissance et calcul des écarts-types par rapport à ces moyennes.....	66
Tableau 9 - Cultivars de pomme de terre et résistances respectives.	77
Tableau 10 - Schéma général de l'expérience.	78

Table des abréviations

S. tuberosum - *Solanum tuberosum*

P. infestans - *Phytophthora infestans*

HR - Humidité relative

Syn. - Synonyme

EU - Europe

PAMP - Pathogen associated molecular pattern

PTI - PAMP-triggered immunity

ETI - effector-triggered immunity

Gène *Avr* - Avirulence

Gène R - Gène de résistance chez l'hôte

EHM - Membrane extrahaustoriale

EHMx - Matrice extrahaustoriale

BFA - Brefeldin A

Avh - Homologue de gène d'avirulence

PCD - Programmed cell death

IRT - Thermographie infrarouge

SSR – Simple Sequence Repeats

Introduction

La pomme de terre (*Solanum tuberosum*) est une solanacée dont la culture fait l'objet d'une importance mondiale (Millam 2006). La culture est répartie en deux secteurs. La pomme de terre de consommation est vendue sur le marché pour être consommée fraîche, ou est transformée en frites surgelées, frites et amidon. Le second secteur est la production de plants de pomme de terre à partir desquels la culture se reproduit de façon végétative. Ils sont vendus chaque année aux producteurs (Sawyer, Oligschläger, et Khabarov 2019; Vreugdenhil et al. 2007). En Belgique, plus de 3 millions de tonnes pommes de terre ont été récoltés en 2018, classant le pays au 17^{ème} rang mondial (De Cicco et Jeanty 2019).

Dans nos régions, la culture est exposée à plusieurs pathogènes et ravageurs, qui peuvent être des champignons, des bactéries, des virus ou encore des insectes et nématodes. La maladie la plus importante est le mildiou de la pomme de terre, causé par l'oomycète *Phytophthora infestans* (Tsedaley 2014). Elle peut être fortement dommageable pour la culture de la pomme de terre (Boddy 2016). En effet, un champ peut être détruit en seulement une à deux semaines (Tsedaley 2014). Ce pathogène est d'ailleurs à l'origine de la grande famine irlandaise qui a sévit entre 1845 et 1850 (Turner 2005).

Pour infecter un plant de pomme de terre, *P. infestans* sécrète des effecteurs, des protéines qui permettent de moduler l'immunité de l'hôte afin de favoriser la colonisation par le pathogène (S. Wang et al. 2019). Ces effecteurs peuvent être reconnus par les gènes de résistance présents chez la pomme de terre, ce qui engendre l'activation d'une immunité déclenchée par les effecteurs. Il en résulte une forte pression sélective sur ces protéines, qui évoluent rapidement afin d'éviter cette reconnaissance par l'hôte, tout en maintenant une virulence (Boutemy et al. 2011). Ce haut potentiel évolutif permet au pathogène de surmonter la résistance complète, non durable, conférée par certains gènes de la pomme de terre (Ewing et al. 2000). La lutte contre le pathogène nécessite donc l'utilisation de fongicides qui doivent régulièrement être pulvérisés sur la culture afin d'obtenir une protection efficace (Mahieu et Couvreur 2019).

En Belgique, ces dernières années ont été marquées par l'apparition de nouvelles souches émergentes du pathogène. Les lignées 36 et 37_A2 sont fortement virulentes et la seconde présente une sensibilité réduite au fluazinam, un fongicide fréquemment utilisé contre le mildiou de la pomme de terre (Euroblight 2020).

Tous ces éléments montrent que le contrôle du pathogène est un enjeu important, et qu'il doit être adapté en fonction de l'évolution de l'oomycète. Le projet Potato Smart, dans lequel est inscrit ce mémoire, est le fruit d'une collaboration de recherche entre le CRA-W, l'UCLouvain et la FIWAP. Il vise à développer un système smart d'aide à la décision destiné aux producteurs, qui pourront optimiser les pulvérisations fongicides. Le projet ajuste les modèles de prédiction de la maladie selon la pression du pathogène, par un captage de l'inoculum

aérien, en tenant compte de l'interaction entre les souches de *P. infestans* en présence et les variétés de pomme de terre cultivées (Rosillon 2018). Cette stratégie se veut précise et permettrait une lutte efficace contre le mildiou de la pomme de terre.

Afin d'ajuster la prédiction des épidémies de mildiou en fonction des conditions de la parcelle, il est important d'étudier en profondeur l'interaction entre le pathogène et son hôte en fonction de la souche de *P. infestans* ou de la variété de pomme de terre considérée. L'objectif premier de ce mémoire était d'étudier les caractéristiques de l'interaction existant entre plusieurs souches du pathogène et variétés de pomme de terre, au travers d'un essai réalisé en serre *in planta*. Cependant, les conditions sanitaires imposées par l'épidémie de Covid 19 ont mené à l'abandon des essais en cours. Deux nouveaux objectifs ont donc été établis.

Tout d'abord, à la vue de l'évolution récente des populations de *P. infestans*, il est important de continuer le suivi afin d'adapter les stratégies de contrôle en fonction des souches présentes. Le premier objectif de ce mémoire est de définir quels étaient les génotypes du pathogène présents en Belgique en 2019 et de les comparer aux populations des années précédentes en Belgique et en Europe. À cet effet, des campagnes d'échantillonnage du pathogène ont été menées à travers la Wallonie par le CRA-W. Les souches ont ensuite été caractérisées et isolées sur matériel frais afin de déterminer leur mating type et leur génotype.

Le second objectif visé est de développer un protocole détaillé étudiant la croissance de plusieurs souches de *P. infestans* sur des disques foliaires issus de plusieurs variétés de pomme de terre. Cette étude discute le développement d'une technique efficace de phénotypage des symptômes. Sur le plan épidémiologique, les paramètres liés à l'infection (concentration seuil en inoculum, temps de latence et d'incubation) peuvent être fonction de la souche de *P. infestans* ou de la variété de pomme de terre considérée. L'analyse de ces caractéristiques sera utile dans le cadre du projet Potato Smart. Pour atteindre cet objectif, plusieurs essais préliminaires ont été mis en place. Ceux-ci visaient notamment à comparer plusieurs techniques d'inoculation, ainsi que comparer des inoculations via des sporanges ou des zoospores, les deux types de propagules infectieuses connus chez le pathogène. Le protocole a ensuite été construit en se basant sur les résultats de ces essais préliminaires et en s'appuyant sur la littérature.

Concernant l'organisation de ce mémoire, la première partie aborde l'état de l'art relatif à la culture de la pomme de terre et ses maladies, la biologie de *P. infestans* et l'évolution des populations, les méthodes de lutte mises en place actuellement, ainsi que les caractéristiques de l'interaction entre *P. infestans* et la pomme de terre. Les techniques d'imagerie utilisées en phytopathologie sont également abordées.

La seconde partie est expérimentale. Elle concerne toutes les manipulations qui ont été réalisées. En premier lieu, les méthodes de caractérisation et isolement des souches sont

développées et les résultats sont exposés et discutés. Ensuite, les essais préliminaires qui s'inscrivent dans le développement du protocole détaillé sont décrits, présentés et discutés. Enfin, la troisième partie concerne le développement du protocole étudiant la croissance du pathogène sur disques foliaires.

Enfin, la troisième partie concerne le développement d'un protocole qui devra permettre d'étudier l'interaction entre *P. infestans* et *S. tuberosum*. Ce protocole consiste à caractériser la croissance de souches du pathogènes sur disques foliaires de différents cultivars de pomme de terre *in vitro*, sur base de l'évolution du développement des symptômes suivie par prise d'image.

I. Revue Bibliographique

1. La culture de la pomme de terre

1.1. Généralités

La pomme de terre, *Solanum tuberosum*, est une solanacée qui a été domestiquée il y a entre 7 000 et 10 000 ans en Amérique du Sud (Rabinowitch et Levy 2001). Son bassin d'évolution se situe dans les Andes, où plusieurs espèces sauvages du genre *Solanum* ont leur centre d'origine. Ces espèces se révèlent proches des espèces domestiquées (Spooner et al. 2014).

Selon Spooner et al. (2014), l'origine évolutive de la pomme de terre n'a pas encore été définie de manière concluante et depuis presque neuf décennies, des généticiens, archéobotanistes et taxonomistes explorent des hypothèses plausibles d'évolution de l'espèce. Cependant, nous savons que l'origine des variétés cultivées provient d'hybridations successives entre des espèces sauvages diploïdes du genre *Tuberosa*. Ces événements ont été accompagnés d'un dédoublement chromosomique menant aux espèces tétraploïdes, ancêtres des variétés que nous cultivons aujourd'hui (Vreugdenhil et al. 2007).

La pomme de terre a été introduite en Europe au 16^{ème} siècle lorsque l'espèce *S. tuberosum* spp. *andigena* a été amenée en Espagne vers 1570, et puis en Angleterre (1580-1590) par les colons d'Amérique du Sud (Rabinowitch et Levy 2001). Ces deux introductions sont probablement les points de départ de la dispersion de la culture de la pomme de terre au reste du monde. La sous-espèce *andigena* étant adaptée au climat des Andes, les plantes ont tout d'abord été considérées comme des « curiosités botaniques », produisant de nombreuses fleurs et quelques petits tubercules à la fin de l'automne lors des jours plus courts. Vers le milieu du 18^{ème} siècle, la plante devient une culture de consommation après avoir subi plusieurs épisodes d'hybridation et de sélection. Ces processus ont favorisé les génotypes les plus adaptés à la photopériode du lieu d'introduction et ont abouti à une pression de sélection favorisant les individus hâtifs, provoquant l'apparition de l'espèce *S. tuberosum* spp. *tuberosum* que nous cultivons aujourd'hui (Simmonds 1966).

La culture de la pomme de terre fait aujourd'hui l'objet d'une importance mondiale par rapport à sa production à hauts rendements de tubercules destinés à la consommation (Millam 2006). En Belgique, elle est la deuxième plus grande culture sur le territoire après le blé et est en croissance depuis plusieurs années (Sawyer, Oligschläger, et Khabarov 2019). En 2018, le pays se classe 17^{ème} producteur au rang mondial, avec 3 045 400 tonnes de pommes de terre récoltées, tous secteurs confondus (De Cicco et Jeanty 2019).

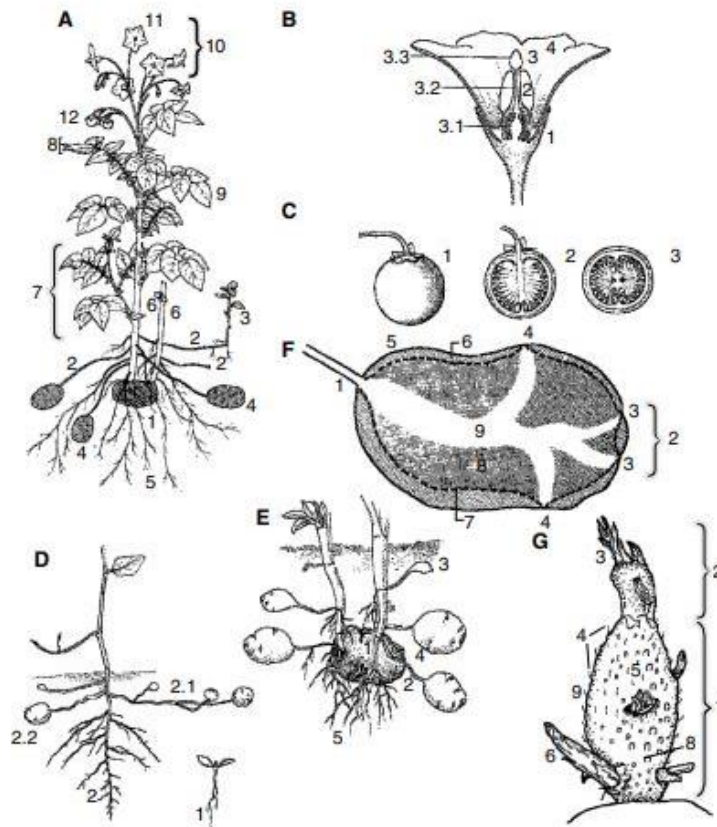


Figure 1 - Morphologie du plant de pomme de terre (*S. tuberosum* spp. *tuberosum*) (Vreugdenhil et al. 2007).

(A) **Plante entière** : 1-tubercule de semence ; 2-stolon ; 3-stolon devenu tige latérale souterraine ; 4-tubercule ; 5-racines ; 6-tige principale ; 7-tige latérale aérienne ; 8-feuille composée ; 9-foliole ; 10-inflorescence ; 11-fleur ; 12-baies. (B) **Fleur** : 1-calice ; 2-étamine (filament + anthère) ; 3-organe femelle (3.1 ovaire, 3.2 style, 3.3 stigmate) ; 4-corolle à 5 pétales souvent fusionnées. (C) **Baies** : 1-aspect général ; 2-coupe longitudinale ; 3-coupe transversale. (D) **Semis** : 1-stade peu après levée ; 2-stade peu après tubérisation (2.1 stolon tubéreux, 2.2 petit tubercule). (E) **Parties souterraines d'une plante provenant d'un tubercule de semence** : 1-tubercule de semence ; 2-stolon tubéreux ; 3-tubercule naissant ; 4-petit tubercule ; 5-racines. (F) **Tubercule** : 1-basal (extrémité du talon ou du stolon) ; 2-apical (ou rose) ; 3-yeux apicaux ; 4-yeux latéraux ; 5-peau ; 6-cortex ; 7-système vasculaire ; 8-parenchyme de stockage ; 9-moelle. (G) **Germe unique sur un tubercule de semence** : 1-partie basale ; 2-extrémité ; 3-bourgeon terminal ; 4-poil ; 5-bourgeon non développé ; 6-bourgeon développé pour la tige latérale ; 7-extrémité de la racine ; 8-lenticelle ; 9-germe principal qui donnera la tige principale (traduction de la légende originale).

La pomme de terre fait généralement partie d'une rotation longue (4 à 5 ans) (Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009). Juste avant l'émergence de la culture, un buttage est réalisé. Il permet de diminuer la pression des adventices précoces, détruits durant le processus, ainsi que d'apporter une protection des tubercules face au soleil (Vangessel et Renner 1990). Cette pratique culturale améliore également le drainage du sol, ainsi que son exploration par les racines. En fin de saison, avant la récolte, la culture est défanée. Cette pratique détruit l'ensemble du feuillage et des tiges. L'objectif est de mettre un terme au développement des tubercules. Cela permet également d'induire l'induration de l'épiderme des tubercules, de limiter la contamination de ceux-ci par les pathogènes, et de faciliter la récolte (Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009).

La culture est divisée en plusieurs secteurs. La pomme de terre de consommation est consommée fraîche (6 à 7% du secteur belge) ou est transformée en frites surgelées, chips et

amidon (86% du secteur belge). Le secteur de la consommation montre une certaine importance en Belgique, avec près de 100kg de pommes de terres fraîches ou transformées consommées chaque année par citoyen moyen (Sawyer, Oligschläger, et Khabarov 2019).

La culture de plants de pomme de terre appartient à un autre secteur. La pomme de terre est une plante pérenne, cependant elle n'est cultivée que sur une saison. Elle se reproduit de façon végétative à partir de plants qui sont produits et vendus chaque année aux producteurs de pommes de terre (figure 2) (Vreugdenhil et al. 2007).

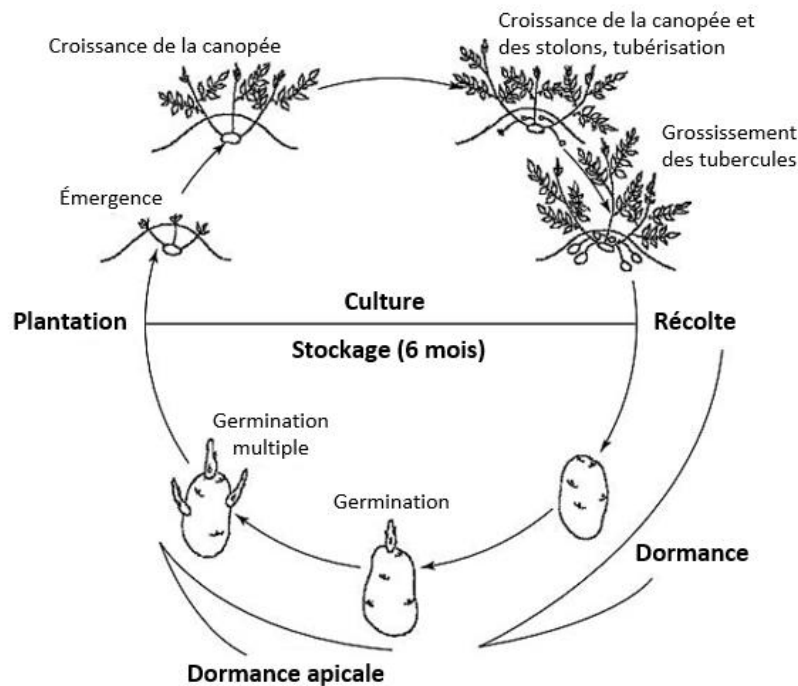


Figure 2 – Cycle culturel et reproduction de la pomme de terre (Vreugdenhil et al. 2007).

1.2. Les principaux agents pathogènes et ravageurs de la pomme de terre

Comme toute culture, la pomme de terre peut être la cible de plusieurs pathogènes et ravageurs, tels que des champignons, bactéries, virus ou encore des insectes et nématodes. L'impact que ces organismes peuvent avoir sur le rendement est fonction du ou des organes atteints (feuilles, tiges, tubercules, racines) et de l'ampleur de cette atteinte.

Voici une liste des principaux ravageurs et maladies touchant actuellement la culture de la pomme de terre dans nos régions :

1.2.1. Maladies cryptogamiques (figure 3)

Le **mildiou** de la pomme de terre est une maladie causée par l'oomycète *Phytophthora infestans*. Il représente la menace la plus importante pour la culture et fera l'objet d'une section détaillée dans la suite de cet écrit.

L'**alternariose** est une maladie foliaire provoquée par deux champignons : *Alternaria solani* et *Alternaria alternata* (Hausladen et Leiminger 2007). La maladie se manifeste par des

taches nécrotiques brunes à brunes-noires, de quelques millimètres à 2 centimètres de diamètre, qui peuvent apparaître sur la face supérieure des feuilles. Ces symptômes font habituellement leur apparition sur les feuilles plus âgées, avant de s'étendre au reste du feuillage (Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009).

Le rhizoctone, dont l'agent responsable est *Rhizoctonia solani*, infecte essentiellement les tiges et stolons des jeunes pousses de pommes de terre lors de la levée. Une infection sévère peut donc fortement réduire le rendement en tubercules (Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009). Le symptôme caractéristique de la maladie est la présence de sclérotés, la forme de survie du champignon, sur la surface des tubercules. Les autres symptômes se manifestent par un retard d'émergence, un raccourcissement des entre-nœuds et un enroulement du feuillage, aboutissant à un rabougrissement général des plants infectés. La formation de petits tubercules aériens s'observe également à cause de la réduction de croissance des stolons. Par temps humide, un mycélium blanc peut se développer à la base des tiges et stolons (Midoune 2015). Le pathogène peut être transmis par les plants de semence contaminés. Il peut également survivre dans le sol sous forme de mycélium ou de sclérotés qui sont alors source d'inoculum primaire (Tsrör 2010).

La dartrose (*Colletotrichum coccodes*) se développe lors d'épisodes estivaux chauds et secs et se caractérise par l'apparition de taches grisâtres à la surface des tubercules. De petits micro-sclérotés apparaissent ensuite au sein de ces taches. La maladie provoque également des symptômes sur les organes aériens. Un flétrissement, un dessèchement et une chlorose des parties caulinaires vers la base de la tige peuvent s'observer. Des sclérotés se développent également sur les stolons et racines (Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009).

La pomme de terre peut également être infectée par plusieurs gales. **La gale argentée**, causée par *Helminthosporium solani*, est une maladie de conservation (la contamination peut survenir avant la récolte). Les symptômes se développent sur la surface des tubercules matures, sous la forme de taches grisées de formes irrégulières qui prennent un aspect argenté et s'étalent avec l'âge. Ces taches sont provoquées par un décollement de l'épiderme. L'espace formé entre la chair du tubercule et la peau se remplit d'air, ce qui peut mener à la déshydratation du tubercule dans les cas sévères (Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009). L'infection primaire des tubercules a lieu au champ durant la saison de culture. La maladie peut ensuite augmenter en incidence lors du stockage, après la récolte, car une sporulation peut propager le pathogène sur les tubercules sains (Frazier et al. 1998).

La gale poudreuse est causé par *Spongospora subterranea*, un protiste de la famille des *Plasmodiophoridae*, qui est également un vecteur du virus du mop-top (non établi en Belgique (CABI 2019a)) dont les symptômes ne sont pas liés à ceux de la gale poudreuse (Merz 2008). Le pathogène est transmis par des cystosores, qui sont des amas de spores, conférant l'aspect poudreux à la maladie. Ces structures peuvent survivre sur les tubercules ou dans le sol durant plusieurs années. Une gale se développe sur les tubercules infectés après

germination des cystosores en conditions humide. Les racines, tiges et stolons du plant de pomme de terre peuvent également être infectés. Les symptômes primaires sont de petits pustules bruns à violets sur l'épiderme des tubercules. Ces pustules grandissent et finissent par rompre l'épiderme. Les lésions matures sont galleuses et peu profondes. Elles contiennent une masse spongieuse de cystosores (De Haan et Van Den Bovenkamp 2005).

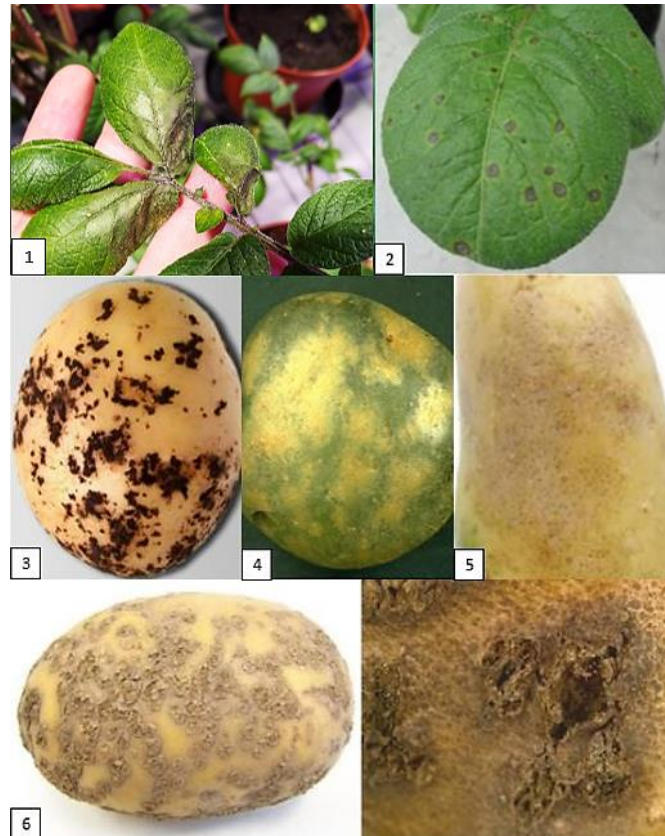


Figure 3 - Symptômes des principales maladies cryptogamiques de nos régions.

1 : mildiou (Bastin 2020), 2 : alternariose, 3 : rhizoctone, 4 : gale argentée, 5 : dartrose (ASBL Corder 2017), 6 : gale poudreuse (gauche et droite) (A. Lees, Bittara, et A. Secor 2020).

1.2.2. Maladies bactériennes (figure 4)

La jambe noire (syn. pourriture molle bactérienne). Plusieurs bactéries peuvent être à l'origine de cette maladie : *Pectobacterium* sp. et *Dickeya* sp., autrefois toutes deux rassemblées sous le genre *Erwinia* spp. (Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009; Czajkowski et al. 2011). L'infection se propage des tubercules vers le haut des tiges. En conditions humides, une pourriture visqueuse qui devient noire au contact de l'air se forme sur les tubercules infectés (Czajkowski et al. 2011). Toute la chair fini par prendre l'aspect d'une bouillie retenue uniquement par la peau du tubercule (Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009). La pourriture peut s'étendre aux tubercules voisins lors du stockage, développant une mauvaise odeur due à des pathogènes secondaires. En conditions plus sèches, les symptômes se manifestent plutôt sur les parties aériennes des plants (Czajkowski et al. 2011). Les tiges et feuilles présentent un flétrissement et jaunissement, et la tige prend une couleur noire sur

quelques centimètres au-dessus du sol (Czajkowski et al. 2011; Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009).

La gale commune est causée par plusieurs bactéries Gram positif du genre *Streptomyces*, comme *Streptomyces scabies*. Elle provoque le développement de lésions à la surface des tubercules (Wanner 2007). Les racines peuvent être également affectées au niveau de leur émergence et croissance lors des premiers stades de développement. Le pathogène se disperse grâce à la production de spores qui peuvent survivre dans le sol ou sur les tubercules semences, elles peuvent également être transportées par des arthropodes ou des nématodes. Lorsqu'une spore rencontre un tubercule, elle développe un mycélium qui se propage à travers les quelques couches cellulaires extérieures, de façon symplastique (intracellulaire via les plasmodesmes) et apoplastique (au sein du continuum extracellulaire). Le pathogène se nourrit du contenu des cellules infectées qui finissent par mourir, tandis que les cellules vivantes voisines de l'infection vont se diviser et produire des couches cellulaires de liège. Ce type de cellule va croître vers l'extérieur et former ces lésions galleuses sur la muqueuse du tubercule. Les conditions environnementales, la sensibilité du cultivar (syn. de variété cultivée) et la composition de la population microbienne du sol va influencer le profil de virulence du genre *Streptomyces* (Braun et al. 2017).

Deux autres maladies bactériennes peuvent provoquer un symptôme commun sur tubercules qui est le brunissement de l'anneau vasculaire. Les symptômes de **la pourriture annulaire** (*Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*) se manifestent habituellement en fin de croissance. Les feuilles de la base des plants infectés prennent une couleur vert clair qui évolue vers la formation d'une nécrose brune. Sur les tubercules, des fissures brunes bordées de rouge sont le résultat de la nécrose de l'anneau vasculaire (Sagcan et Turgut Kara 2019). **La pourriture brune** (*Ralstonia solanacearum*) provoque en premier lieu un flétrissement des jeunes feuilles. Elles peuvent changer de couleur et devenir brunes. Les vaisseaux du xylème de la tige brunissent à leur tour au-dessus de la ligne du sol. La maladie évolue vers un flétrissement général des plants infectés. Les symptômes sur tubercules sont un brunissement et une nécrose de l'anneau vasculaire, ainsi qu'un exsudat bactérien crémeux à la surface de la coupe. Les faisceaux vasculaires coupés ou blessés sécrètent des filaments bactériens de couleur blanche lorsqu'ils sont plongés dans l'eau (Charkowski et al. 2020).

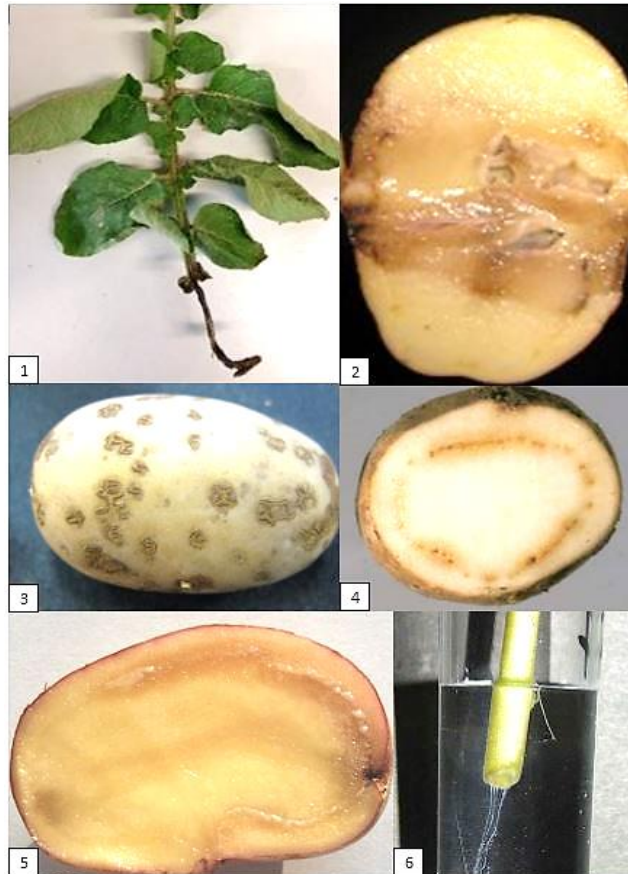


Figure 4 - Symptômes des principales maladies bactériennes de nos régions.

1 : jambe noire, 2 : pourriture molle bactérienne (jambe noire sur tubercule), 3 : gale commune (ASBL Corder 2017), 4 : pourriture annulaire (European Commission et al. 2017), 5 : pourriture brune, 6 : filaments d'exsudat bactérien (pourriture brune) (Ephytia 2019).

1.2.3. Maladies virales

La pomme de terre peut être infectée par une cinquantaine de virus, tels que le virus A (PVA), le virus de l'enroulement des feuilles (PLRV) ou encore le virus X (PVX) . **Le virus Y (PVY)** de la pomme de terre (figure 5) est le virus le plus important sur le continent européen. (Kreuze et al. 2020). Il se manifeste majoritairement par la souche PVY₀ en Belgique qui provoque l'apparition de taches nécrotiques de couleur noirâtre à proximité des nervures foliaires. Elles sont marquées à la face abaxiale des feuilles (face inférieure) lorsque la contamination a lieu pendant la saison en cours. Dans certains cas, un dessèchement des feuilles ainsi qu'une mosaïque déformante peuvent être visibles. Si la plantule est issue d'un tubercule de semence infecté, les symptômes sont plus marqués et se caractérisent par une mosaïque foliaire, un nanisme et nécrose des nervures ainsi qu'une déformation des feuilles. Lorsque le feuillage est atteint, cela impacte négativement les rendements en tubercules (taille et nombre). La transmission du virus peut être verticale (transmission par le tubercule de semence infecté à l'ensemble des organes du plant qui en est issu, source majoritaire de cellules virales) ou horizontale (transmission par les pucerons ailés qui agissent comme vecteurs lorsqu'ils se nourrissent sur les plants de pomme de terre) (ASBL Corder 2017; Rolot 2019).



Figure 5 - Symptômes du PVY₀ sur feuillage de pomme de terre (ASBL Corder 2017).

1.2.4. Ravageurs principaux

Le doryphore (figure 6) est un coléoptère considéré comme le ravageur défoliateur le plus important pour la culture de pomme de terre. Au stade larvaire, le doryphore peut consommer jusqu'à 40cm² de feuilles par jour. L'adulte se nourrit avec moins de voracité mais consomme tout de même 10cm² supplémentaires par jour (Alyokhin et al. 2008). La diminution de la surface foliaire qui en résulte peut occasionner une perte de rendement en tubercules, les doryphores pouvant parfois détruire un plant dans son entièreté (Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009).



Figure 6 - 1 : larve de doryphore, 2 : doryphores adultes (ASBL Corder 2017).

Les plants de pomme de terre peuvent être parasités par de nombreux nématodes. La plupart ne provoquent pas de dégâts notables. Cependant, certaines espèces peuvent être dommageables pour la culture. Les nématodes des espèces *Trichodorus* et *Paratrichodorus* ont une salive toxique pour les racines et sont vecteurs de virus. D'autres nématodes du genre *Nacobbus* et *Méloidogyne* peuvent provoquer des galles racinaires. Le genre *Globodera* est un spécialiste des solanacées et mène à la formation de kystes. Ces structures, ainsi que les galles, sont le résultat de modifications des cellules du plant de pomme de terre. Ce sont les sites d'alimentation des nématodes. L'espèce *Ditylenchus destructor* provoque des dommages sur tubercules en formant une pourriture sèche (Mugniéry et Phillips 2007).

Il est important de préciser que les symptômes décrits dans cette section peuvent parfois se confondre, des synergies peuvent avoir lieu, et certains symptômes peuvent en cacher d'autres. Il est impératif d'identifier et de mettre en évidence le ou les pathogènes en présence afin de dégager un diagnostic exact et un traitement ou moyen de lutte adéquat.

2. L'agent du mildiou de la pomme de terre : *Phytophthora infestans*

Le mildiou de la pomme de terre est la maladie la plus dommageable pour la culture, en particulier dans les régions où des périodes fraîches et humides ont lieu régulièrement (Boddy 2016). Elle est donc considérée comme la maladie la plus importante mondialement et fait partie de celles qui sont les plus étudiées chez la pomme de terre (Tsedaley 2014).

Le mildiou de la pomme de terre survient chaque saison dans presque toutes les régions où la culture est présente. Il se déclare également dans certaines régions productrices d'autres solanacées, principalement la tomate. Au cours de ces deux dernières décennies, une augmentation dans l'incidence et la présence de la maladie a été observée, ce qui la rend encore plus importante au point de vue de son étude (Platt 2008; Boddy 2016; Tsedaley 2014).

