



HAL
open science

Quand un gène d'avirulence en cache un autre : analyse de l'interaction entre AvrLm3 et AvrLm4-7 chez *Leptosphaeria maculans*

Clémence Plissonneau

► **To cite this version:**

Clémence Plissonneau. Quand un gène d'avirulence en cache un autre : analyse de l'interaction entre AvrLm3 et AvrLm4-7 chez *Leptosphaeria maculans*. Phytopathologie et phytopharmacie. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS021 . tel-01380376

HAL Id: tel-01380376

<https://theses.hal.science/tel-01380376v1>

Submitted on 13 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2015SACLS021

**THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à Université Paris Sud**

ÉCOLE DOCTORALE N° 567
Sciences du végétal : du gène à l'écosystème

Spécialité de doctorat : Biologie

Par

Mme Clémence Plissonneau

Quand un gène d'avirulence en cache un autre :
Analyse de l'interaction entre *AvrLm3* et *AvrLm4-7* chez
Leptosphaeria maculans

Thèse présentée et soutenue à Thiverval-Grignon, le 12 octobre 2015 :

Composition du Jury :

Mme, Jacqui Shykoff

Mme Marie-Laure Desprez-Loustau

M. Bruno Favery

M. Didier Tharreau

M. Thierry Rouxel

DR Laboratoire ESE Paris 11 Orsay

DR INRA Bordeaux

DR INRA Sophia-Antipolis

DR CIRAD Montpellier

DR INRA BIOGER

Présidente

Rapporteuse

Rapporteur

Examinateur

Directeur de thèse



NNT : 2015SACLS021

**THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à Université Paris Sud**

ÉCOLE DOCTORALE N° 567
Sciences du végétal : du gène à l'écosystème

Spécialité de doctorat : Biologie

Par

Mme Clémence Plissonneau

Quand un gène d'avirulence en cache un autre :
Analyse de l'interaction entre *AvrLm3* et *AvrLm4-7* chez
Leptosphaeria maculans

Thèse présentée et soutenue à Thiverval-Grignon, le 12 octobre 2015 :

Composition du Jury :

Mme, Jacqui Shykoff

Mme Marie-Laure Desprez-Loustau

M. Bruno Favery

M. Didier Tharreau

M. Thierry Rouxel

DR Laboratoire ESE Paris 11 Orsay

DR INRA Bordeaux

DR INRA Sophia-Antipolis

DR CIRAD Montpellier

DR INRA BIOGER

Présidente

Rapportrice

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse



Remerciements

J'ai réalisé cette thèse au sein de l'équipe « Effecteurs et pathogenèse chez *Leptosphaeria maculans* », de l'unité de recherche BIOGER de l'INRA Versailles-Grignon.

Tout d'abord, je tiens à remercier **Thierry Rouxel** et **Mylène Balesdent** de m'avoir accueillie au sein de leur équipe et de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse. J'ai beaucoup apprécié votre soutien et vos conseils au cours de ces trois années qui ont été très formatrices pour moi.

Je tiens également à remercier l'INRA pour avoir financé mon projet de thèse, par le biais du Contrat jeune Scientifique, ainsi que le métaprogramme INRA SMACH, pour l'appui financier concernant ces travaux.

Merci à **Marie-Laure Loustau** et **Bruno Favery** pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit de thèse. Je remercie également **Jacqui Shykoff** et **Didier Tharreau** de leur participation à mon jury de thèse.

Merci à **Benoît Moury**, **Sébastien Duplessis** et **Florence Carpentier** d'avoir participé à mes comités de thèse et pour leurs conseils avisés.

Je remercie tous les membres de l'équipe Lepto pour leur accueil et leur disponibilité. Un grand merci à **Isabelle Fudal**, **Juliette Linglin** et **Bénédicte Ollivier** pour leur aide et leurs conseils en biologie moléculaire. Merci à **Françoise Blaise** pour ses dépannages en tout genre et à **Laurent Coudard** pour la gestion des collections de souches de champignon. Merci à **Yohann** pour les pauses « diplomatiques » pendant la rédaction, je te laisse la suite du projet AvrLm3 et je te fais confiance pour en arriver à bout. Je remercie également tous les autres membres de l'équipe : **Michel, Julie, Quentin, Jessica, Audrey...**

Merci également à toutes les personnes de BIOGER que cette thèse m'a donnée l'occasion de rencontrer et de côtoyer: **Elisabetta, Hind, Cindy, Guillaume, David, Saad, Guillaume, Antoine, Jaafar, Martin...**

Merci à **Gaël, Steven, Adrien, Anne-So, Elise, Guigui, Marie, Morgane, Julien, Titou** pour avoir pris l'air intéressé quand je vous parle de champignons et m'avoir parfois rappelé que le monde existait hors de la thèse.

Un grand merci à mes parents pour m'avoir poussée et soutenue tout au long de ces (longues) années d'étude.

Mon plus grand merci va à **Arnaud**, pour ta présence, ton humour, ton amour, et tant d'autres choses. Merci de m'avoir supportée (dans les deux sens du terme) pendant ces trois ans, l'aboutissement de ce projet te doit énormément.

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
Avr	Avirulence
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
CC	Coiled-Coil
cM	centiMorgan
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns
ET	Elément Transposable
ETD	Effector-Triggered Immunity
ETI	Effector Triggered Defense
HRM	High Resolution Melting
HST	Host-Selective Toxin
kb	Kilo base
LRR	Leucine Rich Repeat
MAMP	Microbe-Associated Molecular Patterns
NBS	Nucleotide Binding Site
NLS	Nuclear localization sequence
NGS	Next Generation Sequencing
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPS	Petite Protéine Secrétée
PR	Pathogen Related
PRR	Pattern recognition receptor
PTI	PAMP-Triggered Immunity
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
R	Resistance
RIP	Repeat Induced Point Mutation
RH	Réponse Hypersensible

RLK	Receptor-Like Kinase
RLP	Receptor-Like Protein
RNA-seq	RNA sequencing
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Reverse Transcriptase
TAL	Transcription Activator-Like
TIR	Toll/Interleukin Receptor

Liste des figures

Introduction

Figure 1: Exemples de maladies des plantes causées par des microorganismes.

Figure 2: Pertes de rendements imputées aux maladies causées par les principaux champignons et oomycètes au niveau mondial.

Figure 3: Les différents types d'interactions entre un agent pathogène et ses plantes hôtes et non-hôtes.

Figure 4: Le modèle du Zig-Zag

Figure 5: Mécanismes menant à l'activation de la PTI suite à la reconnaissance de la flagelline par la protéine FLS2.

Figure 6: Exemples de protéines PRR.

Figure 7: Réseaux de signalisation déclenchés par l'activation de la PTI.

Figure 8: Exemple de modes d'action d'effecteurs fongiques.

Figure 9: Stratégies mises en place par divers champignons pour se protéger de l'action des chitinases ou empêcher la reconnaissance des oligomères de chitine par les récepteurs des plantes.

Figure 10: Domaines N-terminaux des effecteurs de champignons et d'oomycètes impliqués dans leur sécrétion et leur translocation dans la cellule végétale.

Figure 11: Les relations "gène-pour-gène" et "inverse-gène-pour-gène".

Figure 12: Les principales classes de protéines de résistance, basées sur leurs homologies structurales.

Figure 13: Les modèles de reconnaissance entre protéine d'avorulence et protéine de résistance.

Figure 14: Evolution des résistances RPM1 et RPS2 chez *Arabidopsis thaliana*.

Figure 15: La course aux armements au sein d'un pathosystème.

Figure 16: Régions génomiques riches en gènes codants pour des effecteurs chez les champignons et les oomycètes.

Figure 17: Le génome de *Brassica napus*.

Figure 18: Relation phylogénétique et temps de divergence entre les champignons de la classe des Ascomycètes.

Figure 19: Le cycle de développement de *Leptosphaeria maculans* en Europe.

Figure 20: La structuration en isochores du génome de *Leptosphaeria maculans*.

Figure 21: Fréquence des allèles avirulents des gènes *AvrLm1* à *AvrLm9* chez les populations européennes de *Leptosphaeria maculans*.

Chapitre 1

Article

Figure 1: Genetic and physical maps of the *AvrLm4-7* – *AvrLm3* genomic region of *Leptosphaeria maculans*.

Figure 2: Interaction phenotypes between *Brassica napus* lines and *Leptosphaeria maculans* isolates complemented with the a4A7 and A4A7 alleles of the *AvrLm4-7* gene.

Figure 3: *AvrLm3* annotation, sequence and polymorphism.

Figure 4: Interaction phenotypes between *Brassica napus* lines and *Leptosphaeria maculans* a3a7 isolate Nz-T4 complemented with the *AvrLm3* gene.

Figure 5: *AvrLm3* and *AvrLm4-7* expression during *in vitro* growth and plant colonization.

Figure S1: Interaction phenotype of wild type and transformed *Leptosphaeria maculans* isolates on *Rlm3* and *Rlm7* lines.

Figure S2: Characterization of *Leptosphaeria maculans* isolates silenced for *AvrLm4-7*

Figure S3: Genetic mapping and relative expression of *AvrLm3* using HRM method

Figure S4: Sequence alignment between the avirulence proteins *AvrLm3* and *AvrLmJ1* of *Leptosphaeria maculans*.

Figure S5: Functional validation of *AvrLm3* by silencing experiments.

Figure S6: Absence of physical interaction between *AvrLm3* and *AvrLm4-7* proteins in Yeast-Two-Hybrid heterologous system.

Résultats complémentaires

Figure 1 : Localisation subcellulaire d'*AvrLm3*.

Chapitre 2

Figure 1: Isoforms of the avirulence protein *AvrLm3*.

Figure 2: Phylogenetic relationship between *AvrLm3* alleles.

Figure 3: Polymorphic amino acids of the avirulence protein *AvrLm4-7* in isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7* displaying an avirulent allele of *AvrLm3*.

Figure 4: 3D Structure of *AvrLm4-7* avirulence protein.

Figure 5: Interaction phenotypes on *Rlm3* and *Rlm7* *Brassica napus* lines of *Leptosphaeria maculans* isolates complemented with alleles of *AvrLm4-7*.

Figure 6: Relationship between expression level of *AvrLm3* and virulence of *Leptosphaeria maculans* isolates on susceptible cultivars.

Figure 7: Model for evolution of *AvrLm3* and *AvrLm4-7* in *Leptosphaeria maculans*.

Figure S1: Nucleotide polymorphism between the 22 alleles of *AvrLm3* characterized.

Figure S2: RIPcal analyses of *AvrLm3* alleles.

Figure S3: Amino acid polymorphism between the three alleles of *AvrLm4-7* generated by directed mutagenesis.

Figure S4: Interaction phenotypes between *Rlm4* *Brassica napus* lines and *Leptosphaeria maculans* isolates complemented with alleles of *AvrLm4-7*.

Figure S5: Correlation between the level of residual expression of *AvrLm3* and the virulence of *Leptosphaeria maculans* isolates.

Discussion générale

Figure 1 : Hypothèses de mécanismes conduisant à la suppression de l'interaction entre *AvrLm3* et *Rlm3* par *AvrLm4-7*.

Figure 2 : Symptômes d'incompatibilité sur des cultivars de *Brassica napus* *Rlm3* ou *Rlm7*.

Figure 3 : La présence d'*AvrLm4-7* entraîne une hausse de la surface des symptômes causés par *Leptosphaeria maculans* sur des cultivars sensibles de *Brassica napus*.

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1 : Les protéines PR.

Tableau 2 : Exemples de peptides antimicrobiens produits suite à l'activation de la PTI.

Chapitre 1

Article

Table 1 : Segregation of avirulence of *Leptosphaeria maculans* towards *Rlm3* in cross #69

Table S1 : List and characteristics of polymorphic molecular markers used for AvrLm3 mapping in cross #69

Table S2 : Primers used for vector constructions and qRT-PCR

Table S3 : List of transformation experiments of *Leptosphaeria maculans* isolates

Table S4 : Top 25 genes expressed by four *Leptosphaeria maculans* isolates at 7 days after inoculation of the compatible *Brassica napus* cultivar Darmor-bzh.

Table S5 : *AvrLm3* sequence polymorphism between G06-E107 and Nz-T4, the parent isolates of cross #69

Résultats complémentaires

Tableau 1 : Cibles végétales potentielles d'AvrLm3 et AvrLm4-7 identifiées par crible double hybride.

Chapitre 2

Table 1 : Repartition of avirulence towards *Rlm3* or *Rlm7* in collections of *Leptosphaeria maculans*.

Table 2 : Presence of the avirulence genes *AvrLm3* and *AvrLm4-7* in a selection of *Leptosphaeria maculans* isolates evaluated by PCR amplification of the genes.

Table 3 : Geographic origin and phenotype of isolates in which *AvrLm3* was sequenced.

Table 4 : Analysis of positive selection in the *AvrLm3* coding sequence

Table 5 : Polymorphic sites identified in *AvrLm3* protein sequence and the associated phenotypes.

Table 6 : Amino acid polymorphism of AvrLm4-7 between isolates used for *Leptosphaeria maculans* transformation.

Table S1 : List and characteristics of isolates used in this study.

Table S2 : Primers used in this study.

Sommaire

Introduction

1	Les interactions plantes-microorganismes	19
1.1	Les différents modes de vie des microorganismes associés aux plantes	19
1.2	L'impact des agents pathogènes sur les cultures	19
2	Les réponses des plantes aux agents pathogènes	25
2.1	Les différents types de réponse aux agents pathogènes	25
2.2	Les défenses basales des plantes	25
2.3	La PTI	27
2.4	Les effecteurs sécrétés par les agents pathogènes	31
2.4.1	Définition	31
2.4.2	Mode d'action et cibles des effecteurs	31
2.4.3	Translocation des effecteurs dans la cellule hôte	36
2.4.4	Les répertoires d'effecteurs fongiques	37
2.5	L'ETI	37
2.5.1	La relation gène-pour-gène	37
2.5.2	Les gènes de résistance	39
2.5.3	La reconnaissance des protéines d'avirulence par les protéines de résistance	41
2.5.4	Les réponses de défense induites par l'ETI	46
2.6	Un modèle plus complexe ?	46
3	Le contournement de l'ETI par les agents pathogènes	49
3.1	La course aux armements	49
3.2	Mécanismes moléculaires permettant l'acquisition de la virulence	50
3.2.1	Modification du gène d'avirulence	50
3.2.2	Influence de l'environnement génomique des effecteurs sur leur évolution	53
3.3	Le coût de la virulence	53
3.4	L'enjeu de la durabilité des résistances variétales	54
4	Le pathosystème <i>Brassica napus</i> / <i>Leptosphaeria maculans</i>	57
4.1	<i>Brassica napus</i>	57
4.2	<i>Leptosphaeria maculans</i>	57
4.2.1	Description et phylogénie	57
4.2.2	Cycle de vie	59
4.2.3	Le génome de <i>L. maculans</i>	61
4.2.4	Les gènes d'avirulence de <i>L. maculans</i>	63
4.3	Les méthodes de lutte contre <i>L. maculans</i>	65
4.3.1	Gestion agronomique	65
4.3.2	Lutte chimique	65

4.3.3	Lutte variétale	66
4.4	Le contournement des résistances variétales de <i>B. napus</i> par <i>L. maculans</i>	66
4.5	<i>Rlm7</i> une résistance spécifique plus durable ?	69
5	Objectif de la thèse	77

Chapitre 1

Identification et clonage d'*AvrLm3*

Introduction	83
---------------------	----

Article 1	85
------------------	----

A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*

Résultats complémentaires	135
---------------------------	-----

Chapitre 2

Analyse de la diversité d' *AvrLm3* et identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la virulence vis-à-vis de *Rlm3*

Introduction	145
---------------------	-----

Article 2	147
------------------	-----

Unusual evolutionary mechanisms to escape Effector-Triggered-Immunity in the fungal phytopathogen *Leptosphaeria maculans*

Discussion	207
-------------------	-----

Annexes	235
----------------	-----

Références bibliographiques	255
------------------------------------	-----

INTRODUCTION



Figure 1: Exemples de maladies des plantes causées par des microorganismes.

A. Tâches bactériennes sur feuille de poivron (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Vesicatoria*). **B.** Symptômes causés par le Cowpea severe mosaic virus (CpSMV) sur feuilles de niébé. **C.** Chancre bactérien du citron (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*). **D.** Rhizoctone du riz (*Rhizoctonia solani*). **E.** Pourriture de fruit de papaye causée par *Stemphylium lycopersic*. **F.** Oïdium de l'hévéa (*Oidium heveae*). **G.** Maladie du sikatoga ou cercosporiose sur feuilles de banane (*Mycosphaerella fijensis*). **H.** Pyriculariose du riz (*Pyricularia grisea*). **I.** Symptômes causés par le nématode à galles *Meloidogyne hapla* Chitwood sur des racines de carottes. **J.** Ergot du seigle (*Claviceps purpurea*). **K.** Anthracnose du poivron (*Colletotrichum capsici*). **L.** Sévère attaque d'oïdium sur parcelle de soja (*Microsphaera diffusa*). **M.** Nécrose réticulée de la pomme de terre (*Potato leafroll virus*).