2.1. Généralités et classification

L'agent causal du mildiou de la pomme de terre a été découvert par Anton de Bary en 1861. Il l'a alors nommé *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary et l'a défini comme étant à l'origine de la maladie phytopathogène responsable de la famine irlandaise (abordée plus tard) (Govers et Gijzen 2006). Une théorie proposée par Berkeley (1846), et soutenue par de Bary, stipule que le pathogène a tout d'abord été considéré comme originaire des Andes sud-américaines, qui est également le centre d'origine de son hôte (voir section 1.1). Cependant, une seconde théorie proposée par Reddick (1939) énonce que *P. infestans* serait originaire des hauts plateaux centraux du Mexique. C'est en effet dans cette région que le pathogène présente la plus large diversité génétique du globe. C'est pour cette raison que les premiers inocula introduits en Europe et en Amérique du Nord ont été déterminés comme étant originaires du Mexique (Andrивon 1996).

P. infestans appartient à la famille des *Pythiaceae* et est un oomycète hétérothallique, c'est-à-dire que sa reproduction sexuée nécessite l'interaction entre deux thalles distincts (voir section 2.4) (CABI 2019b). Le genre *Phytophthora* rassemble plus de 65 espèces et fait partie des oomycètes phytopathogènes, avec des espèces du genre *Pythium* et certains biotrophes obligatoires (oïdium duveteux et rouilles blanches). Les oomycètes font partie du groupe des Stramenopiles (ou Hétérokontes). Avec le groupe des Alvéolates, l'ensemble forme les Chromalvéolates, l'un des cinq supergroupes chez les eucaryotes (Govers et Gijzen 2006).

Lorsqu'il a été découvert, et jusque fin du 20^{ème} siècle, *P. infestans* était considéré comme un champignon, tout comme les autres espèces du genre *Phytophthora* et oomycètes en général. En effet, les champignons et oomycètes partagent des caractéristiques communes, telles que le mode de croissance (développement de mycélium), de nutrition (absorption) ou de reproduction/propagation (via des spores). Les machineries phytopathogènes se ressemblent également : les deux groupes utilisent des structures

d'infection similaires, les appressoria et haustoria, et disposent tous deux des enzymes dégradantes des parois cellulaires affaiblissant les tissus hôtes. Cependant, les oomycètes sont évolutivement indépendants des champignons. Ces derniers sont classés parmi les Opisthokontes qui appartiennent aux Unikontes, un autre des cinq supergroupes eucaryotiques. Oomycètes et champignons occupent donc des niches écologiques similaires, mais ils diffèrent au point de vue de leur physiologie, biochimie et génétique (W. Fry 2008; Govers et Gijzen 2006). Parmi ces différences, nous pouvons citer la composition des parois cellulaires. Elles contiennent de la chitine chez les champignons et sont composées principalement de β -1,3-glucanes et cellulose chez les oomycètes (Kamoun 2003). Les oomycètes se différencient également des champignons par la production de zoospores biflagellées chez ces derniers (W. Fry 2008). Ces quelques différences avaient déjà suffi à convaincre quelques scientifiques d'une séparation taxonomique entre les deux groupes, mais ce sont les différences au point de vue génétique qui ont permis l'acceptation générale de cette distance évolutive (W. Fry 2008). En général, les génomes des oomycètes qui ont été étudiés sont diploïdes et dépassent tous les 45 Mb, ils atteignent souvent 90Mb, tandis que les génomes des champignons ne mesurent pas plus de 40 Mb et sont d'ordinaire haploïdes (Govers et Gijzen 2006).

2.2. Impacts cultureux

Le mildiou de la pomme de terre peut avoir des conséquences désastreuses sur la culture et, par conséquent, sur la population et les secteurs qui en dépendent. Cela peut être illustré par la grande famine irlandaise.

La pomme de terre était cultivée en Irlande depuis son implantation vers la fin du 16^{ième} siècle (voir section 1.1). En 1845, *P. infestans* a été introduit en Europe et s'est propagé jusqu'en Irlande durant la saison de culture. La population ayant subi une croissance démographique importante, la culture de pomme de terre s'est étendue de façon importante afin de nourrir cette population. L'énorme perte en rendement causé par le mildiou a provoqué une grande famine entre 1845 et 1850, causant la mort d'un million de personnes et l'émigration de près d'un million d'autres qui fuyaient la famine. Le déclin démographique résultant s'élevait à 21 pourcents (Turner 2005).

Plus récemment en 2014, les pertes mondiales provoquées par le mildiou de la pomme de terre ont été estimées à près de 5 milliards d'euros annuellement (Tsedaley 2014). Ces pertes concernent les diminutions de rendement, la diminution de la qualité marchande des tubercules, mais également les coûts alloués aux méthodes de lutte mises en place contre le pathogène (développées à la section 2.7.) (Nowicki et al. 2012). C'est l'un des rares phytopathogènes capable de détruire un champ en l'espace d'une à deux semaines (Tsedaley 2014).

2.3. Symptômes

Tous les organes d'un plant de pomme de terre sont susceptibles d'être infectés et détruits par *P. infestans*, tout au long de la saison de culture. Les tubercules peuvent être infectés lorsqu'ils sont encore en terre, ils développent alors des symptômes au champ ou lors de leur stockage, après récolte (Agrios 2010; Tsedaley 2014).

Les symptômes sont régulièrement observés en premier lieu sur feuillage. Des taches aux contours irréguliers et de couleur vert pâle apparaissent sur les folioles, souvent aux extrémités et/ou en bordure. Ces lésions prennent un aspect huileux ou humide et s'étendent rapidement. Leur centre devient ensuite plus foncé et les taches se transforment en lésions nécrotiques brunes à noir-violet, souvent cernées d'une fine zone verdâtre à jaunâtre (figure 7 gauche). Ces symptômes sont habituellement plus importants au sein de la canopée, où l'humidité est plus importante (Platt 2008).



Figure 7 – Gauche : nécrose foliaire cernée d'une zone verdâtre (ASBL Corder 2017) ; Milieu : mycélium en bordure de tache nécrotique (ASBL Corder 2017) ; Droite : Sporangies et sporangiophores (W. Fry 2008).

En conditions humides, un mycélium blanc et duveteux croît sur 3 à 5 mm de hauteur en bordure des lésions (figure 7 milieu). Il se développe préférentiellement à la surface abaxiale des feuilles, mais on l'observe également à la surface supérieure des feuilles ou sur les tiges. Les fructifications sont des sporangiophores ramifiés qui produisent des sporanges caractéristiques en forme de citron à leurs extrémités qui présentent une boursouffure également caractéristique de l'oomycète (figure 7 droite). Ce mycélium permet de distinguer le mildiou d'autres maladies foliaires de la pomme de terre (Agrios 2010).

Les symptômes sur tubercules se manifestent à leur surface par des zones de dépression de taille variable et de forme non régulière, la peau prend une couleur brun-violet en ces endroits. L'infection peut pénétrer la chair qui se colore de brun-rougeâtre et développe une pourriture granuleuse sèche visible lorsque l'on coupe le tubercule infecté (figure 8). Un mycélium blanc peut apparaître lors de conditions fraîches (entre 15° et 25°C) et humides (humidité relative HR \pm 100%) (Tsedaley 2014). Après récolte lors du stockage, le mildiou peut continuer sa croissance au sein de la chair des tubercules infectés, des infections secondaires fongiques ou bactériennes peuvent faire leur apparition dans les cas les plus sévères et provoquer une pourriture aqueuses (Platt 2008; Cornell University 2018).



Figure 8 - Symptômes de *P. infestans* sur tubercule de pomme de terre (ASBL Corder 2017).

2.4. Modes de reproduction

Comme énoncé à la section 2.1, *P. infestans* est hétérothallique. Il existe donc deux mating type (types sexuels en français), A1 et A2, qui permettent une reproduction sexuée. Lorsqu'un seul des types est présent, le pathogène se reproduit de façon asexuée (Bengtsson 2013).

Après sa dispersion à travers le monde et en Europe en particulier, le mildiou de la pomme de terre s'est reproduit de manière asexuée durant de nombreuses années car seul le type A1 était présent (Boddy 2016). Le Mexique était le seul endroit où coexistaient les deux mating type jusqu'aux années 1980, où le type A2 s'est répandu à travers le reste du monde. La reproduction de manière sexuelle a alors été rendue possible, ce qui a donné lieu à l'apparition de nouvelles souches et une augmentation de la diversité génétique mondiale (voir section 2.6) (Boddy 2016; Platt 2008).

Le cycle de reproduction de *P. infestans* peut donc être divisé en une phase sexuée et une phase asexuée (figure 9). Cette dernière est réalisée plusieurs fois au cours de la saison de culture et permet au pathogène de se disperser de façon rapide. Au sein du mycélium, des hyphes se spécialisent en sporangiophores ramifiés sur lesquels se développent des sporanges (ou zoosporanges) qui contiennent des zoospores biflagellées (Bengtsson 2013).

La reproduction sexuée quant à elle permet la conservation de la diversité génétique, ainsi que la survie de *P. infestans* dans le sol (Bengtsson 2013). Elle a lieu lors de la rencontre entre les deux mating type A1 et A2 : un hyphes femelle croît à travers l'organe reproductif mâle (antheridium) et se transforme en organe reproducteur femelle (oogonium) (Tsedaley 2014). La fertilisation entre ces deux organes aboutit à la formation d'une oospore. Ces spores issues de la reproduction sexuées se rencontrent plus fréquemment sur les tiges que sur les feuilles. Ces dernières étant détruites plus rapidement que les tiges par le mildiou, la probabilité de les rencontrer sur une feuille est plus faible. La paroi des oospores est épaisse et résistante, elles peuvent donc subsister dans le sol durant plusieurs années. Ces structures peuvent survivre à basses températures mais ne résistent pas à des températures élevées (2h à 46°C ou 12h à 40°C les tue). Lorsqu'une oospore germe, un tube germinatif se forme et

produit un sporange (ou zoosporange) contenant des zoospores, les étapes suivantes sont les mêmes qu'en phase asexuée (Bengtsson 2013; W. Fry 2008).

2.5. Cycle épidémiologique

L'origine de l'inoculum primaire est dans la plupart des cas d'origine asexuée. Les sources peuvent être des sporanges issus des feuilles tombées au sol, du mycélium qui subsiste sur les débris végétaux et des sporanges et du mycélium provenant de tubercules infectés. Ces derniers peuvent être des plants de semence, des tubercules de réforme entassés en bordure du champ ou des tubercules qui sont omis lors de la récolte et subsistent dans le sol jusqu'à l'année suivante. Ce sont ces tubercules infectés qui représentent la source principale d'inoculum primaire asexué de *P. infestans* (Andrison 1995). L'inoculum primaire peut également provenir d'oospores situées dans le sol (Ari Lehtinen et Hannukkala 2004). Cependant, les caractéristiques épidémiologiques de ce type d'inoculum ne sont pas clairement connues (A. Lehtinen, Hannukkala, et Rantanen 2002).

La température et l'humidité jouent un rôle indispensable au développement du pathogène (W. Fry 2008). Les conditions favorables se présentent généralement au printemps (figure 9). Lorsque l'humidité relative est supérieure à 90%, la production de sporanges est stimulée. Ces sporanges proviennent des sources citées ci-dessus. Ceux-ci ont une durée de vie allant de quelques heures à quelques jours quand ils sont hors d'un tissu hôte. Ce temps de survie relativement court leur laisse tout de même le temps de se disperser par voie aérienne sur plusieurs kilomètres, ou d'être transportés par des éclaboussures d'eau qui atteignent les plants voisins (Platt 2008).

Un sporange qui entre en contact avec une feuille ou une tige peut germer et produire un tube germinatif lorsque les températures sont élevées (20° - 25°C), ce phénomène étant appelé germination directe (W. Fry 2008). Cependant, lorsque les températures sont plus faibles (12° -15°C), le sporange va libérer 3 à 8 zoospores biflagellées (Boddy 2016). Elles sont mobiles pour une durée souvent inférieure à 1 heure et forment également un tube germinatif après avoir été enkystées sur la surface du tissu hôte, on parle ici de germination indirecte. Une germination, directe ou indirecte, ne peut avoir lieu que si la surface à infecter présente une forte humidité (HR 100%) durant au moins une courte période de temps (W. Fry 2008; Boddy 2016).

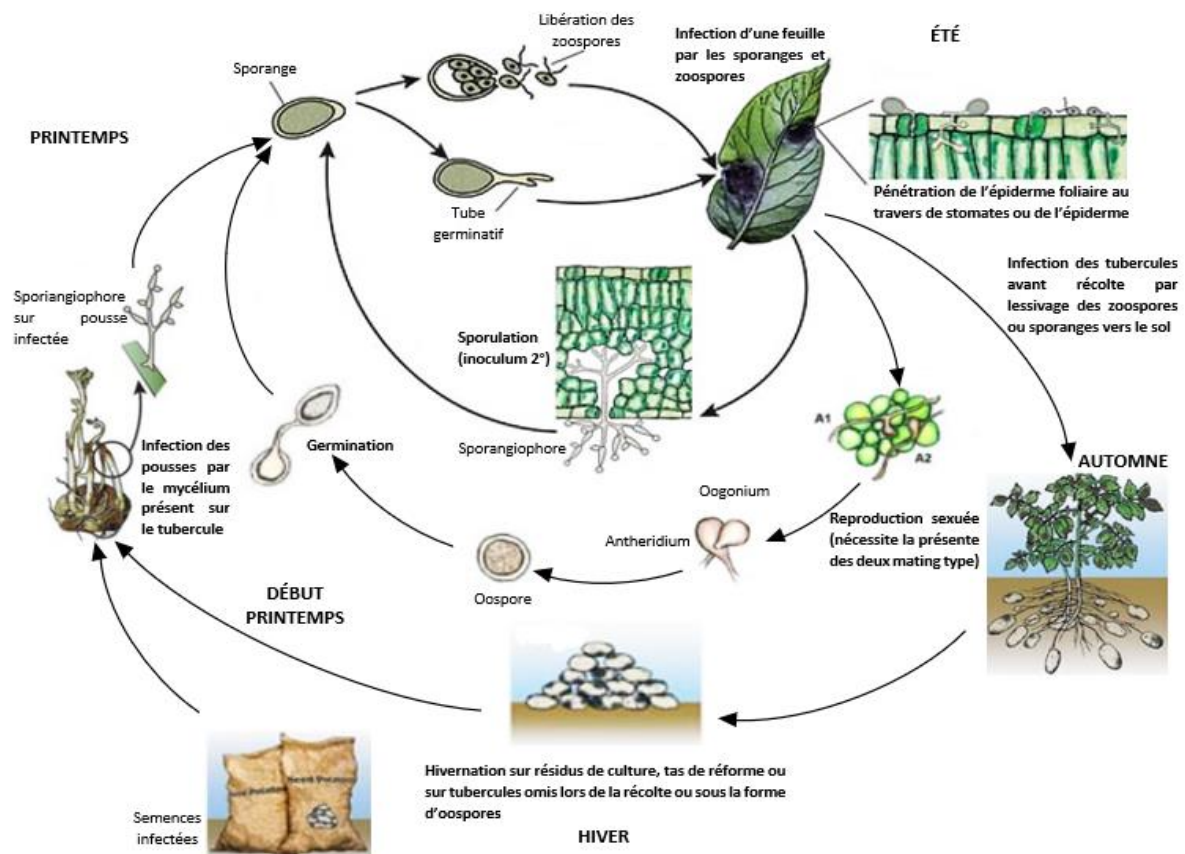


Figure 9 - Cycle épidémiologique de *P. infestans* (Tsedaley 2014; Bengtsson 2013) (illustration créée à partir de celles de P. Wharton et H. P. Havmalm).

Le tube germinatif pénètre au sein du tissu hôte au travers d'un stomate, ou directement au travers de la paroi épidermique via la formation d'un appressorium (Platt 2008). Cette structure infectieuse permet au pathogène d'adhérer à l'épiderme de l'hôte grâce à la pression de turgescence développée au sein de l'appressorium (Bechinger 1999). Le mycélium issu du tube germinatif va croître et s'étendre au sein des espaces intercellulaires, puis pénétrer au sein de cellules en formant des haustoria courbés (Boddy 2016). Ces organes (haustorium au singulier) sont considérés comme des hyphes spécialisés dans l'échange de substances entre l'hôte et le pathogène (Bushnell 1972). Aucun symptôme macroscopique n'est visible à ce stade car *P. infestans* est un pathogène hémibiotrophe (W. Fry 2008). C'est-à-dire que les premiers stades de l'infection ont lieu de façon biotrophe (au sein de tissus vivants), alors que la dernière phase de colonisation est nécrotrophe (au sein des tissus hôtes morts) (Shibata, Kawakita, et Takemoto 2010; Delaye, García-Guzmán, et Heil 2013). Il faut attendre 2 jours au minimum pour que de petites nécroses fassent leur apparition, ce qui correspond à la mort de cellules infectées et une plus grande étendue du mycélium au sein des tissus. Les nécroses continuent de s'étendre et après environ 4 jours à haute HR et température modérée, des sporangiophores portant de nombreux sporanges (jusqu'à 300 000 / nécrose) sont formés (W. Fry 2008). Ces sporanges nouvellement formés forment l'inoculum secondaire qui va se disperser (par voie aérienne et par l'eau) et infecter d'autres feuilles, et

plants. Ces derniers finissent par être fortement nécrosés et le rendement en tubercules diminue (Boddy 2016).

Un cycle asexué peut se répéter de nombreuses fois car le pathogène est polycyclique. Lorsque les conditions sont optimales, une nouvelle génération de sporanges issus d'une infection initiale peut être formée en l'espace de seulement 4 jours (Boddy 2016).

Comme décrit à la section 2.4, lorsque les deux mating type de *P. infestans* se rencontrent, une reproduction sexuée peut avoir lieu. Cela mène à la formation d'une oospore qui pourra germer au printemps et produire un sporange (figure 9).

Lorsque le temps reste très humide (haute saturation en eau) ou que de fortes pluies surviennent pendant une grave épidémie de mildiou, des sporanges provenant de la canopée d'un plant de pomme de terre peuvent être lessivés vers le sol (Grünwald et Flier 2005; Tsedaley 2014). On entre alors dans la phase secondaire du cycle épidémiologique de la maladie. Ces sporanges sont susceptibles d'entrer en contact avec des tubercules, particulièrement lorsque ceux-ci sont en phase de grossissement, ce qui fissure le sol et facilite l'accès à leur surface. Des zoospores émergent des sporanges et produisent un tube germinatif qui pénètre le tubercule au travers de blessures éventuelles ou via les lenticelles. Les lenticelles sont des stomates modifiés présents sur les tubercules (Adams 1975). C'est à travers ces organes que la diffusion d'oxygène pour la respiration a lieu (Wigginton 1973). Lorsque la température du sol est supérieure à 18°C, ce type d'infection ne semble pas se manifester. Le mycélium se développe ensuite de la même façon que précédemment : une croissance extensive intercellulaire accompagnée de la formation d'haustoria intracellulaires (Tsedaley 2014). Les tubercules infectés développent les symptômes décrits à la section 2.3. Après récolte, le pathogène poursuit son développement et les tubercules infectés pourrissent complètement durant leur stockage (Grünwald et Flier 2005). Les symptômes s'étendent éventuellement aux tubercules non contaminés. Le pathogène survit de cette façon jusqu'à l'année suivante où il reprend son cycle épidémiologique depuis le début (figure 13) (Tsedaley 2014).

L'intensité de l'épidémie est influencée par différents aspects. Tout d'abord, le taux de germination des sporanges qui dépend directement des conditions climatiques. La production de sporanges est optimale lorsque l'HR est proche de 100% et les températures comprises entre 15°C et 25°C. Lorsque les 30°C sont dépassés, l'oomycète cesse toute croissance mais ne meure pas, son développement pouvant reprendre lorsque des conditions plus favorables reviennent (Boddy 2016). L'intensité de l'épidémie dépend également de l'efficacité de l'infection (probabilité d'une rencontre efficace entre un sporange et un hôte compatible), du taux de germination (production de tubes germinatifs), taille et nombre des sporanges, du temps de latence (intervalle de temps entre la contamination et la production de nouveaux sporanges), ainsi que de la sensibilité de l'hôte (Mariette 2016).

2.6. Caractérisation des populations européennes de *P. infestans*

Depuis 2013, EuroBlight réalise un monitoring des populations de *P. infestans* (Hansen 2020). Le projet permet aujourd'hui de récolter 1000 à 1500 échantillons de mildiou annuellement à travers tout le continent européen, au sein des régions principales où la pomme de terre est cultivée. Cela permet d'évaluer la variation génotypique annuelle au sein des populations de *P. infestans* (Euroblight 2020). Ces informations concernant le potentiel évolutif des populations sont importantes. La détection d'une population évoluant rapidement permet de se préparer en adaptant les stratégies de lutte contre le mildiou (A. K. Lees et al. 2006).

La caractérisation des populations de *P. infestans* est possible grâce à des marqueurs microsatellites, que l'on appelle également « répétitions de séquences simples » (Single Sequence Repeats (SSR), en anglais) (Cooke, Sullivan, et Lynott 2020). Les SSR correspondent à des séquences répétées, dispersées de manière uniforme au sein du génome nucléaire des eukaryotes. Ces séquences sont des marqueurs adaptés à l'étude génétique, grâce à leur codominance. Cette condition implique une indépendance de l'expression de deux allèles au sein d'un hétérozygote. Aucun des allèles ne masque l'autre car ils s'expriment de façon égale (Snustad et Simmons 2015). La codominance permet donc d'avoir un plus grand pouvoir de résolution dans la caractérisation des populations. Les données peuvent être obtenues sur la structure génétique, la parenté, ainsi que sur le mode de reproduction d'une population (A. K. Lees et al. 2006).

L'étude menée par Lees et al. (2006) a permis de déterminer 12 marqueurs SSR (Pi02, Pi04, Pi16, Pi33, Pi56, Pi63, Pi66, Pi70, Pi89, Pi4B, PiG11 and D13) efficaces pour la caractérisation des populations de *P. infestans* en Europe. Ces séquences sont reconnues grâce à la réalisation de PCR dont les amorces ont été conçues à partir des régions flanquant directement les régions SSR (A. K. Lees et al. 2006). Le protocole développé par EUCABLIGHT (2008) permet de réaliser une PCR multiplex. Les douze marqueurs peuvent être amplifiés au sein de trois réaction PCR (Eucabligh 2008). Selon Li et al. (2013), une PCR multiplex a été développée afin que les douze marqueurs puissent être utilisés en une seule réaction. Cela permet une caractérisation à haut débit du pathogène à travers le globe.

Cette PCR 12-plex est applicable à de l'ADN issu de cartes FTA (figure 10 a et b) contenant un mélange du pathogène et de l'hôte (Cooke, Sullivan, et Lynott 2020). Cet outil en papier a été développé par Flinders Technology Associates (FTA) et permet de préserver des acides nucléiques provenant de différents types d'échantillons biologiques. Les cartes FTA ont été reconnues efficaces dans l'échantillonnage et le traitement (PCR, RT-PCR et PCR multiplex) de l'ADN issu d'agents phytopathogènes. Une PCR peut être réalisée à partir d'un plug (2mm \varnothing) découpé à l'aide d'un poinçon (figure 10.c.) dans la carte FTA, à l'endroit où un échantillon a été appliqué. Ce petit disque subit plusieurs nettoyages (éthanol 70%, solution

de purification et solution tampon) et est ensuite plongé dans les réactifs de la PCR. La réaction permet d'obtenir la caractérisation de la souche collectée sur la carte FTA (Grund, Darissa, et Adam 2010).

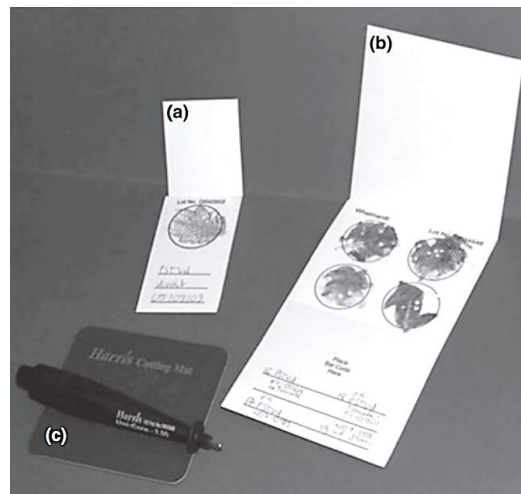


Figure 10 - Cartes FTA et équipement d'échantillonnage (Grund, Darissa, et Adam 2010).
(a) Microcarte (b) Carte à 4 sites d'application (c) Poinçon pour la réalisation de plugs de 2mm de \varnothing .

Le monitoring à l'échelle de l'EU a permis de décrire l'évolution temporelle suivante. À partir de 2004, la souche 13_A2 devient majoritaire aux Pays-Bas (les seuls pays participant à l'échantillonnage étant alors le Royaume-Uni, les Pays-Bas, l'Estonie, l'Écosse, le Pays de Galles et la Slovaquie). Cette lignée clonale se révèle fortement virulente et présente une résistance au métalaxyl, un fongicide utilisé dans la lutte contre le mildiou de la pomme de terre. Les pulvérisations fongicides doivent donc faire face à cette nouvelle situation et leur nombre est adapté (EuroBlight 2020). Entre 2004 et 2013, le mildiou est peu présent, ce qui mène à un nombre plus faible d'échantillonnages. Les données à l'échelle internationale sont moins abondantes, mais la tendance avec une souche 13_A2 majoritaire reste d'actualité (EuroBlight 2019a). La figure 11 montre la propagation de trois nouvelles souches virulentes entre 2013 et 2018 : 37_A2, 36_A2 et 41_A2. En 2018, la souche 13_A2 n'est plus majoritaire et ce sont les souches 37 et 36_A2 qui prennent le dessus. La première a une sensibilité réduite au fluazinam, un autre fongicide utilisé fréquemment contre le mildiou, ce qui provoque un nouveau changement dans les modalités d'utilisation des fongicides en culture de pomme de terre (EuroBlight 2020). Ces modalités sont abordées à la section suivante.

L'évolution de la situation à l'échelle de la Belgique est représentée à la figure 12 (EuroBlight 2019b). Les génotypes évoluent selon la même tendance générale qu'en EU avec une souche 13_A2 majoritaire entre 2013 et 2016. Les souches A1 plus anciennes restent présentes, surtout en 2014, mais leur présence diminue continuellement. En 2015, les souches 37_A2 et 36_A2 font leur apparition pour devenir majoritaires dès 2017 ($\pm 25\%$ des génotypes pour chacune des deux souches (EuroBlight 2019a), où la souche 6_A1 n'est plus observée. L'année 2018 est caractérisée par l'absence de souches A1 et une souche 13_A2 qui ne s'observe que faiblement par rapport aux souches 37_A2 et 36_A2.

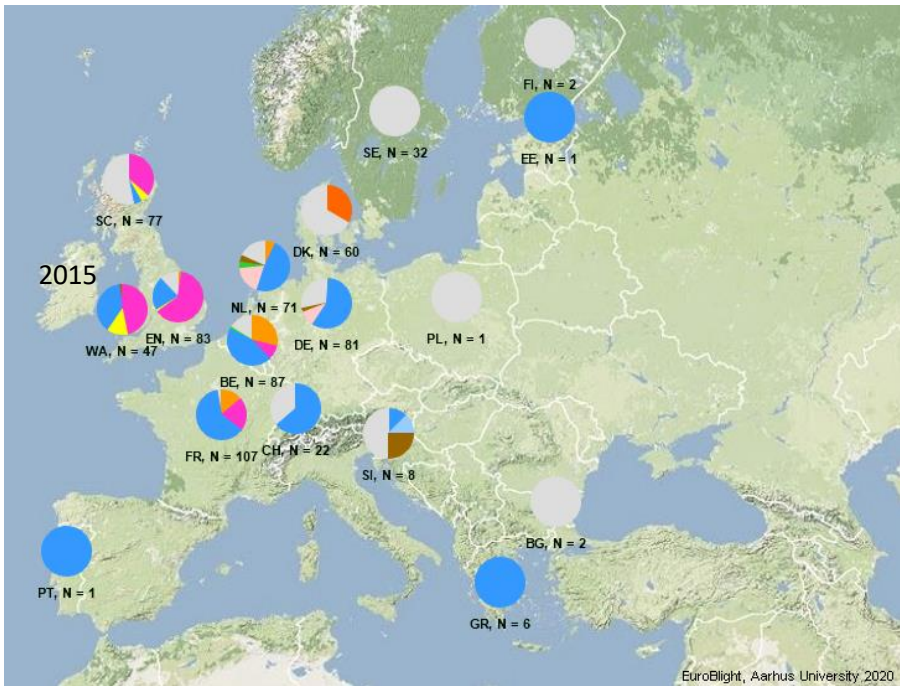
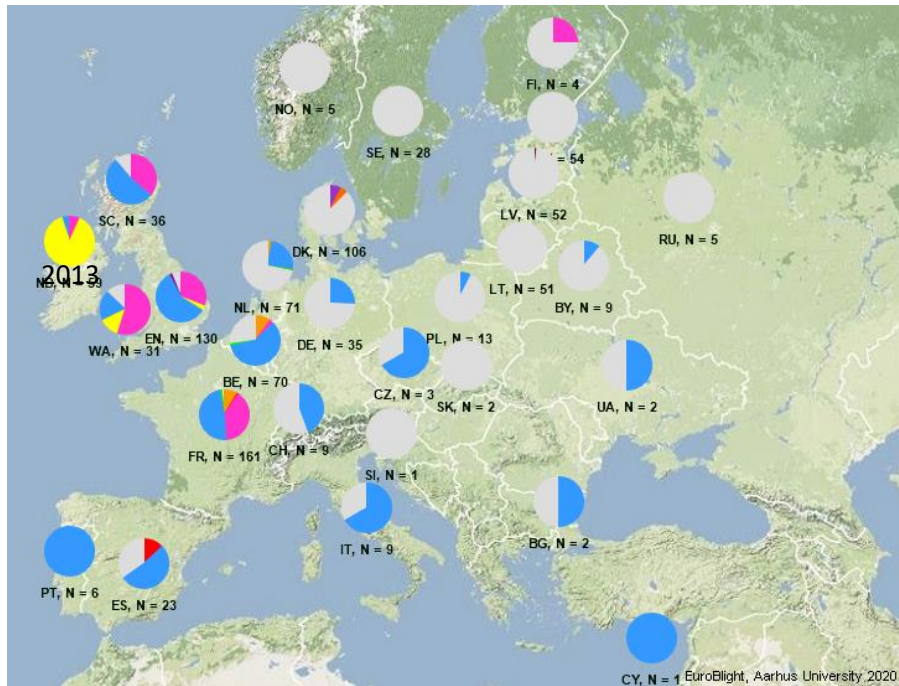
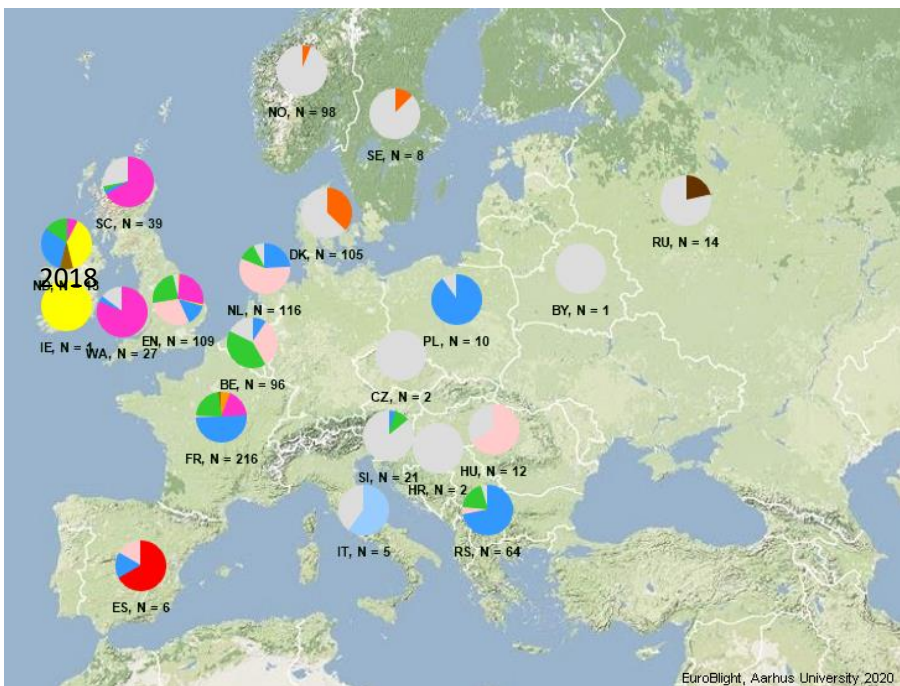
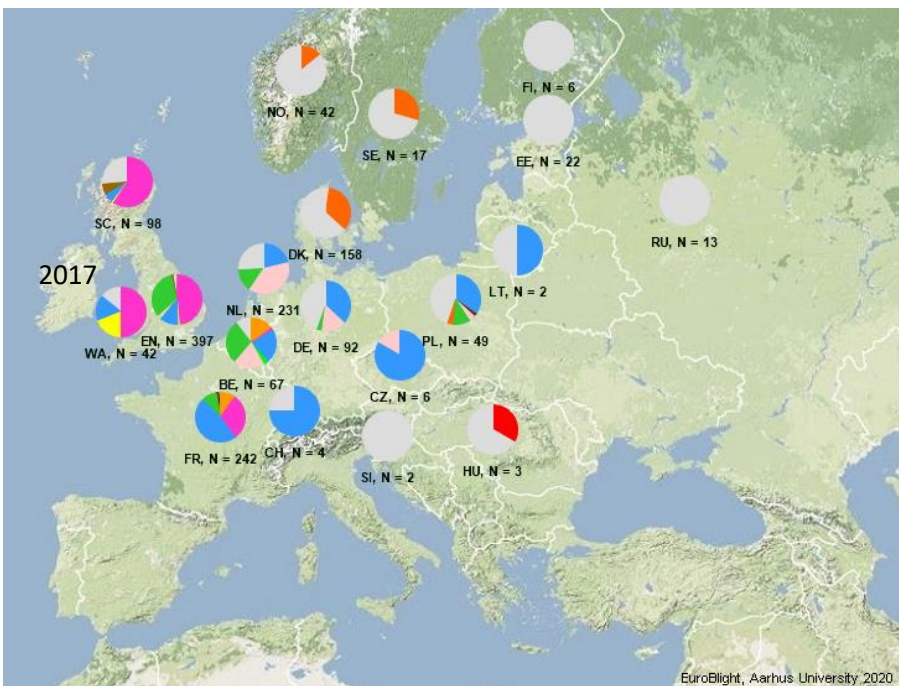


Figure 11 - Fréquences des distributions génotypiques de *P. infestans* en Europe, avec N = nombre d'échantillons (EuroBlight 2019a).