Adapté de apsnet.com

1 Les interactions plantes-microorganismes

1.1 Les différents modes de vie des microorganismes associés aux plantes

Dans les écosystèmes, les plantes sont en contact avec une grande diversité de microorganismes : virus, bactéries, nématodes, oomycètes ou champignons. Ces interactions peuvent être de différents types, neutres, bénéfiques ou néfastes pour les plantes. Les microorganismes saprophytes se développent sur la matière organique morte et jouent un grand rôle dans les écosystèmes en permettant le turn-over de la matière organique. Les microorganismes se développant sur les tissus végétaux vivants peuvent avoir un comportement de symbiotisme ou de parasitisme. Les microorganismes symbiotiques établissent une interaction réciproquement bénéfique avec leur hôte, par exemple via l'échange de divers nutriments et minéraux. Les microorganismes parasites, quant à eux, sont préjudiciables au développement de leur plante hôte, pouvant aller jusqu'à causer leur mort (Figure 1). Ils sont généralement classés selon leur mode de vie. Les biotrophes se développent sur de la matière organique vivante, tandis que les nécrotrophes tuent les tissus végétaux pour s'y développer. Enfin, les microorganismes hémibiotrophes alternent ces deux modes de nutrition au cours de leur cycle de développement. Cette classification un peu simpliste reste toutefois sujette à de nombreux débats au sein de la communauté des phytopathologistes et un même organisme peut être considéré comme un nécrotrophe ou comme un hémibiotrophe selon les auteurs (Sánchez-Vallet *et al.*, 2015).

1.2 L'impact des agents pathogènes sur les cultures

Les microorganismes pathogènes des plantes ont un fort impact au sein des agrosystèmes cultivés. Chaque année, plus de 10 % de la production agricole mondiale est perdue suite aux dommages causés par les agents phytopathogènes (Figure 2) (Strange & Scott, 2005). Ceux-ci constituent donc une grave menace pour la sécurité alimentaire globale, dans un contexte d'augmentation continue de la population mondiale, qui pourrait atteindre 9 milliards d'êtres humains à l'horizon 2050.

Par le passé, certaines épidémies ont eu des conséquences dramatiques pour les populations humaines. Au XIX^{ème} siècle, la famine irlandaise, causée par l'agent du mildiou de la pomme de terre, *Phytophthora infestans*, a causé la mort de près d'un million de personnes et a poussé près de deux millions d'irlandais à émigrer vers les Etats-Unis. Plus

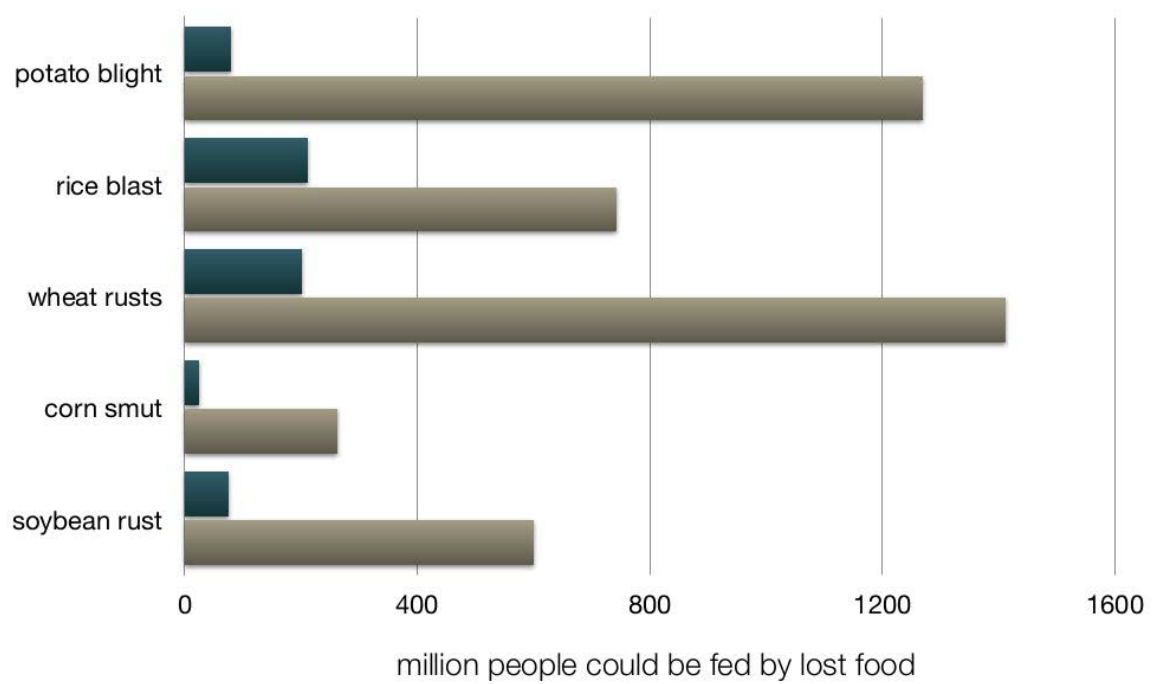


Figure 2: Pertes de rendements imputées aux maladies causées par les principaux champignons et oomycètes au niveau mondial.

Les barres grises indiquent le nombre de personnes pouvant être nourries avec la production annuelle des principales cultures, les barres bleues foncées indiquent les pertes de rendement dues aux maladies des plantes.

Adapté de <http://fr.slideshare.net/SophienKamoun/plant-pathology-in-the-postgenomics-era>

récemment, le champignon *Helminthosporium oryzae* a été à l'origine de l'une des plus importantes famines du XX^{ème} siècle. En 1943, la destruction des récoltes de riz par ce champignon a été responsable de la mort de trois millions de personnes au Bengale (Padmanabhan, 1973).

Le contrôle des agents phytopathogènes est donc un enjeu majeur pour assurer la sécurité alimentaire des populations. Or, dans les agrosystèmes standardisés modernes, les conditions sont généralement favorables au développement des épidémies : grande taille des parcelles agricoles, faible diversité des espèces cultivées au champ et des génotypes d'une espèce donnée, raccourcissement des rotations, développement du travail minimum du sol entre cultures... De plus, les changements climatiques actuels font envisager l'émergence de nouveaux agents pathogènes (Anderson *et al.*, 2004). Pour limiter les dommages causés par les agents pathogènes dans les agrosystèmes, l'homme a développé diverses méthodes de lutte. Tout d'abord, les pratiques culturales permettent de limiter les quantités d'inoculum, par la rotation des cultures et l'enfouissement des résidus. La lutte chimique est également très utilisée depuis le début du XX^{ème} siècle et a permis d'accroître sensiblement les rendements (Hirooka & Ishii, 2013). Enfin, la lutte génétique repose sur l'utilisation de résistances variétales pour lutter contre les agents pathogènes. Deux types de résistances variétales sont différenciées (Figure 3). La résistance quantitative assure un niveau de résistance partiel à la plante hôte suite à sa colonisation par un agent pathogène. Elle est généralement considérée comme multigénique et multifactorielle et est efficace contre l'ensemble des individus d'une espèce d'agent pathogène donnée. La résistance qualitative, quant à elle, confère une résistance totale aux agents pathogènes. Elle n'est toutefois efficace que contre certains pathovars ou races d'une espèce d'agent pathogène donnée. Dans le cas d'une résistance partielle ou quantitative, l'agent pathogène a la capacité de coloniser la plante hôte, mais seulement de façon limitée, ce qui diminue son impact sur le rendement. A l'inverse, dans le cas d'une résistance qualitative, le développement sur la plante hôte des souches incompatibles est impossible.

Au cours du XIX^{ème} siècle, les travaux de Pasteur et de Koch ont mis en évidence la responsabilité des microorganismes dans le développement de maladies. Par la suite, les travaux de génétique effectués par Flor dans les années 1940 ont permis d'identifier le

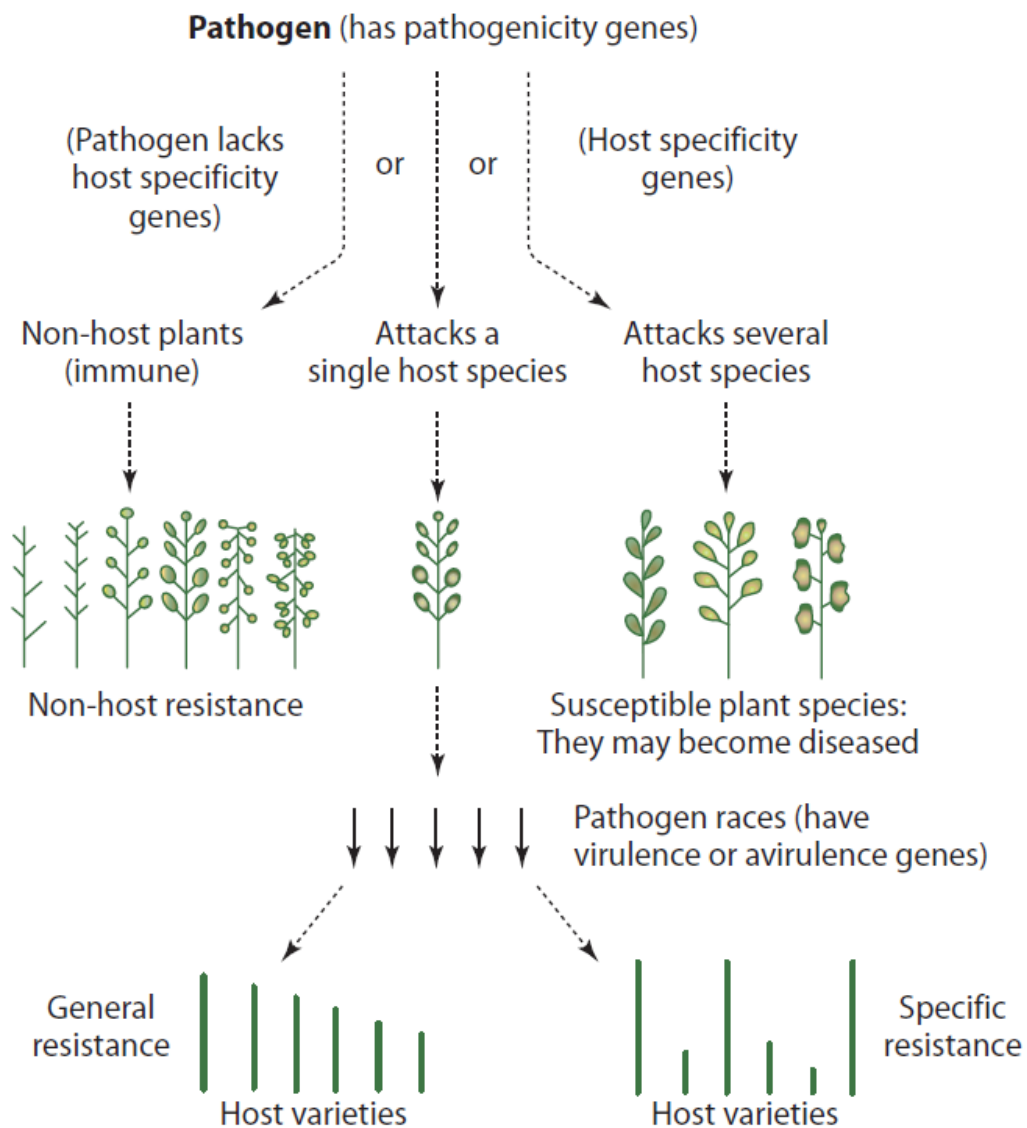


Figure 3: Les différents types d'interactions entre un agent pathogène et ses plantes hôtes et non-hôtes.

Adapté de Agrios (2005).

caractère héréditaire et mono ou oligogénique de la compatibilité ou de l'incompatibilité entre une plante hôte et un agent phytopathogène dans le cas d'une résistance qualitative (Flor, 1946). Dans les années 1990, l'avènement de la biologie moléculaire a permis de mieux caractériser les gènes impliqués dans les interactions entre plantes et microorganismes. Enfin, la baisse des coûts de séquençage, résultant du développement des technologies de seconde génération (NGS), a rendu accessible les séquences des génomes de nombreuses plantes et de leurs agents pathogènes associés.

L'introduction de ce manuscrit de thèse présente les mécanismes génétiques et moléculaires à la base des interactions entre plantes et agents pathogènes, ainsi que les mécanismes moléculaires permettant aux agents pathogènes de contourner les résistances des plantes.

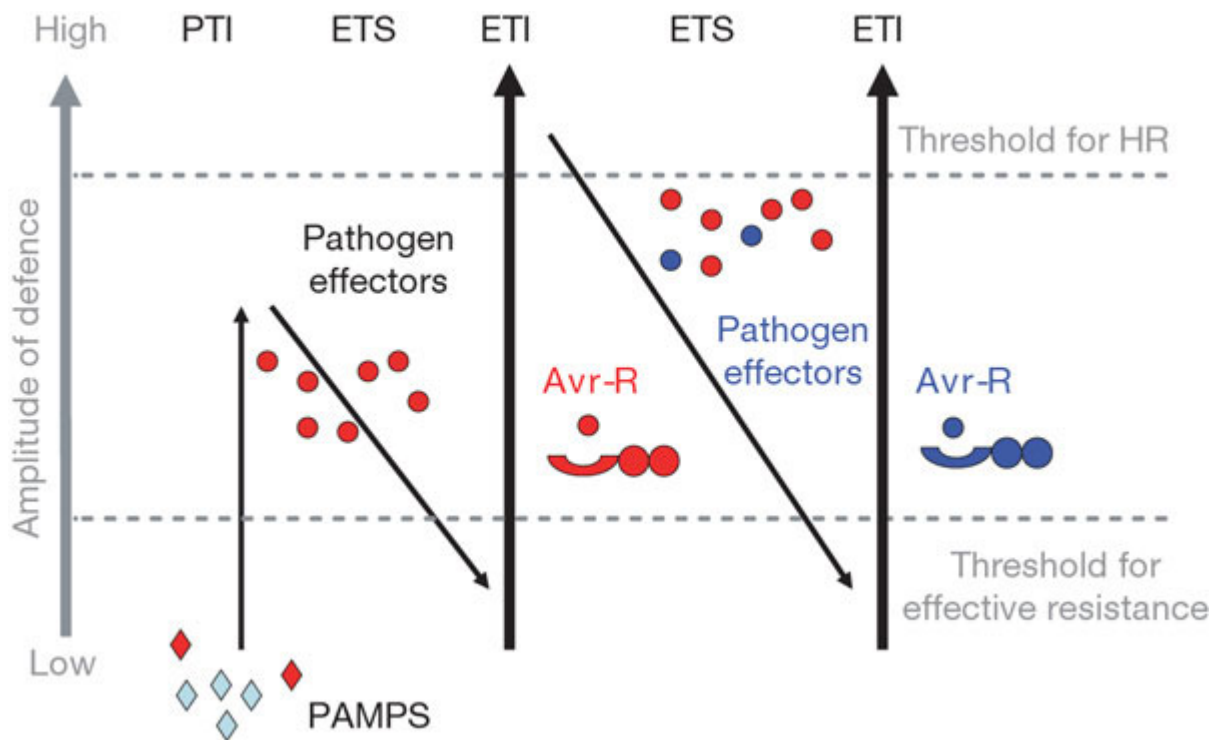


Figure 4: Le modèle du Zig-Zag

Dans le cas d'une interaction plante-agent pathogène, la reconnaissance par la plante des signatures moléculaires de l'agent pathogène appelées Pathogen-Associated-Molecular-Pattern (PAMP) déclenche la Pattern-Triggered-Immunity (PTI). Les agents pathogènes ont évolué des molécules appelées effecteurs (Effector-Triggered-Susceptibility ; ETS) qui leur permettent de contourner la PTI. Ces effecteurs peuvent être reconnus spécifiquement par les protéines de résistance de la plante, déclenchant la mise de place de l'Effector-Triggered-Immunity (ETI), une réponse de défense de plus forte intensité que la PTI. La pression de sélection exercée par ces protéines de résistance sur les populations d'agents pathogènes conduit à l'apparition de nouveaux effecteurs, qui peuvent à leur tour être perçus par la plante.

Adapté de Jones et Dangl (2006).

2 Les réponses des plantes aux agents pathogènes

2.1 Les différents types de réponse aux agents pathogènes

Les plantes disposent d'un panel de mécanismes de défense pour se défendre contre les agents pathogènes, ce qui permet de leur assurer une résistance partielle ou totale face aux bioagresseurs (Figure 3). En 2006, Jones et Dangl ont proposé le modèle évolutif et fonctionnel du « Zig-Zag » pour résumer les différents niveaux de défense des plantes face aux agents pathogènes et l'évolution de ceux-ci aux cours de la coévolution plante-agent pathogène (Figure 4), permettant d'établir une distinction entre les défenses basales de la plante, à large spectre de résistance, et les défenses spécifiques, activées par la reconnaissance d'un agent pathogène en particulier.

2.2 Les défenses basales des plantes

Dans une immense majorité des cas, les interactions entre une plante et un microorganisme phytopathogène sont qualifiées de non-hôte (Figure 3). En effet, un agent pathogène donné ne peut coloniser qu'un faible nombre d'espèces végétales, qui constituent son spectre d'hôte. La notion de résistance "non-hôte" reste toutefois très vague et très variable selon les auteurs. Elle ne traduit au final qu'une absence de compatibilité entre une espèce végétale et une espèce d'agent pathogène. Celle-ci peut être due à de simples critères géographiques (absence de coïncidence entre les aires de répartition de l'hôte et de l'agent pathogène) ou temporels (absence de coïncidence entre le cycle de développement de l'hôte et celui de l'agent pathogène), un substrat inadéquat pour supporter la croissance ou la nutrition de l'agent pathogène, l'existence de barrières préformées infranchissables par l'agent pathogène, ou encore la mise en place de barrières induites efficaces contre l'ensemble d'une espèce d'agent pathogène. Certains auteurs suggèrent que la résistance non-hôte résulte d'une coévolution non-aboutie entre les deux partenaires, l'agent pathogène n'ayant différencié qu'une partie des effecteurs (cf. 2.4) dont il a besoin pour contourner les défenses de l'hôte (Schulze-Lefert & Panstruga, 2011). L'adaptation à une espèce végétale donnée serait alors liée à la capacité de mise en place par l'agent pathogène d'un arsenal d'effecteurs compatibles et avec une interférence la mieux adaptée possible aux voies métaboliques de cette espèce végétale. Ainsi, le spectre d'hôte peut être réduit à une espèce ou à un ordre donné, ce qui est généralement le cas pour les champignons

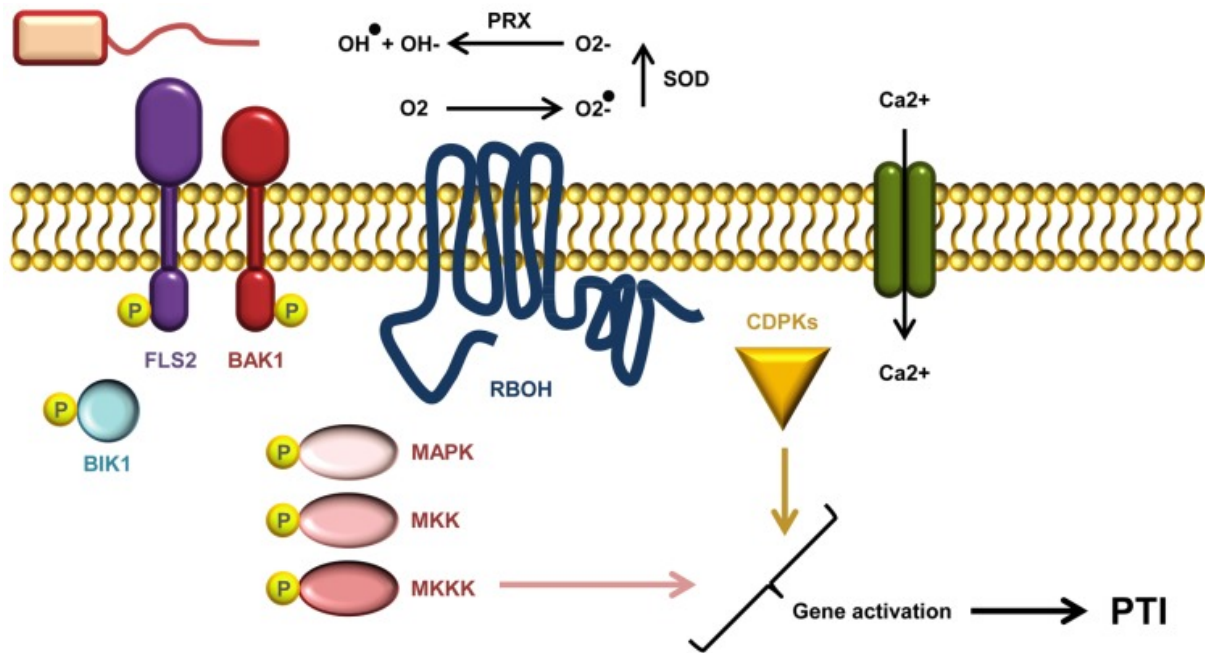


Figure 5: Mécanismes menant à l'activation de la PTI suite à la reconnaissance de la flagelline par la protéine FLS2.

Suite à l'interaction directe entre flg22 et FLS2, un complexe se forme avec les protéines BAK1 et BIK1, ce qui a pour effet d'entraîner une cascade de signalisation par le biais de la phosphorylation de MAP kinases ainsi qu'un afflux massif d'ions calcium (Ca²⁺) dans la cellule. Ces signaux déclenchent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'activation des gènes de défense de la plante. Adapté de Malinovsky *et al.* (2014).

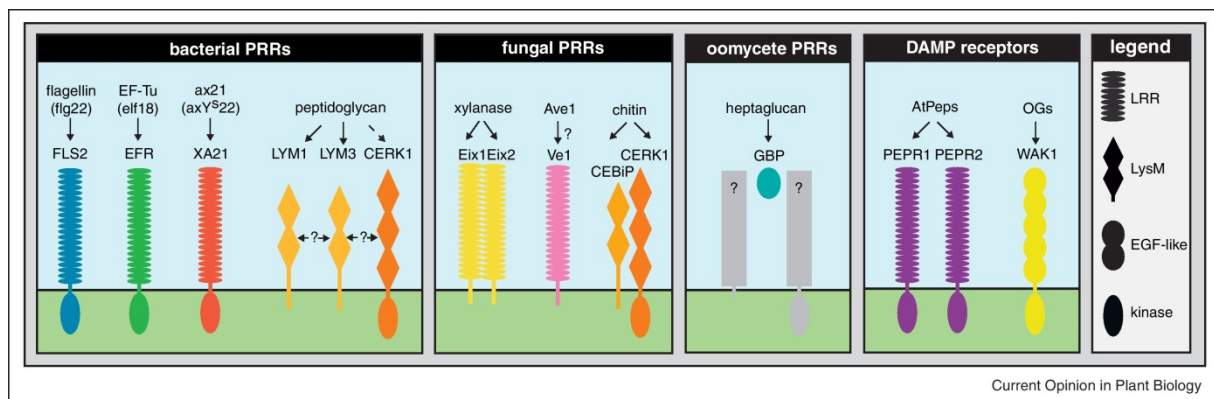


Figure 6: Exemples de protéines PRR.

Le déclenchement de la PTI résulte de la reconnaissance de PAMP par les Pattern-Recognition-Receptor (PRR). Les PRR contiennent généralement un domaine extra cellulaire riche en leucine (LRR) et un domaine transmembranaire. Les PRR de type RLK possèdent un domaine kinase intracellulaire impliqué dans la transduction du signal de reconnaissance, dont les PRR de type Receptor-Like-Protein (RLP) sont dépourvus, suggérant l'intervention d'autres protéines dans la transduction du signal. Adapté de Monaghan et Zipfel (2012).

biotrophes tels que les oïdiums, ou présenter un spectre d'hôte très large, comme dans le cas du champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*, capable d'attaquer près de 300 espèces végétales différentes.

Pour coloniser une plante, les microorganismes doivent tout d'abord être capables d'adhérer aux parois végétales et de franchir ses barrières structurales. La cuticule a notamment un rôle primordial de barrière contre les agents pathogènes aériens (Yeats & Rose, 2013). Toutefois, certains champignons phytopathogènes ont acquis la capacité de perforer la cuticule par l'utilisation d'enzymes particulières (cutinases) et/ou la différenciation de structures appelées appressoria, qui leur permettent de pénétrer les cellules végétales en exerçant une forte pression mécanique sur les parois végétales (Deising *et al.*, 2000). La biosynthèse constitutive d'enzymes antimicrobiennes et de composés toxiques (phytoanticipines) constitue ensuite une seconde ligne de défense lorsque les agents pathogènes ont réussi à pénétrer les tissus végétaux (Clay, 2011; Stotz *et al.*, 2013).

2.3 La PTI

Des mécanismes de défense induits peuvent aussi constituer cette seconde ligne de défense générique contre un grand nombre d'agents pathogènes. Ainsi, la reconnaissance par les plantes de composés microbiens appelés Pathogen-Associated-Molecular-Patterns (PAMP) ou Microbe-Associated-Molecular-Patterns (MAMP) déclenche une réaction de défense appelée Pathogen-Triggerred Immunity (PTI). Les PAMP sont des signatures moléculaires conservées chez les agents pathogènes, correspondant fréquemment à des composés constitutifs extracellulaires, tels que la chitine chez les champignons ou la flagelline chez les bactéries (Schwessinger & Zipfel, 2008; Dodds & Rathjen, 2010; Malinovsky *et al.*, 2014).

La flagelline est une protéine essentielle à la motilité des bactéries et les mécanismes déclenchant la PTI suite à sa reconnaissance ont été largement étudiés. Un motif de 22 acides aminés nommé flg22 est reconnu par le récepteur membranaire FLS2 ou Flagellin-sensitive-2 (Gómez-Gómez & Boller, 2000). Suite à cette reconnaissance, FLS2 interagit avec la protéine BAK1 (BCL2-Antagonist/Killer 1) pour activer les voies de signalisation déclenchant la PTI (Figure 5) (Chinchilla *et al.*, 2007).

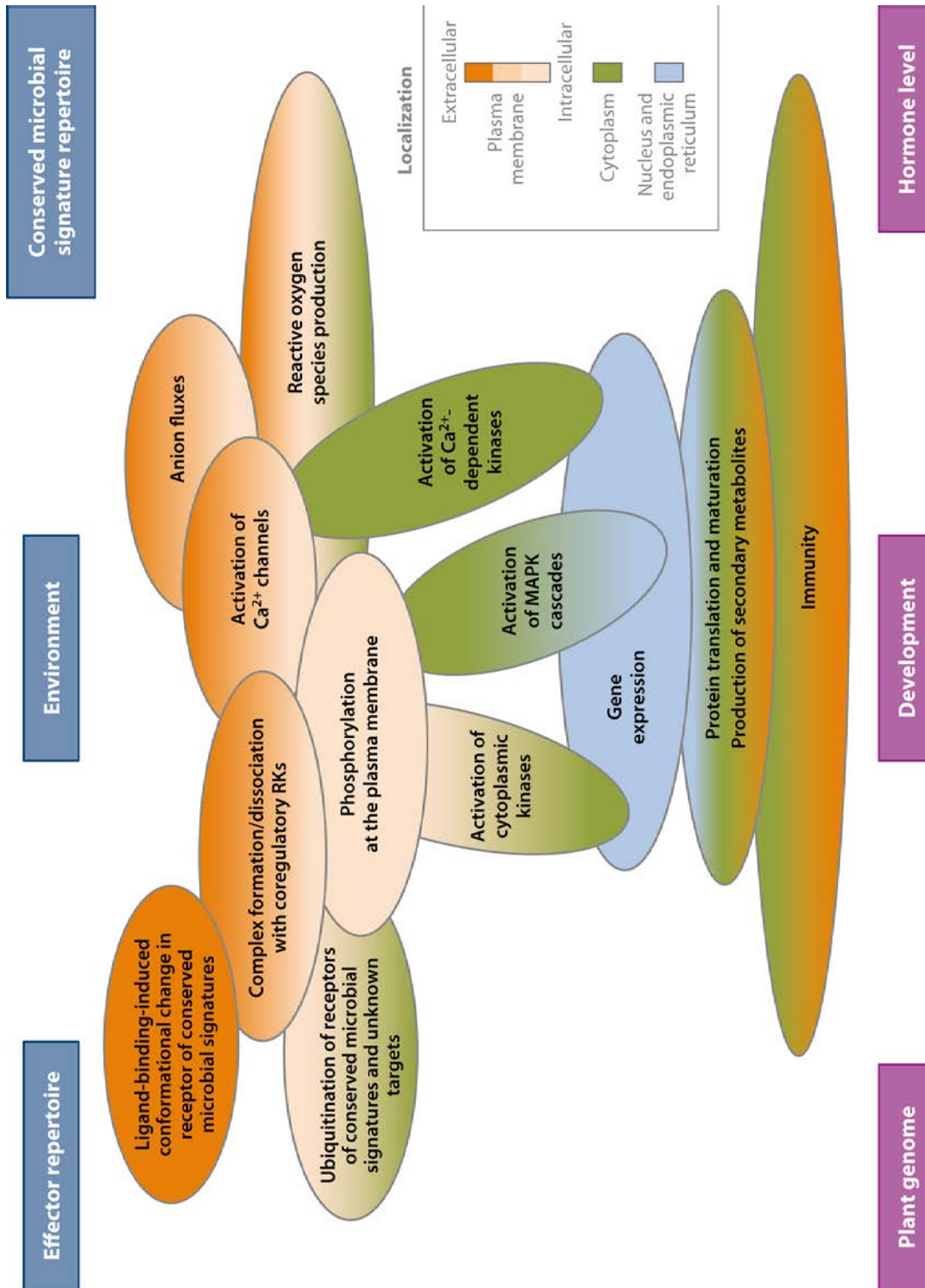


Figure 7: Réseaux de signalisation déclenchés par l'activation de la PTI.

La perception des PAMP par les PRR entraîne l'activation d'un réseau de signalisation complexe, qui aboutit à la mise en place des réactions de défense de la plante.

Adapté de Schwessinger & Ronald (2012).

Il est à noter que la PTI peut également être activée par la reconnaissance de Damage-Associated-Molecular-Patterns (DAMP). Dans ce cas, la plante détecte de manière aspécifique les modifications cellulaires induites par l'agent pathogène lors de l'infection. Par exemple, la libération d'acide galacturonique résultant de la dégradation de la paroi cellulaire par un agent pathogène induit les mécanismes de défense de la plante (Hahn *et al.*, 1981).

La reconnaissance des PAMP par la plante hôte se fait généralement par le biais d'une interaction directe avec des récepteurs membranaires appelés Pattern-Recognition Receptor (PRR) (Monaghan & Zipfel, 2012). Les PRR peuvent être de la famille des Receptor-Like Kinase (RLK) ou des Receptor-Like Protein (RLP) (Tör *et al.*, 2009). Ils se caractérisent par un domaine transmembranaire, un domaine extracellulaire interagissant avec les PAMP, ainsi qu'un domaine cytoplasmique (Figure 6). L'activation de la PTI permet la mise en place rapide et locale de réactions de défense par la plante, dès les premières minutes suivant la reconnaissance (Figure 7). Tout d'abord, on observe un influx massif d'ions calciums (Ca^{2+}) dans la cellule, ainsi qu'un efflux d'ions potassium (K^+) dans le milieu extracellulaire, qui conduisent à son alcalinisation. L'augmentation de la concentration des ions Ca^{2+} dans le cytoplasme active des kinases calcium-dépendantes dont la cascade de signalisation a pour conséquence l'activation de gènes de défense et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La production de ROS a lieu par l'intermédiaire de NADPH plasmiques et, au-delà de la toxicité directe des ROS pour l'agent pathogène, la production de ceux-ci entraîne une fermeture des stomates de la plante (Wu *et al.*, 2014).

Dans l'heure suivant la reconnaissance d'un agent pathogène, l'activation de la PTI induit la transcription de gènes codants pour des protéines de défense ou Pathogen-Related protein (PR). Les protéines PR agissent de façon directe ou indirecte pour limiter le développement des agents pathogènes et 17 familles de protéines PR ont été caractérisées (van Loon *et al.*, 2006) (Tableau 1). Divers peptides antimicrobiens sont également produits et sécrétés dans l'apoplasme (Tableau 2). Ces composés antimicrobiens incluent des métabolites secondaires appelés phytoalexines, telles que la camalexine d'*Arabidopsis thaliana* et d'autres crucifères (Tsuji *et al.*, 1992). Les peptides antimicrobiens ont généralement un effet toxique causant la

Tableau 1: Les protéines PR.

Family	Type member	Properties	Gene symbols
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	B-1,3-glucanase	<i>Ypr2</i>
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, III, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3, Chia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II	<i>Ypr4, Chid</i>
PR-5	Tobacco S	Thaumatococcus-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor 1	Proteinase inhibitor	<i>Ypr6, Pis</i>
PR-7	Tomato P ₆₉	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III	<i>YPr8, Chib</i>
PR-9	Tobacco « lignin-forming peroxydase	Peroxydase	<i>Ypr9, Prx</i>
PR-10	Parsley « PR1 »	Ribonuclease-like	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco « class V » chitinase	Chitinase type I	<i>Ypr11, Chic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin	<i>Ypr13, Thi</i>
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein	<i>Ypr14, Ltp</i>
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate oxydase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown	<i>Ypr17</i>

Le déclenchement de la PTI induit la transcription des gènes codant pour les protéines PR. Les 17 familles de protéines PR ont différentes propriétés, et permettent d'inhiber la colonisation de la plante hôte par les agents pathogènes.

Adapté de van Loon *et al.* (2006).

Tableau 2: Exemples de peptides antimicrobiens produits suite à l'activation de la PTI

Plant Product	Function	Molecular description	Reference
Reactive oxygen species (ROS)	Oxidative damages to pathogens		O'Brien <i>et al.</i> (2012)
Nitric oxide radical	Signalling molecules		Mur <i>et al.</i> (2013)
Phytoalexins	Anti-microbial	Low molecular weight secondary metabolites	Ahuja <i>et al.</i> (2012)
Polyamines		Basic small molecules	Walters (2003)
Cyclotides	Anti-microbial	Cyclic peptides (~3 kDa)	Craik (2012)
Extracellular ATP	Signalling molecules	Nucleoside triphosphate	Chivasa <i>et al.</i> (2009)
Proteinase inhibitor (PR-6)	Enzyme inhibition, interference with replication	Peptides (~8 kDa)	Sels <i>et al.</i> (2008)
Defensins (PR-12)	Induced pathogen cell-death	Basic peptides (~5 kDa)	De Coninck <i>et al.</i> (2013)
Thionins (PR-13)	Increase pathogen plasma membrane permeability	Cysteine-rich peptides (~5 kDa)	Stec (2006)
Lipid transfert proteins (LTPs, PR-14)	Increase pathogen plasma membrane permeability	Basic peptides (7 or 10 kDa)	Carvalho and Gomes (2007)

Adapté de Mott *et al.* (2014)

mort ou la lyse des cellules de l'agent pathogène, mais peuvent aussi être des inhibiteurs des enzymes de dégradation sécrétées par les bioagresseurs (Mott *et al.*, 2014).

Plus tardivement, on observe au niveau du site d'infection une apposition de callose, un polymère de β -1,3-glucane, qui limite la pénétration des agents pathogènes dans les cellules végétales en renforçant leurs parois (Voigt, 2014). Toutefois, le rôle intrinsèque de l'apposition de callose dans la défense contre les agents pathogènes est sujet à débat. En effet, la résistance vis-à-vis de diverses espèces d'oïdium chez des mutants d'*A. thaliana* chez qui la voie de biosynthèse de la callose est inactivée a mis en évidence son rôle de régulateur négatif de la voie de l'acide salicylique (Nishimura *et al.*, 2003).