« Other » : ensemble des souches uniques, différentes les unes des autres et issues de la reproduction sexuée.



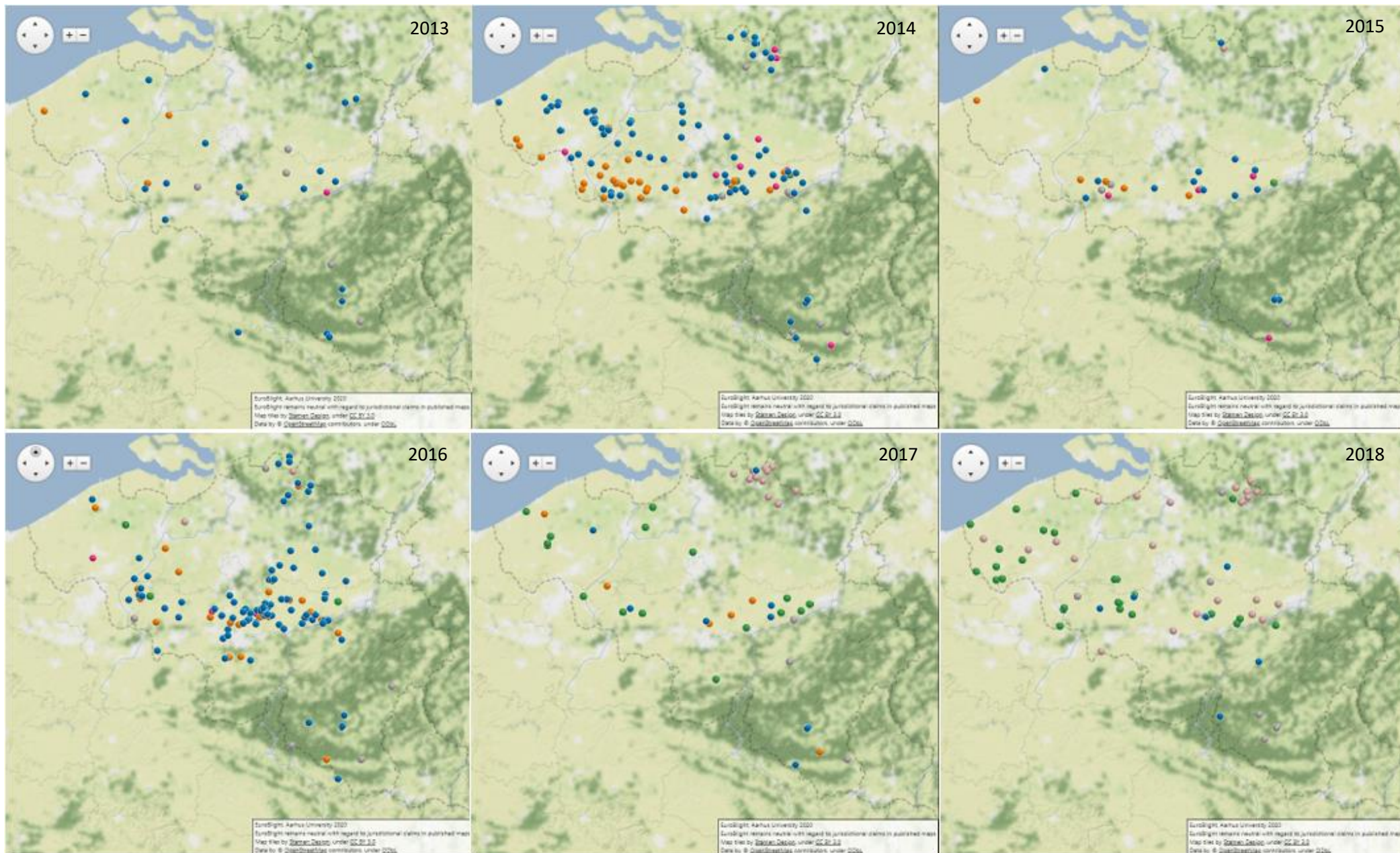


Figure 12 - Cartes des génotypes de *P. infestans* en Belgique de 2013 à 2018 (Euroblight 2019b).

- EU_1_A1 ● EU_37_A2
- EU_6_A1 ● EU_36_A2
- EU_13_A2 ● Other

2.7. Lutte contre *P. infestans* en Wallonie

Plusieurs facteurs sont à prendre en compte dans la lutte contre le mildiou de la pomme de terre. Tout d'abord, les conditions climatiques du territoire Wallon sont généralement favorables au développement du pathogène (climat doux et humide). Ensuite, une part importante des pommes de terre cultivées appartiennent à la variété Bintje, qui présente une forte sensibilité au mildiou (Pilet et al. 2005). De plus, les souches de *P. infestans* actuellement présentes sur le territoire sont fortement virulentes (voir section 2.6). Tous ces éléments montrent que la lutte contre le mildiou de la pomme de terre est d'une grande importance, la culture doit obligatoirement être protégée lorsque les conditions sont favorables au développement d'une infection (Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009).

Le contrôle du pathogène intègre tout d'abord des mesures prophylactiques. La certification des plants de semence permet de s'assurer qu'ils sont sains, la destruction des résidus de culture et gestion des tas d'écart de triage, ainsi que l'élimination des repousses de l'année précédente participe à la diminution de l'inoculum primaire (Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009). Ensuite, la lutte contre le mildiou de la pomme de terre nécessite l'utilisation de fongicides car le pathogène surmonte rapidement les gènes de résistance de l'hôte (voir section 3.1). Ces fongicides sont classés selon leur mode d'action et sont utilisés de manière préventive (Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009) (tableau 1). Les matières actives sont souvent utilisées en combinaisons au sein des produits commerciaux (Phytoweb 2020). Afin de diminuer le risque de développement d'une résistance chez le pathogène, ces utilisations en combinaison et une alternance entre les matières actives doivent être effectuées avec celles qui utilisent des modes d'action différents (Dekker 1982). Les fongicides à action ciblée (pas multisites) peuvent avoir un effet curatif en début d'infection. Cependant, la rapidité du cycle asexué du pathogène lui permet de développer une épidémie en peu de temps (voir section 2.5). Si l'étendue de la maladie est déjà trop importante, les fongicides à action ciblée ne peuvent plus assurer d'effet curatif. En agriculture biologique, des fongicides à base de cuivre sont autorisés, comme la bouillie bordelaise. Cependant, ce type de produit peut provoquer une accumulation de cuivre dans le sol et doit donc être utilisé de façon raisonnée¹ (Centre Pilote Pommes de terre (CPP) 2009).

Une protection efficace de la culture nécessite régulièrement plusieurs applications. Dans l'optique d'une optimisation des pulvérisations fongicides, dont l'objectif est de minimiser les conséquences économiques et environnementales, limiter le développement d'infections et de résistances chez le pathogène, et de diminuer le temps alloué par les agriculteurs à la pulvérisation, il est important de se baser sur des outils d'aide à la décision (Mahieu et Couvreur 2019).

¹ Recommandations d'utilisation sur le site Phytoweb

Tableau 1 - Modes d'action et matières actives utilisées dans la lutte contre le mildiou de la pomme de terre (FRAC 2018).

Fonction métabolique inhibée	Cible inhibée	Matière active	Groupe
Biosynthèse de la paroi cellulaire	Cellulose synthase	Benthiavalarbe	Amides d'acides carboxyliques
		Diméthomorphe	
Synthèse ou transport des lipides / intégrité ou fonction de la membrane	Homéostasie des lipides et transfert/stockage	Oxathiapiproline	Inhibition de l'homologue de la protéine de liaison à l'oxystérol
	Perméabilité de la membrane cellulaire, acides gras	Propamocarbe	Carbamates
Respiration	Complexe III : cytochrome bc1 (ubiquinone réductase) au site Qo, sous-site de liaison à la stigmatelline	Amétoctradine	Quinone outside Inhibitor stigmatellin binding type
	Complexe III : cytochrome bc1 (ubiquinol oxydase) au site Qo (gène cyt b)	Azoxystrobine	Quinone outside Inhibitors
		Famoxadone	
		Pyraclostrobrine	
Découpleur de la phosphorylation oxydative	Fluazinam	n/a	
Complexe III : cytochrome bc1(ubiquinone réductase) au site Qi	Cyazofamide	Quinone inside Inhibitors	
	Amilsulbrom		
Cytosquelette et protéines motrices	Assemblage des β -tubulines durant la mitose	Zoxamide	Benzamides
	Délocalisation des protéines de type spectrine	Fluopicolide	
Action multisite	Activité multisite par contact	Mancozebe	Dithiocarbamates (électrophiles)
		Cuivre (différents sels)	Inorganique
Biosynthèse de stérols dans les membranes	C14-déméthylase (erg11/cyp51)	Difénoconazole	DMI-fongicides (inhibiteurs de la déméthylation) (SBI : Classe I) Azole
Métabolisme des acides nucléiques	ARN polymérase I	Bénalaxyl-M (=kiralaxyl)	PA-fongicides (phénylamides)
		Métalaxyl-m (=mefenoxam)	

Ces outils d'aide à la décision sont utiles dans la définition de seuils d'intervention. En Wallonie, les agriculteurs disposent d'un système d'avertissement appelé Vigimap. Il est actif depuis septembre 2019 et est issu d'un partenariat entre le Carah (ASBL des services agricoles de la Province de Hainaut) et le CRA-W (Centre de Recherche Agronomique Wallon). Le programme utilise des données météorologiques récoltées grâce à un réseau de \pm 40 stations automatisées, situées à travers la Wallonie. Ces données sont sous la responsabilité de l'unité agriculture, territoire et intégration technologique du CRA-W qui intègre aujourd'hui le réseau Pameseb des stations météorologiques. Le programme calcule les périodes d'infections potentielles et d'incubation selon le modèle de Guntz et Divoux. Ce modèle intègre des données météorologiques (température, précipitations, HR) à partir desquelles le risque d'infection est déterminé (Clément 2019). L'utilisateur peut répertorier ses parcelles et consulter des courbes de simulation du développement de la maladie adaptées à ses données parcellaires. Différents schémas de lutte peuvent ensuite être mis en place en tenant compte des types de produits phytosanitaires utilisés selon la situation donnée, afin d'optimiser leurs interventions (Mahieu et Couvreur 2019).

Un pathosystème est en constante évolution, la recherche est donc continue dans l'amélioration des méthodes de lutte contre le mildiou de la pomme de terre. Dans ce contexte, des études sont menées pour apporter de nouvelles connaissances sur le pathogène et les paramètres du modèle sont régulièrement adaptés selon l'évolution spatiotemporelle des lignées clonales (Mahieu et Couvreur 2019). La recherche est également dirigée vers le développement de variétés moins sensibles au mildiou au moyen de résistances horizontales (voir section 3.1). L'unité biodiversité et amélioration des plantes & forêts du CRA-W met en place l'essai MILVAR à Libramont. L'objectif de cet essai pluriannuel est de caractériser les variétés et clones issus du programme de sélection variétale du CRA par rapport à leur résistance au mildiou. Une note allant de 0 (ultrasensible) à 9 (résistante) leur est attribuée et les variétés intéressantes au point de vue de leur sensibilité sont retenues (César 2018).

Le projet Potato Smart, est lui aussi lié à la lutte contre le mildiou de la pomme de terre (Rosillon 2018). Il a pour cible de développer un système SMART d'outil d'aide à la décision. Les producteurs pourront ainsi adapter les pulvérisations fongicides selon la pression parasitaire présente sur chaque parcelle, au moyen d'une stratégie appropriée à leur type de production : conventionnel, biologique et en protection intégrée des cultures. Cet outil nouvelle génération ajustera les modèles de prédiction par un captage de l'inoculum aérien et en intégrant l'interaction entre souches de *P. infestans* et variété de pomme de terre. Des informations culturelles (variété de pomme de terre, pratiques culturales sur la parcelle, biologique ou conventionnel...), météorologiques et d'ordre épidémiologique seront analysées en temps réel, au sein d'un logiciel pour Smart Phone. Le projet poursuit 5 grands objectifs :

1. Caractérisation, quantification et cartographie des populations de *P. infestans* en région wallonne.
2. Étude des caractéristiques épidémiologiques (facteurs climatiques et environnementaux, variété de la plante hôte, cycle épidémique, succession des phases (survie, latence, incubation, sporulation, dispersion).
3. Adaptation de modèles épidémiologiques connus selon les populations détectées et les paramètres météorologiques et culturels.
4. Adaptation des stratégies et méthodes de contrôle dans un contexte de réduction des produits phytopharmaceutiques.
5. Création de l'application pour Smart Phone intégrant toutes les informations.

Enfin, des recherches sont également menées vers la découverte d'organismes antagonistes. Certaines souches bactériennes du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* montrent des activités antagonistes contre *P. infestans* et pourraient donner lieu au développement de nouveaux produits qui pourront être utilisés dans la lutte contre le pathogène. Ce secteur est encore aux prémices de son développement mais offre une alternative future à l'utilisation de fongicides en culture de pomme de terre (Caulier et al. 2018).

3. Interaction entre *P. infestans* et *S. tuberosum*

3.1. Gènes de virulence - Gènes de résistance

Le développement d'une maladie phytopathogène nécessite la réunion de trois éléments : une plante hôte susceptible, un pathogène virulent et des conditions environnementales favorables. Ces éléments appartiennent à la « pyramide des maladies » (figure 13) et leur interaction est déterminante (Ankita et al. 2015; Legrève et Duveiller 2010).

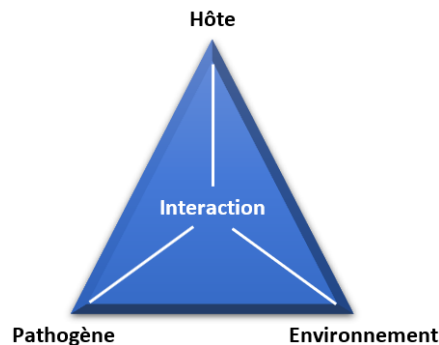


Figure 13 - Triangle des maladies.

Une interaction entre les trois éléments n'est pas toujours possible. D'une part, les plantes développent des systèmes de défense qui leur permettent de reconnaître les pathogènes et ainsi, mettre en place des barrières, comme des callosités. D'autre part, les pathogènes développent des stratégies leur permettant de ne pas être détectés ou de supprimer les mécanismes de défense mis en place par leur hôte, comme la sécrétion d'effecteurs (Barras-Hidalgo 2004).

L'immunité végétale innée s'opère à deux niveaux. Une immunité déclenchée par les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), qui sont des molécules associées à l'agent pathogène. L'hôte dispose de récepteurs qui sont capables de reconnaître ces PAMPs. Anciennement, ce type d'immunité était appelé « résistance basale ou horizontale ». On la dénomme aujourd'hui en anglais, PAMP-triggered immunity (PTI) (Boller et Felix 2009). La PTI empêche l'action de pathogènes non spécifiques. L'immunité végétale de second type empêche quant à elle l'action de pathogènes qui ont une interaction spécifique avec l'hôte (Ankita et al. 2015). Autrefois appelée résistance verticale, l'immunité déclenchée par les effecteurs (Effector-Triggered Immunity ETI) est soumise à l'interaction « Gène - pour - gène » (Boller et Felix 2009). Cette hypothèse de H.H. Flor énonce que les plantes disposent de gènes R de résistance dominants et uniques, qui ont la faculté de détecter des pathogènes de façon spécifique. Cette reconnaissance est possible si l'agent pathogène dispose des gènes d'avirulence (gènes *Avr*) qui codent pour des protéines reconnues sous certaines conditions par les plantes qui présentent un gène R complémentaire. Une reconnaissance spécifique mène à l'activation des défenses de l'hôte. Dans le cas où les protéines d'avirulence et les récepteurs R n'interagissent pas, l'infection de l'hôte est possible. On parle alors de relation

compatible et l'agent pathogène est considéré comme virulent (Barras-Hidalgo 2004). Ces relations sont synthétisées dans la figure 14.

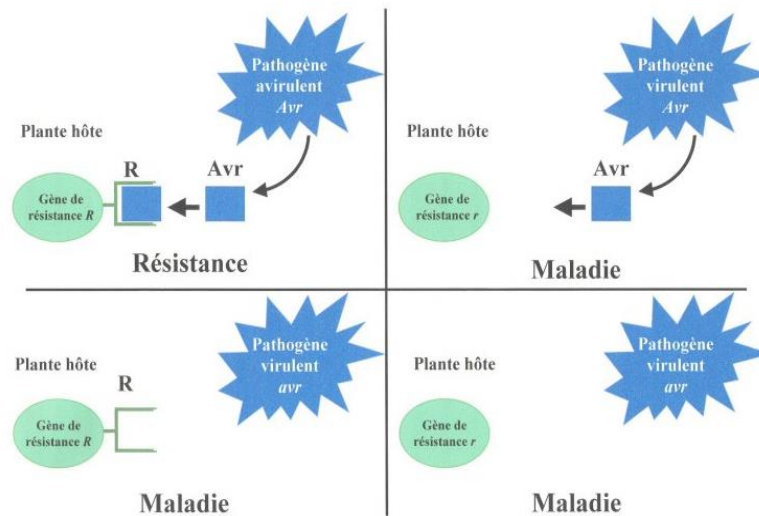


Figure 14 - Illustration de la théorie "gène-pour-gène" (Sayegh 2009).

La résistance est induite uniquement si la plante exprime le gène de résistance R dont le produit reconnaît le produit du gène d'avirulence Avr exprimé par l'agent pathogène. Dans tous les autres cas, la maladie se développe (R, Avr : gènes dominants; r, avr : gènes récessifs avec R = produit du gène R et Avr : produit du gène Avr) (légende tirée de la référence).

Chez la pomme de terre, des gènes R ont été transférés de *Solanum demissum*, un cultivar originaire du Mexique, vers des cultivars utilisés en Europe entre 1920 et 1950 (Dorrance et Inglis 1997). Le produit des gènes Avr, des effecteurs sécrétés par *P. infestans* au sein de l'hôte, est reconnu par ces gènes de résistance (Govers et Gijzen 2006). Ce type de protéine sera abordé en détail dans cette section. Lorsque le pathogène est reconnu, les mécanismes de défense de la pomme de terre sont stimulés (ETI), ce qui empêche l'oomycète de continuer sa croissance. Cette réaction peut être associée à une réponse hypersensible (W. Fry 2008).

Cette résistance qualitative s'avère non durable (Ewing et al. 2000; W. Fry 2008; Solomon-Blackburn, Stewart, et Bradshaw 2007). Le haut potentiel évolutif du pathogène lui permet de surmonter rapidement les gènes R, qu'ils soient uniques ou en combinaison (Ewing et al. 2000; Solomon-Blackburn, Stewart, et Bradshaw 2007). Les souches évoluent et deviennent virulentes envers des hôtes qui étaient résistants (Ewing et al. 2000). Ce type de dynamique se rencontre typiquement au sein d'une interaction gène-pour-gène (Dorrance et Inglis 1997).

Récemment, la sélection des cultivars de pomme de terre utilise préférentiellement un autre type de résistance, considéré comme plus durable. Elle est de nature quantitative, multigénique et confère une résistance partielle (Ewing et al. 2000; Dorrance et Inglis 1997). Les cultivars de pomme de terre ne sont pas complètement résistants au mildiou mais l'infection est réduite (limitation de la pénétration, diminution de la taille des lésions et de la sporulation) (Dorrance et Inglis 1997).

3.2. L'interface haustoriale de *P. infestans*

Comme énoncé à la section 2.5, *P. infestans* infecte les cellules de *S. tuberosum* via la formation d'haustoria, l'état terminal d'hyphe spécialisés (Bozkurt et Kamoun 2020). Cette caractéristique est partagée par de nombreux pathogènes filamenteux (C. Whisson et al. 2016). À la différence des haustoria fongiques qui sont des cellules séparées avec noyau et organelles, l'haustorium des oomycètes partage une paroi continue avec celle de l'hyphe (Bozkurt et Kamoun 2020). Cette structure s'enfonce au sein des tissus hôtes (figure 18). À ce niveau, une différence dans la formation de callosités peut être observée entre un hôte susceptible au pathogène et un hôte qui ne l'est pas. Dans ce cas, la cellule en contact avec l'haustorium développe des callosités qui englobent l'hyphe spécialisé. Mais dans une cellule d'un hôte susceptible, les callosités sont généralement absentes, ou forment une structure en collier à la base de l'haustorium, ce qui est insuffisant pour empêcher son développement (C. Whisson et al. 2016).

Le cytoplasme de la cellule hôte est séparé de l'haustorium par une membrane extrahaustoriale (EHM «*extrahaustorial membrane*» en anglais) qui est obtenue par une modulation de la membrane plasmique invaginée de la cellule hôte (Catanzariti, Dodds, et Ellis 2007). On a donc une interface formée d'un côté, par la membrane et paroi haustoriale, et de l'autre côté, par la EHM dérivée de l'hôte (figure 15) (C. Whisson et al. 2016). La composition de la EHM diffère nettement de celle de la membrane plasmique adjacente. Des protéines habituellement intégrées au sein de la membrane végétale, comme des récepteurs de surface immunitaires, ne sont plus présents dans la EHM. La composition de la EHM est fonction du pathosystème considéré. Les pathogènes qui forment un haustorium utilisent des stratégies spécifiques de transformation de la membrane végétale en EHM, afin de favoriser la virulence. Cette membrane particulière n'est donc pas uniforme. (Bozkurt et Kamoun 2020).

Entre la EHM et la paroi haustoriale se situe une matrice extracellulaire (figure 15) appelée matrice extrahaustoriale (EHMx). Cette matrice est un lieu d'interactions étroites entre l'haustorium de *P. infestans* et la membrane dérivée de l'hôte végétal (C. Whisson et al. 2016). Ces processus seront abordés dans la suite de cette section.

La structure infectieuse développée par l'oomycète lui permet donc de former une interface étroite et complexe avec son hôte. Cette surface d'échange est la clé de l'interaction plante-pathogène, aboutissant au développement d'une infection ou à l'arrêt du pathogène. Une stratégie de reprogrammation des voies d'échanges de la membrane et de l'immunité de l'hôte est mise en place afin d'éviter une destruction par les défenses cellulaires hôtes et ainsi, favoriser l'infection (C. Whisson et al. 2016).

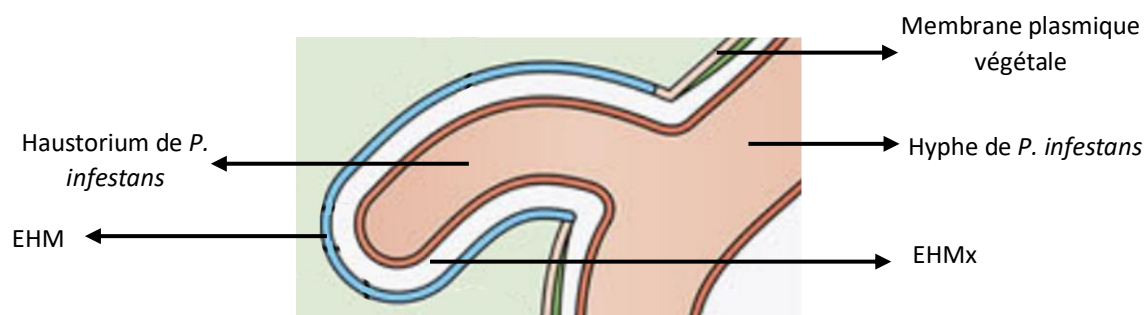


Figure 15 - Haustorium de *P. infestans* invaginé au sein des tissus hôte (image adaptée de (Bozkurt et Kamoun 2020)).

3.3. Les échanges moléculaires au sein de l'interface haustoriale

La compréhension des mécanismes ainsi que des processus moléculaires sous-jacents au développement du mildiou de la pomme de terre est une étape importante. En effet, elle permet la mise en lumière de nouvelles cibles pour le contrôle du pathogène, ou le développement de nouveaux moyens de lutte. Cela doit passer par l'élucidation de « où » et « comment » ces molécules sont produites, ainsi que par la découverte des mécanismes agissant sur l'immunité de l'hôte (Bozkurt et Kamoun 2020; S. Wang et al. 2018).

En 1966, l'haustorium de *P. infestans* est observé pour la première fois en microscopie électronique. C'est en 2007 que la première observation directe de sécrétions protéiques haustoriale est réalisée. Parmi ces protéines, des effecteurs sont caractérisés. Jusqu'en 2018, seul un faible nombre d'effecteurs ont été répertoriés. La protéine transmembranaire HMP1 (Haustorium specific membrane protein) a, quant à elle, été reconnue comme essentielle à *P. infestans* pour développer une infection (S. Wang et al. 2018).

Ces observations ont renforcé l'idée que l'haustorium de *P. infestans* est un site général de sécrétions protéiques appartenant à plusieurs classes (Bozkurt et Kamoun 2020; S. Wang et al. 2018). Elles rassemblent des enzymes de dégradation (comme la pectinestérase PE1) et de modification de la paroi cellulaire, qui participent à la formation de la EHM ; la protéine MAMP-like INF4 (Microbe Associated Molecular Pattern) qui permet de déclencher une réponse immunitaire chez l'hôte, et des effecteurs apoplastiques qui seraient à l'origine d'une suppression de l'immunité de l'hôte (S. Wang et al. 2018). Un exemple d'effeteur apoplastique est l'EPIC1 qui cible des protéases associées à la défense de l'hôte au sein de l'espace extracellulaire (S. Wang et al. 2017). Ces classes protéiques ont été caractérisées lors d'études menées récemment par Wang et al. (2017 et 2018).

Ces molécules sont d'origine diverses : la membrane vacuolaire, la membrane plasmique, en incluant des vésicules endocytiques, des plasmodesmes ou encore le réticulum endoplasmique (RE) (Bozkurt et Kamoun 2020). Leur activité se situe dans la matrice extrahaustoriale (apoplaste) (S. Wang et al. 2018). L'utilisation de Brefeldin A (BFA), un inhibiteur de la sécrétion conventionnelle chez les plantes a eu pour effet d'empêcher leur sécrétion (S. Wang et al. 2018; 2017). Il a donc été reconnu que ces classes protéiques sont sécrétées de manière conventionnelle, la voie qui est régie par le réticulum endoplasmique-

vers-Golgi. Les protéines appartenant à ces classes sont qualifiées d'apoplastiques et ont une action à l'extérieur de la cellule végétale hôte, dans la EHMx (S. Wang et al. 2018).

Le traitement à la BFA a également permis de mettre en évidence une autre classe protéique : les effecteurs RXLR-dEER. Leur mode de sécrétion n'est pas influencé par l'inhibiteur et est donc différentiel. Ces effecteurs ont une action cytoplasmique, c'est-à-dire qu'ils sont transloqués au sein de la cellule hôte via une sécrétion non-conventionnelle (S. Wang et al. 2018).

Si les voies de sécrétion des effecteurs apoplastiques et cytoplasmiques sont connues, les mécanismes moléculaires de sécrétion et translocation sous-jacents restent peu, voire non connus, pour la plupart des effecteurs (S. Wang et al. 2018; 2017; 2019). Des suppositions basées sur le parasite *Plasmodium* ont été réalisées quant aux possibles voies de translocation des effecteurs à travers l'EHMx et la EHM (figure 16). Elles pourraient se produire par endocytose médiée par un récepteur, fusion de vésicules extracellulaires (exosomes) chargées en effecteurs, ou par un transport actif facilité via un translocon issu du pathogène (Bozkurt et Kamoun 2020).

Des études sont actuellement menées afin de préciser ces voies de translocation, particulièrement pour les effecteurs RXLR-dEER qui semblent intervenir de façon récurrente au niveau de la suppression de l'immunité de l'hôte dans l'interface haustoriale entre *P. infestans* et *S. tuberosum*.

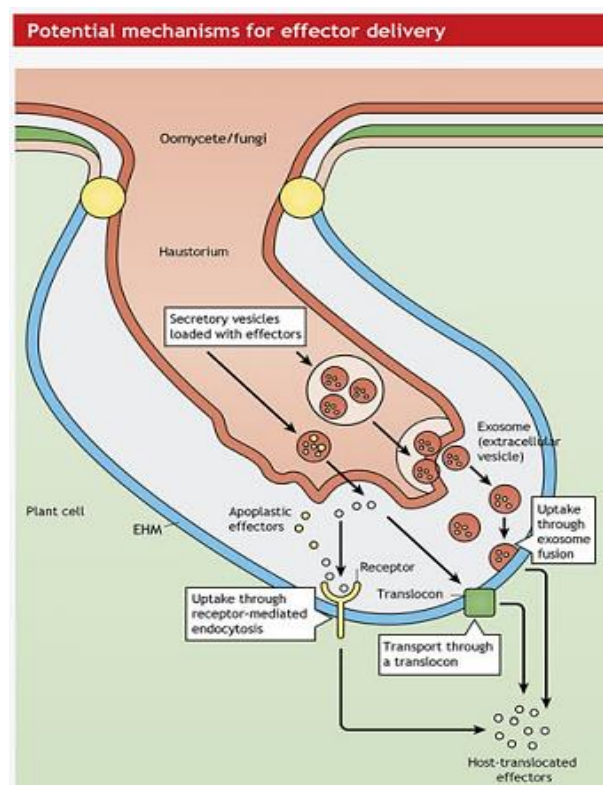


Figure 16 - Voies de translocation des effecteurs à travers l'EHMx et la EHM (Bozkurt et Kamoun 2020).

3.4. Les effecteurs RXLR-dEER

Ces protéines à action cytoplasmique sont impliquées au stade biotrophe du pathogène (Muhovski 2020). Ils présentent une homologie avec les gènes *Avr* connus chez d'autres organismes phytopathogènes. Les effecteurs RXLR-dEER sont ainsi également appelés gènes *Avh* (pour homologues de gène d'avirulence) et sont soumis à l'interaction gène-pour-gène abordée à la section 3.1, qui met en jeu les gènes de résistance R chez l'hôte (Van Poppel et al. 2009; H. Y. Jiang et al. 2008).

3.4.1. Aspects structuraux

Les gènes *Avh* font l'objet de recherches récentes car ils comportent deux motifs d'acides aminés conservés à l'extrémité N-terminale : RXLR et dEER (Boutemy et al. 2011; H. Y. Jiang et al. 2008; Van Poppel et al. 2009). Le motif RXLR est une séquence fortement conservée de « Arg - un acide aminé quelconque - Leu - Arg » (S. Wang et al. 2019). Le motif dEER quant à lui est moins fidèlement conservé. Ces caractéristiques pourraient être utilisées dans le développement de nouveaux moyens de lutte contre le pathogène. Les motifs conservés ont un rôle dans le ciblage et l'entrée au sein d'une cellule végétale hôte (Van Poppel et al. 2009; H. Y. Jiang et al. 2008), mais une étude menée par L. S. Boutemy et al. (2011) a montré qu'ils ne sont pas indispensables à l'activité de l'effecteur lorsqu'il est directement exprimé dans la cellule hôte.

Le domaine concerné par l'activité de l'effecteur se situe à l'extrémité C-terminale. Cette région présente une grande diversité de séquences et peu de similarités avec des protéines connues à activités similaires, ce qui peut rendre difficile sa caractérisation (Boutemy et al. 2011). Malgré cela, des séquences reconnaissables et répétitives ont été décrites chez plus de la moitié des effecteurs RXLR-dEER. Ces motifs ont été nommés W, Y et L, selon les résidus d'acides aminés situés à des positions fixes dans les séquences conservées respectives (Van Poppel et al. 2009; Boutemy et al. 2011). Les motifs W (tryptophane), Y (tyrosine) et L (leucine) sont des séquences de 21 à 30 acides aminés qui se présentent en modules dans l'ordre W-Y-L. Leur nombre varie pour chaque gène *Avh* considéré et est corrélé avec la taille de la protéine. Chez les oomycètes, les modules se répètent 1 à 11 fois. Il est supposé que la virulence ou avirulence de l'effecteur est déterminée au sein de cette région C-terminale. Si l'hôte bénéficie d'une protéine R qui reconnaît une séquence conservée, le pathogène est avirulent, mais en cas d'absence d'un gène R, la protéine *Avh* peut empêcher la mort cellulaire prématurée² et ainsi se développer (Van Poppel et al. 2009). La structure modulaire des protéines *Avh* des oomycètes permet de situer les composants abordés ci-dessus (figure 17).

² *P. infestans* étant un pathogène hémibiotrophe, une mort prématurée de la cellule hôte en réponse immunitaire à l'infection empêche le développement du pathogène.

Ces analyses convergent vers l'hypothèse que la plupart des effecteurs RXLR-dEER, mais probablement pas tous, seraient dérivés d'un ancêtre commun. Cependant, les connaissances concernant l'activité de virulence de ces protéines sont encore émergentes et les mécanismes biochimiques qui y sont liés sont encore pour la plupart inconnus (Boutemy et al. 2011).



Figure 17 - Structure modulaire d'une protéine Avh chez un oomycète (Van Poppel et al. 2009). De gauche à droite : extrémité N-terminale avec un **peptide signal (SP)** qui disparaît lorsque la protéine est sécrétée par le pathogène ; le **domaine RXLR-dEER** nécessaire au ciblage de la cellule hôte ; l'**extrémité C-terminale** avec un nombre variable de répétitions de modules composés de motifs W, Y et/ou L.

3.4.2. Aspects évolutifs

Si l'on considère que les protéines R de la pomme de terre reconnaissent des séquences conservées au sein des protéines Avh, comme énoncé précédemment, la sélection chez la plante hôte favorise logiquement les gènes R capables de détecter ces séquences. Chez le pathogène, les régions conservées se manifestent par les motifs W, Y et L à l'extrémité C-terminale, les effecteurs subissent alors une forte sélection positive dirigée par l'hôte et ciblée principalement vers cette extrémité (Van Poppel et al. 2009; H. Y. Jiang et al. 2008).

Plusieurs pressions s'exercent donc sur l'effectome (ensemble des effecteurs) (H. Y. Jiang et al. 2008). D'une part, une pression sélective qui vise à ne pas être reconnu par l'hôte. Et d'autre part, la sélection qui vise à maintenir l'activité de virulence du pathogène (Boutemy et al. 2011). Une diversification rapide des séquences des gènes Avh, principalement au niveau de l'extrémité C-terminale, aurait permis au pathogène d'accroître le nombre de gènes effecteurs tout en minimisant la probabilité d'être reconnu par l'hôte. Les gènes Avh ont été reconnus comme étant les parties du génome qui évoluent le plus rapidement, permettant le contournement des résistances (H. Y. Jiang et al. 2008). Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels les effecteurs parviennent à évoluer ne sont pas bien compris (Boutemy et al. 2011).

3.4.3. Les effecteurs RXLR chez *P. infestans*

La grande majorité des effecteurs RXLR de *P. infestans* sont à ce jour non caractérisés. Cependant, le séquençage du génome a révélé plus de 550 gènes candidats pouvant coder pour des effecteurs RXLR. En 2019, seulement 19 de ces protéines Avh candidates ont été exprimées au sein d'une cellule végétale hôte afin de déterminer leur localisation subcellulaire et leur action potentielle sur le développement de l'infection (S. Wang et al. 2019).

Une étude menée par Wang et al. (2019) sur un panel de 71 gènes Avh candidats (dont 19 précités) a montré que la plupart de ces protéines se localisent dans le cytoplasme, le noyau ou la membrane plasmique de la cellule hôte après avoir été sécrétées. Pour certains

effecteurs RXLR répertoriés, leur localisation est en accord avec leur fonction. L'effecteur Pi04314 est localisé au niveau du noyau et interagit avec un isoforme de la protéine phosphatase 1 (PP1c) au sein du noyau. Pi03192 se situe dans le ER où il entre en interaction avec des facteurs de transcription sécrétés dans le ER. PexRD54 s'associe à des autophagosomes où il interagit avec ATG8, un noyau adaptateur pour l'autophagie. AVR3a se situe quant à lui dans le cytoplasme et nucléoplasme de la cellule végétale (cet effecteur sera détaillé au paragraphe suivant). L'étude a également démontré que beaucoup d'effecteurs seraient sécrétés au même moment et agiraient de concert. Des effecteurs qui ciblent des voies immunitaires différentes permettraient de favoriser de façon additive la croissance du pathogène (S. Wang et al. 2019).

AVR3a est l'un des premiers effecteurs RXLR à avoir été étudié (Van Poppel et al. 2009; C. Whisson et al. 2016). L'effecteur AVR3a de *P. infestans* dispose d'un seul motif W et ne compte aucun motif Y ou L (figure 18) (Van Poppel et al. 2009).



Figure 18 - Structure modulaire d'un effecteur AVR3a issu de *P. infestans* (Van Poppel et al. 2009).

P. infestans sécrète l'effecteur sous deux formes alléliques majeures : AVR3aKI et AVR3aEM, avec K/E qui correspondent au résidu en position 80 (Lys ou Glu) et I/M au résidu en position 103 (Ile ou Met) dans le domaine W. La nature de ces deux acides aminés à l'extrémité C-terminale, détermine la virulence de la protéine Avh (Van Poppel et al. 2009; Boutemy et al. 2011).

Chez les variétés de *S. tuberosum* portant le gène de résistance R3a, la forme AVR3aKI est reconnue (C. Whisson et al. 2016). En présence de cette forme avirulente, l'ETI est activée. Cela provoque une mort cellulaire programmée (programmed cell death PCD) de la cellule infectée et un arrêt de l'infection (Boutemy et al. 2011). Si la plante est en présence de la forme AVR3aEM, ou si elle n'est pas porteuse du gène R3a (dans ce cas les deux formes alléliques ont le même effet), l'ubiquitine ligase CMPG1 subit une interaction *in planta* avec l'effecteur. Cette protéine ayant un rôle immunitaire s'en retrouve stabilisée et cela induit la suppression de l'immunité conférée par l'élicite IN1 (C. Whisson et al. 2016; Boutemy et al. 2011). La mort cellulaire induite par IN1 ne peut donc pas avoir lieu et l'infection peut se développer (S. Wang et al. 2019).

Avr3a est le seul exemple choisi ici pour illustrer les protéines Avh car la diversité que représente cette grande famille serait trop importante dans le cadre de ce travail. Cependant, il est nécessaire de préciser que chaque effecteur RXLR possède ses spécificités d'action.

4. Techniques d'imagerie pour l'évaluation des maladies foliaires

Les recherches actuellement menées sur *P. infestans* s'inscrivent dans un contexte d'amélioration des connaissances sur le pathogène et de ses interactions avec la pomme de terre. Selon la résistance du cultivar considéré et l'agressivité de la souche de *P. infestans*, le développement des symptômes foliaires ne sera pas le même (Flier, van den Bosch, et Turkensteen 2003). Il est donc important de pouvoir détecter, identifier, quantifier et comparer ces symptômes de façon précise.

L'estimation visuelle des dégâts occasionnés par *P. infestans* est la technique qui est généralement appliquée. Elle utilise l'identification des symptômes ou des structures visibles qui se développent sous l'action du pathogène considéré. Aujourd'hui, l'estimation visuelle est utilisée par des experts qualifiés qui suivent des normes détaillées, ce qui la rend relativement fiable et précise (Mahlein 2016). Cependant, des évaluateurs observant les mêmes feuilles obtiendront des différences significatives dans les résultats obtenus. Cela montre qu'il existe une variabilité au sein de la fiabilité d'un évaluateur et de l'adéquation avec la réalité (Bock et al. 2010). Afin de diminuer cette variabilité et augmenter la sensibilité de l'évaluation des maladies des plantes, de nouvelles méthodes automatisées et basées sur des capteurs optiques ont été développées. Les imageries hyperspectrales, thermiques, via la fluorescence chlorophyllienne et RVB sont des techniques fiables qui offrent une grande sensibilité et spécificité (Mahlein 2016). Elles permettent de détecter des modifications physiologiques au sein de plantes qui subissent un stress d'origine biotique. Ces techniques sont non-destructive et autorisent plusieurs mesures au cours du temps sur les mêmes individus (Mahlein et al. 2018).

4.1. Imagerie hyperspectrale

Cette technologie est la plus récente, son application en pathologie végétale est encore expérimentale (Bock et al. 2010; Mahlein 2016). Le système mesure la réflectance (part de lumière réfléchi par un objet) d'une source végétale dans une large gamme spectrale, allant des ultraviolets au proche infrarouge (Mishra et al. 2017). Une image hyperspectrale est alors obtenue, à partir de laquelle on peut retirer des informations à la fois chimiques et structurelles, relatives à l'état du végétal. Ces images s'observent en trois dimensions (figure 19) et sont parfois appelées « hypercubes » (Bock et al. 2010). La matrice associée présente des axes x et y qui concernent les données spatiales, et un axe z qui reprend les données spectrales (intensité de réflectance par bande d'onde) (Mahlein 2016; Mishra et al. 2017).

Lors d'une infection, la réflectance d'une feuille peut être modifiée par une altération de ses structures foliaires ou de sa composition chimique interne. Ces changements sont spécifiques au pathogène et permettent d'étudier les interactions plante-pathogène (Mahlein 2016). Une étude menée par Gold et al. (2020), a montré que selon le cultivar de pomme de

terre considéré, la réflectance des plants infectés par *P. infestans* diffère, indiquant des variations dans les interactions plante-pathogène.

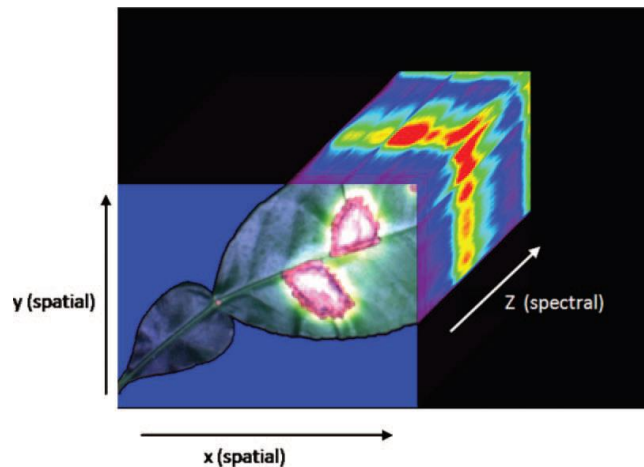


Figure 19 - Image spectrale "hypercube" d'une feuille présentant des symptômes foliaires (bock et al. 2010).

4.2. Capteurs thermiques

Cette technologie utilise des caméras thermographiques ou infrarouges (thermographie infrarouge IRT) qui détectent les rayonnements émis dans l'IR (de 8 à 12 μm). Les images obtenues sont en « fausses couleurs », c'est-à-dire que chacun des pixels présente la température de l'objet mesurée en cet endroit-là (Mahlein 2016).

Elle permet d'étudier les relations existantes entre l'eau et la plante. En effet, la transpiration foliaire est fondamentalement liée à sa température (Jones et Schofield 2008). Les organismes pathogènes peuvent provoquer des variations locales et bien définies dans ces relations plantes-eau (Jones 2004; Mahlein 2016). L'hétérogénéité créée au sein de la canopée peut être utilisée en IRT, en mesurant la différence de température moyenne entre les feuilles, les plantes et les populations. Cet outil est un bon indicateur de l'apparition de maladies phytopathogènes (Mahlein 2016).

Cependant, il est nécessaire de prendre en considération que la température foliaire ne dépend pas uniquement des infections, mais également de la température et humidité relative, de l'anémométrie, ainsi que du rayonnement lumineux net absorbé (Jones et Schofield 2008). En pathologie végétale, l'utilisation de l'IRT est souvent combinée avec d'autres données spectrales, comme la fluorescence chlorophyllienne (Jones 2004).

4.3. Imagerie par fluorescence chlorophyllienne

Le transport photosynthétique des électrons peut être influencé lors des premiers stades d'une infection par un pathogène, ce qui provoque une variation de la fluorescence chlorophyllienne de la plante (Chaerle, Leinonen, et al. 2007).

Cette technique d'imagerie utilise des caméras à fluorescence chlorophyllienne pour détecter les variations photosynthétiques. Cette détection permet d'anticiper l'apparition des

symptômes visibles provoqués par un pathogène ou un stress abiotique (Chaerle, Hagenbeek, et al. 2007). La combinaison de cette méthode avec des techniques d'analyse d'images a rendu possible la discrimination et quantification de l'intensité d'une infection fongique (Mahlein 2016).

L'imagerie par fluorescence chlorophyllienne montre un inconvénient majeur : un protocole strict doit être suivi lors de la préparation des plantes (Mahlein 2016). Un calibrage doit d'abord être effectué à l'aide des plants témoins pour déterminer les paramètres de fluorescence (non détaillés ici) après un passage à l'obscurité. Les paramètres des plants infectés sont ensuite mesurés avant d'être comparés avec ceux des plants témoins (Barbagallo et al. 2003). La méthode n'est donc pas totalement adaptée à des essais en serre ou en champs (Mahlein 2016).

4.4. Imagerie RVB

Ce type d'imagerie utilise un appareil photo numérique pour produire des images RVB (Mahlein 2016). Celles-ci sont composées de pixels ayant des valeurs particulières pour chacune des trois couleurs primaires : rouge, vert et bleu (RVB). Cela permet de produire une image colorée selon la réalité (Bock et al. 2010). Cette technique est relativement accessible au point de vue coût, matériel et utilisation. L'imagerie RVB est connue depuis plusieurs décennies dans l'évaluation des pathologies végétales (Bock et al. 2010). De plus, les paramètres techniques se sont fortement améliorés au cours des dernières années, comme la sensibilité à la lumière, la résolution ou encore la mise au point optique et numérique (Mahlein 2016).

Les capteurs RVB peuvent être utilisés à toutes les échelles de résolution pour détecter des stress biotiques chez les plantes. Certains paramètres (couleurs, niveaux de gris, texture, forme) peuvent être utilisés comme caractéristiques dans la détection, l'identification ou encore la quantification de symptômes de maladies phytopathogènes. Plusieurs logiciels d'identification tels que ASSESS2.0, Leaf Doctor ou encore Scion Image existent (Mahlein 2016). Le logiciel gratuit ImageJ est utilisé dans la quantification du développement des symptômes foliaires à partir d'images RVB. Pour cela, une macro-instruction peut être développée en fonction de ce l'on souhaite mesurer (Guyer et al. 2015).

L'aspect critique de ce type d'imagerie se situe au niveau de l'acquisition des images. Des problèmes peuvent survenir lors de l'automatisation du processus, car il est nécessaire de conserver une stabilité au niveau de la mise au point (netteté), de l'éclairage et des couleurs. Des conditions hétérogènes pourraient mener à une confusion de détection entre les tissus sains et infectés (Bock et al. 2010).

4.5. Considérations

Les exemples présentés dans le tableau 2 nous montrent que plusieurs pathosystèmes ont déjà été étudiés avec les quatre techniques d'imagerie (Mahlein 2016). L'absence du système *P. infestans* - *S. tuberosum* parmi ces exemples laisse penser que leur interaction n'a pas encore fait l'objet de nombreuses études. Les informations récoltées pourraient servir de base dans le développement d'une méthode d'évaluation adaptée à ce pathosystème. Dans cette optique, il est nécessaire d'utiliser la technique adéquate, qui aura fait l'objet d'une étude laboratoire (Chaerle, Leinonen, et al. 2007).

L'évaluation des maladies phytopathogènes au moyen des capteurs optiques est un domaine en pleine évolution. Les technologies nécessaires à la détection spécifique des maladies ne sont pas encore largement disponibles sur le marché et les systèmes adaptés au phénotypage des maladies sur terrain ou en serre doivent encore être adaptés et calibrés. Ces derniers sont adaptés à certains pathosystèmes et très spécifiques, rendant leur utilisation à grande échelle impossible (Mahlein 2016). L'EPPN (European Plant Phenotyping Network) est un réseau rassemblant 23 de ces installations expérimentales, au sein de cinq pays à travers l'Europe. Les technologies sont donc accessibles au niveau transnational pour les scientifiques européens (Pieruschka et Schurr 2019). Un de ces prototypes est présent à l'UCLouvain. C'est un système mis en place par le professeur Xavier Draye et qui permet le phénotypage racinaire automatisé d'herbacées (Draye 2020).

À côté des avantages que présentent les capteurs optiques (automatisation, rapidité, etc.), un élément clé à prendre en compte concerne l'interprétation des données récoltées. En dehors de l'imagerie RVB, elles se présentent plutôt sous forme de « spectres » dépendant de plusieurs paramètres, dont la qualité et la quantité se sont fortement améliorées. La quantité de données atteint régulièrement les téraoctets et nécessitent donc des méthodes avancées de traitement, d'analyse et d'interprétation (Mahlein 2016). Le développement d'algorithmes spécifiques est nécessaire au traitement efficace de ces données. Plusieurs logiciels capables de traiter les données d'imagerie hyperspectrale sont disponibles sur le marché, comme IDRISI, ER Mapper ou ERDAS Imagine (Bock et al. 2010).

Tableau 2 - Exemples de pathosystèmes plante-pathogène évalués au moyen de capteurs optiques (Mahlein 2016).

Sensor	Crop	Disease / Pathogen	
RGB	Cotton	Bacterial angular (<i>Xanthomonas campestris</i>) Ascochyta blight (<i>Ascochyta gossypii</i>)	
	Sugar beet	Cercospora leaf spot (<i>Cercospora beticola</i>), Sugar beet rust (<i>Uromyces betae</i>), Ramularia leaf spot (<i>Ramularia beticola</i>), Phoma leaf spot (<i>Phoma betae</i>), bacterial leaf spot (<i>Pseudomonas</i> <i>syringae</i> pv. <i>Aptata</i>)	
	Grapefruit	Citrus canker (<i>X. axonopodis</i>)	
	Tabaco	Anthracoise (<i>Colletotrichum destructivum</i>)	
	Apple	Apple scab (<i>Venturia inaequalis</i>)	
	Canadian goldenrod	Rust (<i>Coleosporium asterum</i>)	
	Spectral sensors	Barley	Net blotch (<i>Pyrenophora teres</i>), Brown rust (<i>Puccinia hordei</i>), Powdery mildew (<i>Blumeria graminis hordei</i>)
Wheat		Head blight (<i>Fusarium graminearum</i>) Yellow rust (<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>)	
Sugar beet		Cercospora leaf spot (<i>C. beticola</i>), Sugar beet rust (<i>U. betae</i>), Powdery mildew (<i>Erysiphe betae</i>), Root rot (<i>Rhizoctonia solani</i>), Rhizomania (<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>)	
Tomato		Late blight (<i>Phytophthora infestans</i>)	
Apple		Apple scab (<i>V. inaequalis</i>)	
Tulip		<i>Tulip breaking virus</i> (TBV)	
Sugar cane		Orange rust (<i>Puccinia kuehni</i>)	
Thermal sensors		Sugar beet	Cercospora leaf spot (<i>C. beticola</i>)
		Cucumber	Downy mildew (<i>Pseudoperonospora cubensis</i>), Powdery mildew (<i>Podosphaera xanthii</i>)
		Apple	Apple scab (<i>V. inaequalis</i>)
Fluorescence imaging	Rosa	Downy mildew (<i>Peronospora sparsa</i>)	
	Wheat	Leaf rust (<i>Puccinia triticina</i>) Powdery mildew (<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>)	
	Sugar beet	Cercospora leaf spot (<i>C. beticola</i>)	
	Bean	Common Bacterial Blight (<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i>)	
	Lettuce	Downy mildew (<i>Bremia lactucae</i>)	

II. Démarches expérimentales réalisées

1. Caractérisation et isolation de souches de *P. infestans* à partir de matériel frais

1.1. Contexte et objectif

À la vue de l'évolution récente observée au sein des populations de *P. infestans* (voir section 2.6), il est important d'effectuer un suivi au sein de notre territoire (mating type, génotypes présents, étude et évolution de leur virulence). Cela permet d'adapter les stratégies de contrôle en conséquence, en se basant sur une meilleure connaissance des populations du pathogène en présence.

Dans le cadre du projet Euroblight, des campagnes d'échantillonnage de souches de *P. infestans* à partir de matériel frais sont réalisées chaque saison. Elles visent à étudier la diversité et l'évolution des populations de *P. infestans*. Lors de la réalisation de ce mémoire, des collectes d'échantillons et des isollements de souches ont été réalisés au CRA-W à Libramont (laboratoire Mildiou - Pomme de terre, au sein de l'unité Biodiversité et Amélioration des Plantes & Forêts du département Sciences du vivant). Ces manipulations visent à pouvoir comparer les populations de mildiou présentes à Libramont, avec celles considérées à l'échelle de la Belgique, ainsi que de l'Europe.

1.2. Méthodologie

1.2.1. Échantillonnage

Les échantillons ont été collectés à travers l'ensemble de la Wallonie. Des feuilles de pommes de terre présentant des symptômes ont été récoltées et transportées jusqu'au laboratoire au moyen de sachets ou de boîtes propres annotées selon la variété sur laquelle l'échantillon a été récolté.

1.2.2. Caractérisation d'une souche via cartes FTA

La première étape de la caractérisation nécessite la récolte d'un échantillon d'ADN du pathogène sur une carte FTA (voir section 2.6). Deux folioles provenant idéalement du même

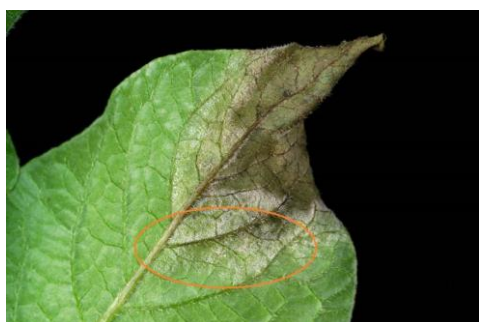


Figure 20 - Symptôme sporulant de *P. infestans* sur une feuille de pomme de terre (Euroblight 2020b).

plant et présentant une lésion unique et sporulante (figure 20) sont sélectionnées. Si les lésions ne sporulent pas, il faut les placer en chambre humide (HR \pm 90%) 12 à 16 heures afin de favoriser la sporulation. Il est nécessaire d'éviter l'utilisation de feuilles sénescentes ou présentant des symptômes à un stade trop avancé afin de faciliter les analyses. Des lésions de ce type pourraient contenir des contaminations par des pathogènes secondaires.

La suite du protocole est réalisée sous flux afin d'éviter la contamination des échantillons. Un morceau de la lésion (1-2 cm²) est découpé et placé sur l'une des deux zones d'échantillonnage (figure 24), la face sporulante en contact avec la carte FTA. Il est important d'éviter de toucher ces zones avec autre chose que l'échantillon. Après avoir recouvert l'échantillon avec la partie couvrante de la carte FTA, une pression modérée est appliquée à l'aide d'un petit marteau ou tout autre objet pouvant servir à cet usage. Il faut veiller à ne pas appliquer une pression trop forte, ce qui risquerait d'endommager l'échantillon d'ADN récolté sur la carte.

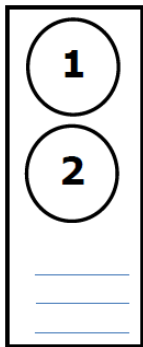


Figure 21 - Schématisation de la partie échantillonnage d'une carte FTA (Euroblight 2020).

Lorsqu'un extrait foliaire vert est imprimé sur la zone d'échantillonnage (zones 1 et 2 de la figure 21), il faut s'assurer que tout résidu foliaire a été retiré de la carte FTA et laisser celle-ci sécher à l'air pour une durée d'au moins une heure.

La carte FTA doit être référencée et un formulaire (disponible à l'annexe 2) doit être rempli afin de renseigner les conditions d'échantillonnage. L'ensemble peut ensuite être envoyé pour l'étape de caractérisation de l'échantillon d'ADN. Elle est réalisée selon la méthode décrite à la section 2.6. utilisant des marqueurs SSR. La caractérisation n'est pas réalisée au CRA-W et n'est donc pas détaillée ici.

Le protocole détaillé de l'échantillonnage au moyen de cartes FTA est disponible à l'annexe 1.

1.2.3. Isolation d'une souche à partir de matériel frais (CRA-W)

Le protocole est basé sur l'utilisation d'une variété de pomme de terre sensible au mildiou, comme par exemple la Bintje. Les tubercules sont désinfectés dans un bain d'eau de Javel 1% durant 30 minutes. Des rondelles incurvées d'une épaisseur d'environ 1 cm (figure 22A et 22B) sont ensuite découpées et trempées dans l'eau de Javel 1% durant 5 minutes. Elles sont rincées avec de l'eau déminéralisée stérile et puis séchées. Afin d'isoler une souche de *P. infestans* pure, il faut inoculer une seule lésion provenant des feuilles échantillonnées par rondelle.

Une lésion est sélectionnée de la même manière que pour la réalisation d'une carte FTA (une lésion individualisée, non contaminée et sporulante). Sous flux, afin d'éviter toute contamination, un fragment (+/- 5 mm) de la lésion est prélevé à l'aide d'un scalpel stérilisé à la flamme. Ce fragment est déposé au sein d'une légère incision réalisée sur la face supérieure de la rondelle de pomme de terre (figure 22B), la face sporulante vers le bas. Au total, 6 fragments seront inoculés par rondelle. Elles sont ensuite déposées dans une boîte d'incubation où un papier absorbant humide a préalablement été déposé, et incubées à l'obscurité à une température de 16°C.



Figure 22 - Schématisation de la rondelle de pomme de terre incurvée (CRA-W 2003).

À partir du second jour d'incubation, un contrôle visuel des tubercules est régulièrement effectué. Le pathogène se développe jusqu'à transpercer l'épaisseur de la rondelle pour se développer à la face inférieure. Lorsque le mycélium est suffisamment développé (> 1mm d'épaisseur), une petite partie peut être prélevée sous flux à l'aide d'un scalpel stérilisé à la flamme. Durant cette étape, il faut veiller à ne pas toucher la chair du tubercule qui pourrait être source de contaminations. Trois à quatre prélèvements successifs sont réalisés et déposés dans une boîte de Petri (90mm Ø) contenant du milieu pois. Le milieu pois va favoriser la croissance mycélienne lors de l'incubation à 16°C. Lorsque le pathogène s'est bien développé, il peut être transféré régulièrement dans de nouvelles boîtes de Petri afin de le conserver dans le temps. Le protocole complet de l'isolation d'une souche pure de *P. infestans* se situe en annexe 3.

1.3. Résultats des isolements et caractérisation SSR 2019

1.3.1. Résultats des isolements réalisés à Libramont

Lors de ma présence au CRA-W à Libramont, 40 échantillons récoltés entre le 23 juillet et le 23 septembre 2019 ont été envoyés pour caractérisation. Des résultats ont été obtenus pour 36 échantillons, le tableau des résultats complets se situe en annexe 4.1. Dans la plupart des cas (30 sur 36), une caractérisation complète a été possible. Le mating type est déterminé par croisements avec des souches de référence dont le mating type est connu (César 2019b). Pour rappel, le mating type fait référence aux thalles A1 et A2 (hétérothallisme), les deux formes sous lesquelles l'oomycète existe. Une reproduction sexuée nécessite une interaction entre les deux types de thalle. Le génotype est obtenu après une caractérisation SSR réalisée au James Hutton Institute (voir revue bibliographique). Le mating type ou génotype de certains échantillons n'a pas été déterminé, ils ne sont donc pas pris en compte dans la figure 27.

La répartition des mating type à la figure 23A nous montre qu'ils ont des fréquences similaires à 3% près. Le pourcentage non défini appartient aux trois échantillons dont le mating type n'a pas été caractérisé. Concernant les génotypes, la figure 23B nous montre que la majorité des souches appartiennent à la catégorie « misc ». Cette catégorie est celle des « miscellaneous » en anglais. Elle correspond à un ensemble de souches toutes différentes les unes des autres qui pourraient être issues d'une reproduction sexuée. Presque tous les génotypes « misc » appartiennent au mating type A1. Le deuxième pourcentage le plus

important concerne le génotype 36_A2 (43,3%). Les souches 13_A2 et 37_A2 sont quant à elles minoritaires avec seulement 3,3% d'occurrence, cela correspond à 1 souche parmi les 30.

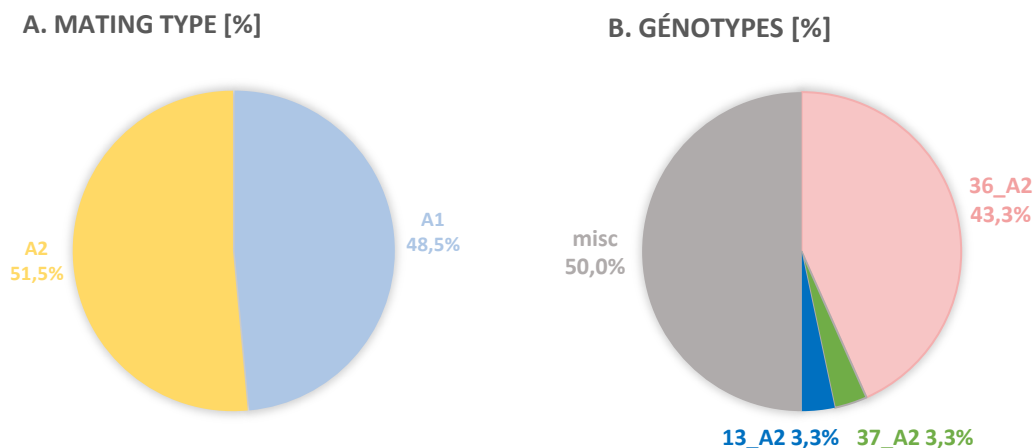


Figure 23 – Résultats caractérisation échantillonnage Libramont essai MILVAR – saison 2019. A. Fréquences des mating type ; B. Fréquences des génotypes.

1.3.2. Résultats des isolements réalisés en Wallonie (Libramont compris)

Les résultats ci-dessus peuvent être comparés avec la caractérisation des souches récoltées à travers toute la Wallonie, qui entre dans le cadre du projet Potato Smart. Parmi les 90 souches récoltées, 73 ont été caractérisées complètement (mating type et génotype). Le tableau complet de ces résultats se situe en annexe 4.2. La figure 24A nous montre que le mating type A2 est majoritaire, environ trois quarts des échantillons caractérisés appartiennent à cette catégorie. On rencontre donc plus fréquemment des souches A2 lorsqu'on se place à l'échelle de la Wallonie. Si l'on compare la fréquence des génotypes entre Libramont et la Wallonie (figure 24B), on remarque que la catégorie misc passe en seconde position, et la souche 36_A2 majoritaire représente la moitié des échantillons. Les souches 13_A2 et 37_A2 partagent à nouveau des fréquences relativement similaires (9,6% et 16,4% respectivement). Parmi les 90 échantillons caractérisés, une souche 1_A1 a été découverte. Cette souche n'était pas présente au sein des échantillons réalisés à Libramont.

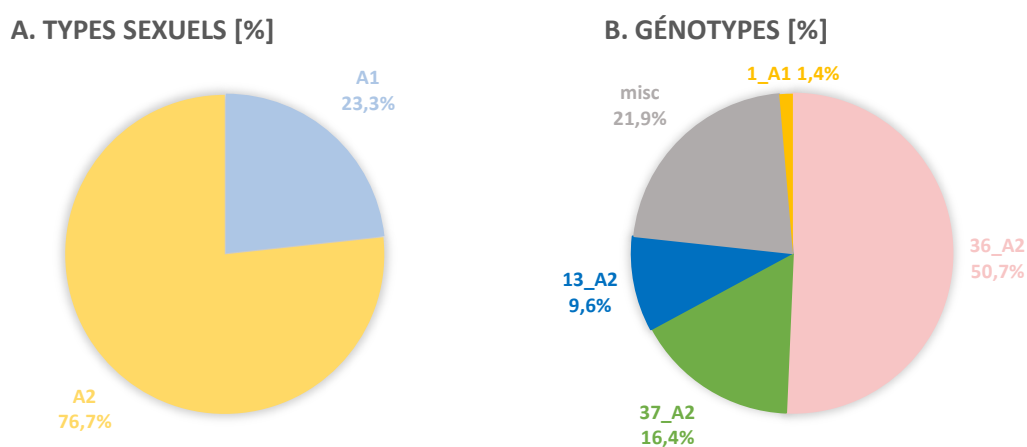


Figure 24 – Résultats caractérisation échantillonnage wallon – saison 2019. A. Fréquences des mating type ; B. Fréquences des génotypes.

Les échantillons ont été prélevés dans plusieurs provinces, sur un large panel de variétés de pommes de terre et sur une période s'étalant du 31 mai au 15 octobre 2019. La figure 29 reprend les fréquences génotypiques classées selon ces trois critères.

Sur la figure 25A, on remarque que la souche 36_A2 est présente dans chacune des provinces. Elle est majoritaire au Brabant-Wallon et en Hainaut. La catégorie « misc » ne se retrouve qu'en province de Luxembourg, où elle est majoritaire avec 48,4% des fréquences, contre 45,2% pour la 36_A2. À Namur, la fréquence est de 40% pour les souches 36 et 37_A2. C'est dans le Brabant-Wallon à Louvain-la-Neuve que la souche 1_A1 a été collectée. La souche 13_A2 quant à elle n'est présente qu'en provinces de Liège, Luxembourg et Namur. Concernant le nombre d'échantillons récoltés, leur nombre est variable selon la province considérée. C'est en province de Luxembourg que leur nombre est le plus élevé.

La figure 25B présente les variétés de pommes de terre sur lesquelles les échantillons ont été collectés. Elles présentent des degrés de résistance divers. C'est sur la variété sensible Bintje que le nombre d'échantillons collectés et caractérisés est le plus grand (7 caractérisations). La souche 13_A2 a été collectée seulement sur quatre variétés (Connect, Gasoré, Louisa et Pamela) alors que la souche 36_A2 se rencontre sur la plupart des variétés, excepté Connect, Louisa, Vitelotte, CMK2008 et CMK2010.