2.4 Les effecteurs sécrétés par les agents pathogènes

2.4.1 Définition

Afin de contourner les défenses générales des plantes, les agents pathogènes utilisent un arsenal complexe de molécules, comprenant des enzymes de dégradation, des toxines, des inhibiteurs des enzymes de l'hôte, des effecteurs etc... Très récente chez les filamenteux phytopathogènes, la notion d'effecteur se rapporte à toute molécule sécrétée lors de l'interaction avec la plante hôte, ayant pour but de manipuler la structure et les fonctions de la cellule hôte, que ce soit afin de supprimer les mécanismes de défense induits par la PTI ou pour faciliter l'acquisition de nutriments. De façon plus restrictive, la notion d'effecteur se rapporte souvent à un ensemble de petites protéines sécrétées et présentant souvent très peu d'homologies avec les autres protéines référencées dans les bases de données.

2.4.2 Mode d'action et cibles des effecteurs

Malgré de grandes différences de séquence ou de mécanisme de translocation dans les cellules végétales, la caractérisation fonctionnelle d'un nombre croissant d'effecteurs a mis en évidence des grandes catégories de modes d'action communs chez les agents pathogènes bactériens, oomycètes et fongiques (Figure 8).

L'activation de la PTI suite à la reconnaissance des PAMP d'un agent pathogène induit la sécrétion par la plante de diverses enzymes et composés antimicrobiens dans l'apoplasme (cf. 2.3). Afin d'échapper à ces réponses de défense, certains effecteurs ont la capacité

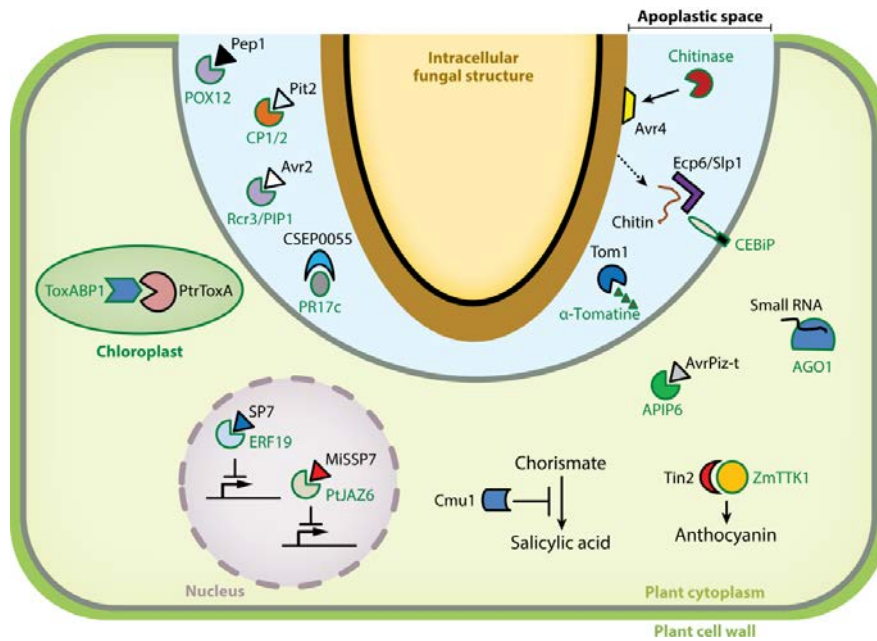


Figure 8: Exemple de modes d'action d'effecteurs fongiques.

Les effecteurs sécrétés par les agents pathogènes lors de l'infection peuvent agir dans l'apoplasme, ou être transloqués dans les cellules végétales, ou ils perturbent divers mécanismes cellulaires (expression des gènes, voies hormonales, photosynthèse,...)

Adapté de Lo Presti *et al.* (2015)

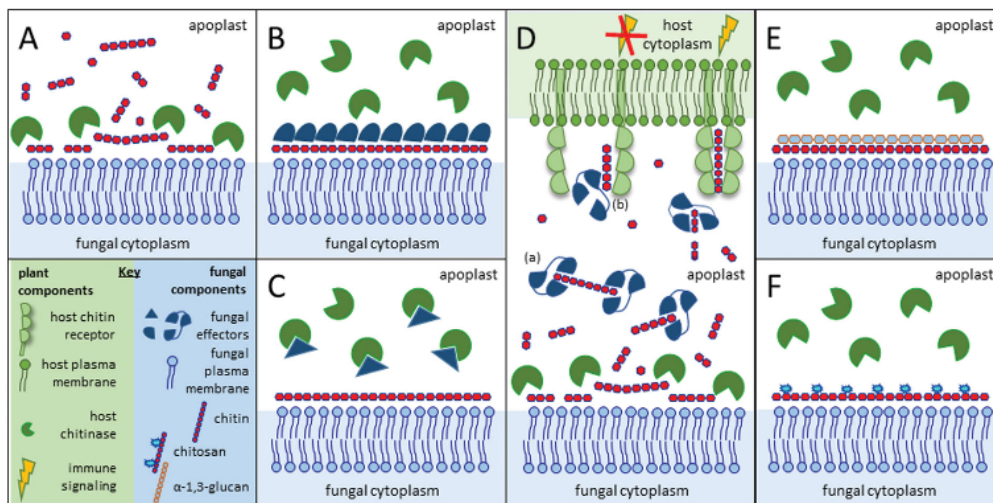


Figure 9: Stratégies mises en place par divers champignons pour se protéger de l'action des chitinases ou empêcher la reconnaissance des oligomères de chitine par les récepteurs des plantes.

A. La chitine des parois cellulaires fongiques est ciblée par les chitinases sécrétés par la plante hôte, ce qui peut mener à l'hydrolyse des hyphes. Les fragments de chitine libérés peuvent être perçus par les protéines PR de la plante hôte. **B.** Des effecteurs se fixent à la paroi cellulaire des champignons pour la protéger de l'action des chitinases. **C.** Des effecteurs ont la capacité de se fixer aux chitinases, afin d'inhiber leur action. **D.** Les effecteurs LysM perturbent la reconnaissance de la chitine par les récepteurs LysM. **E.** L'accumulation de α -1,3-glucane à la surface des hyphes prévient leur dégradation par les chitinases. **F.** La chitine peut être convertie en chitosane, qui est moins sensible à l'action des chitinases. Il s'agit toutefois également d'un PAMP.

Adapté de Sanchez-Vallet *et al.* (2014).

d'inhiber l'action de ces enzymes. Par exemple, chez l'oomycète *P. infestans*, les protéines cystatin-like codées par les effecteurs EPIC1 et EPIC2B inhibent l'action de la protéase papaine-like à cystéine C14, produite par les plantes de la famille des solanacées (Kaschani *et al.*, 2010). Il a également été montré que l'inhibition des protéases à cystéines de la plante hôte par la protéine Pit2 était essentielle pour la colonisation du maïs par *Ustilago maydis* (Mueller *et al.*, 2013). Chez le champignon *Cladosporium fulvum*, la protéine codée par l'effecteur Avr4 protège les parois membranaire du champignon contre l'hydrolyse provoquée par les chitinases sécrétées par la plante hôte (van den Burg *et al.*, 2006; van Esse *et al.*, 2007) (Figure 8). L'effecteur Ecp6, également identifié chez *C. fulvum*, interagit lui aussi avec la chitine (de Jonge *et al.*, 2010). Toutefois, il a un mode d'action distinct de celui d'Avr4 et empêcherait la reconnaissance des oligomères résultant de la dégradation de la chitine par les récepteurs de la plante hôte. Des gènes homologues à Ecp6 ont depuis été identifiés chez de nombreux champignons phytopathogènes (Figure 9), indiquant qu'il s'agirait d'une stratégie très conservée chez ces organismes (Stergiopoulos *et al.*, 2012). Cette famille d'effecteurs a récemment été renommée effecteurs « LysM », par référence avec les motifs riches en lysine présents chez les récepteurs PRR des plantes reconnaissant la chitine (Kombrink & Thomma, 2013).

La suppression des réponses de défense de la plante par le biais de la modulation de ses gènes de défense est également l'une des stratégies mises en œuvre par les agents pathogènes lors de l'infection (Canonne & Rivas, 2012). Les bactéries du genre *Ralstonia* et *Xanthomonas* sécrètent des effecteurs appelés Transcription Activator-Like (TAL), qui agissent comme des facteurs de transcription chez la plante hôte. Les effecteurs TAL sont caractérisés par leur domaine central composé d'une répétition en tandem d'une séquence de 34 acides aminés, déterminant la spécificité de ces effecteurs (Scholze & Boch, 2011). Chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, l'effecteur TalC induit l'expression du gène Os11N3, codant pour la noduline-3 chez le riz et précédemment décrit comme un gène de sensibilité. La présence de cet effecteur est nécessaire pour la colonisation de la plante hôte (Yu *et al.*, 2011). Toutefois, les effecteurs TAL peuvent aussi cibler d'autres gènes que ceux impliqués dans les voies de défense. Ainsi, chez *X. axonopodis* pv. *manihotis*, l'effecteur TAL20 cible le gène *MeSWEET10a*. Il s'agit d'un transporteur du sucre, intervenant dans l'efflux de sucre des

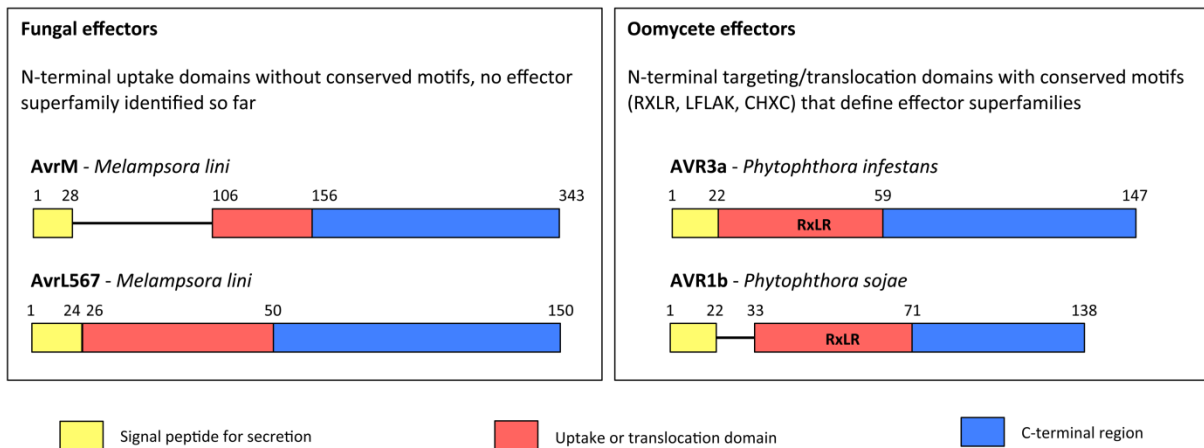


Figure 104: Domaines N-terminaux des effecteurs de champignons et d'oomycètes impliqués dans leur sécrétion et leur translocation dans la cellule végétale.

Chez les oomycètes et les champignons, un peptide signal situé à l'extrémité N-terminale des effecteurs permet leur sécrétion dans l'apoplasme. Chez les oomycète, la translocation dans la cellule végétale se fait par la fixation de motifs RxLR au phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P). Les effecteurs des champignons semblent dépourvus de ce motif.

Adapté de Petre et Kamoun (2014)

cellules du mésophylle vers l'apoplasme, facilitant ainsi l'acquisition de nutriments par la bactérie (Cohn *et al.*, 2014).

Des effecteurs ont également la capacité de remodeler la structure chromatinienne de la cellule hôte. Chez l'oomycète *Phytophthora capsici*, l'effecteur CRN83_152 se localise dans le noyau de la cellule hôte, où il entraîne une réorganisation de la chromatine, entraînant ainsi une action sur l'expression de nombreux gènes (Stam *et al.*, 2013). Un mode d'action similaire a été suggéré pour l'effecteur HopAI1 de *Pseudomonas syringae*, qui affecterait les modifications post-traductionnelles des histones de la cellule hôte (Zhang *et al.*, 2007; Canonne & Rivas, 2012).

Les voies de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique sont des régulateurs majeurs de la mise en place des mécanismes de défense des plantes (Halim *et al.*, 2006). De nombreux effecteurs ont été décrits comme ayant la capacité perturber ces voies hormonales. Par exemple, pour former le réseau de Hartig, une structure mycélienne permettant l'établissement de la symbiose avec le peuplier, le champignon *Laccaria bicolor* sécrète l'effecteur MiSSP7, qui interagit avec le facteur de transcription JAZ6, pour réprimer l'expression des gènes de la voie de l'acide jasmonique (Plett *et al.*, 2014). L'effecteur HopX1, sécrété par la bactérie *P. syringae* interagit également avec la protéine JAZ chez *Arabidopsis* (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2014). L'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis* interfère quant à lui avec la voie de l'acide salicylique en interagissant avec la subunité 19 du complexe médiateur, un complexe protéique régulant la transcription de l'ADN (Caillaud *et al.*, 2013).

La modulation des processus de défense de la cellule hôte par les agents pathogènes n'est toutefois pas assurée que par les effecteurs. Chez le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*, des petits ARN non codants sont transférés dans les cellules hôtes. Ils interagissent avec la protéine Argonaute 1, une protéine clé du mécanisme de silencing chez les plantes, pour réprimer spécifiquement l'expression de gènes de défense (Figure 8) (Weiberg *et al.*, 2013).

2.4.3 Translocation des effecteurs dans la cellule hôte

La caractérisation d'effecteurs interagissant avec des composants intracellulaires de l'hôte pose la question de leur translocation à l'intérieur de la cellule hôte. En particulier, la localisation cytoplasmique de nombreuses protéines de résistance impliquées dans la reconnaissance d'effecteurs fongiques et d'oomycètes laisse supposer leur translocation dans les cellules végétales. Les bactéries de type Gram négatif et les nématodes ont développé des structures spécialisées pour injecter directement les effecteurs dans le cytoplasme de la cellule hôte. Chez les bactéries, la sécrétion des effecteurs se fait par le biais du système de sécrétion de type III, un complexe formé d'environ 25 protéines et s'apparentant à une « seringue » (Cornelis & Van Gijsegem, 2000). Les nématodes possèdent un stylet qui pénètre la membrane des cellules hôtes et permet la sécrétion des effecteurs comme l'acquisition de nutriments (Mitchum *et al.*, 2013). Les champignons et les oomycètes sont quant à eux dépourvus de structures spécifiques permettant la translocation des effecteurs, qui sont sécrétés hors de la cellule de l'agent pathogène dans les espaces intercellulaires (apoplasme, espace extra-haustorial, etc..) grâce à un peptide signal situé à l'extrémité N-terminale des effecteurs (Figure 10).

Chez les effecteurs des oomycètes, un motif RXLR situé dans la région N-terminale des protéines matures est communément présent et son interaction avec le phospholipide membranaire phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) permettrait l'entrée des effecteurs dans la cellule hôte (Whisson *et al.*, 2007; Kale *et al.*, 2010). Toutefois, le rôle de ce motif dans la translocation des effecteurs au sein de la cellule hôte est actuellement largement débattu, en particulier pour les effecteurs fongiques qui ne présentent pas de motif conservé de type RxLR ou autre, mais des motifs proches, dénommés « RXLR-like » (Yaeno *et al.*, 2011; Petre & Kamoun, 2014; Blondeau *et al.*, 2015). Ainsi dans le cas des effecteurs fongiques certains auteurs doutent de la capacité de translocation des effecteurs dans la cellule végétale en l'absence de l'agent pathogène (Wawra *et al.*, 2012), alors que d'autres, à l'aide de l'analyse de la structure tridimensionnelle des protéines, mettent en avant des régions protéiques présentant des caractéristiques physico-chimiques particulières, plutôt que des motifs conservés (Blondeau *et al.*, 2015).

2.4.4 Les répertoires d'effecteurs fongiques

Le clonage de gènes codant pour des effecteurs fongiques a permis d'identifier des caractéristiques communes à ces gènes. Ils codent généralement pour des petites protéines sécrétées (PPS), sans homologies de séquence avec des gènes présents chez d'autres espèces, souvent riche en cystéines et sont exprimés spécifiquement lors de l'infection de la plante hôte. Le nombre croissant de génomes fongiques disponibles a permis d'établir des répertoires de gènes codant pour des effecteurs putatifs chez un grand nombre d'espèces de champignons. Les génomes fongiques contiennent plusieurs centaines de gènes codant pour des effecteurs candidats, typiquement de l'ordre de 500 à 600 chez les ascomycètes, représentant de 5 à 10 % des gènes prédits (Lo Presti *et al.*, 2015). Le manque général d'homologies de séquence de ces gènes avec ceux d'autres espèces, voire même l'absence générale de paralogues au sein d'un génome, est un obstacle pour l'identification de la fonction des effecteurs fongiques par des analyses *in silico*. De plus, la redondance supposée dans la fonction des effecteurs fongiques constitue une limite supplémentaire pour identifier leur rôle intrinsèque dans la pathogénie.

2.5 L'ETI

2.5.1 La relation gène-pour-gène

Les agents pathogènes ayant acquis la capacité de contourner les mécanismes de défense basale d'une plante peuvent la coloniser, il s'agit alors d'une espèce hôte pour le parasite. Toutefois, au cours de leur évolution, les plantes ont développé un second niveau très spécifique de reconnaissance des agents pathogènes, appelé résistance « hôte » ou résistance spécifique, et qui s'applique envers certains pathovars ou races d'une espèce d'agent pathogène capable de les infecter. Ce concept est historiquement connu en tant que relation « gène-pour-gène » et a été mis en évidence grâce aux travaux de Flor sur la maladie de la rouille du lin, causée par le champignon *Melampsora lini* (Flor, 1971). Une protéine de résistance de la plante (R) "reconnait" spécifiquement un effecteur sécrété par l'agent pathogène lors de l'infection, alors appelé protéine d'avirulence (Avr). L'interaction, directe ou indirecte, entre les protéines R et Avr déclenche une forte réponse immunitaire de la part de la plante, appelée Effector-Triggered-Immunity (ETI) et caractérisée par une réaction hypersensible (RH) (Figure 3 et 11). La mort cellulaire localisée autour du point d'infection

Avr gene-for-gene interaction

		Host	
		R-	rr
Pathogen	A-	-	+
	aa	+	+

Lack of recognition = virulence
 A resistant plant (R) interacts with an Avr factor (A) of a biotroph to induce a HR and host cell death that prevents further pathogen propagation.