Selon la période considérée (figure 25C), les génotypes observés semblent varier. La souche 13_A2 a été récoltée uniquement entre le 21 août et le 16 septembre tandis que la souche 37_A2 semble être moins présente entre le 6 août et le 1^{er} octobre. La catégorie « misc » est répartie entre fin juillet et fin août. Concernant la souche 36_A2, la tendance montre une présence tout au long de la période de récolte des échantillons, avec une absence de 2 semaines (23 juillet au 6 août).

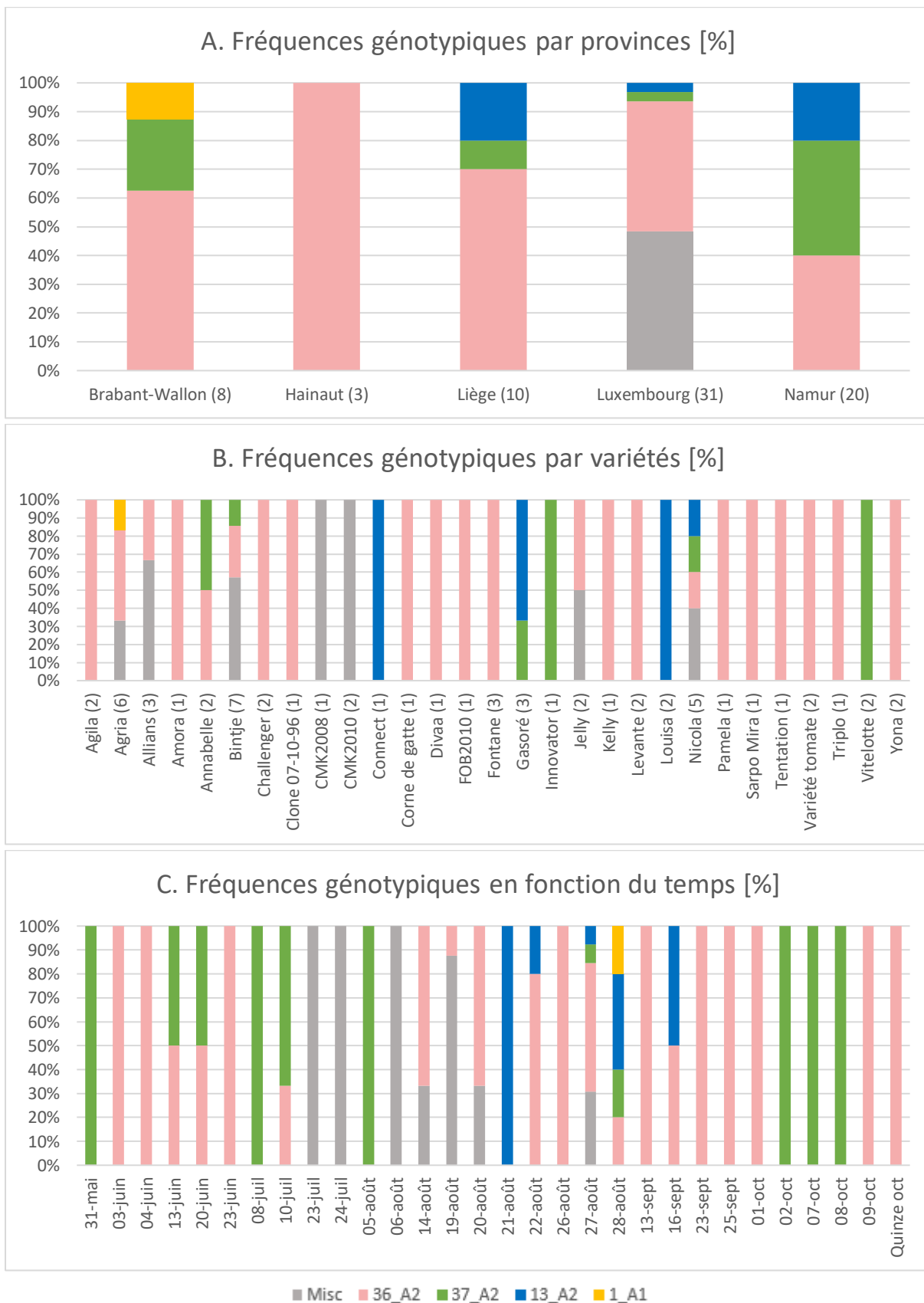


Figure 25 - Fréquences génotypiques des échantillons wallons - saison 2019, classées selon le lieu, la date de récolte et la variété de pomme de terre infectée.

Dans les figures A et B, le nombre d'échantillons collectés et caractérisés dans chacune des catégories est précisé entre parenthèses.

1.4. Discussion

Les fréquences génotypiques des populations de *P. infestans* peuvent être observées sur les cartes Euroblight de la figure 26. La situation de la Belgique en 2019 peut être comparée avec la situation des années précédentes. En 2017, les souches 13_A2, 36_A2 et 37_A2 s'observent à des fréquences similaires. Une quatrième souche qui s'observe de façon fréquente est la 1_A1. En 2018, les souches 36_A2 et 37_A2 se partagent la majorité et 13_A2 devient minoritaire, tandis que le type A1 ne s'observe plus. En 2019, les résultats obtenus (figure 28), ainsi que la carte Euroblight correspondante nous montrent que la souche 36_A2 est devenue majoritaire. La souche 37_A2 diminue en fréquence et se rapproche de celle de la 13_A2. On a donc une évolution de la situation. Selon Hansen (2020), cela pourrait s'expliquer par le taux d'utilisation du fluazinam. La souche 37_A2 montrant une sensibilité réduite au fongicide, son utilisation aurait diminué. Cela a mené à une diminution de la pression sélective en faveur de la souche 37_A2, et donc à une diminution de la fréquence de cette souche (Hansen 2020). L'année 2019 est également marquée par un retour de la souche 1_A1 sur le territoire belge. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la souche 36_A2 ne compense pas parfaitement la diminution de la 37_A2, ce qui a donné l'occasion à la 1_A1 de se développer.

Ces observations montrent que les populations du pathogène sont en constante évolution et que celle-ci peut être rapide, mais une tendance reste cependant constante. Le mating type A2 reste majoritaire, comme depuis 2017, ce qui montre que la fitness de ce mating type est supérieure à celle du mating type A1. La fitness (taux de reproduction, de survie, etc.) est la capacité d'un organisme à conserver une stabilité dans son développement même en cas de perturbations (Clarke 1995).

Le classement selon les critères spatiotemporels et la variété de pomme de terre permettent de dégager plusieurs tendances générales à l'échelle de la Belgique. La souche 36_A2 est présente sur tout le territoire wallon, sur la majorité des cultivars et sur toute la période d'échantillonnage, ce qui est en accord avec le fait qu'elle soit devenue majoritaire en 2019. La souche 13_A2 semble se démarquer des autres par une présence localisée (3/5 provinces) durant une période courte (3/20 semaines d'échantillonnages). Il serait utile d'étudier les conditions de température et d'humidité durant la période du 21 août au 16 septembre dans les localités où les échantillons ont été prélevés. Cela permettrait d'apporter des éléments de réponse concernant la présence du pathogène dans ces conditions spatiotemporelles.

Au niveau spatial, la catégorie « misc » n'a été collectée qu'en province de Luxembourg, où elle est majoritaire. Ces souches seraient issues de la germination d'oospores présentes dans le sol (Hansen 2020). Ces dernières années (jusqu'en 2017), les deux mating type A1 et A2 étaient présents sur le territoire, et notamment à Libramont (EuroBlight 2019b). Il est donc probable qu'une reproduction sexuée ait pu avoir lieu, aboutissant à la formation

d'oospores pouvant survivre plusieurs années dans le sol (voir section 2.4. de la revue bibliographique). Ces croisements seraient à l'origine des nouveaux phénotypes uniques repris dans la catégorie « misc » et pourraient donc être la cause de l'émergence de nouvelles souches. Les conséquences épidémiologiques liées aux oospores seront abordées dans la suite de la discussion.

Concernant la répartition des génotypes selon la variété de pomme de terre, le fait que ce soit sur la variété Bintje que les échantillons sont les plus nombreux est assez prévisible. En effet, cette variété est largement cultivée sur le territoire et étant fort sensible à la maladie, la probabilité d'infection est plus élevée. Les résultats montrent que la souche 13_A2 est présente sur uniquement quatre cultivars dont les notes de susceptibilités attribuées par le CRA-W sont 4,9 (Nicola), 7,7 (Gasoré), 8,2 (Louisa) et 8,6 (Connect) (César 2019a). Pour rappel, les notes attribuées oscillent entre 0 et 9, le dernier chiffre correspondant à une susceptibilité presque nulle. On observe que pour les deux cultivars les moins sensibles, seule la souche 13_A2 a été observée. Tandis que pour les variétés Gasoré et Nicola, plusieurs génotypes ont été détectés. La présence de la souche 13_A2 pourrait être liée au fait que la souche 36_A2 ne se développe pas sur les variétés fortement résistantes, ce qui permet à la première de se développer par absence de compétition. Tandis que sur des variétés plus sensibles, la souche 36_A2 aurait une meilleure fitness que la 13_A2.

Les hypothèses avancées ici ne peuvent pas être confirmées, étant donné que le nombre d'échantillons n'est pas constant selon les critères. Des analyses statistiques n'ont donc pas été réalisées et seules les observations principales sont présentées. Cependant, ces observations montrent l'utilité de l'étude de la répartition spatiotemporelle des génotypes en fonction des données environnementales, ainsi que du lien qui existerait entre la variété cultivée et la souche présente. Cela pourrait apporter des données intéressantes pour l'optimisation de la lutte contre le pathogène.

Il est intéressant de comparer la situation de la Belgique avec celle du reste de l'Europe. Hansen (2020) nous livre le rapport des résultats du monitoring Euroblight 2019. L'année a été marquée par une pression relativement faible du mildiou de la pomme de terre en Europe. Toutefois, environ 75% des résultats d'échantillonnage concernent des souches issues de la reproduction asexuée, qui appartiennent aux souches observées au cours des années précédentes. Les 25% restants appartiennent à la catégorie « other ». Pour rappel, cette catégorie correspond à l'ensemble des échantillons dont les génotypes sont diversifiés et qui correspondent à un inoculum composée d'oospores (Hansen 2020). Cette catégorie est appelée « misc » dans les résultats provenant du CRA-W.

Le cas des anciennes souches majoritaires (13_A2, 6_A1 et 1_A1) peut être abordé. La souche 13_A2 n'est plus la souche la plus fréquente en Europe (9,3% des échantillons en 2019), alors qu'elle l'était depuis 2013 (Hansen 2020). Sur la figure 26C, on remarque que cette souche reste majoritaire pour la Pologne, la France et l'Ukraine. En Belgique, la situation

de 2019 est en accord avec celle de l'EU pour la souche 13_A2 qui n'y est plus majoritaire depuis 2017 (EuroBlight 2019a). Concernant la souche 6_A1, elle ne s'observe plus sur le territoire belge depuis 2017 mais on remarque qu'elle reste très présente en Grande-Bretagne avec 20,4% des échantillons 2019 (EuroBlight 2019a; 2019b). La souche 1_A1 a subi une diminution générale au niveau européen en passant de 1,6% en 2018 à 0,4% des échantillons en 2019 (Hansen 2020). En effet, la figure 26C nous montre qu'elle ne s'observe qu'en France, et les résultats au niveau de la Belgique ne contiennent qu'une souche 1_A1 sur 90 échantillons. La tendance générale au niveau de l'EU est un remplacement de ces trois souches par de nouvelles (Hansen 2020).

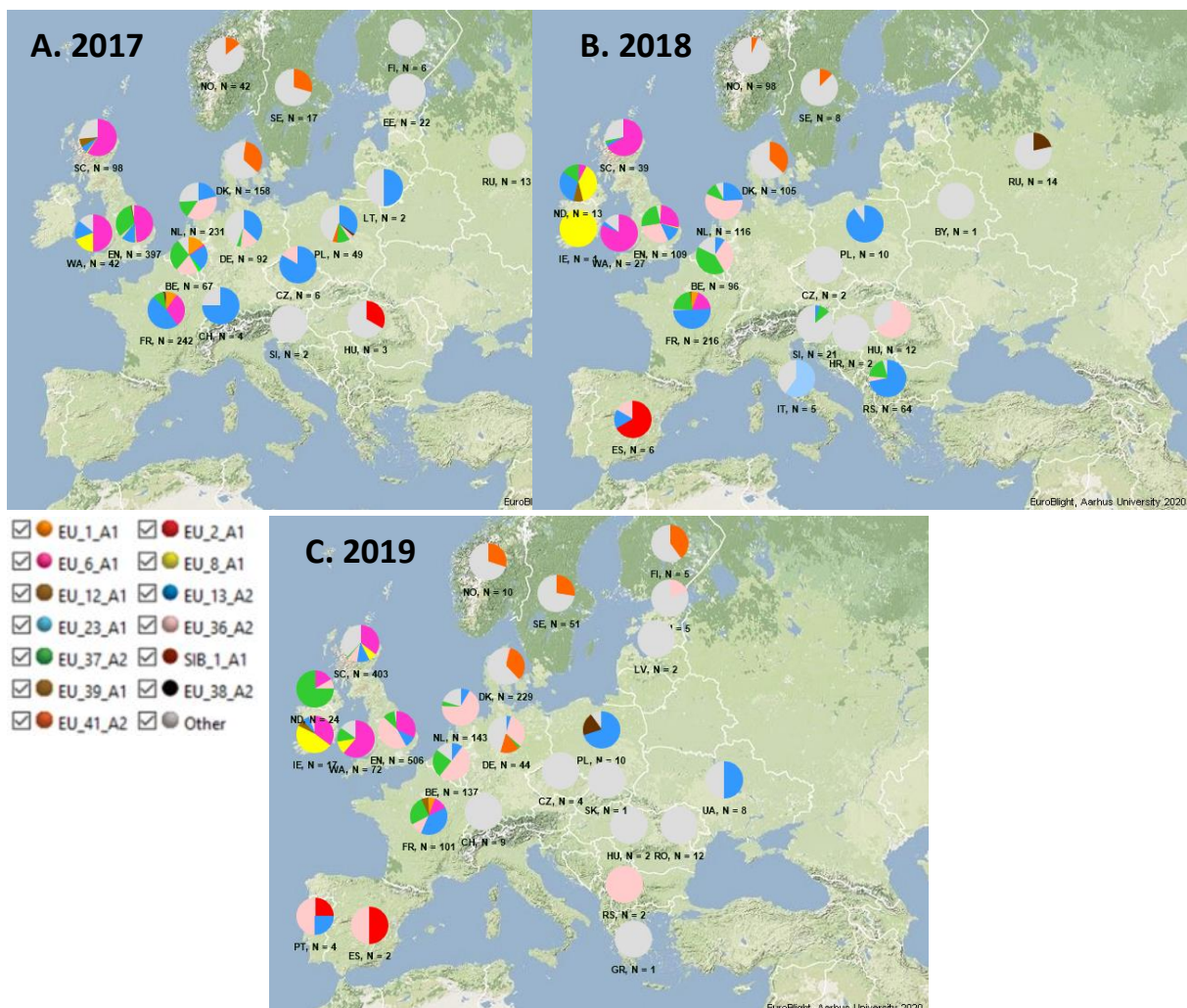


Figure 26 - Cartes des fréquences génotypiques des populations européennes de *P. infestans* (EuroBlight 2019a).

Les souches plus récentes (36_A2, 41_A2 et 37_A2) montrent une certaine évolution par rapport aux années précédentes (figure 26). La fréquence de la souche 41_A2 a augmenté au niveau européen avec 4,6% en 2018 contre 5,7% en 2019 (Hansen 2020). Elle reste cependant répandue uniquement dans les pays du nord de l'Europe (Danemark, Finlande, Norvège, Suède, Allemagne) et ne concerne donc pas encore la Belgique. La souche 36_A2 est celle qui présente la fréquence européenne la plus élevée (26%) pour l'année 2019 (Hansen 2020). On observe une situation similaire en Belgique où la même souche représente est

majoritaire avec 41,1% des échantillons. Comme à l'échelle du territoire belge, on constate une diminution de la fréquence de la souche 37_A2 en EU. Hansen (2020) énonce que c'est la première détection d'une diminution pour cette souche depuis 2013. Selon Kato et al. (1997), le fait que des souches soient majoritaires, et que d'autres soient en régression, signifie par définition que les « nouvelles » ont une meilleure fitness.

Plusieurs tendances européennes semblent donc se manifester également en Belgique (36_A2 majoritaire, 13_A2 minoritaire, recul de la 37_A2). Cependant, la situation à l'échelle de l'Europe n'est pas homogène. La figure 26C montre que le continent est divisé en plusieurs zones. La zone nord-est où la souche 41_A2 est majoritaire, une zone sud-est où ce sont les génotypes « other » (catégorie équivalente à « misc ») qui se rencontrent le plus fréquemment. On distingue également la zone formée par l'Irlande et la Grande-Bretagne qui a subi les épidémies de 6_A1. Enfin, une zone centrale où l'on distingue une large majorité de fréquence de la souche 36_A2. Le monitoring montre donc son importance car les populations sont en évolution continue et rapide. Cela permet d'adapter les modèles de prédiction et d'avertissement du mildiou de la pomme de terre.

Tout comme à l'échelle de la Belgique, la catégorie « other » représente une part non négligeable des fréquences génotypiques (environ 25%) au niveau européen, et en particulier dans les pays de l'est (figure 26C). Les menaces et conséquences épidémiologiques liées à cet inoculum composé d'oospores ne sont pas claires (Hansen 2020; A. Lehtinen, Hannukkala, et Rantanen 2002). Il en est de même pour les avantages évolutifs de la recombinaison sexuelle à l'origine de nouveaux phénotypes (Hansen 2020). Selon Turkensteen et al. (2000), la germination des oospores du sol est un processus relativement imprévisible et constitue l'inoculum initial dans la majorité des cultures de pomme de terre aux Pays-Bas. Lehtinen et al. (2002) énonce que les études liées au potentiel infectieux des oospores, ainsi qu'aux facteurs climatiques influençant la survie de ce type d'inoculum sont nécessaires afin d'optimiser les modèles de prévision du mildiou.

2. Manipulations préliminaires au développement protocolaire

2.1. Contexte

Afin de développer un protocole complet visant à étudier l'interaction entre *P. infestans* et *S. tuberosum*, plusieurs essais préliminaires sont mis en place. Ces manipulations ont pour but de préciser plusieurs aspects techniques.

La première manipulation est une étude *in planta* de la variation des symptômes provoqués par *P. infestans* selon la méthode d'inoculation et la concentration en inoculum. Elle vise à comparer trois méthodes d'inoculation de plants entiers de pomme de terre. Ces méthodes concernent une inoculation par dépôt d'une goutte de suspension de zoospores mélangée à de la gélatine ou via une goutte sur laquelle est déposé un disque de cellophane, et une inoculation par pulvérisation. Plusieurs concentrations en inoculum sont également testées. Au laboratoire, l'inoculation de plants entiers est habituellement réalisée au moyen d'une pulvérisation. Le désavantage de cette technique est qu'il est impossible de quantifier exactement le nombre de sporanges inoculés sur la feuille, car la pulvérisation ne permet pas à tout le liquide d'arriver sur la surface foliaire. L'objectif de cet essai est de mettre au point une technique d'inoculation qui rend possible la quantification du nombre de sporanges inoculés sur le plant de pomme de terre.

Ensuite, le second essai concerne l'étude de l'évolution de la quantité de sporanges produits sur milieu seigle selon la concentration en sucrose. Le taux et la vitesse de sporulation sont comparés sur deux milieux seigle présentant une différence de concentration en sucrose. L'objectif est de vérifier s'il est possible d'obtenir une sporulation suffisante (> 50 000 sporanges/mL) plus rapidement que 21 jours. Au sein du laboratoire, le milieu seigle utilisé contient 0,1% de sucrose. Cette concentration va être comparée avec un milieu seigle contenant 2% de sucrose.

Le dernier essai étudie sur feuilles détachées le potentiel infectieux de *P. infestans* selon le type d'inoculum et le milieu de croissance. Il permet de comparer le développement des symptômes après une inoculation par des sporanges ou des zoospores, et de vérifier si la concentration en sucrose du milieu de croissance a une influence sur le développement de ces symptômes. L'objectif est de déterminer s'il est nécessaire d'incuber la suspension de sporanges 2 heures à 4°C pour libérer les zoospores avant de procéder à une inoculation de matériel frais (feuille détachée, plant entier).

2.2. Méthodologies

Matériel frais

Pour la réalisation des essais, des plants de pomme de terre appartenant à une variété sensible sont utilisés. Plusieurs plants de Bintje (15) et Fontane (10) provenant du CRA-W ont

été mis en croissance en serre (20°C, HR ± 70%) dans des pots de 14cm Ø. Ils sont arrosés tous les deux jours.

La souche du pathogène utilisée dans chacune des études est la 13_A2. Elle provient du CRA-W où elle a été isolée à partir de matériel frais. Elle est cultivée en boîte de Petri sur milieu seigle agar qui permet de favoriser la sporulation du pathogène (protocole de préparation en annexe 5.1.). La souche 13_A2 a été sélectionnée car elle présente une bonne croissance sur ce type de milieu. Elle est régulièrement repiquée (revivifiée) selon le protocole détaillé en annexe 5.2. Les boîtes de culture sont incubées retournées à 18°C à l'obscurité.

2.2.1 Étude *in planta* de la variation des symptômes provoqués par *P. infestans* selon la méthode d'inoculation et la concentration en inoculum

Restauration de pathogénicité et préparation des suspensions de sporanges

La pathogénicité de la souche doit tout d'abord être restaurée en la cultivant sur matériel végétal. À cet effet, cinq boîtes de culture sont prélevées lorsqu'elles sont âgées d'environ 21 jours. En conditions stériles, les sporanges sont récoltés avec 7mL d'une solution stérile d'eau et Tween 20 (0,1%). Le Tween est un surfactant qui permet de séparer les sporanges dans la suspension afin de faciliter leur comptage. Le contenu d'une boîte est raclé à l'aide d'un râteau et le liquide est transvasé dans une seconde boîte de Petri à l'aide d'une pipette. Le même protocole est suivi pour l'ensemble des boîtes. Les sporanges contenus dans la suspension sont comptés sur une cellule de Fuchs-Rosenthal au microscope à contraste de phase. Seize carrés de la cellule sont comptés deux fois de manière successive. Si la différence entre les deux comptages est inférieure à 10%, leur moyenne est une bonne estimation du nombre de sporanges présents sur la cellule. Le facteur multiplicatif correspondant à 16 carrés est 312,5. Le nombre de sporanges comptés est donc multiplié par ce facteur afin d'obtenir une concentration en sporanges par mL. L'abaque détaillé de l'utilisation de la cellule de Fuchs Rosenthal se situe en annexe 6. La concentration de la suspension est ensuite ajustée à 50 000 sporanges/mL. Deux comptages successifs sont à nouveau réalisés pour vérifier cette concentration. La suspension est ensuite incubée 2 heures à 4°C pour libérer les zoospores contenues dans les sporanges.

Vingt feuilles de Bintje sont désinfectées dans de l'eau de Javel 1% durant 30 secondes. Elles sont ensuite rincées trois fois à l'eau déminéralisée et séchées sur du papier absorbant. La suite de la manipulation est réalisée sous flux, à l'aide de matériel stérile. Le pédoncule des feuilles est inséré dans une boule d'ouate et l'ensemble est placé dans une boîte de Petri contenant un papier filtre, face abaxiale de la feuille vers le haut. L'ouate est imbibée par 7mL d'eau stérile à l'aide d'une pipette, le surplus imbibe le papier filtre. L'eau permet d'avoir une humidité relative élevée dans la boîte de Petri. Les feuilles sont ensuite inoculées avec 5 gouttes de 50µl de la suspension de zoospores. Les boîtes sont scellées à l'aide de parafilm et stockées à 17°C à la lumière pendant 10 jours.

Après cette période, un contrôle visuel de la croissance du pathogène et de la production de sporanges est effectué. Si elle est suffisante (figure 27), une suspension de sporanges restaurés en pathogénicité est préparée en conditions stériles. Dans quatre Falcon de 45mL, les feuilles sont placées par cinq dans 25mL d'une solution stérile d'eau et Tween 20 (0,1%). Le mélange est vortexé et les feuilles retirées afin de récupérer uniquement la suspension de sporanges. Le protocole de la restauration de pathogénicité se situe en annexe 7.



Figure 27 – Mycélium de *P. infestans* sur feuille de pomme de terre (Bastin 2020).

La concentration en sporanges est déterminée selon la méthode précédemment explicitée et trois suspensions de concentrations différentes sont préparées (2000, 10 000 et 50 000 sporanges/mL). Ces concentrations ont été sélectionnées en se basant sur celles utilisées par l'équipe du projet Potato Smart (Legrève 2020). Les trois suspensions sont réparties selon le tableau 3. Pour la solution avec gélatine, 5% (v/v) de gélatine en poudre sont ajoutés à la suspension de sporanges. Toutes les suspensions sont ensuite incubées 2 heures à 4°C pour libérer les zoospores.

Tableau 3 - Préparation des suspensions de sporanges.

Volume	Contenant	Composants	Concentrations (sporanges/mL)
±600µl	Falcon 15mL	Eau et Tween 20, sporanges	2000
			10 000
			50 000
±600µl	Falcon 15mL	Eau et Tween 20, sporanges + 5% gélatine en poudre	2000
			10 000
			50 000
±3mL	Pulvérisateur (1mL par poussée)	Eau et Tween 20, sporanges	2000
			10 000
			50 000

Inoculation des plants de pomme de terre

Le dispositif expérimental est détaillé à au tableau 4. Au total, douze plants de Bintje sont inoculés selon trois méthodes d'inoculation décrites ci-dessous.

Tableau 4 – Traitements des plants de Bintje.

Légende : Chaque pastille représente un plant de pomme de terre sur lequel trois feuilles sont inoculées.

	Goutte + cellophane	Goutte + gélatine 5%	Pulvérisation
2 000 sporanges/mL	●	●	●
10 000 sporanges/mL	●	●	●
50 000 sporanges/mL	●	●	●
Témoins	●	●	●

a) Inoculation par une goutte et cellophane

Après avoir vortexé la suspension de zoospores, une goutte de 50µl est déposée à l'aide d'une pipette sur chacune des trois feuilles sélectionnées sur les plants (une dans le haut, au milieu et une à la base du plant). Un disque de cellophane (5mm Ø) est ensuite déposé sur les gouttes pour les stabiliser sur la feuille (figure 28).

b) Inoculation par une goutte et gélatine

Les suspensions de zoospores contenant 5% de gélatine sont également vortexées. La gélatine augmente la densité du mélange et donc l'adhésion de la suspension à la feuille. À nouveau, une goutte de 50µl de suspension est déposée sur chacune des trois feuilles sélectionnées sur les plants.



Figure 28 - Goutte de suspension de zoospores avec cellophane (Bastin 2020).

c) Inoculation par pulvérisation

Les trois feuilles par plant sont inoculées par la pulvérisation de 1mL de suspension sur leur face supérieure. La suspension est homogénéisée avant chaque pulvérisation.

d) Inoculation des plants témoins

Les trois plants témoins sont traités par une solution d'eau et Tween 20 (0,1%) ne contenant pas d'inoculum, chacun selon une des trois méthodes (5% de gélatine sont ajoutés à la solution d'eau et Tween 20 pour l'inoculation correspondante).

Pour les inoculations aux points a) et b), une quantification du nombre de sporanges est possible à partir de la concentration de la suspension de sporanges ($nombre\ de\ sporanges = \frac{X}{1000\ \mu l} \times 50\ \mu l$, où X = 2000, 10 000 ou 50 000). Par exemple, une goutte de suspension à 10 000 sporanges/mL contient 500 sporanges.

Conditions d'incubation et de croissance des plants après inoculation

Les plants sont incubés 12 heures dans une chambre humide qui peut être montée sur la table de la serre (figure 29). Des tuteurs sont plantés dans des pots remplis de sable et une bâche est déposée sur la structure. Cette construction est désinfectée avec de l'eau de Javel 1%. Elle permet de garder une humidité relative proche de 100% à l'aide de deux humidificateurs placés sous la bâche scellée à l'aide de ruban adhésif. Après incubation dans cette chambre humide, les plants restent en serre G2Q³ et sont arrosés un jour sur deux (22°C, HR ± 80%).

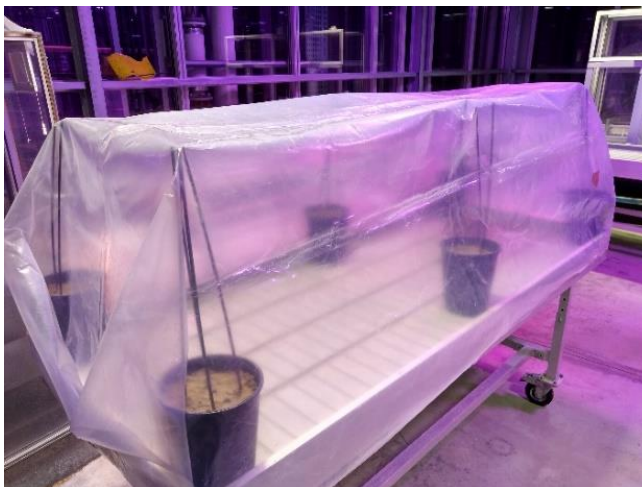


Figure 29 - Construction de la chambre humide (Bastin 2020).

Suivi du développement des symptômes

L'évolution des symptômes a été évaluée par la prise de photographies à un intervalle de 3 jours. Aucune cotation rigoureuse réelle n'a été appliquée.

Le protocole détaillé de cette manipulation se situe en annexe 8.

³ Serre de quarantaine biohazard destinée à l'étude d'organismes phytopathogènes.

2.2.2. Étude de l'évolution de la quantité de sporanges de *P. infestans* produits sur milieu seigle selon la concentration en sucrose

Préparation des milieux seigles et repiquage de la souche 13_A2

Tout d'abord, deux types de milieux seigle agar sont préparés. Le premier est préparé selon le protocole disponible à l'annexe 5.1 (0,1% de sucrose). Le protocole pour le second milieu est adapté afin d'augmenter la concentration en sucrose à 2%.

La souche 13_A2 contenue dans deux boîtes-mères est ensuite repiquée selon le protocole en annexe 5.2. en conditions stériles dans 50 boîtes de Petri stériles (25 avec milieu seigle 0,1% sucrose et 25 seigle 2% sucrose). Ces boîtes sont incubées retournées à 18°C à l'obscurité. Le nombre de boîtes comprend 5 répétitions techniques, ainsi qu'un supplément de 5 unités par type de milieu seigle. Ces cultures de réserve permettent de remplacer une boîte au cas où une contamination viendrait à se développer.

Comptage du nombre de sporanges

Chaque semaine et à raison de quatre fois, soit 7, 14, 21 et 28 jours après inoculation, la production de sporanges dans 5 boîtes est évaluée pour chacun des types de milieu seigle. Les sporanges sont récoltés selon la méthode précédemment décrite et les suspensions sont placées dans 2 Falcon de 15mL. Les sporanges sont comptés pour chacune des suspensions (annexe 6). Le protocole détaillé de cette étude se situe en annexe 9.

Analyse des données

Les données sont analysées avec le tableur Excel (écarts-types, test de Student).

2.2.3. Étude sur feuilles détachées du potentiel infectieux de *P. infestans* selon le type d'inoculum et le milieu de croissance

Restauration de pathogénicité et préparation des suspensions de sporanges

Tout d'abord, une restauration de pathogénicité est réalisée sur dix feuilles de la variété Fontane selon le protocole développé précédemment. Cinq feuilles sont inoculées par une suspension préparée à partir de sporanges produits sur seigle 0,1% sucrose. Les cinq autres feuilles sont inoculées à partir de sporanges produits sur seigle 2% sucrose.

Lorsque 10 jours ont passé, les suspensions de sporanges (50 000 sporanges/mL) sont préparées à partir de l'inoculum produit lors de la restauration de pathogénicité. La moitié de chacune des suspensions est incubé 2 heures à 4°C. Au terme de ces manipulations, quatre types de suspensions sont obtenus (tableau 5).

Tableau 5 - Préparation des suspensions d'inoculum.

Concentration en sucrose du milieu de culture « mère »	Type d'inoculum	N° de traitement
0,1%	Sporanges	1
	Zoospores	2
2%	Sporanges	3
	Zoospores	4

Inoculation sur feuilles détachées

Quinze feuilles de Fontane sont collectées et traitées selon la procédure décrite auparavant et réparties dans 15 boîtes de Petri (voir restauration de pathogénicité) (désinfection, ouate imbibée autour du pédoncule et papier absorbant dans une boîte de Petri). Sous flux, l'inoculation des quatre traitements est réalisée sur douze feuilles de pomme de terre (3 répétitions techniques par traitement). Une goutte de 50µL de suspension d'inoculum est déposée sur un des folioles composant les feuilles. Les 3 feuilles restantes servent de témoins et sont traitées par une goutte (50µL) d'une solution stérile d'eau et Tween 20 (0.1%) ne contenant pas d'inoculum. Les boîtes sont scellées et incubées à 22°C (même température qu'en G2Q) en présence de lumière, face foliaire inoculée vers le haut.

Suivi de l'évolution des symptômes

Chaque jour, les boîtes sont photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique à une heure plus ou moins constante.

Analyse des données

Les images sont analysées au moyen d'une macro-instruction implantée dans le programme ImageJ (annexe 10.2.). Le code permet d'obtenir la surface totale de la feuille et la surface saine grâce à la détection des pixels de couleur verte dans l'image. Tous les autres pixels contenus dans la feuille ne répondant pas à la condition « verte » ne sont pas comptabilisés au sein de la surface saine. Un simple calcul permet d'obtenir le pourcentage de surface infectée :

$$\% \text{ mildiou} = 100 - \left(\frac{\text{surface saine}}{\text{surface totale}} \times 100 \right)$$

Le protocole complet de la manipulation se situe en annexe 10.1.

2.3. Résultats

2.3.1. Étude *in planta* de la variation des symptômes provoqués par *P. infestans* selon la méthode d'inoculation et la concentration en inoculum

Les trois types d'inoculation ont permis au mildiou de s'installer sur les plantes car des symptômes ont été observés sur les plantes entre 2 et 3 jours après inoculation. Aux concentrations de 10 000 et 50 000 sporanges/mL, toutes les méthodes d'inoculation ont provoqué des symptômes. Cependant, seule une inoculation par dépôt d'une goutte contenant de la gélatine a mené au développement de symptômes à une concentration de 2000 sporanges/mL. Le tableau 6 synthétise ces résultats.

Tableau 6 - Développement du mildiou selon la méthode d'inoculation et la concentration en inoculum.

+ : présence de symptômes

- : pas de symptôme

	Goutte + cellophane	Goutte + gélatine 5%	Pulvérisation
2 000 sporanges/mL	-	+	-
10 000 sporanges/mL	+	+	+
50 000 sporanges/mL	+	+	+
Témoins	-	-	-

Une goutte de suspension de zoospores contenant de la gélatine provoque une brûlure sur la surface foliaire (figure 30). Ces blessures apparaissent lorsque la chambre humide est démontée et que les plants sont exposés aux sources lumineuses de la serre. Elles sont également présentes sur les plants traités avec une solution d'eau et Tween seule. Une minorité ($\pm 1/4$) des feuilles inoculées selon cette technique ne montrent pas de brûlure, celles plutôt situées vers la base des plants.



Figure 30 - Foliolle inoculée par une goutte de suspension de zoospore contenant 5% de gélatine (Bastin 2020).







Ce sont donc les inoculations par pulvérisation et par le dépôt d'une goutte de suspension avec disque de cellophane qui semblent fonctionner le mieux. À partir de la goutte, l'inoculum peut être quantifié.

Le tableau 7 illustre le développement des symptômes au jour 10 après inoculation par les suspensions de 10 000 et 50 000 sporanges/mL. En raison d'absence d'image, la concentration de 2000 sporanges/mL n'est pas représentée. Les nécroses semblent s'étendre plus rapidement lorsque l'inoculum est à une concentration de 50 000 sporanges/mL. En effet, pour chaque technique d'inoculation, la sévérité de l'infection est plus importante lorsque la concentration en inoculum est de 50 000 sporanges/mL. L'évolution des symptômes semble plus rapide lors d'une inoculation par pulvérisation (au jour 10, presque la totalité de la feuille est nécrosée).

Le protocole présente plusieurs lacunes au niveau de l'évaluation des symptômes. D'abord, la prise d'image n'a pas été réalisée de façon rigoureuse (luminosité, angle de

photographie), ce qui rend une évaluation du développement des nécroses difficile. De plus, l'intervalle de 3 jours entre chaque prise d'image ne permet pas un suivi précis de l'évolution de la maladie. Ensuite, l'inutilisation d'une échelle de cotation n'a pas permis d'obtenir des résultats quantifiables. Seules des tendances générales et observations ont pu être dégagées.

Tableau 7 – Symptômes observés au jour 10 après inoculation pour deux concentrations en inoculum.

	Goutte et gélatine	Goutte et cellophane	Pulvérisation
10 000 sporanges/mL			
50 000 sporanges/mL			

2.3.2 Étude de l'évolution de la quantité de sporanges de *P. infestans* produits sur milieu seigle selon la concentration en sucrose

Le nombre moyen de sporanges produits aux quatre temps d'incubation dans 5 boîtes des milieux seigle contenant des concentrations distinctes en sucrose (0,1% et 2%) sont présentés dans le tableau 8 et illustrés à la figure 31. Ces résultats permettent de comparer le taux de sporulation de la souche 13_A2 sur milieu seigle à 0,1% en sucrose et à 2% en sucrose.

Sur les deux types de milieu, le nombre moyen de sporanges augmente fortement durant la deuxième semaine de croissance (jour 7 à 14). En effet, pour le milieu à 0,1% de sucrose, le facteur multiplicatif est presque de 9. Pour l'autre milieu (2% sucrose), il est d'environ 7. L'augmentation est plus faible pour les semaines suivantes, surtout pour le milieu à 2% en sucrose où le nombre moyen de sporanges ne varie presque pas.

La réalisation d'un test de Student permet de montrer une différence significative pour les jours 7 (p-value = 0,00060554 < 0,001) et 14 (p-value = 0,041815051 < 0,05) (figure 31). Durant les deux premières semaines, la sporulation est significativement plus importante pour le

mycélium produit sur milieu seigle avec 2% de sucrose. Cette tendance semble s'inverser pour les deux autres semaines de croissance, où les écart-types sont plus larges.

Tableau 8 - Moyennes du nombre de sporanges selon le type de milieu de croissance et calcul des écarts-types par rapport à ces moyennes.

Nombre de sporanges	Jours			
	7	14	21	28
Sucrose 0,1%	3562,5	32000	45406,25	57093,75
Écarts-types	784,37	3819,98	8725,27	15657,23
Sucrose 2%	6437,5	43125	38312,5	46156,25
Écarts-types	879,73	9540,85	15002,20	13323,74

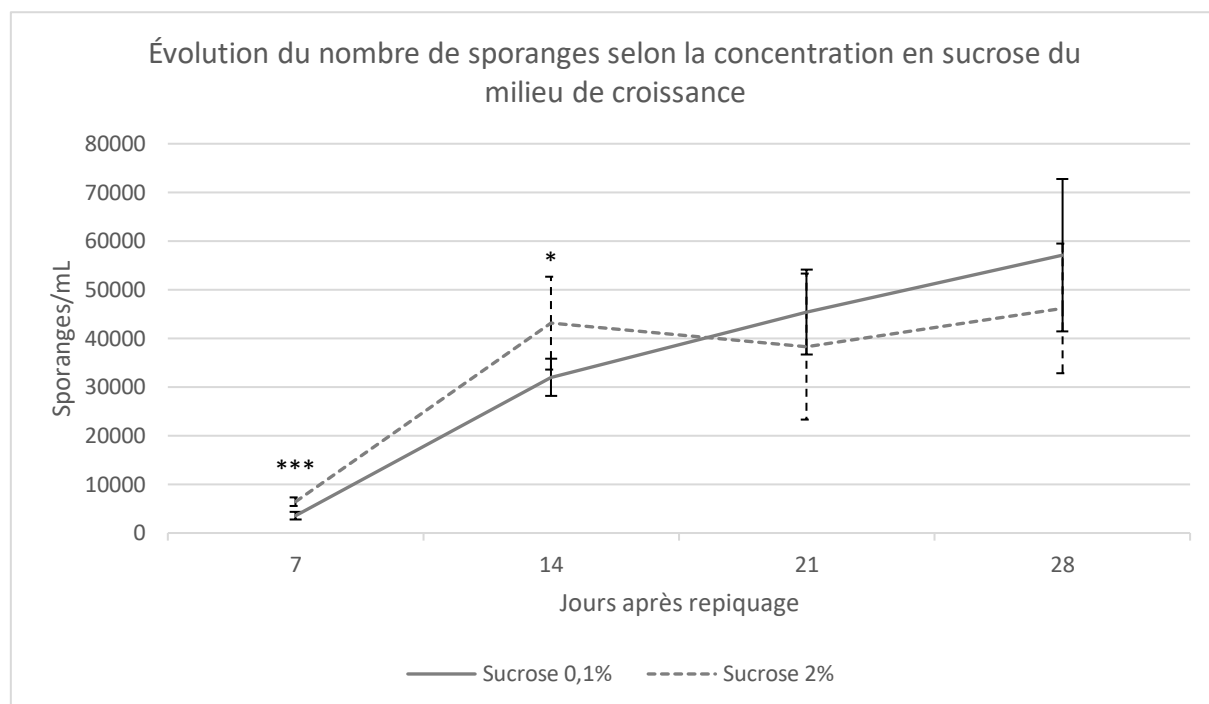


Figure 31 - Évolution de la sporulation moyenne de la souche 13_A2 de *P. infestans* en fonction du taux de sucrose contenu dans le milieu seigle.

La manipulation a été mise en place 1 fois, 5 répétitions techniques par manipulation.

t-test : p-value < 0,001 : *** ; < 0,01 : ** ; < 0,05 : *.

2.3.3. Étude sur feuilles détachées du potentiel infectieux de *P. infestans* selon le type d'inoculum et le milieu de croissance

Les quatre types d'inoculum ont provoqué le développement de symptômes sur chacune des feuilles détachées. Les données récoltées grâce au code utilisé dans ImageJ sont représentées dans les quatre graphiques de la figure 32 (données complètes en annexe 10.3.). La moyenne du pourcentage de mildiou sur la surface foliaire a été calculée pour les trois répétitions techniques à chaque fois. L'écart-type par rapport à ces moyennes a également été calculé. Ces graphiques permettent de comparer plusieurs éléments : le potentiel infectieux des zoospores et des sporanges, ainsi que le potentiel infectieux des sporanges ou des zoospores selon la concentration en sucrose du milieu de croissance.

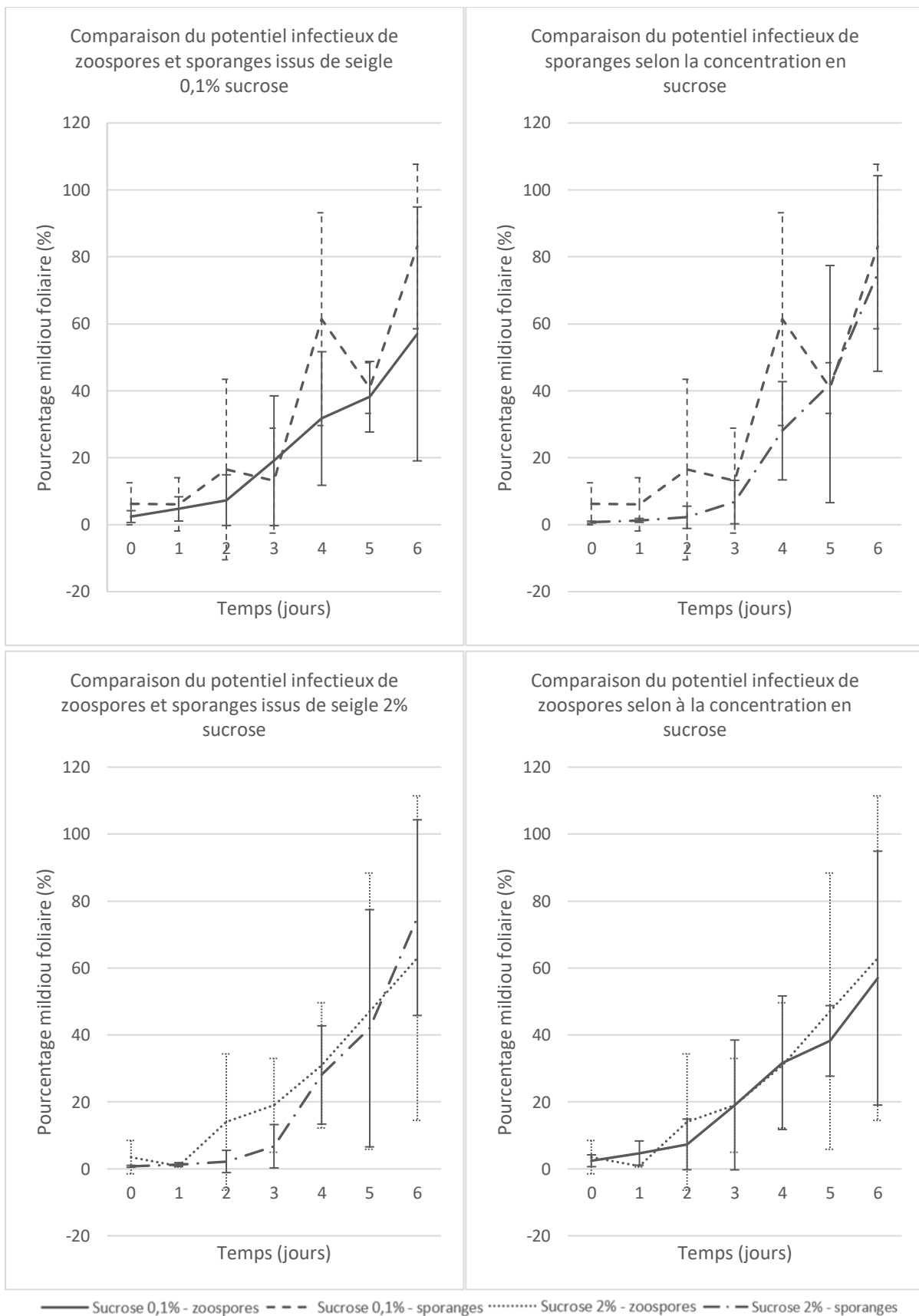


Figure 32 – Évolution du développement des symptômes de mildiou selon le type d'inoculum et le milieu de croissance. La manipulation a été mise en place 1 fois, 3 répétitions techniques par manipulation.

Dans le graphique supérieur gauche qui compare le potentiel infectieux du matériel issu de seigle à 0,1% en sucrose, on remarque que la courbe liée aux sporanges montre une allure particulière. Les valeurs « sucrose 0,1% - sporanges » en annexe 10.3. montrent des fluctuations lorsqu'on avance dans le temps (augmentations suivies de diminutions du pourcentage). Cela ne permet pas la comparaison avec la courbe liée aux zoospores. Dans le graphique supérieur droit, la même courbe est présente et la comparaison du potentiel infectieux de sporanges issus des deux types milieux seigles est également difficile.

Les graphiques inférieurs présentent quant à eux des courbes d'allures comparables. Cependant, le faible nombre de répétitions techniques et biologiques ne permet pas de réaliser de tests statistiques consistants. Certaines tendances peuvent toutefois être observées. Dans le graphique inférieur gauche qui compare le potentiel infectieux de sporanges et zoospores, il semble ne pas y avoir de différence significative entre les deux courbes. Les inoculations par ces deux types d'inoculum semblent donc ici équivalentes. La même observation peut être réalisée dans le graphique inférieur droit qui compare le potentiel infectieux de zoospores selon la concentration en sucrose du milieu de croissance. Malgré l'importance des variations entre les répétitions, en moyenne, les courbes des deux graphiques inférieurs se superposent. Il est possible de comparer l'allure générale des courbes qui concernent une inoculation par des sporanges ou par des zoospores. Dans le second cas, le développement des symptômes évoluerait de façon plus linéaire avec le temps.

Les pourcentages de mildiou foliaire (annexe 10.3.) montrent de grandes variations au sein des répétitions (par exemple, les trois répétitions au jour 5 pour les sporanges issus d'un milieu à 2% en sucrose ont des pourcentages de 45,175 ; 5,107 ; 75,722). Au jour 0, on remarque également que les pourcentages ne sont pas toujours nuls (pour la courbe « sucrose 0,1% - sporanges » par exemple). Ces observations pourraient suggérer une mauvaise interprétation des photographies par le programme d'analyse d'image.

2.4. Discussions

2.4.1. Étude *in planta* de la variation des symptômes provoqués par *P. infestans* selon la méthode d'inoculation et la concentration en inoculum

La réalisation de cet essai a permis de mettre en évidence une méthode d'inoculation à partir de laquelle l'inoculum peut être quantifié. En effet, le dépôt d'une goutte sur laquelle un morceau de cellophane est déposé rend cela possible. Le nombre de sporanges contenus dans cette goutte peut être déduit à partir de la concentration de la suspension. Cependant, l'incubation au froid a provoqué la libération des zoospores. Le nombre de propagules à quantifier au sein de la goutte concerne donc des zoospores et non des sporanges. Lors d'une inoculation avec ces derniers, leur nombre peut être estimé à l'aide d'une cellule de Fuchs Rosenthal. Mais lorsqu'on inocule des zoospores, leur nombre réel est variable et dépend du nombre de sporanges qui ont libéré leur contenu (Widmer 2009). Judelson et Tani (2007) avec Judelson et Roberts (2002) ont montré qu'après 2 heures à 10°C, le pourcentage de sporanges ayant libéré des zoospores allait de 58% à 74%. Le nombre de zoospores relâchées quant à lui varie entre 3 et 8 (Boddy 2016). Pour quantifier le nombre de propagules inoculées sur les feuilles par le dépôt d'une goutte, il serait nécessaire d'estimer le nombre de zoospores à partir du nombre de sporanges présents dans la solution. Pour apporter plus de précision, les zoospores pourraient également être comptées après incubation au froid à l'aide d'un hémocytomètre adapté à la taille de ces cellules (Yan et al. 2002). Cette méthode d'inoculation *in planta* offre la possibilité de réaliser une étude qui permettrait de découvrir la concentration minimale requise pour qu'il y ait développement d'une infection.

Aux concentrations de 10 000 et 50 000 sporanges/mL, des nécroses se sont développées pour chacune des méthodes d'inoculation. À la concentration de 2000 sporanges/mL cependant, seules les feuilles inoculées par une goutte contenant de la gélatine ont développé des symptômes de mildiou. Cela pourrait s'expliquer par l'apparition de brûlures foliaires après une inoculation selon cette méthode. Cette lésion pourrait être une porte d'entrée pour le pathogène. En effet, Gascuel et al. (2015) stipulent que les tubes germinatifs du pathogène *Plasmopara halstedii*, un oomycète, peuvent pénétrer les tissus hôtes au travers de blessures. La faible concentration en sporanges suffirait dans ce cas au développement de l'infection. Concernant la cause de l'apparition des brûlures, une hypothèse peut être avancée. Le fait qu'elles s'observent également sur le plant témoin montre que c'est bien la présence de gélatine qui les provoque, car une solution d'eau et Tween seule ne provoque aucun symptôme (brûlure ou mildiou). Leur apparition pourrait être liée à l'effet loupe provoqué par la goutte contenant la gélatine. En effet, les feuilles ne présentant pas de brûlure se situent vers la base de la plante, une zone où la lumière est moins forte et moins directe. Cette hypothèse pourrait être vérifiée grâce à l'inoculation d'une goutte avec gélatine en absence de source lumineuse. Inoculer le pathogène par dépôt d'une goutte avec gélatine serait donc à éviter. Les deux autres méthodes sont quant à elles efficaces. L'utilisation de l'une ou l'autre sera liée à l'objectif de l'expérience. Une

pulvérisation de l'inoculum est plus rapide et moins minutieuse que le dépôt d'une goutte et d'un disque de cellophane, mais la première technique ne permet pas de quantifier le nombre de propagules déposées.

Selon la tendance générale (tableau 7), la concentration en inoculum influencerait le développement du pathogène. La quantité des lésions serait en effet proportionnelle à la quantité d'inoculum (Harrison 1995). Une autre étude indique que lorsque la concentration de l'inoculum augmente, la réaction immunitaire est moins importante (Stewart 1990). Une inoculation par pulvérisation semble également influencer le développement des symptômes. Il faut ici prendre en compte que 1 mL de suspension de zoospores est pulvérisée sur la feuille. La totalité n'atterrit pas sur la feuille, mais la quantité reste supérieure aux 50 µL déposés par une inoculation à l'aide d'une goutte. Le nombre de sporanges inoculés serait donc supérieur dans le cas d'une inoculation par pulvérisation, ce qui aboutit à des symptômes plus sévères. Il serait judicieux d'apporter une modification au protocole qui comparerait les inoculations par une goutte avec la pulvérisation de 50µl de suspension de zoospores sur la surface foliaire.

Concernant le choix des feuilles inoculées sur chacun des plants, une sélection « dans le haut, au milieu et dans le bas » n'est pas suffisante. En effet, la réaction de la plante lors d'une infection par *P. infestans* n'est pas la même selon la position des feuilles infectées (Dorrance et Inglis 1997). La position des feuilles est un facteur déterminant au point de vue de leur résistance. Une feuille apicale sera plus résistante qu'une feuille basale (Visker et al. 2003). Cette caractéristique est observée à travers toutes les expériences menées par Visker et al. (2003) et serait donc un effet général. Dans ce type de manipulation, il est donc nécessaire de sélectionner des feuilles du même âge.

Les lacunes soulevées dans la présentation des résultats (méthode et fréquence de la prise d'images, inutilisation d'une échelle de cotation) pourraient aisément être corrigées. Dorrance et Inglis (1997) évaluent l'étendue des symptômes à l'aide d'une estimation du pourcentage foliaire atteint. Une méthode de cotation telle que celle-ci pourrait être adaptée à une évaluation par pourcentage de surface foliaire nécrosée dans le cadre de cette manipulation. La fréquence de ces cotations devrait être journalière afin d'assurer un suivi continu des symptômes.

2.4.2. Étude de l'évolution de la quantité de sporanges de *P. infestans* produits sur milieu seigle selon la concentration en sucrose

Les résultats montrent qu'il est possible d'obtenir une sporulation relativement élevée en moins de 21 jours sur le milieu seigle à 2% en sucrose. Après 2 semaines, le nombre moyen de sporanges sur ce milieu atteint presque 50 000 sporanges/mL (\pm 43 000 sporanges/mL) alors qu'il atteint 32 000 sporanges sur milieu seigle à 0,1% en sucrose. Cette différence étant significative, on a donc bien une sporulation plus importante sur milieu seigle à 2% en sucrose pour la deuxième semaine de croissance. Durant les semaines suivantes (jours 14 à 28), le nombre moyen de sporanges sur ce milieu n'augmente que faiblement. Les sporanges

produits peuvent donc être récoltés après 14 jours. Sur le milieu moins concentré en sucrose, le nombre moyen de sporanges semble augmenter de façon plus importante durant cette période (inversement de tendance). L'utilisation d'un milieu ou l'autre dépend donc de la situation. Si des sporanges doivent être produits rapidement, il est possible de mettre une souche en culture dans un nombre élevé de boîtes contenant un milieu seigle à 2% en sucrose. Les propagules seront en nombre suffisant après 2 semaines de croissance. Si on dispose d'un nombre limité de boîtes contenant un milieu seigle à 0,1% de sucrose, une croissance plus longue (21 jours minimum) permettra d'obtenir une sporulation suffisante. Il serait intéressant de réaliser plusieurs répétitions de la manipulation afin de vérifier ces tendances et résultats.

Le sucrose est une molécule composée d'un glucose et d'un fructose (Tran et Tappy 2012). Dans le cytoplasme des eucaryotes, le glucose est converti en pyruvate, responsable de la formation d'ATP, qui participe en grande partie au fonctionnement du métabolisme (Judelson 2017). Judelson, Tani et Narayan (2009) stipulent que les oomycètes, dont *P. infestans*, régulent leur métabolisme en réponse à la disponibilité en nutriment, dont font partie les sucres. Ces derniers ont donc une grande importance dans la croissance mycélienne, ainsi que pour la sporulation chez *P. infestans* (Kumbar 2017).

Cela expliquerait la présence d'un taux de sporulation plus élevé lorsque la concentration en sucrose augmente. En effet, Yang et Schoulties (1972) ont montré que la croissance mycélienne de l'oomycète *Aphanomyces euteiches* est favorisée en présence de glucose et de fructose. En effet, des concentrations croissantes en glucose augmentent la croissance mycélienne. Cet effet s'atténue cependant pour des concentrations supérieures à 1,8% de glucose. L'essai réalisé dans ce travail concerne la sporulation de *P. infestans*, il faut donc prendre en compte que l'expérience de Yang et Schoulties concerne la croissance mycélienne avant d'être en mesure de tirer des conclusions.

Kumbar (2017) et Padmaja et al. (2014) ont montré que le milieu le plus adapté à la culture de *P. infestans* et de *P. colocasiae* était le milieu carotte agar. Ce milieu favorise la croissance mycélienne et la sporulation des pathogènes. Les composés contenus dans les vacuoles et cellules de parenchyme de la carotte sont en grande part des sucres solubles. Lorsque la racine est à maturité, la sucrose est le sucre soluble majoritaire (Suojala 2000). Le milieu carotte agar est donc enrichi par le sucrose issu de la carotte, en plus du sucrose ajouté comme composant. Cela permet de considérer qu'un milieu plus riche en sucrose favorise la croissance et la sporulation, ce qui est en accord avec les résultats obtenus ici.

2.4.3. Étude sur feuilles détachées du potentiel infectieux de *P. infestans* selon le type d'inoculum et le milieu de croissance

Selon Widmer (2009), peu d'études comparant les infections causées par des zoospores ou des sporanges du type *Phytophthora* spp. ont été menées. Il énonce également que ce type d'étude est important, car s'il existe des différences entre les deux types

d'inoculum, les expériences futures doivent en tenir compte afin de minimiser leur variabilité (Widmer 2009).

L'essai avait pour objectif de déterminer la nécessité d'incuber une suspension de sporanges 2 heures à 4°C avant de procéder à une inoculation sur feuilles détachées. Malgré l'absence de différence significative entre le potentiel infectieux de zoospores et de sporanges issus de *P. infestans*, l'allure générale des courbes montre que le développement des symptômes évoluerait de façon plus linéaire lorsque ce sont des zoospores qui sont inoculées. Ce type de courbe a l'avantage d'être plus facile à analyser et une inoculation par des zoospores, après incubation au froid de la suspension, pourrait donc être préférée. Cette technique est celle qui est habituellement utilisée au laboratoire.

Pour rappel, les zoospores et sporanges sont les propagules qui sont produites par *P. infestans* et qui assurent sa dissémination (voir section 2.5). En fonction de la température, les sporanges germent directement sur l'hôte (> 15°C), ou libèrent des zoospores (< 15°C) (Boddy 2016). Avant 2009, les études concernant des essais d'inoculation d'espèces de *Phytophthora* utilisaient parfois des zoospores, parfois des sporanges, mais l'effet du type de propagule utilisé n'était pas connu (Widmer 2009).

Les zoospores sont donc issues des sporanges. Comme précisé lors de la discussion du premier essai (section 2.4.1.), le nombre réel de zoospores présentes dans une suspension est variable (dépend du nombre de sporanges qui libèrent des zoospores et du nombre de zoospores libérées par sporange). L'essai compare les deux types de propagules au niveau de leur potentiel infectieux. Il serait donc ici nécessaire d'utiliser des concentrations égales en sporanges et zoospores afin d'obtenir des résultats précis et comparables. L'utilisation d'un hémocytomètre adapté au comptage des zoospores montre ici son importance. À cet effet, une cellule de Thoma permettrait de compter les propagules sous un microscope à contraste de phase (Oertel et Jelke 1986).

Selon Judelson et Roberts (2002), chez les espèces du genre *Phytophthora* qui ont la capacité de germer à partir de sporanges ou de zoospores, ce sont ces dernières qui participent principalement à la dispersion et à l'infection des hôtes. Chez *Phytophthora ramorum*, l'inoculation de plants de rhododendrons à l'aide des zoospores a donné lieu à un plus grand nombre de feuilles portant des lésions, lorsqu'on la compare avec une inoculation par des sporanges (Widmer 2009). Une étude de Savory et al. (2014) stipule que les zoospores de plusieurs espèces de *Phytophthora* spp. et *Pythium* ont une capacité d'auto-agrégation qui permettrait d'augmenter leur potentiel infectieux (plus de propagules en un seul endroit augmentent la probabilité de succès d'infection).

Concernant les sporanges, le potentiel infectieux que possèdent ceux qui n'ont pas libéré de zoospores et qui germent de façon directe n'est pas connu (Widmer 2009). Cependant, les résultats obtenus pour *Phytophthora ramorum* ont montré que les lésions issues de la germination directe de sporanges, sans libération de zoospores, ne sont pas aussi

étendues que les lésions issues d'un même nombre de zoospores (Widmer 2009). Une étude plus ancienne menée par Ko et Chan (1974) sur *Phytophthora palmivora* a montré que les sporanges possédaient un potentiel infectieux sur semences de papaye plus élevé que les zoospores. La formation des zoospores consomme de l'énergie (développement d'une membrane cellulaire, des flagelles). Toute cette énergie est donc contenue au sein d'un sporange. Si l'on considère une zoospore seule, l'énergie dont elle dispose est moins élevée que celle d'un sporange dans lequel s'accumulent plusieurs zoospores. L'infection par un sporange serait donc plus efficace car il peut allouer son « potentiel énergétique » élevé à l'infection de l'hôte.

Le potentiel infectieux des propagules est donc discutable en fonction de l'espèce de *Phytophthora* considérée. Ce type d'étude est donc pertinent et mérite un approfondissement afin d'éventuellement découvrir une différence significative entre le potentiel infectieux de sporanges et de zoospores. L'expérience pourrait donc être menée à nouveau pour confirmer la tendance mise en évidence, en augmentant le nombre de répétitions techniques.

La détection de surfaces nécrosées au jour 0 par le programme d'analyse d'image, ou la présence d'une grande variabilité entre les répétitions techniques peuvent s'expliquer par plusieurs éléments. Tout d'abord, les feuilles placées dans les boîtes de Petri avant d'être inoculées avaient, pour la majorité, une taille trop importante par rapport au contenant. Cela est à l'origine de la formation de zones d'ombre dans la boîte de Petri. Le contraste existant entre ces zones et les tissus infectés a pu se révéler insuffisant, et donc la surface nécrosée a été surévaluée. Cela explique la détection de surfaces infectées dès le jour 0. Ensuite, les photographies ont été réalisées à l'aide d'un dispositif permettant une position stable par rapport à l'objet photographié. Cependant, l'angle de la source lumineuse utilisée pour éclairer les boîtes de Petri n'était pas constant. Comme expliqué dans la section sur l'imagerie RVB, une luminosité variable peut donner lieu à une mauvaise interprétation par le programme d'analyse d'image. Cela provoque des variations entre les répétitions. Ces deux éléments sont à l'origine de la présence des fluctuations anormales de la courbe « sucrose 0,1% - sporanges ». La présence de zones d'ombre et d'un angle d'éclairage variable a donné lieu à l'obtention de deux types d'images. Certaines avec peu de zones d'ombre (on a un minimum car seuls les tissus infectés sont considérés par ImageJ), et d'autres avec plus de zones d'ombre (on a un maximum car ImageJ additionne les tissus infectés et les zones d'ombre). Une adaptation du protocole permettrait de corriger ces problèmes techniques. Par exemple, réduire la taille des feuilles afin qu'elles soient à plat dans les boîtes de Petri et utiliser un dispositif autorisant une position stable de la source lumineuse tout en évitant la présence de reflets sur la boîte de Petri photographiée.

III. Développement protocolaire

1. Mise au point d'un protocole visant à caractériser l'interaction plante-pathogène selon le type de cultivar et la souche de *P. infestans*

1.1. Contexte

Sur un plan épidémiologique, plusieurs paramètres importent sur la vitesse de propagation et l'intensité de la maladie. Ils concernent notamment le nombre de propagules infectieuses nécessaires au développement d'une infection, le taux de sporulation, ainsi que les temps d'incubation et de latence. Les deux derniers correspondent au délai entre l'infection initiale et l'apparition des symptômes ou de la sporulation, respectivement (Leclerc et al. 2014; Suffert et Thompson 2018). En fonction de la souche de *P. infestans* ou de la variété de pomme de terre considérée, ces paramètres peuvent varier. L'étude de l'interaction entre plusieurs souches du pathogène et variétés de son hôte présente donc un intérêt particulier.

Ce type d'étude permet également d'analyser le comportement de plusieurs cultivars de pomme de terre selon un spectre de plusieurs souches de *P. infestans*. Ensuite, l'inoculation de plusieurs concentrations en inoculum pourrait apporter une avancée dans la découverte de la concentration minimale nécessaire au développement d'une infection. Toutes ces informations se révèlent utiles dans le cadre du développement d'un modèle épidémiologique précis. En effet, Tako et al. (1997) énoncent que les conditions climatiques et la résistance variétale ont un impact sur la fréquence des applications fongicides, cependant la souche du pathogène en présence est également à prendre en compte.

Cette étude s'inscrit dans le contexte du projet Potato SMART, dont l'objectif est de mettre en place un modèle d'avertissement adapté à la variété de pomme de terre et aux souches de mildiou présentes, en plus des autres variables météorologiques et culturelles (voir section 2.7). Ce modèle permettrait d'optimiser la prédiction du mildiou selon les interactions souches-variétés et d'adapter les pulvérisations fongicides en conséquence.

L'étude de l'interaction plante-pathogène et des paramètres abordés ci-dessus peut-être réalisée dans différentes conditions. Afin de faciliter la comparaison en les répétitions et la mise en évidence de spécificités, il est nécessaire que ces conditions soient contrôlées et standardisées. Pour permettre cela, travailler sur feuilles plutôt que sur plants entiers (*in planta*) permet de limiter la place nécessaire à l'essai, ainsi que les variations microclimatiques. Plusieurs études sur *P. infestans* ont mené des essais sur feuilles détachées (Tooley 1990; Deahl, Inglis, et DeMuth 1993; Goth et Keane 1997). Cependant, si l'on se base sur l'essai préliminaire réalisé dans le cadre de ce mémoire, l'utilisation de feuilles détachées dans des boîtes de Petri peut poser problème. Si la feuille est trop grande, les zones d'ombres créées interfèrent avec le système d'imagerie utilisé dans la cotation (voir essais préliminaires 2.4.3). L'utilisation de disques foliaires, découpés dans des feuilles, peut être une alternative à ce problème.