HST gene-for-gene interaction

		Host	
		S-	ss
Pathogen	T-	+	-
	tt	-	-

Recognition = virulence
 A toxin sensitive plant (S) interacts with the toxin (T) of a necrotroph to induce a HR and host cell death that allows further pathogen propagation.

Figure 11: Les relations "gène-pour-gène" et "inverse-gène-pour-gène".

Adapté de Stukenbrock & McDonald (2009)

freine alors la progression des parasites et l'interaction est qualifiée « d'incompatible ». A l'inverse une interaction est dite « compatible » lorsque les protéines R ou/et Avr sont absentes. La reconnaissance ne peut alors avoir lieu et la maladie s'exprime.

Toutefois, la RH ne serait efficace que contre les agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes en phase biotrophe. Il a en effet été proposé que la RH confère un avantage pour les espèces nécrotrophes telles que *B. cinerea* (Govrin & Levine, 2000). Un niveau de complexité supplémentaire dans l'interaction « gène-pour-gène » concerne les toxines « hôte spécifique » (HST), qui ont été principalement décrites chez des Dothidéomycètes nécrotrophes (Figure 11) (Friesen *et al.*, 2008). Dans ce cas, le succès de l'infection est conditionné par l'interaction entre une HST avec un gène de sensibilité présent chez la plante hôte, dans une relation spécifique qualifiée d'"inverse gene for gene". Par exemple, la toxine ToxA, produite par les champignons *Pyrenophora tritici-repentis* et *Stagonospora nodorum* interagit avec une protéine de sensibilité du blé (Tsn1) pour permettre la colonisation (Faris *et al.*, 2010).

2.5.2 Les gènes de résistance

Les gènes de résistance codent pour des récepteurs membranaires ou intracellulaires qui reconnaissent de façon directe ou indirecte une protéine d'avirulence et permettent donc le déclenchement de l'ETI. Huit familles de gènes de résistance ont été caractérisées et regroupées selon leurs homologies de structure (Figure 12) (Gururani *et al.*, 2012). La plus importante famille de protéines de résistance est celle des protéines cytoplasmiques NBS-LRR, constituées d'un motif Nucleotide Binding (NBS) permettant la liaison à des nucléotides et d'une région C-terminale riche en leucine (LRR) impliquée dans l'interaction avec d'autres protéines. Les NBS-LRR sont subdivisées en deux classes selon la présence d'un domaine Coiled-Coil (CC) ou toll-interleukin-1-receptor (TIR) à leur extrémité C-terminale. Les domaines TIR interviennent dans la cascade de signalisation conduisant au déclenchement de l'ETI, tandis que les domaines CC peuvent interagir avec une grande diversité de molécules (protéines, ADN) et avoir également un rôle dans la transduction du signal. Par exemple, chez l'orge, le domaine CC de la protéine de résistance NBS-LRR-CC Mla confère la résistance à *Blumeria graminis* en interagissant directement avec les facteurs de transcription MYB6 et WRKY1 (Chang *et al.*, 2013). Les protéines NBS-LRR peuvent aussi

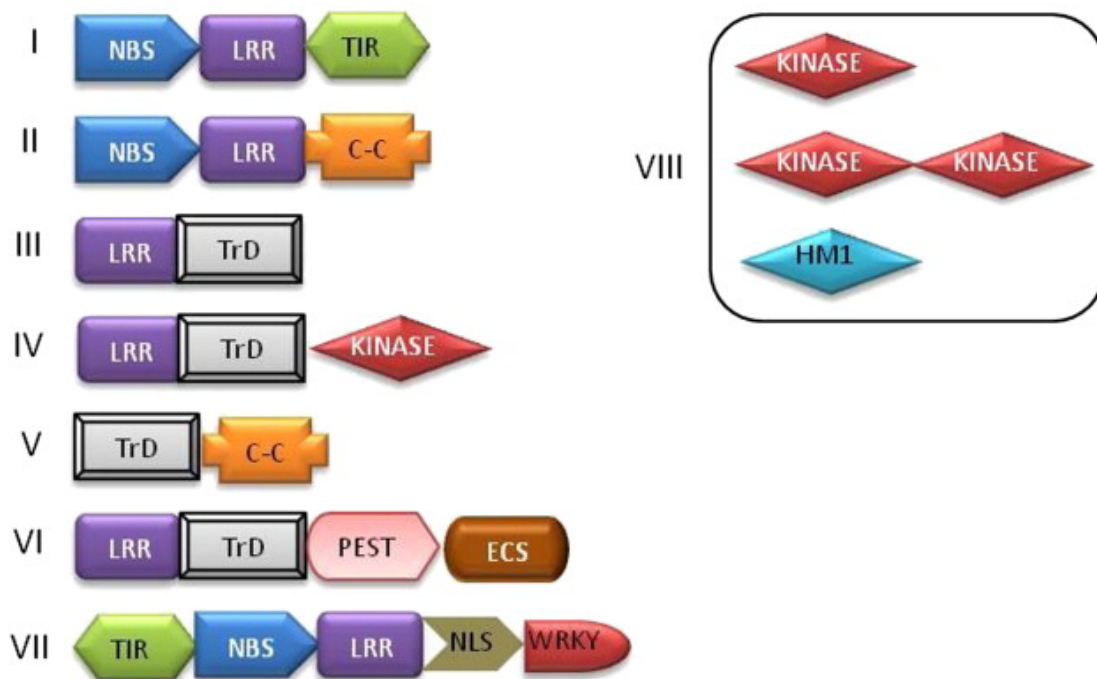


Figure 12: Les principales classes de protéines de résistance, basées sur leurs homologies structurales.

LRR = Leucine Rich Repeat ; NBS = Nucleotide Binding Site ; TIR = Toll/Interleukin-1- receptors; C-C – Coiled coil; TrD – Transmembrane domain; PEST – Protein degradation domain (proline-glycine-serine-threonine); ECS – Endocytosis cell signaling domain; NLS – Nuclear localization signal; WRKY – Amino acid domain; HM1 – *Helminthosporium carbonum* toxin reductase enzyme.

Adapté de Gururani *et al.* (2012)

avoir d'autres domaines caractéristiques tels que les domaines WRKY et NLS. Les motifs NLS (Nuclear Localization Sequence) permettent l'adressage des protéines au noyau et les motifs WRKY sont impliqués dans la liaison aux acides nucléiques. Chez *Arabidopsis*, le gène de résistance *RRS1-R* permet la résistance à la bactérie *Ralstonia solanacearum* par la liaison de son domaine WRKY à l'ADN (Deslandes *et al.*, 2002) suite à son adressage au noyau permis par la présence d'un motif NLS.

Les gènes de résistance peuvent également coder pour des protéines transmembranaires, possédant un domaine LRR extracellulaire (eLRR), permettant la reconnaissance de protéines d'avirulence apoplastiques (Figure 12). La structure C-terminale de ces récepteurs peut varier, avec la présence de domaine kinase, de domaine CC, ou plus rarement de domaine PEST (Pro-Glu-Ser-Thr). *Ve1* et *Ve2* sont des LRR extracellulaires (eLRR-RLP) qui contiennent un domaine PEST, qui serait responsable de l'internalisation ou de l'ubiquitination du récepteur suite à la reconnaissance de la protéine d'avirulence (Kawchuk *et al.*, 2001). Les récepteurs de type receptor-like-kinase (RLK) sont également un type de protéine de résistance transmembranaire, dont la protéine de résistance *I3*, permettant la résistance de la tomate à *Fusarium oxysporum* constitue un exemple (Catanzariti *et al.*, 2015).

Toutefois, certains gènes de résistance identifiés ne présentent pas de structure particulière (Figure 12). Le gène de résistance *Hm1* présente par exemple l'originalité de coder pour une toxine réductase qui dégrade une toxine sécrétée par le champignon *Cocliobolus carbonum* et essentielle à sa pathogénie sur maïs (Johal & Briggs, 1992). La protéine *Pto* est quant à elle une protéine kinase identifiée chez la tomate et conférant la résistance à *P. syringea* suite à la reconnaissance de la protéine *AvrPto* (Martin *et al.*, 1993).

2.5.3 La reconnaissance des protéines d'avirulence par les protéines de résistance

La relation « gène-pour-gène » suppose une reconnaissance spécifique entre une protéine d'avirulence et sa protéine de résistance associée. Une interaction physique entre ces deux protéines avait donc été initialement postulée, d'après le modèle « ligand-récepteur » (Keen, 1982). L'identification d'interactions directes entre divers couples de protéines *Avr/R* a permis de valider ce modèle chez plusieurs pathosystèmes.

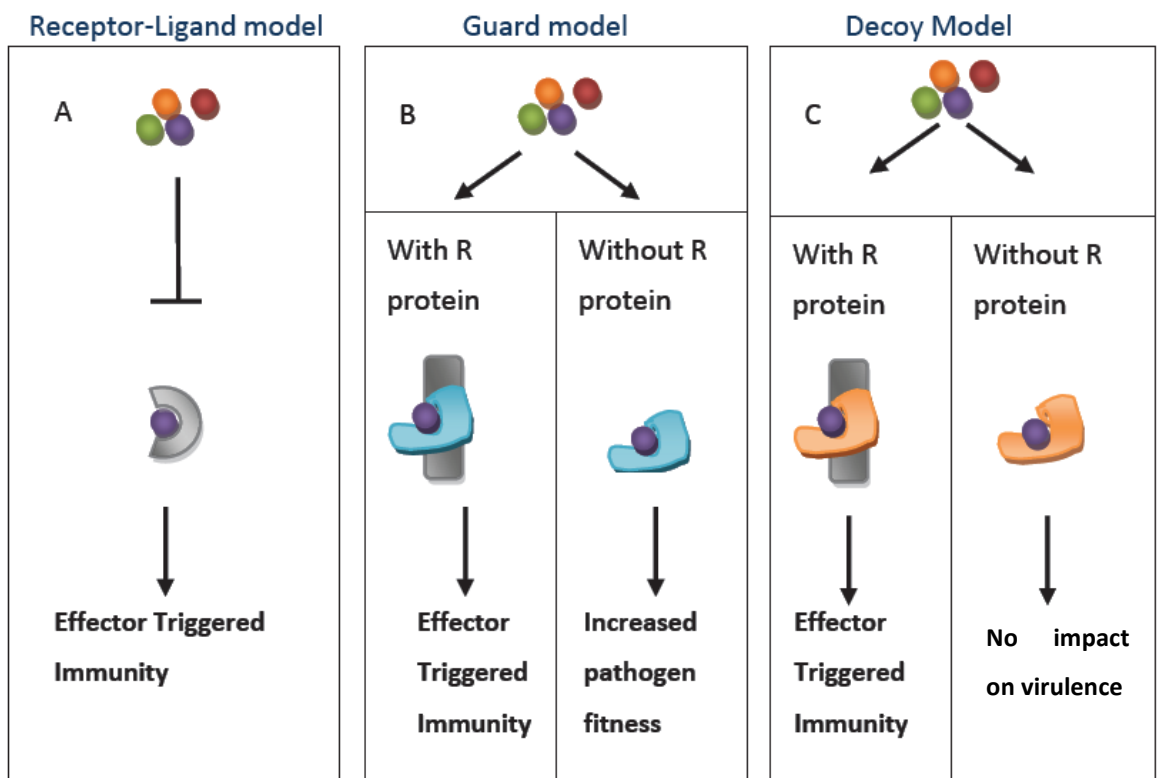


Figure 13: Les modèles de reconnaissance entre protéine d'avirulence et protéine de résistance.
Adapté de Lu & Desveaux (2013)

Une interaction directe a notamment été montrée entre la protéine de résistance du riz *Pi-ta* et la protéine d'avirulence de *M. oryzae* AvrPita par la méthode du double hybride mais aussi *in planta* (Jia *et al.*, 2000). L'interaction directe entre les protéines Avr/R a également été identifiée entre les protéines AvrM et M ou AvrL567 et les protéines L5 et L6 dans le cas de la rouille du lin (Catanzariti *et al.*, 2010; Ravensdale *et al.*, 2012) ou entre les protéines PopP2 de *R. solanacearum* et RSS1-R d'*A. thaliana* (Deslandes *et al.*, 2003).

Cependant, dans de nombreux cas, il a été impossible démontrer une interaction physique entre les protéines d'avirulence et de résistance, notamment entre les protéines Pto et Prf chez la tomate et la protéine d'avirulence AvrPto de *P. syringae*. Cela a fait émerger l'hypothèse de l'existence d'un second mécanisme d'interaction, appelé modèle de garde et permettant la reconnaissance indirecte de la protéine d'avirulence (Van Der Biezen & Jones, 1998). Le modèle de garde propose que les protéines de résistance perçoivent les perturbations cellulaires induites par la modification de la cible végétale suite à son interaction avec l'effecteur (Figure 13). Chez *A. thaliana*, la protéine RIN4 (RPM1-Interacting-Protein-4) est un exemple de protéine de garde qui a été largement étudié. Ce régulateur négatif de la PTI est ciblé par les effecteurs AvrRpm1, AvrPt2, AvrB, AvrPto et HopF2 de *P. syringae* (Mackey *et al.*, 2002; Axtell & Staskawicz, 2003; Wilton *et al.*, 2010; Deslandes & Rivas, 2012). La protéine RPM1 induit les mécanismes de défense suite à la perception de la phosphorylation de RIN4 par les effecteurs AvrB et AvrRPM1. De façon similaire, le clivage de RIN4 par la protéine AvrPt2 active l'ETI par le biais de la protéine de résistance RPS2 (Figure 14).

Le génome d'*A. thaliana* compte environ 150 NBS-LRR prédites (Dangl & Jones, 2001). Ce faible nombre de récepteurs suggère l'importance du modèle de garde dans la reconnaissance des effecteurs. En effet, le modèle « récepteur-ligand » implique l'évolution d'un grand nombre de récepteurs chez la plante hôte pour être capable de reconnaître spécifiquement chacun des effecteurs sécrétés par un agent pathogène lors de l'infection. Or, le nombre d'agents pathogènes capables d'infecter une espèce donnée peut être très important, augmentant encore le nombre de gènes de résistance nécessaires à l'immunité. Le modèle de garde, en permettant l'activation des mécanismes de défense suite à la surveillance d'une seule cible potentiellement visée par plusieurs effecteurs est donc une

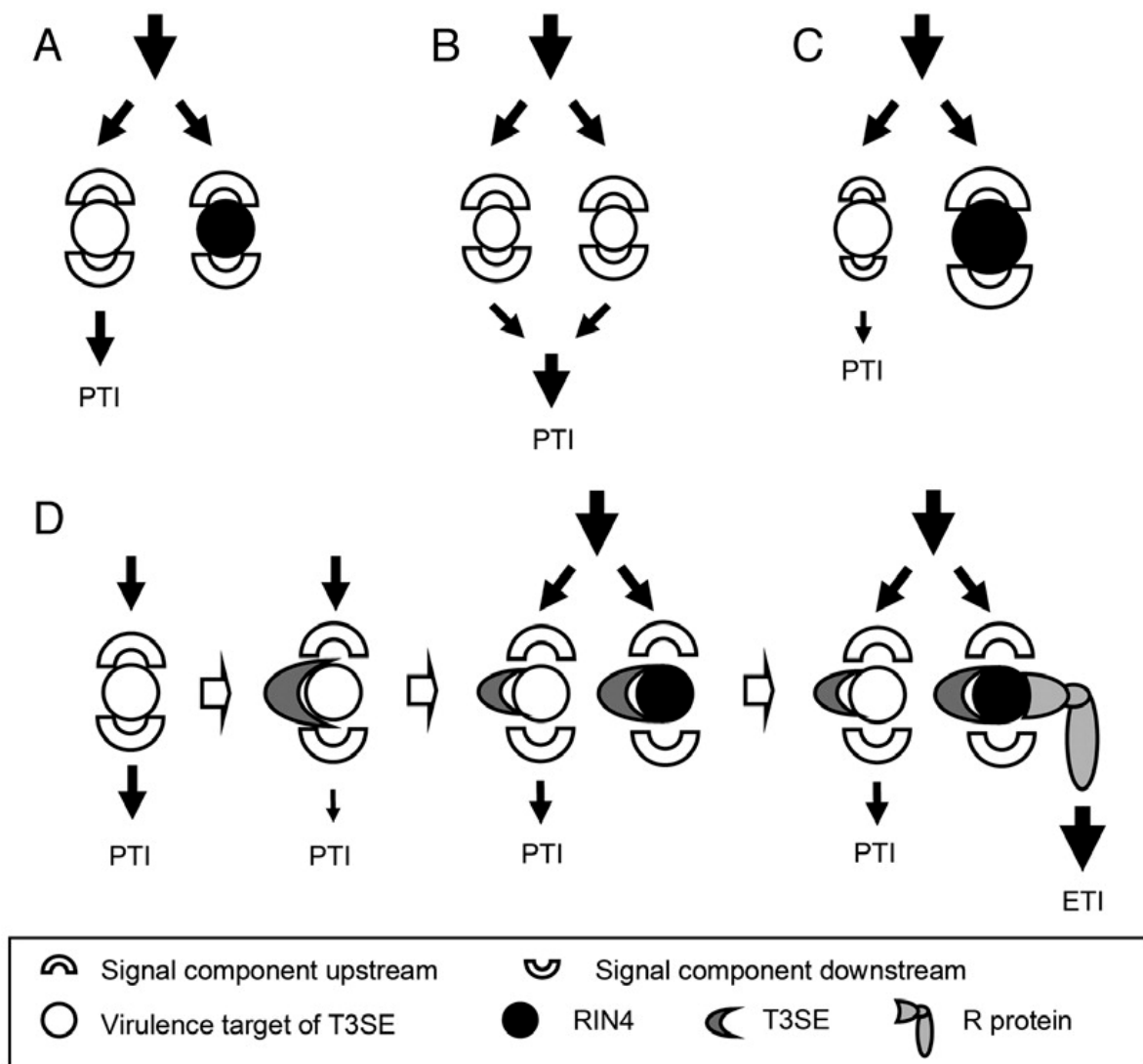


Figure 14: Evolution des résistances RPM1 et RPS2 chez *Arabidopsis thaliana*.