Hodgson (1961) a utilisé cette technique afin d'étudier la résistance partielle de la pomme de terre à *P. infestans*. Plus récemment, De Vrieze et al. (2018) ont réalisé un essai sur disques foliaires issus de trois cultivars de pomme de terre différents. L'objectif était d'évaluer le potentiel inhibiteur de souches de *Pseudomonas* envers *P. infestans*. Les disques ont été découpés au sein des troisième et quatrième feuilles des plants cultivés en serre, et inoculés sur la face abaxiale des feuilles dans des boîtes de Petri. Cette méthode a été préférée au détriment d'un essai en serre ou en champ, qui présentent un manque de reproductibilité (De Vrieze et al. 2018).

Ce type d'essai a également été valorisé dans l'étude d'autres pathosystèmes. Brown et Moore (1999) ont comparé l'inoculation de disques foliaires, de plants entiers en serre et en champ dans l'évaluation de la résistance des plants de vigne au mildiou. Les résultats montrent que les essais sur disques foliaires concordent à 85,6% avec les essais réalisés au champ (Brown et Moore 1999). Ils permettent donc de prédire assez fidèlement la résistance des plants de vigne. Les évaluations en serre *in planta* permettent également de prédire cette résistance (80,3% de concordance dans les résultats) (Brown et Moore 1999). Cependant, cette méthode est plus conséquente au niveau de sa mise en œuvre (espace requis, conditions de croissance, nombre de plants...), une standardisation est donc plus difficile à obtenir.

Les disques foliaires offrent donc un avantage au niveau de la répétabilité des expériences. Cependant, Guyer et al. (2015) ont montré dans leur étude sur le mildiou de la pomme de terre, qu'il existait une variation entre les résultats obtenus pour les disques foliaires, les plants cultivés en serre et ceux cultivés au champ. Un essai sur disque ne permettrait donc pas de remplacer un essai mené *in planta*. Dans leur essai, les disques foliaires ont été déposés sur un papier filtre humide dans une boîte de Petri. Après inoculation, les boîtes ont été incubées à 18°C à l'obscurité (Guyer et al. 2015). Dorrance et al. (1997) énoncent également que des essais en laboratoire se révèlent moins fiables que des essais *in planta* dans le cas de l'évaluation globale de la résistance partielle du feuillage au mildiou de la pomme de terre. Dans leurs essais, les disques foliaires ont été déposés dans des boîtes de Petri contenant un milieu eau agar (1,5%). L'incubation après inoculation était à 22°C avec 12h de lumière (Dorrance et Inglis 1997). Il importe donc de comparer des résultats obtenus sur disques foliaires et *in planta* afin de vérifier ces résultats, en tentant de standardiser les conditions entre les boîtes de Petri et la serre.

Que l'on considère des disques foliaires ou des plantes entières, l'âge du matériel est un aspect important à prendre en compte dans l'étude de *P. infestans*. Hodgson (1961) rapporte que les plants et feuilles utilisés pour l'évaluation des symptômes foliaires doivent être au même stade de croissance et les inoculations réalisées lorsque les plants sont normalement infectés au champ. Fry et Apple (1986) ont également observé que l'âge des plantes a un impact sur la vitesse de propagation d'une épidémie. Selon eux, l'infection se répand moins rapidement chez les plantes d'âge moyen que chez les plus âgées (W. E. Fry et Apple 1986). Au sein d'un même plant, la sensibilité évolue donc avec le temps. Il est donc

nécessaire de privilégier des plants au même stade lorsque l'on souhaite les comparer dans un essai en serre, et sélectionner des feuilles du même âge lorsque l'on effectue un essai en laboratoire (Dorrance et Inglis 1997).

La concentration en inoculum est un autre aspect abordé dans l'étude de l'interaction entre *P. infestans* et *S. tuberosum*. La nature de la relation (log-normale ou exponentielle) existant entre la concentration en inoculum et le taux d'infection de l'hôte fait l'objet d'avis divergents selon des études plus anciennes (Kroll et Eide 1981). Stewart (1990) quant à elle utilise quatre concentrations en inoculum dans son étude sur *P. infestans* (2 500, 5 000, 10 000 et 20 000 sporanges/mL). Les résultats lui ont permis d'observer qu'une augmentation de la concentration en inoculum diminuait la réponse immunitaire des feuilles détachées de pommes de terre (Stewart 1990).

Afin d'évaluer les résultats obtenus après l'application du protocole dont cette section fait l'objet, il est nécessaire d'utiliser une technique permettant de générer une grande quantité de données précises. Une cotation visuelle journalière (évaluation du pourcentage de la surface foliaire nécrosée) peut s'avérer chronophage et être de précision variable (voir section 4.1). De Vrieze et al. (2018), ainsi que Guyer et al. (2015) réalisent des photographies (imagerie RVB) des disques foliaires, une fois après 7 jours d'incubation pour la première étude, et de façon journalière dans la deuxième. Elles sont analysées à l'aide d'une macro-instruction implantée dans le programme ImageJ. Ce code leur permet de quantifier la surface foliaire nécrosée, ainsi que le taux de sporulation en fin d'expérience (De Vrieze et al. 2018; Guyer et al. 2015). À côté de cela, l'utilisation des autres technologies d'imageries (voir section 4 de la revue bibliographique) rend possible la mise en évidence de phénomènes non visibles à l'œil nu.

L'objectif de cette section est de développer un protocole détaillé, permettant de caractériser facilement et en conditions standardisées le comportement d'une souche de *P. infestans* face à un cultivar de pomme de terre, en s'appuyant sur la littérature et les résultats des essais préliminaires. Un protocole d'étude de la croissance du pathogène sur disques foliaires, incluant un phénotypage des symptômes par imagerie RVB est ici proposé. L'influence de la concentration en inoculum est également analysée pour chacune des combinaisons souche-cultivar.

1.2. Méthodologie

Le plan expérimental de l'étude comprend cinq étapes, qui sont reprises dans l'organigramme situé en figure 33.

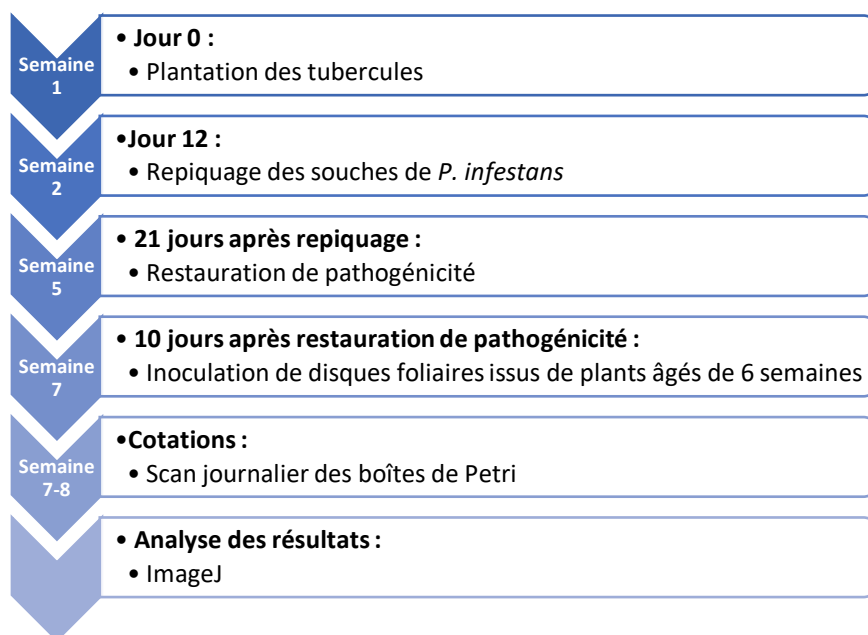


Figure 33 - Étapes du plan expérimental de l'étude de l'interaction entre *P. infestans* et *S. tuberosum*.

1.2.1. Matériel frais

Quatre souches de *P. infestans* sont testées dans cet essai. Elles ont été sélectionnées selon les résultats obtenus pour le monitoring du pathogène. Les souches 36_A2 et 37_A2 sont actuellement majoritaires sur le territoire belge, il est donc utile de les intégrer dans l'étude. La souche 13_A2 est également présente et permet de comparer la virulence des souches plus récentes (36 et 37_A2) avec la virulence de l'ancienne souche majoritaire (13_A2). Enfin, il est intéressant de comparer les souches de mating type A2 avec une souche de mating type A1. La dernière souche testée est donc la 6_A1. Toutes les souches ont été isolées à partir de matériel frais au CRA-W en septembre 2019 (voir annexe 3). Elles ont ensuite été cultivées sur milieu seigle agar à 18°C à l'obscurité. Les souches ont régulièrement été repiquées (\pm tous les mois) à partir du mois d'octobre.

Sept variétés de pomme de terre ont été sélectionnées au sein de l'essai MILVAR à Libramont. Ces variétés présentent un panel de résistances variables au mildiou de la pomme de terre (tableau 9).

Tableau 9 - Cultivars de pomme de terre et résistances respectives.

Cultivars	Note Mildiou*	Degré de résistance
Bintje	2	Susceptible
Challenger	4,9	Moyennement susceptible
Gasoré	7,7	Moyennement résistants
Allians	8	
Connect	8,6	
Sarpo Mira	8,9	Fortement résistants
Kelly	9	

* La note mildiou a été attribuée par le CRA-W à la suite d'essais variétaux. Elle représente la résistance relative au mildiou de la pomme de terre sur une échelle allant de 0 (très susceptible) à 9 (fortement résistant).

1.2.2. Méthode proposée

Production du matériel végétal

Les tubercules de chaque cultivar sont placés dans des pots contenant du terreau (14 cm Ø). Afin de disposer de suffisamment de feuilles, il faut compter 35 plants par cultivar (45 plants de Bintje en prévision de la restauration de pathogénicité). Les plants sont ensuite placés en serre (20°C, HR ± 70%) pour leur croissance. La source lumineuse de la serre doit prévoir suffisamment d'UV afin d'éviter la formation de cloques sur les feuilles.

Revivification des souches de *P. infestans* et préparation des suspensions de sporanges

Les quatre souches de *P. infestans* sont repiquées chacune dans 15 boîtes de Petri contenant un milieu seigle agar (protocole en annexe 6.2). Les boîtes sont incubées 21 jours à 18°C à l'obscurité. Après cette durée, une restauration de pathogénicité est réalisée pour chacune des souches sur 25 feuilles de pomme de terre (100 feuilles de Bintje sont prélevées sur les plants supplémentaires). Après 10 jours, les sporanges issus de la restauration de pathogénicité sont récupérés dans une solution d'eau et Tween 20 (annexe 7). Une solution de chacune des concentrations est préparée pour les quatre souches, il y a donc au total 12 solutions de sporanges. Les solutions sont ensuite incubées deux heures à 4°C afin de libérer les zoospores de sporanges.

Inoculation des souches sur disques foliaires selon le dispositif expérimental

Les disques foliaires (2 cm Ø) sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce au sein des folioles de la 4^{ème} feuille à partir de la base des plants. Les disques foliaires sont prévus au nombre de 156 par cultivar (3 disques par boîtes de Petri, 4 boîtes de Petri par combinaison et 12 combinaisons différentes) (tableau 10).

Tableau 10 - Schéma général de l'expérience.

Chaque point représente une répétition, qui consiste en une boîte de Petri contenant trois disques foliaires.

Souches	Concentrations (sporangies/mL)	Cultivars						
		Bintje	Challenger	Gasorée	Allians	Connect	Sarpo Mira	Kelly
6_A1	2 000	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
	10 000	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
	50 000	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
13_A2	2 000	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
	10 000	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
	50 000	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
36_A2	2 000	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
	10 000	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
	50 000	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
37_A2	2 000	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
	10 000	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
	50 000	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●
Témoins	/	●●	●●	●●	●●	●●	●●	●●

Tous les disques foliaires sont désinfectés à l'eau de Javel 1% (30 secondes) et rincés trois fois avec de l'eau déminéralisée. Ils sont séchés et placés par trois, face abaxiale vers le haut, dans des boîtes de Petri contenant un papier filtre humidifié par 4mL d'eau stérile. Une goutte de 50µl de solution de sporanges est déposée au centre des disques. Douze disques par cultivar sont utilisés comme témoins. Ils sont traités avec une goutte de 50µl d'une solution d'eau et Tween 20.

Incubation et suivi de l'évolution des symptômes

Les boîtes sont scellées et incubées à 18°C en présence de lumière constante, face foliaire inoculée vers le haut. Des images de la surface inoculée (face abaxiale des feuilles) sont prises journalièrement à heure fixe à l'aide d'un scanner (Konica Monolta bizhub 364e).

Analyse des données

Les images peuvent être analysées par le programme ImageJ à l'aide de la macro-instruction (annexe 10.2) utilisé dans l'essai préliminaire sur feuilles détachées. Ce code permet d'obtenir la surface totale du disque et la surface des tissus sains par détection des pixels de couleur verte. La surface nécrosée est déduite à partir de ces deux valeurs (voir formule appliquée dans l'essai préliminaire). En supplément, il est également possible d'utiliser la macro-instruction de Guyer et al. (2015) qui permet d'évaluer le taux de sporulation en fin d'incubation. Le temps de latence peut de cette façon être obtenu.

1.3. Discussion

En fonction des résultats obtenus lors de l'application de ce protocole, plusieurs aspects peuvent être discutés. Tout d'abord, le nombre de concentrations testées pourrait s'avérer limitant pour la création d'une modélisation précise. Afin de déterminer la relation existant entre concentration en inoculum et développement de l'infection, il pourrait être intéressant d'élargir le spectre de concentrations. Si des symptômes se développent sur chacun des cultivars pour toutes les souches à une concentration de 2000 sporanges/mL, alors elle n'est pas discriminante. Il peut alors être utile de tester des concentrations inférieures afin de déterminer la concentration minimale nécessaire au développement d'une infection. À l'inverse, si aucun symptôme ne se développe à une concentration de 50 000 sporanges/mL, augmenter la concentration permettrait de définir la concentration nécessaire à surmonter la résistance du cultivar.

Ensuite, l'inoculum est ici incubé deux heures à 4°C afin de libérer les zoospores. Lors de la réalisation de l'essai préliminaire comparant le potentiel infectieux de sporanges et zoospores, les résultats obtenus avaient montré que c'était une inoculation avec des zoospores qui semblait la mieux adaptée (voir discussion 2.4.3). De plus, l'incubation des solutions de sporanges au froid est la méthode qui est généralement utilisée au laboratoire pour l'inoculation de *P. infestans*.

Le protocole utilise quatre répétitions par combinaison, chacune des répétitions comptant trois disques foliaires dans une même boîte de Petri. Deux types de variation pourraient donc être quantifiées dans les résultats : une variation intra-boîte, et une variation inter-boîte. Les disques foliaires présents dans une boîte de Petri scellée par du parafilm auront été exposées aux mêmes conditions (température, humidité), il est donc possible qu'aucune variabilité intra-boîte ne s'observe. Dans ce cas, le nombre de disques foliaires pourrait être revu à la baisse, ce qui permettrait de ne pas devoir planter autant de tubercules que prévu. L'expérience pourrait alors être facilement répétée, car elle serait moins conséquente à mettre en place.

Concernant la prise d'images, un scanner est utilisé à la place d'un appareil photo numérique. Cet appareil a été choisi afin d'éviter le problème lié à l'angle de la source lumineuse, rencontré lors de la réalisation de l'essai préliminaire sur feuilles détachées en boîtes de Petri. L'utilisation d'un scanner permet également de limiter les reflets sur la surface des boîtes de Petri. Un autre élément qui se rapporte à l'analyse des images est la macro-instruction utilisée dans ce protocole (annexe 10.2). Une prise d'image journalière pourrait ne pas être suffisante à la récolte de données consistantes (comme abordé dans l'introduction de cette section). Cependant, les infrastructures actuellement disponibles au laboratoire n'offrent pas la possibilité d'obtenir des images de façon plus régulière. Plusieurs prises d'image pourraient être planifiées sur la plage de 24h, mais cela n'est pas confortable pour l'expérimentateur. Il serait alors possible d'imaginer un prototype d'une plateforme automatisée adaptée à la prise d'images en boîtes de Petri. Un système de tapis roulants déposant les boîtes les unes après les autres sur un scanner de façon régulière (toutes les 2h par exemple) au sein d'une chambre d'incubation lumineuse à 18°C serait idéal. La prise d'images pourrait dans ce cas être plus fréquente et les résultats obtenus modélisés plus fidèlement à la situation réelle.

Comme abordé dans le contexte de ce protocole, les avis divergent quant à la comparabilité des résultats obtenus sur disques foliaires ou *in planta*. Cet essai sur disques foliaires pourrait donc être adapté à la réalisation d'un essai en serre *in planta* afin de comparer les résultats, à l'instar de Brown et Moore (1999). Selon les résultats de l'essai préliminaire comparant les techniques d'inoculation, les plants pourraient être inoculés à l'aide d'une goutte sur laquelle un disque de cellophane est déposé. La quantité de propagules serait donc contrôlée. La technique d'imagerie pourrait également être adaptée à un essai *in planta*.

Dans cette optique, l'imagerie hyperspectrale pourrait être utilisée pour mesurer l'évolution des symptômes de mildiou foliaire sur plants de pomme de terre en serre selon une méthode automatisée. Ce type de capteur permet de réaliser des observations à une dimension inaccessible à l'œil nu ou pour l'imagerie RVB. Il offre en effet une plus grande résolution qu'un appareil photo ou un scanner grâce à la largeur du spectre électromagnétique dans lequel il travaille (plus large qu'en imagerie RVB) (voir section 4 de la

revue bibliographique). Son automatisation permet de fournir une grande quantité de données qui peuvent alors être modélisées. L'imagerie hyperstectrale a déjà plusieurs fois été intégrée au sein de systèmes automatisés en serre ou en champ (Humplík et al. 2015; Virlet et al. 2017). De plus, des études récentes (2015 et 2016) ont également utilisé des capteurs hyperspectraux dans l'évaluation de la résistance végétale aux agents pathogènes (Kuska et al. 2015; Leucker et al. 2016).

Lorsque l'on travaille *in planta*, les mesures à l'aide d'un capteur optique sont réalisées à l'échelle du couvert végétal. Au sein de la canopée, chacune des feuilles peut présenter un angle différent par rapport au capteur, et à la source de lumière. En plus de cela, il faut prendre en compte que les feuilles se situent à plusieurs étages foliaires, ce qui conduit à des variations de distance entre capteur, source de lumière et feuilles mesurées. Les feuilles situées à la base des plants sont donc généralement moins éclairées en raison de la présence des étages foliaires supérieurs (Behmann et al. 2015).

Thomas (2018) a développé un système de phénotypage basé sur l'imagerie hyperspectrale qui quantifie l'évolution des symptômes d'oïdium sur orge. Il permet d'obtenir des mesures à haut débit à l'échelle de la canopée, tout en travaillant dans un environnement contrôlé afin d'acquérir des données stables durant la période de l'essai. Celui-ci est réalisé en serre dans des micro parcelles, qui permettent de reproduire des conditions de croissance similaires à celles trouvée en champ (profondeur de sol, densité de semis). Cela permet d'éviter le problème lié à la différence de phénotype qu'il peut exister entre des plants en champ et des plants en pots, dans lesquels la croissance racinaire est limitée. En serre, les conditions environnementales (température et HR) peuvent être contrôlées, ce qui offre une certaine répétabilité à l'essai (Thomas et al. 2018).

Thomas (2018) a reproduit le système de boîte noire mobile de Joalland (2017) afin d'automatiser la mesure des symptômes (figure 34). Les images hyperspectrales sont collectées depuis le dessus de chacune des micro parcelles, à une hauteur de 1,2m. Des lampes halogènes (120W) sont placées dans la boîte noire et fournissent un éclairage optimal et constant de la canopée, ce qui minimise les problèmes de luminosité soulevés précédemment (Joalland et al. 2017). Cela permet d'exclure la luminosité extérieure variable, qui pourrait interférer avec la prise de mesures. Un spectromètre hyperspectral Specim V10E est utilisé pour quantifier l'évolution des symptômes (Thomas et al. 2018). Cette combinaison de sources lumineuses et boîte noire fournit des conditions de mesure stables entre micro parcelles et entre les différentes prises de mesures (Behmann et al. 2015).

Thomas (2018) a jugé le dispositif expérimental comme efficace. Ce type de système permet en effet de réduire la charge de travail manuel tout en fournissant une quantification précise et objective des symptômes foliaires de la maladie. La prise de mesure est donc réalisée à haut débit de façon automatisée, et fournit une haute résolution spatiale dans un

environnement contrôlé. De plus, l'outil autorise la détection des symptômes à un stade précoce, qui pourraient ne pas être visibles à l'œil nu (Thomas et al. 2018).

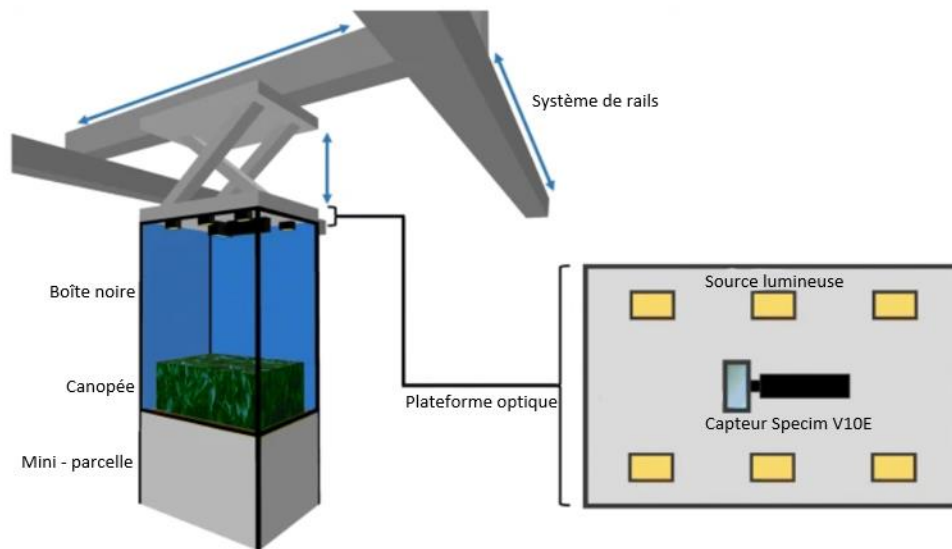


Figure 34 - Plateforme de phénotypage à capteur hyperspectral (Thomas et al. 2018).

Le dispositif pourrait être adapté à une évaluation des symptômes de mildiou sur plants de pomme de terre en adaptant la taille des micro parcelles et la densité de semis au sein de celles-ci. Durant les premiers essais, une estimation visuelle basée sur une échelle du pourcentage de canopée nécrosée pourrait être combinée aux données hyperspectrales afin de calibrer le capteur. L'utilisation de l'imagerie hyperspectrale permet, dans le cas de l'étude de l'interaction entre *P. infestans* et la pomme de terre, de caractériser la phase biotrophe du pathogène, non visible à l'œil nu ou en imagerie RVB. Les résultats obtenus en serre seraient ensuite comparés à des résultats d'un essai similaire mené en champ. Une concordance entre les deux essais signifierait qu'une manipulation en serre pourrait prédire fidèlement le comportement de résistance des plants de pomme de terre en champ.

IV. Conclusions et perspectives

Le mildiou de la pomme de terre, causé par *P. infestans* est la maladie la plus dommageable pour la culture. Une protection efficace contre cette maladie nécessite l'utilisation de traitements fongicides. En effet, le haut potentiel évolutif de l'agent causal lui permet de surmonter les gènes de résistance complète présents chez certaines variétés de pomme de terre. De plus, les populations du pathogène ont évolué au cours de ces dernières années, avec l'émergence en Europe de nouvelles souches fortement virulentes, telles que les 36_A2 et 37_A2. Des recherches sont actuellement menées vers le développement de variétés à résistance partielle plus durable, qui nécessiteront un contrôle du pathogène adapté. Une meilleure connaissance des mécanismes d'interaction entre *P. infestans* et *S. tuberosum* permettra d'améliorer la prédiction de l'évolution de la maladie. En ce sens, un outil d'aide à la décision, basé notamment sur la quantification de l'inoculum aérien et l'interaction souche-cultivar présente sur la parcelle, est développé par le Projet Potato smart. Ces connaissances permettront d'adapter, mais également d'optimiser la stratégie de contrôle par traitements fongicides afin de diminuer le risque d'infection de la culture.

Les objectifs poursuivis à travers ce travail étaient d'identifier les génotypes de *P. infestans* présents en Belgique durant la saison de culture 2019, et d'améliorer la connaissance des interactions spécifiques entre cultivars et souches du pathogène. L'épidémie du Covid en 2020 a provoqué l'arrêt des travaux expérimentaux en laboratoire et en serre. Les essais visant à caractériser les interactions souches-cultivars n'ayant pas pu être réalisés, le second objectif de ce travail a évolué vers le développement d'un protocole visant à caractériser le comportement de souches de *P. infestans* sur disques foliaires issus de différentes variétés de pomme de terre, en intégrant une technique efficace d'évaluation des symptômes.

À l'échelle de la Belgique, les résultats de la caractérisation des souches collectées en 2019 ont mené à l'identification des souches 36_A2, 37_A2, 13_A2, 1_A1 et de la catégorie « misc ». Leurs fréquences ont été comparées avec la situation des années précédentes. Deux tendances générales peuvent être dégagées. La fréquence de la souche 36_A2 est en augmentation et elle est devenue majoritaire sur le territoire. Tandis que la fréquence de la souche 37_A2 subit un recul qui serait provoqué par une diminution de l'utilisation de fluazinam. La situation a donc évolué par rapport à 2018, où ces deux lignées clonales avaient des fréquences similaires. L'année 2019 est également marquée par le retour de la souche 1_A1, qui n'avait pas été détectée en 2018. Le mating type A2 reste tout de même majoritaire (depuis 2017), ce qui montre que sa fitness serait supérieure à celle du type A1. Une analyse de la distribution et de l'origine des souches a été effectuée en fonction de la province d'échantillonnage, la variété sur laquelle elles ont été récoltées, et la date de récolte. Cela a permis de mettre en évidence que la souche 36_A2 est présente sur tout le territoire wallon durant toute la durée d'échantillonnage. La souche 13_A2 est quant à elle localisée dans trois provinces et s'observe pendant une période plus courte. Certains cultivars fortement

résistants semblent ne pas être infectés par la souche 36_A2, tels que Louisa et Connect. Ils ont cependant été infectés par la souche 13_A2, ce qui nous amène à poser l'hypothèse que l'absence de compétition permet à cette lignée clonale de se développer sur les variétés moins sensibles. Ces observations montrent l'intérêt d'une étude de la répartition spatiotemporelle des génotypes selon les données environnementales, ainsi que du lien entre la variété de pomme de terre cultivée et la présence de certaines souche de *P. infestans*.

À l'échelle de l'Europe, la souche 13_A2 n'est plus majoritaire pour la première fois depuis 2013. On distingue également des tendances similaires à celles de la Belgique (36_A2 majoritaire, 37_A1 en recul). Cependant, la distribution des population de *P. infestans* n'y est pas homogène car le continent peut être divisé en plusieurs zones selon la souche majoritaire présente. Ces éléments montrent qu'il est nécessaire de considérer les génotypes des souches présentes dans le développement d'un modèle épidémiologique. Le pathogène évolue rapidement au niveau spatiotemporel, que l'on soit à l'échelle belge ou européenne. Le suivi du pathogène mené par Euroblight est donc important, et permet une adaptation continue des modèles de prédiction.

La caractérisation des souches a également permis de montrer que de nouveaux génotypes uniques apparaissent en Belgique et en Europe. La reproduction sexuée du pathogène pourrait probablement être à l'origine de la présence de ces nouvelles souches. On ne connaît pas l'importance de ce type de reproduction en Belgique, mais étant donné la présence des deux mating type ces dernières années, il est possible que des oospores aient été produites. Cependant, les conséquences épidémiologiques liées à un inoculum composé d'oospores ne sont pas clairement connues, ainsi que les avantages évolutifs d'une recombinaison sexuelle. Des études doivent encore être menées en ce sens afin d'inclure ces éléments dans les modèles épidémiologiques. Ces nouveaux génotypes pourraient également être à l'origine d'un nouveau tournant dans l'évolution des populations de *P. infestans*, par l'apparition de nouvelles lignées clonales virulentes, à l'instar des souches 36, 37 et 41_A2.

Afin de développer le protocole concernant le second objectif, trois essais préliminaires ont été mis en place dans le cadre de ce travail. Le premier visait à étudier la variation des symptômes du mildiou sur plants entiers de pomme de terre selon la méthode d'inoculation. Les résultats ont montré qu'une inoculation par une goutte de suspension de sporanges stabilisée sur une feuille par un disque de cellophane est efficace. Cette technique permet de quantifier l'inoculum à partir de la concentration de la suspension. Un autre essai visait à comparer la sporulation de *P. infestans* selon la concentration en sucrose du milieu de culture. L'objectif était de déterminer s'il était possible d'obtenir une quantité suffisante en sporanges plus rapidement qu'en 21 jours. À l'issue de la manipulation, le nombre de sporanges produits sur milieu seigle 2% sucrose après 14 jours était significativement plus élevé que sur seigle 0,1% sucrose. Enfin, le troisième essai avait pour objectif de comparer le potentiel infectieux de zoospores et sporanges sur feuilles détachées. Malgré le fait qu'aucune différence significative n'ait pu être mise en évidence, il semble que le développement des

symptômes après une inoculation par des zoospores évolue de façon plus linéaire dans le temps. Il est donc préférable d'utiliser ce type d'inoculum afin d'obtenir des résultats simples à analyser. Dans ce cas, il serait utile de quantifier les zoospores à l'aide d'un hémocytomètre adapté afin de travailler dans des conditions précises et contrôlées. Dans chacun des essais, certains aspects ont posé problème (technique de cotation, nombre de répétitions, prise d'images). Cependant, cela a permis de mettre en lumière les éléments à modifier et adapter pour optimiser les protocoles pour des manipulations futures.

Les nouveaux éléments précisés par la réalisation des essais préliminaires ont été utiles dans le développement du protocole étudiant l'interaction plante-pathogène sur disques foliaires. Étant donné qu'il n'a pas été mis en place, certains aspects devront éventuellement être adaptés selon les résultats obtenus (concentrations en inoculum testées, nombre de disques par boîte de Petri, méthode de prise d'image). Toutefois, les résultats de cet essai seront utiles au sein du projet Potato Smart car ils permettront de préciser le comportement des cultivars en fonction de la souche de *P. infestans* inoculée. Plusieurs perspectives peuvent être dégagées quant à ce protocole. Tout d'abord, l'essai permettra de déterminer le nombre seuil de propagules nécessaires au développement d'une infection. Plusieurs nouvelles concentrations pourraient être testées en fonction des résultats obtenus avec 2000, 10 000 et 50 000 sporanges/mL. Ensuite, le protocole pourrait être adapté sur plants entiers en serre, et un système de phénotypage hyperspectral développé. Cela permettra de déterminer le lien entre les caractérisations *in vitro* et *in planta* de l'interaction souches-variétés, et la façon dont les paramètres relatifs à la quantité seuil d'inoculum, au temps de latence et à la capacité de sporulation doivent être inclus dans les modèles de prédiction.

Ce travail fournit donc un protocole sur feuilles détachées et les prémices d'un essai *in planta*, dont la mise en place pourrait provoquer une avancée dans l'étude de l'interaction entre *P. infestans* et *S. tuberosum* selon la souche et le cultivar considérés. En plus de cela, le suivi des populations du pathogène, à l'échelle de la Belgique et de l'Europe montre une nouvelle fois son importance et la nécessité de son intégration au sein des modèles de prédiction. Ces derniers n'ont pas encore atteint leur potentiel maximum mais leur ajustement selon les critères visés par le projet Potato Smart pourrait être une bonne voie vers cet aboutissement.

Références

- Adams, M. J. 1975. « Potato Tuber Lenticels: Development and Structure ». *Annals of Applied Biology* 79 (3): 265-73. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1975.tb01582.x>.
- Agrios, George N. 2010. *Plant Pathology*. 2^e éd. Academic Press.
- Alyokhin, Andrei, Mitchell Baker, David Mota-Sanchez, Galen Dively, et Edward Grafius. 2008. « Colorado Potato Beetle Resistance to Insecticides ». *American Journal of Potato Research* 85 (6): 395-413. <https://doi.org/10.1007/s12230-008-9052-0>.
- Andriveau, Didier. 1995. « Biology, Ecology, and Epidemiology of the Potato Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* in Soil ». *Phytopathology* Vol. 85 (No. 10): 1053-56. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-1053>.
- . 1996. « The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence ». *Plant Pathology* Vol. 45: 1027-35.
- Ankita, Sarkar, Sinha Asha, Sarma B. K., et Singh H. B. 2015. « Plant pathogen interaction and host defense responses ». *Improved Production Technologies in Vegetable Crops - IIVR training manual*, n° 59: 246.
- ASBL Corder. 2017. « Fiches maladies, ravageurs et adventices ». appi. 9 octobre 2017. <https://appi.be/fr/fiches-maladies-ravageurs>.
- Barbagallo, R. P., K. Oxborough, E. P. Kenneth, et N. R. Baker. 2003. « Rapid, Noninvasive Screening for Perturbations of Metabolism and Plant Growth Using Chlorophyll Fluorescence Imaging ». *Plant Physiology* 132: 485-93. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018093>.
- Barras-Hidalgo, Orlando. 2004. « Basic insight in plant-pathogen interaction ». *Bioteconología Aplicada*, n° 21: 1-4.
- Bechinger, C. 1999. « Optical Measurements of Invasive Forces Exerted by Appressoria of a Plant Pathogenic Fungus ». *Science* 285 (5435): 1896-99. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1896>.
- Behmann, Jan, Anne-Katrin Mahlein, Stefan Paulus, Heiner Kuhlmann, Erich-Christian Oerke, et Lutz Plümer. 2015. « Calibration of Hyperspectral Close-Range Pushbroom Cameras for Plant Phenotyping ». *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing* 106 (août): 172-82. <https://doi.org/10.1016/j.isprsjprs.2015.05.010>.
- Bengtsson, Thérèse. 2013. « Boosting Potato Defence Against Late Blight : A study from Field to Molecule ». Alnarp: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Bock, C. H., G. H. Poole, P. E. Parker, et T. R. Gottwald. 2010. « Plant Disease Severity Estimated Visually, by Digital Photography and Image Analysis, and by Hyperspectral Imaging ». *Critical Reviews in Plant Sciences* 29 (2): 59-107. <https://doi.org/10.1080/07352681003617285>.
- Boddy, Lynne. 2016. « Pathogens of Autotrophs ». In *The Fungi*, 279-88. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00008-6>.
- Boller, Thomas, et Georg Felix. 2009. « A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors ». *Annual Review of Plant Biology* 60 (1): 379-406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>.
- Boutemy, Laurence S., Stuart R. F. King, Joe Win, Richard K. Hughes, Thomas A. Clarke, Tharin M. A. Blumenschein, Sophien Kamoun, et Mark J. Banfield. 2011. « Structures of *Phytophthora* RXLR Effector Proteins: A CONSERVED BUT ADAPTABLE FOLD UNDERPINS FUNCTIONAL DIVERSITY ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (41): 35834-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.262303>.
- Bozkurt, Tolga O., et Sophien Kamoun. 2020. « The plant–pathogen haustorial interface at a glance ». *Journal of Cell Science* 133 (5): 1-6. <https://doi.org/10.1242/jcs.237958>.

- Braun, Sarah, Amanda Gevens, Amy Charkowski, Christina Allen, et Shelley Jansky. 2017. « Potato Common Scab: A Review of the Causal Pathogens, Management Practices, Varietal Resistance Screening Methods, and Host Resistance ». *American Journal of Potato Research* 94 (4): 283-96. <https://doi.org/10.1007/s12230-017-9575-3>.
- Brown, Maurus V., et James N. Moore. 1999. « Comparison of Leaf Disk, Greenhouse, and Field Screening Procedures for Evaluation of Grape Seedlings for Downy Mildew Resistance ». *HortScience* 34 (2): 331-33.
- Bushnell, W R. 1972. « Physiology of Fungal Haustoria ». *Annual Review of Phytopathology* 10 (1): 151-76. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.10.090172.001055>.
- C. Whisson, Stephen, Petra C. Boevink, Shumei Wang, et Paul RJ Birch. 2016. « The cell biology of late blight disease ». *Current Opinion on Microbiology*, n° 34: 127-35.
- CABI. 2019a. « Invasive Species Compendium - Potato mop-top virus ». CABI. 19 novembre 2019. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/42827>.
- . 2019b. « Invasive Species Compendium - *Phytophthora infestans* (Phytophthora blight) ». CABI. 25 novembre 2019. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40970#totaxonomicTree>.
- Catanzariti, Ann-Maree, Peter N. Dodds, et Jeffrey G. Ellis. 2007. « Avirulence Proteins from Haustoria-Forming Pathogens: Avirulence Proteins from Haustoria-Forming Pathogens ». *FEMS Microbiology Letters* 269 (2): 181-88. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00684.x>.
- Caulier, Simon, Annika Gillis, Gil Colau, Florent Licciardi, Maxime Liépin, Nicolas Desoignies, Pauline Modrie, Anne Legrève, Jacques Mahillon, et Claude Bragard. 2018. « Versatile Antagonistic Activities of Soil-Borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and Other Potato Pathogens ». *Frontiers in Microbiology* 9 (143). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00143>.
- Centre Pilote Pommes de terre (CPP). 2009. « Guide de bonnes pratiques phytosanitaires en culture de pommes de terre ». Comité régional PHYTO.
- César, Vincent. 2018. « Visite de l'essai MILVAR à Libramont ». Wallonie recherche CRA-W. 2018. <https://www.cra.wallonie.be/fr/visite-de-lessai-milvar-a-libramont>.
- . 2019a. Communication personnelle sur les notes de susceptibilité attribuées aux variétés de l'essai MILVAR.
- . 2019b. Communications personnelles sur les manipulations réalisées au sein du laboratoire Mildiou - Pomme de terre au CRA-W (Libramont).
- Chaerle, Laury, Dik Hagenbeek, Erik De Bruyne, et Dominique Van Der Straeten. 2007. « Chlorophyll Fluorescence Imaging for Disease-Resistance Screening of Sugar Beet ». *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 91 (2): 97-106. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9282-8>.
- Chaerle, Laury, Ilkka Leinonen, Hamlyn G. Jones, et Dominique Van Der Straeten. 2007. « Monitoring and Screening Plant Populations with Combined Thermal and Chlorophyll Fluorescence Imaging ». *Journal of Experimental Botany* 58 (4): 773-84. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl257>.
- Charkowski, A., et et al. 2020. « Brown rot and bacterial wilt of potato caused by *Ralstonia solanacearum* ». In *The Potato Crop - Its Agricultural, Nutritional and Social Contribution to Humankind*, 352-57. Springer International Publishing.
- Clarke, Geoffrey M. 1995. « Relationships Between Developmental Stability and Fitness: Application for Conservation Biology ». *Conservation Biology* 9 (1): 18-24. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1995.09010018.x>.
- Clément, Thimothée. 2019. « Prédiction du risque du mildiou de la pomme de terre à l'échelle de la parcelle en Wallonie : validation et analyse de sensibilité du modèle Guntz-Divoux, test et calibration du modèle français "Milsol", et effet de la résistance variétale de l'hôte sur le cycle

- du pathogène ». Louvain-la-Neuve: Faculté des bioingénieurs - UCLouvain. <http://hdl.handle.net/2078.1/thesis:19497>.
- Cooke, David, Louise Sullivan, et James Lynott. 2020. « 12-plex SSR genotyping of *Phytophthora infestans* ». The James Hutton Institute.
- Cornell University. 2018. « Late Blight: *Phytophthora infestans* ». Plant Disease Diagnostic Clinic - College of Agriculture and Life Sciences. <http://plantclinic.cornell.edu/factsheets/lateblight.pdf>.
- Czajkowski, R., M. C. M. Pérombelon, J. A. van Veen, et J. M. van der Wolf. 2011. « Control of Blackleg and Tuber Soft Rot of Potato Caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* Species: A Review: Control of *Dickeya* and *Pectobacterium* Species in Potato ». *Plant Pathology* 60 (6): 999-1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02470.x>.
- De Cicco, Antonella, et Jean-Claude Jeanty. 2019. « The EU potato sector - statistics on production, prices and trade ». *Statistics explained - Eurostat*.
- De Haan, Eisse G., et Gé w. Van Den Bovenkamp. 2005. « Improved Diagnosis of Powdery Scab (*Spongospora Subterranea* Sp.*Subterranea*) Symptoms on Potato Tubers (*Solanum Tuberosum* L.) ». *Potato Research* 48 (1-2): 1-14. <https://doi.org/10.1007/BF02733677>.
- De Vrieze, Mout, Fanny Germanier, Nicolas Vuille, et Laure Weisskopf. 2018. « Combining Different Potato-Associated *Pseudomonas* Strains for Improved Biocontrol of *Phytophthora infestans* ». *Frontiers in Microbiology* 9 (octobre): 2573. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02573>.
- Deahl, K. L., D. A. Inglis, et S. P. DeMuth. 1993. « Testing for Resistance to Metalaxyl In *Phytophthora infestans* Isolates from Northwestern Washington ». *American Potato Journal* 70 (11): 779-95. <https://doi.org/10.1007/BF02849105>.
- Dekker, J. 1982. « Countermeasures for avoiding fungicide resistance ». In *Fungicide resistance in crop protection*, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 177-86. Wageningen.
- Delaye, Luis, Graciela García-Guzmán, et Martin Heil. 2013. « Endophytes versus Biotrophic and Necrotrophic Pathogens—Are Fungal Lifestyles Evolutionarily Stable Traits? ». *Fungal Diversity* 60 (1): 125-35. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0240-y>.
- Dorrance, Anne E., et Debra Ann Inglis. 1997. « Assessment of Greenhouse and Laboratory Screening Methods for Evaluating Potato Foliage for Resistance to Late Blight ». *Plant Disease* 81 (10): 1206-13.
- Draye, Xavier. 2020. Échange à propos des plateformes de phénotypage.
- Ephytia. 2019. « Pomme de terre - *Ralstonia solanacearum* - Pourriture brune ». 27 novembre 2019. <http://ephytia.inra.fr/fr/C/20905/Pomme-de-terre-Ralstonia-solanacearum-pourriture-brune>.
- Eucablight. 2008. « Protocols for SSR analysis of *P. infestans* (Draft) ». SCRI living technology.
- EuroBlight. 2019a. « Genotype Frequency Map ». EuroBlight - A potato late blight network for Europe. 2019. <https://agro.au.dk/forskning/internationale-platforme/euroblight/pathogen-monitoring/genotype-frequency-map/>.
- . 2019b. « Genotype map ». EuroBlight - A potato late blight network for Europe. 2019. <https://agro.au.dk/forskning/internationale-platforme/euroblight/pathogen-monitoring/genotype-map/>.
- Euroblight. 2020. « About Pathogen Monitoring ». EuroBlight - A potato late blight network for Europe. 2020. <https://agro.au.dk/forskning/internationale-platforme/euroblight/pathogen-monitoring/about-pathogen-monitoring/>.

- European Commission, et Directorate-General for Health and Food Safety. 2017. *Potato Ring Rot and Brown Rot Surveys in the EU: Annual Report 2015/2016*. <http://dx.publications.europa.eu/10.2875/391318>.
- Ewing, Elmer E., Ivan Šimko, Christine D. Smart, Merideth W. Bonierbale, Eduardo S.G. Mizubuti, Gregory D. May, et William E. Fry. 2000. « Genetic mapping from field tests of qualitative and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii* ». *Molecular Breeding* 6 (1): 25-36. <https://doi.org/10.1023/A:1009648408198>.
- Flier, W.G., G.B.M. van den Bosch, et L.J. Turkensteen. 2003. « Stability of partial resistance in potato cultivars exposed to aggressive strains of *Phytophthora infestans* ». *Plant Pathology* 52: 326-37.
- FRAC. 2018. « Fungicide Resistance Management by Fungicide Common Name ». Fungicide Resistance Action Committee. 2018. <https://www.frac.info/fungicide-resistance-management/by-fungicide-common-name>.
- Frazier, Mary J., Kiran K. Shetty, Gale E. Kleinkopf, et Phillip Nolte. 1998. « Management of Silver Scurf (*Helminthosporium Solani*) with Fungicide Seed Treatments and Storage Practices ». *American Journal of Potato Research* 75 (3): 129-35. <https://doi.org/10.1007/BF02895847>.
- Fry, W. E., et A. E. Apple. 1986. « Disease Management Implications of Age-Related Changes in Susceptibility of Potato Foliage To *Phytophthora Infestans* ». *American Potato Journal* 63 (1): 47-56. <https://doi.org/10.1007/BF02855299>.
- Fry, William. 2008. « *Phytophthora Infestans* : The Plant (and R Gene) Destroyer ». *Molecular Plant Pathology* Vol. 9 (No. 3): 385-402. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x>.
- Goth, R. W., et J. Keane. 1997. « A Detached-Leaf Method to Evaluate Late Blight Resistance in Potato and Tomato ». *American Potato Journal* 74 (5): 347-52. <https://doi.org/10.1007/BF02851579>.
- Govers, Francine, et Mark Gijzen. 2006. « *Phytophthora* Genomics: The Plant Destroyers' Genome Decoded ». *Molecular plant-microbe interactions* Vol. 19 (No. 12): 1295-1301.
- Grund, Elisabeth, Omar Darissa, et Günter Adam. 2010. « Application of FTA® Cards to Sample Microbial Plant Pathogens for PCR and RT-PCR: FTA Cards and Plant Pathogens ». *Journal of Phytopathology* 158 (11-12): 750-57. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01695.x>.
- Grünwald, Niklaus J., et Wilbert G. Flier. 2005. « The Biology of *Phytophthora Infestans* at Its Center of Origin ». *Annual Review of Phytopathology* 43 (1): 171-90. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135906>.
- Guyer, Anouk, Mout De Vrieze, Denise Bönisch, Ramona Gloor, Tomke Musa, Natacha Bodenhausen, Aurélien Bailly, et Laure Weisskopf. 2015. « The Anti-*Phytophthora* Effect of Selected Potato-Associated *Pseudomonas* Strains: From the Laboratory to the Field ». *Frontiers in Microbiology* 6 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01309>.
- H. Y. Jiang, Rays, Sucheta Tripathy, Francine Govers, et Brett M. Tyler. 2008. « RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (12): 4874-79.
- Hansen, Jens Gronbech. 2020. « Results of the Euroblight potato late blight monitoring in 2019 ». EuroBlight - A potato late blight network for Europe. 6 mars 2020. <https://agro.au.dk/forskning/internationale-platforme/euroblight/currently/news/nyhed/artikel/results-of-the-euroblight-potato-late-blight-monitoring-in-2019/>.
- Harrison, J.G. 1995. « Factors involved in the development of potato late blight disease (*Phytophthora infestans*) ». In *Potato Ecology and Modelling of Crops under Conditions Limiting Growth*, Kluwer Academic Publishers, 215-36.

- Hausladen, H., et J. Leiminger. 2007. « Potato early blight in Germany (*Alternaria solani* – *Alternaria alternata*) ». *PPO-Special Report* 12: 189-93.
- Humplík, Jan F, Dušan Lazár, Alexandra Husičková, et Lukáš Spíchal. 2015. « Automated Phenotyping of Plant Shoots Using Imaging Methods for Analysis of Plant Stress Responses – a Review ». *Plant Methods* 11 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0072-8>.
- Joalland, Samuel, Claudio Screpanti, Frank Liebisch, Hubert Vincent Varella, Alain Gaume, et Achim Walter. 2017. « Comparison of Visible Imaging, Thermography and Spectrometry Methods to Evaluate the Effect of *Heterodera schachtii* Inoculation on Sugar Beets ». *Plant Methods* 13 (1): 73. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0223-1>.
- Jones, H. G. 2004. « Application of Thermal Imaging and Infrared Sensing in Plant Physiology and Ecophysiology ». *Advances in Botanical Research* 41: 108-63.
- Jones, H.G., et P. Schofield. 2008. « Thermal and other remotesensing of plant stress ». *Gen. Appl. Plant Physiology* 34 (1-2): 19-32.
- Judelson, Howard S. 2017. « Metabolic Diversity and Novelties in the Oomycetes ». *Annual Review of Microbiology* 71 (1): 21-39. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093609>.
- Kamoun, Sophien. 2003. « Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes ». *Eukaryotic Cell* 2 (2): 191-99. <https://doi.org/10.1128/EC.2.2.191-199.2003>.
- Kreuze, J. F., J. A. C. Souza-Dias, A. Jeevalatha, A. R. Figueira, J. P. T. Valkonen, et R. A. C. Jones. 2020. « Viral Diseases in Potato ». In *The Potato Crop*, édité par Hugo Campos et Oscar Ortiz, 389-430. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5_11.
- Kroll, R.E., et C.J. Eide. 1981. « EFFECT OF INOCULUM CONCENTRATION OF PHYTOPHTHORA INFESTANS ON POTATO LATE BLIGHT ». *Scientific Journal Series* 58: 153-61.
- Kumbar, Bhimanagoud. 2017. « Standardisation of specific media for *Phytophthora infestans* ». *Global Journal of Bio-science and Biotechnology* 6 (2): 374-76.
- Kuska, Matheus, Mirwaes Wahabzada, Marlene Leucker, Heinz-Wilhelm Dehne, Kristian Kersting, Erich-Christian Oerke, Ulrike Steiner, et Anne-Katrin Mahlein. 2015. « Hyperspectral Phenotyping on the Microscopic Scale: Towards Automated Characterization of Plant-Pathogen Interactions ». *Plant Methods* 11 (1): 28. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0073-7>.
- Leclerc, Melen, Thierry Doré, Christopher A. Gilligan, Philippe Lucas, et João A. N. Filipe. 2014. « Estimating the Delay between Host Infection and Disease (Incubation Period) and Assessing Its Significance to the Epidemiology of Plant Diseases ». Édité par Hiroshi Nishiura. *PLoS ONE* 9 (1): e86568. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086568>.
- Lees, A. K., R. Wattier, D. S. Shaw, L. Sullivan, N. A. Williams, et D. E. L. Cooke. 2006. « Novel Microsatellite Markers for the Analysis of *Phytophthora infestans* Populations ». *Plant Pathology* 55 (3): 311-19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01359.x>.
- Lees, Alison, Francisco Bittara, et Gary A. Secor. 2020. « Scientific description of Powdery Scab Disease ». potatoPRO.com. 2020. <https://www.potatopro.com/about/powdery-scab-0>.
- Legrève, Anne. 2020. Communication personnelle.
- Legrève, Anne, et Étienne Duveiller. 2010. « Preventing Potential Disease and Pest Epidemics Under a Changing Climate ». In *Climate Change and Crop Production*, CABI North American Office, 13:52-67.
- Lehtinen, A., A. Hannukkala, et T. Rantanen. 2002. « Infection potential and variation of soil borne *Phytophthora infestans* ». *PPO - Special Report* 8: 73-76.

- Lehtinen, Ari, et Asko Hannukkala. 2004. « Oospores of *Phytophthora infestans* in soil provide an important new source of primary inoculum in Finland ». *Agricultural and food science* 13: 399-410.
- Leucker, Marlene, Anne-Katrin Mahlein, Ulrike Steiner, et Erich-Christian Oerke. 2016. « Improvement of Lesion Phenotyping in *Cercospora Beticola* –Sugar Beet Interaction by Hyperspectral Imaging ». *Phytopathology*® 106 (2): 177-84. <https://doi.org/10.1094/PHTO-04-15-0100-R>.
- Mahieu, Olivier, et Benjamin Couvreur. 2019. « Les systèmes d'aide à la décision pour la lutte contre le mildiou de la pomme de terre en Région wallonne : vers l'intégration et l'amélioration des systèmes ». Carah. 2019. <http://www.carah.be/projets/mildiou.html>.
- Mahlein. 2016. « Plant Disease Detection by Imaging Sensors – Parallels and Specific Demands for Precision Agriculture and Plant Phenotyping ». *Plant Disease* 100 (2): 241-51. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0340-FE>.
- Mahlein, M.T. Kuska, J. Behmann, G. Polder, et A. Walter. 2018. « Hyperspectral Sensors and Imaging Technologies in Phytopathology: State of the Art ». *Annual Review of Phytopathology* 56 (1): 535-58. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-050100>.
- Mariette, Nicolas. 2016. « Traits de vie, adaptation et pouvoir invasif de lignées clonales de *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre. » Agrocampus Ouest, Université Bretagne Loire. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01589675>.
- Merz, Ueli. 2008. « Powdery Scab of Potato—Occurrence, Life Cycle and Epidemiology ». *American Journal of Potato Research* 85 (4): 241-46. <https://doi.org/10.1007/s12230-008-9019-1>.
- Midoune, Amel. 2015. « Recherche sur *Rhizoctonia solani* J.G.Kühn, agent du rhizoctone brun de la pomme de terre: caractérisation morphologique, identification des groupes d'anastomose et comportement variétal ». Alger: École nationale supérieure agronomique El-Harrach.
- Millam, Steve. 2006. « Potato (*Solanum tuberosum* L.) ». In *Agrobacterium Protocols Volume 2*, édité par Kan Wang, 25-35. Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-131-2:25>.
- Mishra, Puneet, Mohd Shahrimie Mohd Asaari, Ana Herrero-Langreo, Santosh Lohumi, Belén Diezma, et Paul Scheunders. 2017. « Close Range Hyperspectral Imaging of Plants: A Review ». *Biosystems Engineering* 164 (décembre): 49-67. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2017.09.009>.
- Mugniéry, Didier, et Mark S. Phillips. 2007. « The Nematode Parasites of Potato ». In *Potato Biology and Biotechnology*, 569-94. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044451018-1/50068-3>.
- Muhovski, Yordan. 2020. « Discussion Sur Les Gènes d'avirulence et Les Gènes de Résistance Intervenant Dans l'interaction Entre *Phytophthora Infestans* et *Solanum Tuberosum* », 14 juillet 2020.
- Nowicki, Marcin, Majid R. Foolad, Marzena Nowakowska, et E.U. Kozik. 2012. « Potato and Tomato Late Blight caused by *Phytophthora infestans*: An overview of pathology and resistance breeding ». *Plant Disease* 96 (1): 4-17. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0458>.
- Oertel, B., et E. Jelke. 1986. « Formation of Multinucleate Zoospores In *Phytophthora Infestans* (Mont.) De Bary (Oomycetes, Pythiaceae) ». *Protoplasma* 135 (2-3): 173-79. <https://doi.org/10.1007/BF01277011>.
- Phytoweb. 2020. « Consulter autorisations de produits phytopharmaceutiques ». Phytoweb - Produits Phytopharmaceutiques en Engrais. 2020. <https://fytoweb.be/fr/autorisations>.
- Pieruschka, Roland, et Uli Schurr. 2019. « Plant Phenotyping: Past, Present, and Future ». *Plant Phenomics* 2019 (mars): 1-6. <https://doi.org/10.34133/2019/7507131>.

- Pilet, F., R. Pelle, D. Ellisseche, et D. Andrivon. 2005. « Efficacy of the R2 Resistance Gene as a Component for the Durable Management of Potato Late Blight in France ». *Plant Pathology* 0 (0): 051024011435003-??? <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01288.x>.
- Platt, Robert. 2008. « Maladies de la pomme de terre causées par des oomycètes ». *Cahiers Agricultures* 17 (4): 361-67. <https://doi.org/10.1684/agr.2008.0211>.
- Rabinowitch, Haim D., et David Levy. 2001. « Biology and Physiology of the Potato ». In *Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes*, édité par Gad Loebenstein, Philip H. Berger, Alan A. Brunt, et Roger H. Lawson, 19-37. Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0842-6_2.
- Rolot, Jean-Louis. 2019. « Controlling the potato virus Y: an absolute necessity for our crops ». *CRAW-info*, n° 63 (Winter -2020): 4.
- Rosillon, Damien. 2018. « Potato SMART ». Wallonie recherche CRA-W. 2018. <https://www.cra.wallonie.be/fr/potato-smart>.
- Sagcan, Hasan, et Neslihan Turgut Kara. 2019. « Detection of Potato Ring Rot Pathogen *Clavibacter Michiganensis* Subsp. *Sepedonicus* by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay ». *Scientific Reports* 9 (1): 20393. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56680-9>.
- Sawyer, Geoff, Christopher Oligschläger, et Nikolay Khabarov. 2019. « A case Study - Growing Potatoes in Belgium ». Sentinels Benefits Study (SeBS). European Association of Remote Sensing Companies (EARSC).
- Sayegh, Majd. 2009. « La résistance du cotonnier *Gossypium hirsutum* à la bactériose causée par *Xanthomonas campestris* pathovar *malvacearum* - Rôle du gène GhLOX1 dans la réaction hypersensible ». Nancy: Nancy-Université - Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Shibata, Yusuke, Kazuhito Kawakita, et Daigo Takemoto. 2010. « Age-Related Resistance of *Nicotiana Benthamiana* Against Hemibiotrophic Pathogen *Phytophthora Infestans* Requires Both Ethylene- and Salicylic Acid-Mediated Signaling Pathways ». *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 23 (9): 1130-42. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-9-1130>.
- Simmonds, N. W. 1966. « Studies of the Tetraploid Potatoes. III. Progress in the Experimental Re-Creation of the *Tuberosum* Group ». *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 59 (379): 279-88. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1966.tb00063.x>.
- Snustad, Peter D., et Michael J. Simmons. 2015. *Principles of genetics*. 7^e éd. John Wiley & Sons.
- Solomon-Blackburn, Ruth M., Helen E. Stewart, et John E. Bradshaw. 2007. « Distinguishing Major-Gene from Field Resistance to Late Blight (*Phytophthora Infestans*) of Potato (*Solanum Tuberosum*) and Selecting for High Levels of Field Resistance ». *Theoretical and Applied Genetics* 115 (1): 141-49. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0550-0>.
- Spooner, David M., Marc Ghislain, Reinhard Simon, Shelley H. Jansky, et Tatjana Gavrilenko. 2014. « Systematics, Diversity, Genetics, and Evolution of Wild and Cultivated Potatoes ». *The Botanical Review* 80 (4): 283-383. <https://doi.org/10.1007/s12229-014-9146-y>.
- Stewart, Helen E. 1990. « Effect of plant age and inoculum concentration on expression of major gene resistance to *Phytophthora infestans* in detached potato leaflets ». *Mycological Research* 94 (6): 823-26.
- Suffert, F., et R. N. Thompson. 2018. « Some Reasons Why the Latent Period Should Not Always Be Considered Constant over the Course of a Plant Disease Epidemic ». *Plant Pathology* 67 (9): 1831-40. <https://doi.org/10.1111/ppa.12894>.
- Suojala, Terhi. 2000. « Variation in Sugar Content and Composition of Carrot Storage Roots at Harvest and during Storage ». *Scientia Horticulturae* 85 (1-2): 1-19. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00133-8).

- Thomas, Stefan, Jan Behmann, Angelina Steier, Thorsten Kraska, Onno Muller, Uwe Rascher, et Anne-Katrin Mahlein. 2018. « Quantitative Assessment of Disease Severity and Rating of Barley Cultivars Based on Hyperspectral Imaging in a Non-Invasive, Automated Phenotyping Platform ». *Plant Methods* 14 (1): 45. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0313-8>.
- Tooley, P. W. 1990. « Variation in Resistance To *Phytophthora infestans* among 21 *Solanum verrucosum* Plant Introductions ». *American Potato Journal* 67 (8): 491-98. <https://doi.org/10.1007/BF03045111>.
- Tran, C., et L. Tappy. 2012. « Sucrose, glucose, fructose : quels sont les effets des sucres sur la santé métabolique ? » *Revue Médicale Suisse* 8: 513-18.
- Tsedaley, Binyam. 2014. « Late Blight of Potato (*Phytophthora infestans*) Biology, Economic Importance and its Management Approaches ». *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* Vol. 4 (No. 25): 215-25.
- Tsrur, Leah. 2010. « Biology, Epidemiology and Management of *Rhizoctonia solani* on Potato: *Rhizoctonia* Diseases on Potato ». *Journal of Phytopathology* 158 (10): 649-58. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2010.01671.x>.
- Turner, R. Steven. 2005. « After the famine: Plant pathology, *Phytophthora infestans*, and the late blight of potatoes, 1845–1960 ». *Historical Studies in the Physical and Biological Sciences* Vol. 35 (No. 2): 342.
- Van Poppel, Pieter M. J. A., Rays H. Y. Jiang, Jadwiga Śliwka, et Francine Govers. 2009. « Recognition of *Phytophthora infestans* Avr4 by Potato R4 Is Triggered by C-Terminal Domains Comprising W Motifs ». *Molecular Plant Pathology* 10 (5): 611-20. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00556.x>.
- Vangessel, Mark J., et Karen A. Renner. 1990. « Effect of Soil Type, Hilling Time, and Weed Interference on Potato (*Solanum tuberosum*) Development and Yield ». *Weed Technology* 4 (2): 299-305.
- Virlet, Nicolas, Kasra Sabermanesh, Pouria Sadeghi-Tehran, et Malcolm J. Hawkesford. 2017. « Field Scanalyzer: An Automated Robotic Field Phenotyping Platform for Detailed Crop Monitoring ». *Functional Plant Biology* 44 (1): 143. <https://doi.org/10.1071/FP16163>.
- Visker, M. H. P. W., L. C. P. Keizer, D. J. Budding, L. C. Van Loon, L. T. Colon, et P. C. Struik. 2003. « Leaf Position Prevails Over Plant Age and Leaf Age in Reflecting Resistance to Late Blight in Potato ». *Phytopathology*® 93 (6): 666-74. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.6.666>.
- Vreugdenhil, Dick, John Bradshaw, Christiane Gebhardt, Francine Govers, Donald K.L. Mackerron, Mark A. Taylor, et Heather A. Ross. 2007. *Potato biology and Biotechnology - Advances and Perspectives*. Elsevier.
- Wang, Shumei, Petra C. Boevink, Lydia Welsh, Ruofang Zhang, Stephen C. Whisson, et Paul R. J. Birch. 2017. « Delivery of cytoplasmic and apoplastic effectors from *Phytophthora infestans* haustoria by distinct secretion pathways ». *New Phytologist* 216 (1): 205-15. <https://doi.org/10.1111/nph.14696>.
- Wang, Shumei, Hazel McLellan, Tatyana Bukharova, Qin He, Fraser Murphy, Jiayang Shi, Shaohui Sun, et al. 2019. « *Phytophthora infestans* RXLR Effectors Act in Concert at Diverse Subcellular Locations to Enhance Host Colonization ». *Journal of Experimental Botany* 70 (1): 343-56. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery360>.
- Wang, Shumei, Lydia Welsh, Peter Thorpe, Stephen C. Whisson, Petra C. Boevink, et Paul R. J. Birch. 2018. « The *Phytophthora infestans* Haustorium Is a Site for Secretion of Diverse Classes of Infection-Associated Proteins ». Édité par Steven E. Lindow. *MBio* 9 (4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01216-18>.
- Wanner, Leslie A. 2007. « A New Strain of *Streptomyces* Causing Common Scab in Potato ». *Plant Disease* 91 (4): 352-59.

- Widmer, T.L. 2009. « Infective Potential of Sporangia and Zoospores of *Phytophthora ramorum* ». *Plant Disease* 93 (1): 30-35.
- Wigginton, M. J. 1973. « Diffusion of Oxygen through Lenticels in Potato Tuber ». *Potato Research* 16 (2): 85-87. <https://doi.org/10.1007/BF02360611>.
- Yan, Zhinong, M. S. Reddy, Choong-Min Ryu, John A. McInroy, Mark Wilson, et Joseph W. Kloepper. 2002. « Induced Systemic Protection Against Tomato Late Blight Elicited by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria ». *Phytopathology*® 92 (12): 1329-33. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.12.1329>.

Étude de l'interaction entre *Phytophthora infestans* et *Solanum tuberosum*

Lore-Anne Bastin

La culture de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) fait l'objet d'une importance mondiale. En Belgique, la production était supérieure à 3 millions de tonnes en 2018, classant le pays au 17^{ème} rang international. La maladie la plus importante pour sa culture est le mildiou, causé par l'oomycète *Phytophthora infestans*. À la vue des caractéristiques épidémiologiques de cette maladie et le potentiel évolutif élevé de l'agent causal, la lutte contre la maladie nécessite l'utilisation répétée de fongicides. Ces dernières années ont été marquées par l'apparition de nouvelles souches émergentes en Europe, dont certaines sont fortement virulentes ou présentent une sensibilité réduite au fluazinam. Le contrôle du pathogène doit donc être adapté en fonction de l'évolution de l'oomycète.

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet Potato Smart, qui vise à développer un système d'aide à la décision qui permettra d'optimiser les pulvérisations fongicides en fonction du risque présent. L'outil se base notamment sur l'ajustement de modèles de prédiction en intégrant des paramètres d'ordre épidémiologiques, tels que la quantification de l'inoculum aérien et la meilleure connaissance des interactions entre souches de *P. infestans* et variétés de pomme de terre. Dans cette optique, deux objectifs principaux ont été définis. Ils visaient à caractériser les génotypes de *P. infestans* présents en Belgique en 2019, ainsi qu'à améliorer la connaissance des interactions spécifiques entre le pathogène et la pomme de terre, selon le cultivar et la souche considérés.

La caractérisation des génotypes a permis de montrer que les populations de *P. infestans* continuent à évoluer en Belgique. De nouveaux génotypes uniques ont fait leur apparition et la souche 36_A2 présente une fréquence plus grande cette année, tandis que la souche 37_A2 est en recul. La diminution de l'utilisation de fluazinam pourrait en être la cause. La répartition spatio-temporelle des populations n'est pas homogène à l'échelle belge ou européenne, ce qui démontre l'intérêt d'intégrer les génotypes des souches présentes dans les systèmes de prédiction de cette maladie.

Concernant la caractérisation des interactions souches-cultivars, trois essais préliminaires ont permis de développer un protocole *vitro* sur disques foliaires. Ce dernier offre la possibilité de connaître le nombre seuil de propagules infectieuses nécessaires au développement d'une infection, ainsi que le temps de latence selon le couple souche-cultivar. Ces éléments pourront ensuite être intégrés dans les modèles de prédiction du risque de développement du mildiou en région wallonne.