A. RIN4 a un régulateur négatif de la PTI, par son mimétisme d'un médiateur du signal de la PTI. **B.** La réponse de la PTI est amplifiée en l'absence de RIN4. **C.** Dans le cas d'une surexpression de RIN4, la réponse de la PTI est réduite. **D.** Les effecteurs AvrRpm1 et AvrPt2 inhibent la PTI en ciblant ses régulateurs. RIN4 interagit avec AvrRpm1 et AvrRpt2 en jouant le rôle de « leurre ». L'ETI est déclenchée suite à la reconnaissance des modifications de RIN4 induites par AvrRPM1 et AvrPt2 par les protéines de résistance RPM1 et RPS2.

Adapté de Hou *et al.* (2011).

stratégie plus « économe » pour les plantes. Toutefois, il implique que la protéine « gardée » soit la cible intrinsèque de l'effecteur. Or, la manipulation de ces cibles ne constitue pas toujours un gain de pathogénie pour les agents pathogènes. Par exemple, l'effecteur Avr2, sécrété par le champignon *C. fulvum* lors de l'infection de la tomate, interagit avec la protéase RCR3 de la plante. Cette interaction est perçue par la protéine Cf-2, ce qui a pour effet d'induire une RH. Cependant, bien que l'effet d'Avr2 dans la pathogénie ait été démontré, l'absence de la protéine RCR3 n'entraîne pas de diminution du pouvoir pathogène du champignon (Dixon *et al.*, 2000; Esse *et al.*, 2008).

En 2008, Van der Hoorn et Kamoun ont proposé le modèle du « Decoy » (ou leurre) en complément du modèle de garde. Ils ont postulé que dans la majorité des cas, la protéine « gardée » ne serait pas la cible de l'effecteur et son interaction avec l'effecteur n'entraînerait donc pas de gain dans le pouvoir pathogène (Figure 13). La protéine leurre, par mimétisme avec la vraie cible, permettrait de « piéger » l'effecteur en entrant en compétition avec sa cible de virulence. Le modèle du Decoy permet également une explication quant à l'évolution des gènes codant pour les protéines de garde. En effet, dans le cadre du modèle de garde, ces gènes sont soumis à deux pressions de sélection antagonistes, conduisant à un système instable. D'une part, en l'absence de la protéine de résistance, la reconnaissance d'un effecteur par la protéine de garde ne confère plus d'avantage sélectif à la plante hôte et l'évolution naturelle des gènes tend à une perte progressive d'affinité entre l'effecteur et la protéine de garde. D'autre part, la présence du gène de résistance implique un renforcement de la spécificité de la protéine de garde pour l'effecteur. Il est proposé que les protéines leurre auraient évolué par duplication de gènes codant pour les cibles d'effecteur ou de manière indépendante, spécialisée dans la reconnaissance des agents pathogènes (van der Hoorn & Kamoun, 2008).

La reconnaissance d'un effecteur peut également se faire suite à sa liaison avec un promoteur de gène de résistance. Dans le cas de la protéine d'avirulence TAL AvrBs3, de *X. campestris*, le promoteur du gène de résistance *Bs3* est spécifique du domaine de liaison à l'ADN de cet effecteur et constitue un exemple original de leurre (Römer *et al.*, 2007).

2.5.4 Les réponses de défense induites par l'ETI

La reconnaissance des protéines d'avirulence par les protéines de résistances conduit à une RH au niveau du point d'infection, inhibant totalement le développement des agents pathogènes. La mise en place de la RH implique des voies de signalisation similaires à celles induites par la PTI, mais des différences quantitatives sont observées dans le niveau des réponses de défense (Cui *et al.*, 2015). L'ETI active en effet les mécanismes de défense de manière plus soutenue et prolongée que la PTI (Tsuda & Katagiri, 2010).

2.6 Un modèle plus complexe ?

Bien que le modèle Zig-Zag permette d'illustrer simplement la coévolution entre les mécanismes de virulence des agents pathogènes et les mécanismes de défense des plantes, la stricte distinction qu'il implique entre la PTI et l'ETI est actuellement remise en question (Thomma *et al.*, 2011; Pritchard & Birch, 2014). En effet, les PAMP sont considérés comme des signatures moléculaires très conservées au sein des principaux genres d'agents pathogènes (e.g la chitine chez les champignons ou la flagelline chez les bactéries). Toutefois, le gène *flg22* s'avère polymorphe dans les populations bactériennes et des mutations dans le domaine *flg22* permettent de diminuer l'affinité avec le récepteur FLS2 ou d'échapper à sa reconnaissance (Clarke *et al.*, 2013). Les effecteurs sont quant à eux généralement décrits comme spécifiques à une espèce d'agents pathogènes. Or, des effecteurs LysM ont été identifiés chez de nombreuses espèces fongiques (voir section 2.4.2). La protéine Ave1, sécrétée par les champignons *Verticilium dahliae* et *Verticilium albo-atrum*, induit les mécanismes de défense chez la tomate suite à sa reconnaissance par la protéine de résistance Ve1. Des homologues à Ave1 ont été identifiés chez *F. oxysporum* et *Cercospora beticola* et ont la capacité d'interagir avec Ve1 (de Jonge *et al.*, 2012). De plus, la protéine Ve1 est une eLRR-RLP et a donc une structure proche des PRR induisant la PTI. Il a donc été suggéré par plusieurs auteurs que l'interaction entre Ve1 et Ave1 et ses homologues relevait de la PTI et non de l'ETI (Thomma *et al.*, 2011; Fradin *et al.*, 2011).

Des auteurs ont récemment proposé le terme de Effector-Triggered-Defense (ETD) pour qualifier les interactions entre les effecteurs sécrétés par les champignons apoplastiques et les récepteurs membranaires de type RLP les percevant et pour lesquelles la mise en place des défenses est plus tardive et moins efficace que dans le cas de l'ETI (Stotz *et al.*, 2014).

L'établissement du modèle Zig-Zag repose sur un relativement faible nombre d'exemples d'interactions précises, identifiés principalement chez des espèces modèles. La coévolution entre les plantes et les agents pathogènes pourrait avoir mené à l'évolution de mécanismes d'interaction et de réponses très divers et la frontière entre ETI et PTI pourrait être plus floue qu'initialement postulé.

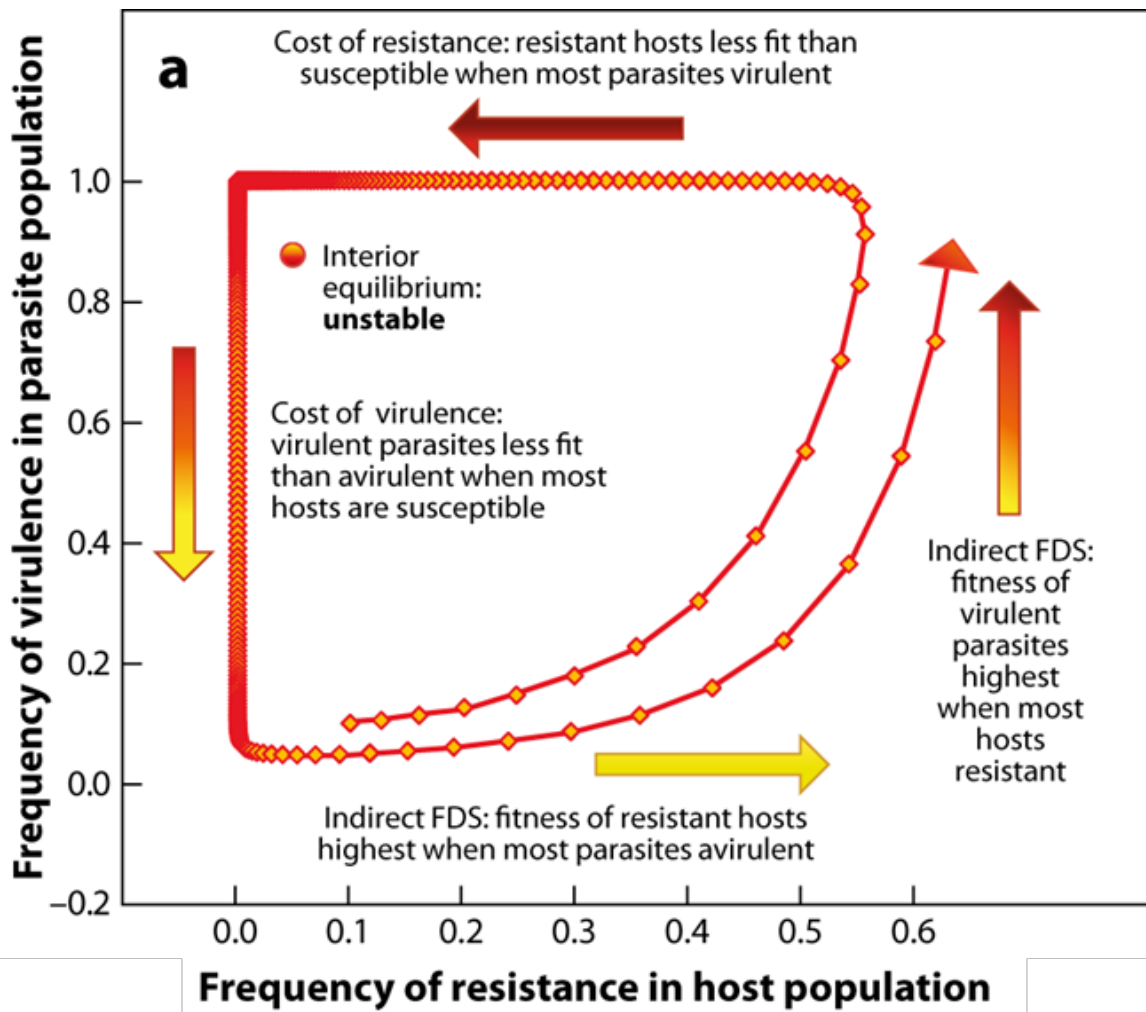


Figure 15: La course aux armements au sein d'un pathosystème.

FDS = Frequency Dependent Selection

Adapté de Brown et Tellier (2011)

3 Le contournement de l'ETI par les agents pathogènes

3.1 La course aux armements

Les différentes stratégies d'attaque et de défense mises en place par les plantes et leurs agents pathogènes résultent d'une longue coévolution entre les organismes en interaction et peuvent être décrits selon le concept de la « course aux armements » (Figure 15). En effet, dans les écosystèmes naturels, une population d'agents pathogènes ayant acquis la capacité de contourner les défenses basales d'une plante donnée va pouvoir la coloniser. Cela aura pour conséquence de sélectionner les plantes hôtes possédant le moyen de reconnaître ces agents pathogènes afin d'activer leurs mécanismes de défense. Les plantes résistantes vont devenir peu à peu majoritaires au sein de l'écosystème, exerçant à leur tour une pression de sélection sur les populations d'agent pathogène. Cette pression de sélection favorisera donc les agents pathogènes insensibles à cette résistance, entraînant un nouveau cycle de pressions de sélection antagonistes.

Dans les agrosystèmes standardisés actuels, la lente coévolution entre les plantes et leurs agents pathogènes se trouve fortement accélérée par le biais des pratiques agricoles. En effet, les sélectionneurs favorisent généralement l'introgession de gènes de résistance majeurs dans les variétés. Or, celles-ci sont cultivées au sein de grandes parcelles homogènes, avec une faible rotation des cultures. La pression de sélection exercée sur les agents pathogènes par les plantes cultivées est donc bien plus forte qu'au sein des écosystèmes naturels. Les microorganismes ayant la capacité de rapidement s'adapter aux pressions de sélection auxquelles ils sont soumis, de nombreux cas de contournement de résistance monogénique ont été rapportés, notamment dans le cas des résistances aux rouilles et à l'oïdium chez les céréales (Wolfe & McDermott, 1994; Kolmer, 1996).

Les gènes de résistance des plantes cultivées sont donc soumis à des cycles de « boom and bust » (McDonald & Linde, 2002). Après avoir été introduits dans des variétés, ils connaissent généralement un grand succès commercial, ce qui conduit à leur contournement à court ou moyen terme par les agents pathogènes et aboutit donc à un épuisement des résistances génétiques disponibles pour faire face à un agent pathogène.

3.2 Mécanismes moléculaires permettant l'acquisition de la virulence

3.2.1 Modification du gène d'avirulence

Une grande diversité de mécanismes moléculaires permettant le contournement des résistances variétales a été identifiée. Tout d'abord, la présence de mutations dans la séquence d'un gène d'avirulence est un des mécanismes permettant d'échapper à la reconnaissance par les protéines de résistance. Chez *P. syringae*, des mutations dans la séquence du gène *AvrRpt2* suppriment la résistance induite par RPS2 (Lim & Kunkel, 2004). Chez *C. fulvum*, des mutations ponctuelles dans la séquence des gènes d'avirulence *Avr2*, *Avr4*, et *Avr5* ont été rapportées comme responsables de la perte d'avirulence vis-à-vis de *Cf-2*, *Cf-4* et *Cf-5* chez la tomate (Joosten *et al.*, 1997; Luderer *et al.*, 2002; Iida *et al.*, 2015). Chez le gène *Avr2*, une mutation entraîne la suppression du codon d'initiation, il n'y a donc pas de protéine d'avirulence produite ; des insertions et des délétions de nucléotides responsables d'un décalage du cadre de lecture sont également décrites (Luderer *et al.*, 2002). Pour le gène *Avr4*, les mutations identifiées chez les souches virulentes vis-à-vis de *Cf-4* entraînent une rupture des ponts disulfure de la protéine, perturbant ainsi sa stabilité (Joosten *et al.*, 1997). Enfin, chez le gène *Avr5*, une unique mutation entraînant un changement dans la séquence protéique (Gly⁹⁰Arg) entraîne la virulence vis-à-vis de *Cf-5* (Iida *et al.*, 2015).

Toutefois, les mutations de la séquence codante ne sont pas le seul mécanisme permettant la virulence. Chez le champignon *Rynchosporium secalis*, l'analyse des mécanismes ayant conduit au contournement de la résistance *Rrs1* a montré une égale répartition entre la délétion totale de la séquence codante et des mutations ponctuelles dans la séquence du gène *NIP1* chez les souches virulentes (Schürch *et al.*, 2004). Les délétions entraînant la perte de l'avirulence peuvent être limitées à quelques nucléotides, entraînant un décalage du cadre de lecture lors de la traduction de la protéine, ou concerner de grandes régions génomiques. Chez *M. oryzae* des délétions de l'ordre de 10 kb sont associées à la perte du gène d'avirulence *Avr-Pita* (Orbach *et al.*, 2000) et chez *Leptosphaeria maculans*, la virulence vis-à-vis de *Rlm1* est principalement liée à la délétion d'une région génomique de 260 kb contenant le gène d'avirulence *AvrLm1* (Gout *et al.*, 2007).

Le passage à la virulence peut également résulter de l'insertion d'un élément transposable (ET) dans la séquence codante du gène d'avirulence. Ce mécanisme a par exemple été rapporté pour le gène d'avirulence *Avr1* chez *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*: l'insertion du transposon *Hormin* entraîne la troncature du gène d'avirulence (Inami *et al.*, 2012). Chez *M. oryzae*, la virulence vis-à-vis de la résistance *Pi-ta* suite à l'insertion du transposon *Pot3* dans la séquence promotrice du gène d'avirulence *AvrPi-ta* constitue un autre exemple (Zhou *et al.*, 2007).

Chez *L. maculans*, le contournement des gènes de résistance peut être favorisé par le mécanisme de Repeat Induced Point mutation (RIP) (Fudal *et al.*, 2009; Daverdin *et al.*, 2012). Ce mécanisme préméiotique est spécifique aux Ascomycètes. Il permet l'inactivation des ET par la génération de nombreuses mutations C→T et G→A (Galagan & Selker, 2004). Le RIP peut « déborder » des ET et introduire des mutations dans la séquence codante des gènes situés à proximité (Irelan *et al.*, 1994) Le rôle majeur du RIP a été rapporté dans le cas de l'inactivation des gènes d'avirulence *AvrLm4-7* et *AvrLm6* chez *L. maculans* (Fudal *et al.*, 2009; Daverdin *et al.*, 2012).

Chez l'oomycète *P. sojae*, un mécanisme original menant à la virulence vis-à-vis de *Rps3a* a été mis en évidence. Dans ce cas, la séquence codante du gène *Avr3a* n'est pas altérée, mais des mécanismes épigénétiques (petits ARN non codants) inhibent l'expression du gène (Kasuga & Gijzen, 2013; Qutob *et al.*, 2013).

Enfin, certains effecteurs suppriment l'ETI induite par la reconnaissance de gènes d'avirulence, illustrant ainsi le concept de coévolution entre protéines d'avirulence et de résistance proposé par le modèle Zig-Zag (Figure 4). Par exemple, chez *P. syringae*, les protéines d'avirulence *AvrB* et *AvrRPM1*, en entraînant la phosphorylation de *RIN4*, sont perçues par la protéine de résistance *RPM1*, ce qui a pour effet d'induire l'ETI (Mackey *et al.*, 2002). Or, l'effecteur *AvrRpt2* est quant à lui perçu par la protéine de résistance *RPS2* suite au clivage de *RIN4* (Axtell & Staskawicz, 2003). L'action d'*AvrRpt2* sur *RIN4* empêche donc sa phosphorylation par *AvrB* et *AvrRPM1* et par conséquent supprime l'avirulence vis-à-vis de *RPM1*. L'avirulence vis-à-vis de *RPS2* peut également être inhibée par l'action de l'effecteur *HopF2* (Wilton *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2011; Deslandes & Rivas, 2012). Chez la bactérie *X*.

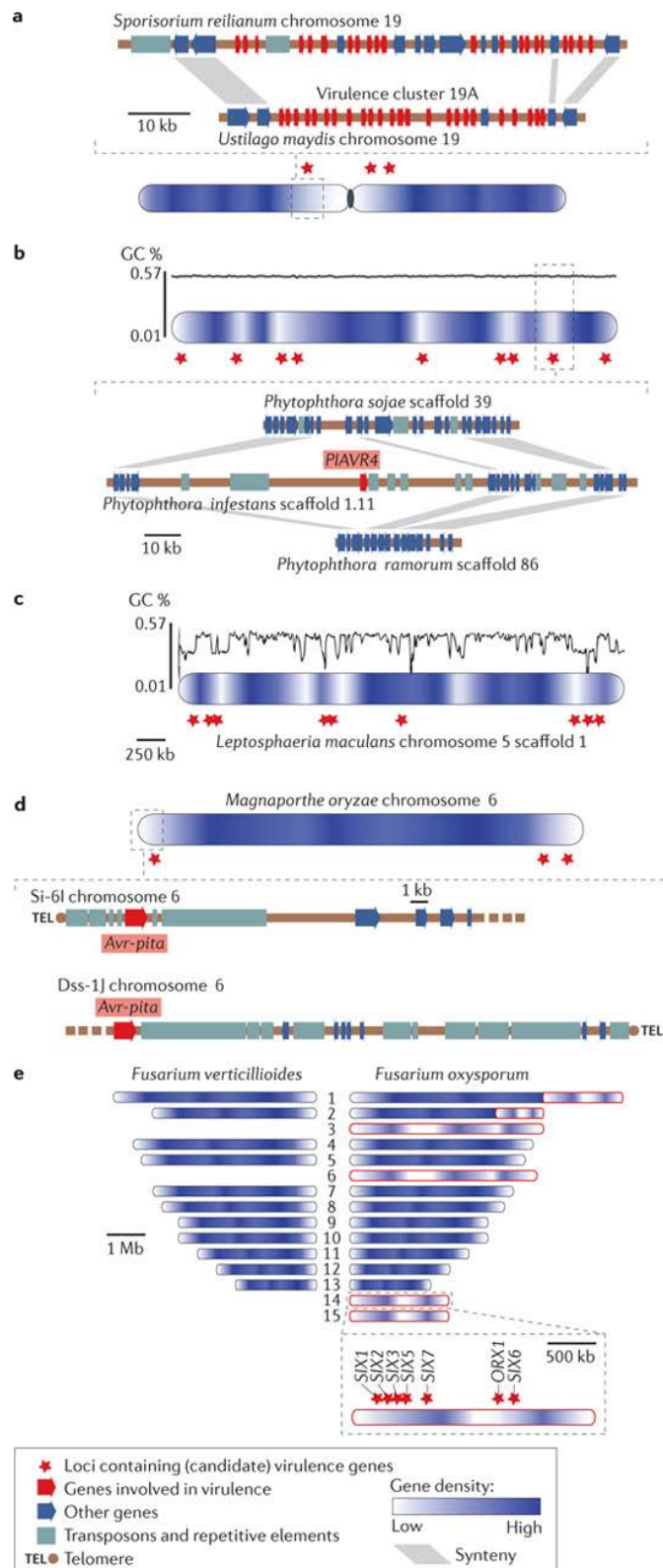


Figure 16: Régions génomiques riches en gènes codants pour des effecteurs chez les champignons et les oomycètes.

Les gènes codants pour des effecteurs chez les champignons et les oomycètes sont fréquemment localisés dans des régions dynamiques du génome et pauvre en gènes.

Adapté de Raffaele et Kamoun (2012).

campestris pv. *vesicatoria*, la protéine d'avirulence AvrBsT supprime l'ETI induite par AvrBs1 en interagissant avec la protéine cytoplasmique SnRK1, une sucrose non-fermenting 1 (SNF1)-related kinase (Szczeny *et al.*, 2010). Un mécanisme similaire a été identifié chez *F. oxysporum*, chez lequel la présence du gène d'avirulence Avr1 supprime la reconnaissance des gènes d'avirulence Avr2 et Avr3 (Houterman *et al.*, 2008).

3.2.2 Influence de l'environnement génomique des effecteurs sur leur évolution

L'évolution rapide des gènes d'avirulence, et de l'ensemble des effecteurs de manière générale, est corrélée avec leur localisation dans des régions dynamiques du génome, qui sont caractérisées par leur faible teneur en gènes et leur richesse en éléments répétés (Figure 16) (Raffaele & Kamoun, 2012). Ainsi, les délétions observées pour le gène *AvrPi-ta* sont favorisées par sa localisation télomérique. Ces régions sont connues pour être instables et des délétions spontanées du gène ont été observées en condition de culture axéniques (Orbach *et al.*, 2000). De manière générale, la localisation télomérique de nombreux gènes d'avirulence de ce champignon jouerait un rôle dans leur rapide adaptation aux résistances variétales par la translocation fréquente des régions télomériques lors de la méiose (Figure 16) (Chuma *et al.*, 2011b,a). Chez *F. oxysporum*, les gènes d'avirulence sont localisés sur un chromosome dispensable, pouvant être transmis par transfert horizontal à d'autres souches (Figure 16) (Ma *et al.*, 2010). Enfin, la localisation des effecteurs du champignon *L. maculans* dans des isochores riches en éléments transposables joue un rôle majeur dans leur évolution (Rouxel *et al.*, 2011) et sera développé ultérieurement (cf. 4 .2.3).

3.3 Le coût de la virulence

Les gènes d'avirulence appartiennent à la classe des gènes codants pour des effecteurs, leur perte de fonction impliquerait donc un déficit dans le pouvoir pathogène, ce qui est défini par le concept du « coût de la virulence » ou « coût de fitness ». La fitness d'un individu correspond à sa capacité à accomplir son cycle de développement et à se reproduire dans un contexte de compétition avec d'autres individus de la même espèce. Lorsque la majorité des plantes hôtes d'un agent pathogène possède un gène de résistance donné, la perte du gène d'avirulence confère un avantage. Toutefois, lorsque le gène de résistance est rare dans les populations, les souches virulentes sont moins pathogènes et donc moins compétitives par rapport aux souches avirulentes, ce qui constitue un coût de fitness (Figure 15).

Une diminution du pouvoir pathogène suite à la perte de fonctionnalité d'un gène d'avirulence a été rapportée dans de nombreux cas. Par exemple des mutants affectés dans la séquence du gène codant pour AvrB chez *P. syringae* sont moins agressifs vis-à-vis de leur hôte (Ong & Innes, 2006). Chez *F. oxysporum* la délétion du gène *Avr2* entraîne une baisse significative du pouvoir pathogène (Houterman *et al.*, 2009). Toutefois, dans certains cas, l'inactivation génique n'a pas d'effet visible sur le pouvoir pathogène, ou en tous cas sur des composantes du pouvoir pathogène accessibles à l'expérimentation au laboratoire. C'est notamment le cas pour des mutants du gène *AvrRpt2* chez *P. syringae* ou suite à la délétion des effecteurs SSP15 et SSP18 chez *Zymoseptoria tritici* (Lim & Kunkel, 2004; Mirzadi Gohari *et al.*, 2015). En l'absence d'accès à la totalité des composantes du cycle infectieux, les auteurs interprètent généralement ces données comme la preuve d'une redondance de fonction de certains effecteurs.

3.4 L'enjeu de la durabilité des résistances variétales

La durabilité des résistances variétales est actuellement un enjeu majeur en agriculture. En effet, le contexte actuel tend à limiter l'usage de produits pesticides pour lutter contre les agents pathogènes et l'introduction de résistances par transgénèse est peu acceptée par les consommateurs. Or, le nombre de gènes de résistance efficaces contre un agent pathogène donné disponibles au sein des ressources génétiques d'une plante cultivée est limité. L'estimation du coût de fitness associé au contournement d'une résistance variétale peut être un moyen de prédire sa durabilité *a priori* (Leach *et al.*, 2001). En effet, un fort coût de fitness favorisera le maintien des allèles avirulents dans les populations d'agents pathogènes, au moins à court terme, dans l'attente de la mise en place de mécanismes de compensation permettant le maintien de la fonction effectrice tout en perdant la caractéristique d'avirulence (cf. Chap. 2).

Les stratégies de déploiement des gènes de résistance influencent également la durabilité des résistances variétales (Mundt, 2014). Le déploiement massif et répété d'une source unique de résistance exerce une très forte pression de sélection sur les agents pathogènes et tend à favoriser les individus virulents, malgré l'existence d'un potentiel coût de la virulence. L'alternance spatiale et temporelle des gènes de résistance à l'échelle du paysage peut

permettre d'augmenter la durabilité des résistances en maintenant une diversité dans les populations. Le pyramidage de gènes de résistance dans des variétés est également une approche possible pour augmenter la durabilité. En effet, on peut postuler intuitivement que le contournement simultané de plusieurs gènes de résistance majeurs nécessite la mise en place simultanée de mutations dans des gènes distincts et se traduit donc par un coût de fitness trop important pour les agents pathogènes (Mundt, 2014). L'association de résistances quantitatives et qualitatives s'est également révélée un moyen efficace pour augmenter la durabilité des résistances variétales au champ, notamment dans le modèle *L. maculans*-colza (Delourme *et al.*, 2006; Brun *et al.*, 2010; Quenouille *et al.*, 2013).

Enfin, au-delà du coût de fitness lié à la perte d'un effecteur, la durabilité d'une résistance est également conditionnée par la biologie des agents pathogènes, leurs capacités de dispersion et la taille effective des populations. Ce sont généralement les agents pathogènes présentant un mode de reproduction mixte, à dispersion aérienne et présentant de grandes tailles de population qui présentent le plus grand potentiel adaptatif et donc pour lesquels l'apparition et la dispersion d'un allèle virulent seront les plus rapides (McDonald & Linde, 2002).

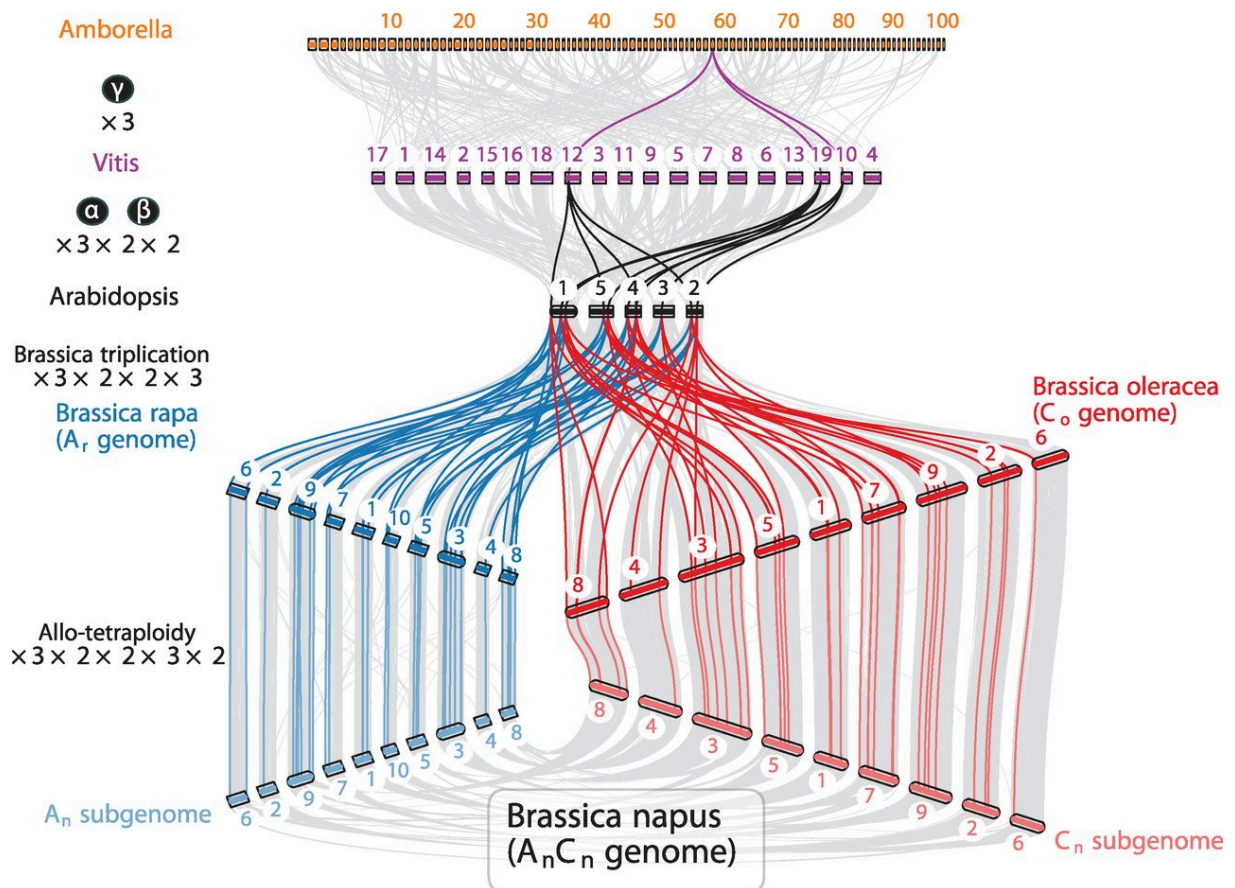


Figure 17: Le génome de *Brassica napus*.

B. napus est issu de l'allopolyploïdisation naturelle entre le navet (*B. rapa*, génome « A », 2N=20) et le chou (*B. oleracea*, génome « C », 2N=18).

Adapté de Chalhoub *et al.* (2014).

4 Le pathosystème *Brassica napus* / *Leptosphaeria maculans*

4.1 *Brassica napus*

Le colza (*Brassica napus*) est une espèce végétale de la famille des Brassicaceae, issue de l'allopolyploïdisation entre le navet (*B. rapa*) et le chou (*B. oleracea*), ayant probablement eu lieu de multiple fois de façon indépendante. L'espèce est apparue il y a environ 7500 ans, mais des événements d'allopolyploïdisation beaucoup plus récents sont soupçonnés (Allender et King, 2010). Le génome de *B. napus* a récemment été séquencé (Chalhoub *et al.*, 2014, Figure 17).

Le colza est une culture d'une grande importance économique en Europe, Amérique du Nord, Chine et en Australie, avec 36,4 millions d'hectares cultivés au niveau mondial en 2013. En France, les surfaces de colza représentaient 1,4 millions d'hectares en 2013, pour une production totale de 4,4 millions de tonnes (Données FAO). Le colza est principalement utilisé pour la production d'huile à partir de ses graines, consacrée à l'alimentation humaine ou à un usage industriel, mais également pour la production de tourteaux, sous-produits de l'extraction de l'huile, destinés à l'alimentation animale. Ces dernières années la production d'agrocultures à partir de l'estérification de l'huile de colza constitue un nouveau débouché pour cette filière.

Les principaux bioagresseurs pouvant impacter le rendement des cultures de colza sont les insectes et les champignons. Les ravageurs les plus dommageables sont les altises et les charançons. Les maladies fongiques causées par *L. maculans* et *Sclerotinia sclerotinium* sont également très importantes. Enfin, les adventices peuvent également avoir un fort impact sur le rendement de cette culture.

4.2 *Leptosphaeria maculans*

4.2.1 Description et phylogénie

L. maculans est un champignon de la famille des Dothidéomycètes et de l'ordre des Pléosporales (Figure 18). La classe des Dothidéomycètes regroupe environ 19000 espèces,

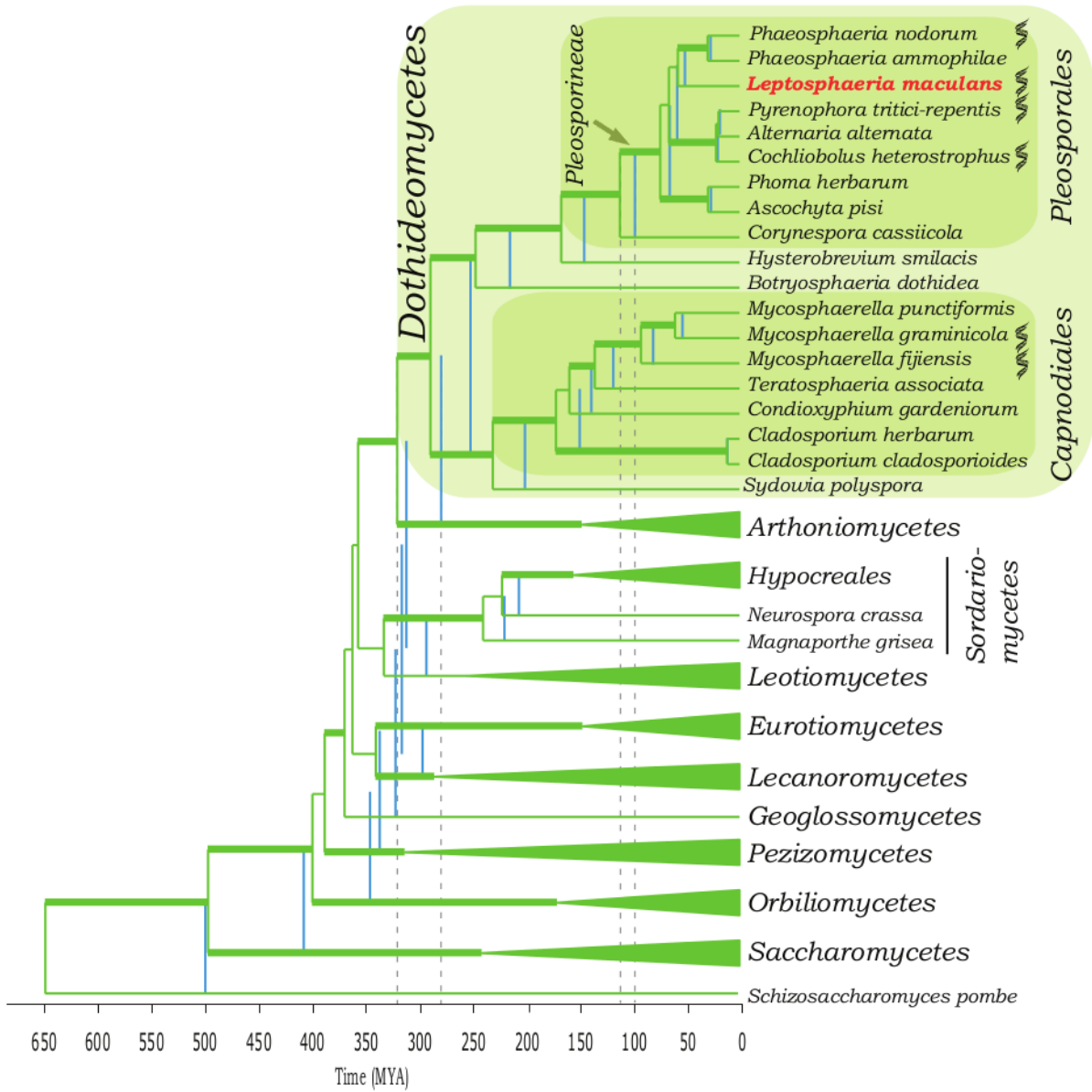


Figure 18: Relation phylogénétique et temps de divergence entre les champignons de la classe des Ascomycètes.

Adapté de Rouxel *et al.* (2011)

reparties en 249 genres (Hyde *et al.*, 2013). L'ordre des Pléosporales est le plus important au sein de la classe des Dothidéomycètes, avec plus de 4700 espèces (Zhang *et al.*, 2011). La majorité des champignons appartenant à l'ordre des Pléosporales ont un mode de vie saprophyte, mais on trouve également des espèces présentant des modes de vie nécrotrophes, hémibiotrophes ou endophytes (Schoch *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Les Pléosporales regroupent de nombreux agents phytopathogènes tels que *Stagonospora nodorum*, *Alternaria alternata* ou *Cocchiobolus heterostrophus*.

L. maculans est l'agent pathogène responsable de la nécrose du collet des crucifères, également appelée phoma du colza. Bien que *L. maculans* soit capable d'attaquer une grande majorité des plantes de la famille des *Brassicaceae*, c'est sur colza que les dommages dus à ce champignon sont les plus importants. En effet, *L. maculans* provoque des nécroses au niveau du collet des tiges de colza en fin de saison culturale, pouvant potentiellement entraîner une verse parasitaire. Les pertes de rendement imputables à *L. maculans* ont été estimées de 5% à 20% en Europe (Fitt *et al.*, 2006). *L. maculans* est présent dans la majorité des principales zones de culture de colza : Europe, Australie et Amérique du Nord, mais il est absent de Chine (Fitt *et al.*, 2006). Toutefois, les échanges globaux et le déploiement de cultivars de colza sensibles à *L. maculans* font craindre l'émergence de cette maladie dans cette région. *L. maculans* et l'espèce proche *L. biglobosa* constituent un complexe d'espèce et seule *L. biglobosa* est présente en Chine. *L. maculans* et *L. biglobosa* ont un cycle de développement similaire. Toutefois, contrairement à *L. maculans* qui provoque des nécroses au niveau du collet des plantes en fin de saison de culture, *L. biglobosa* développe quant à lui des nécroses au niveau des tiges et impacte donc peu le rendement.

4.2.2 Cycle de vie

L. maculans est un champignon hémibiotrophe et a un cycle de vie complexe, « calqué » sur le cycle de développement du colza. Le champignon alterne plusieurs modes de nutrition au cours de son cycle de développement (Rouxel & Balesdent, 2005). *L. maculans* se développe de façon saprophyte sur les résidus de culture infectés lors de la précédente saison de culture. C'est là qu'il effectue sa reproduction sexuée en produisant des ascospores au sein de périthèces (Figure 19.A). Il s'agit d'une étape importante de son cycle de développement, car les ascospores sont à l'origine de l'inoculum primaire, principal vecteur de dispersion de

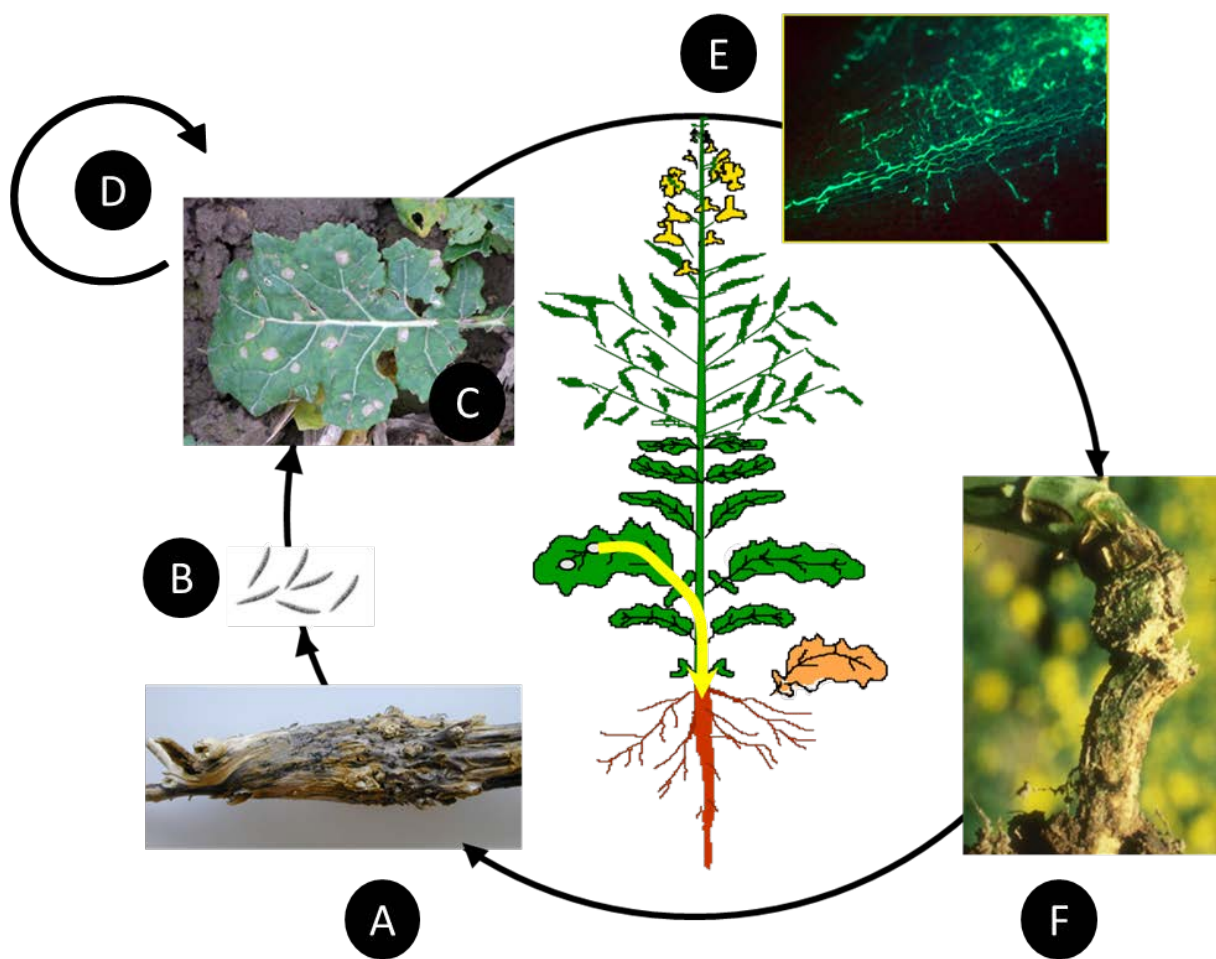


Figure 19: Le cycle de développement de *Leptosphaeria maculans* en Europe.

A. *L. maculans* effectue sa reproduction sexuée sur les résidus de culture de colza, les ascospores sont produites au sein de périthèces à la fin de l'été. **B.** A l'automne, les ascospores sont libérées et disséminées sur de grandes distances par le vent. **C.** Les ascospores germent et pénètrent les feuilles de colza par les stomates. Suite à une courte phase biotrophe, des macules se forment sur les feuilles de colza, où des conidies se forment dans des pycnides issues de la reproduction asexuée. **D.** Les conidies sont une source d'inoculum secondaire et peuvent être responsable de l'infection de feuilles adjacentes par phénomène de « splashing ». **E.** Au cours de l'hiver, *L. maculans* se développe de manière systémique dans la plante, jusqu'au collet, de façon totalement asymptomatique. **F.** *L. maculans* devient nécrotrophe en fin de saison de culture et peut causer une verse parasitaire. Adapté de Rouxel et Balesdent (2005).

la maladie (West *et al.*, 2001). A l'automne (en Europe), lorsque les conditions environnementales sont favorables au développement du champignon (i.e suite à des périodes de pluie et une baisse des températures), les ascospores sont libérées (Figure 19.B) et peuvent être disséminées sur de grandes distances par le vent (West & Fitt, 2005). Les ascospores germent sur les feuilles de colza et les hyphes pénètrent la plante par les stomates et colonisent les tissus du mésophylle. Suite à une courte phase biotrophe et asymptomatique, des macules de forment sur les feuilles de colza infectées (Figure 19.C). Lors de cette phase nécrotrophe, le champignon effectue sa reproduction asexuée en produisant des conidies au sein de pycnides (Figure 19.D). Ces conidies sont une source d'inoculum secondaire et peuvent infecter les feuilles adjacentes par phénomène de « splashing » (Travadon *et al.*, 2007). En Europe, la formation de macules n'impacte pas le rendement et la plante continue sa croissance. Toutefois, en Australie, un important développement de macules foliaires peut entraîner la mort des jeunes plantules de colza et être à l'origine d'une fonte de semis potentiellement dommageable pour le rendement (West *et al.*, 2001). Au cours de l'hiver, *L. maculans* colonise les tissus végétaux de façon systémique jusqu'à atteindre le collet, la base de la tige du colza (Figure 19.E). Lors de cette phase, le champignon a un mode de vie endophyte et aucun symptôme n'est visible sur les plantes de colza. Les mécanismes moléculaires permettant à *L. maculans* de se développer tout au long de l'hiver dans les tissus de la plante, actuellement très peu caractérisés, sont en cours d'étude dans l'équipe où j'ai effectué ma thèse. En fin de saison de culture, *L. maculans* redevient nécrotrophe et déclenche une nécrose des tissus du collet du colza, pouvant entraîner une verse parasitaire (Figure 19.F).

4.2.3 Le génome de *L. maculans*

Le séquençage de *L. maculans* en 2007 a révélé une structure originale de génome, en « isochores » qui était alors inédite chez les champignons (Rouxel *et al.*, 2011). *L. maculans* a un génome de 45.1 Mb, assemblés en 76 SuperContigs, correspondant à 18 chromosomes dont un est dispensable. Le nombre de gènes prédits chez *L. maculans* est de 12469 gènes, ce qui est comparable avec le contenu en gènes de la plupart des autres champignons séquencés à ce jour (Rouxel *et al.*, 2011). Le génome de *L. maculans* présente la particularité



Figure 20: La structuration en isochores du génome de *Leptosphaeria maculans*.

Exemple de l'extrémité 5' du SC12. Les isochores GC ont un taux de base GC équilibré et contiennent 95% des gènes prédits. Les isochores AT sont composés d'une mosaïque d'éléments transposables tronqués et dégénérés par le mécanisme de RIP, et sont pauvres en gènes.

d'avoir été largement envahi par des éléments transposables (ET), qui constituent 36 % de son génome (Rouxel *et al.*, 2011).

La présence d'ET dans le génome de *L. maculans* est responsable de sa structuration en isochores (Figure 20). Deux types d'isochores distincts sont présents dans le génome de *L. maculans*. Les isochores GC ont une proportion équilibrée de bases GC (51,0 %), tandis que les isochores AT ont un taux de bases GC de 33,9 %. Les isochores AT présentent un faible taux de recombinaison et sont majoritairement composés d'une mosaïque d'éléments transposables tronqués et dégénérés par le mécanisme de RIP (cf 3.2.1). C'est l'action du RIP, par la génération de nombreuses mutations C→T et G→A qui a conduit au déséquilibre en bases nucléotidiques des isochores AT. L'assemblage du génome de *L. maculans* a mis en évidence l'alternance des isochores AT et des isochores GC le long de tous les chromosomes, avec 413 isochores AT et 399 isochores GC décrits (Rouxel *et al.*, 2011). Bien que la structuration en isochores ait été précédemment mise en évidence chez les génomes de nombreux eucaryotes supérieurs végétaux ou animaux (Eyre-Walker & Hurst, 2001; Zhang & Zhang, 2004), *L. maculans* est le premier champignon pour lequel une telle structure de génome ait été décrite. Les isochores AT de *L. maculans* ont une taille moyenne de 38,6 kb, bien plus faible que pour les isochores décrits chez les vertébrés, où celle-ci est généralement supérieure à 300 kb (Bernardi, 2000; Costantini *et al.*, 2009).

Environ 95% des gènes prédits dans le génome de *L. maculans* sont concentrés dans les isochores GC, tandis que les isochores AT ne contiennent que 5 % des gènes prédits. Toutefois, les isochores AT sont enrichis en gènes ayant un rôle dans la pathogénie du champignon, et notamment en gènes codant des petites protéines sécrétées (PPS). Il a été montré que les isochores AT avaient un rôle à la fois dans l'évolution et la régulation de l'expression des gènes intervenant dans la pathogénie chez *L. maculans* (Fudal *et al.*, 2009; Daverdin *et al.*, 2012; Soyer *et al.*, 2014).

4.2.4 Les gènes d'avirulence de *L. maculans*

A ce jour, onze gènes d'avirulence ont été génétiquement caractérisés chez *L. maculans* et six ont été clonés : *AvrLm1*, *AvrLm2*, *AvrLm4-7*, *AvrLm6*, *AvrLm11* et *AvrLmJ1*

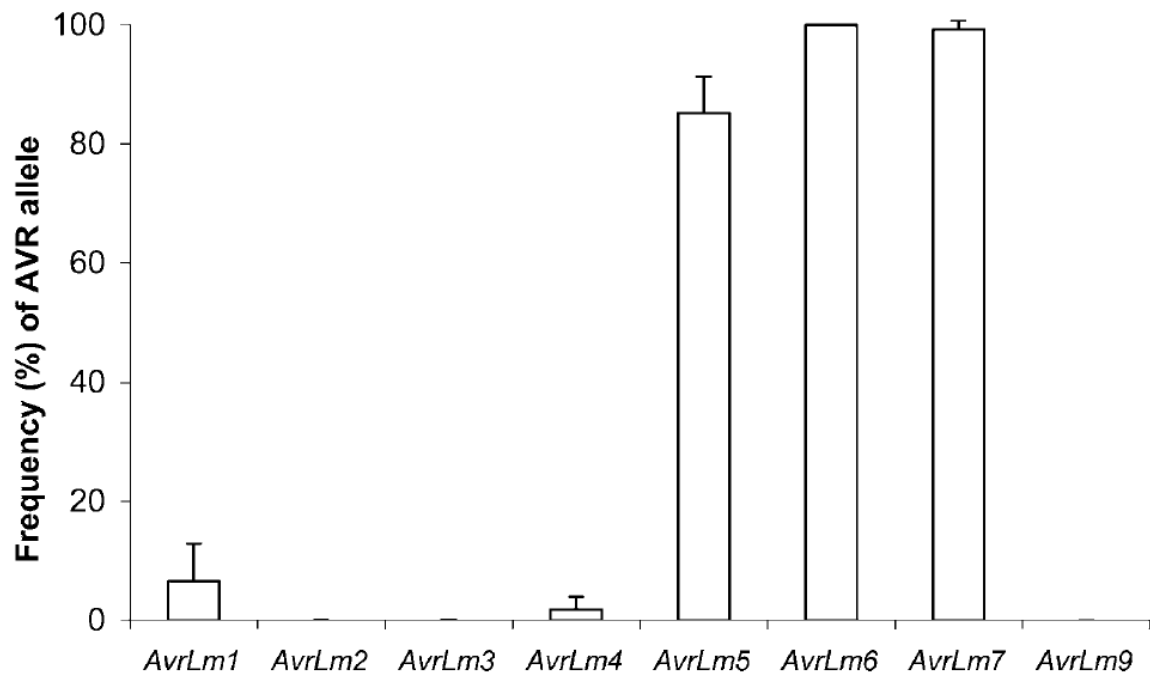


Figure 21: Fréquence des allèles avirulents des gènes *AvrLm1* à *AvrLm9* chez les populations européennes de *Leptosphaeria maculans*.

Adapté de Stachowiak *et al.* (2006).

(Gout *et al.*, 2006; Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009; Balesdent *et al.*, 2013; Ghanbarnia *et al.*, 2014; Van de Wouw *et al.*, 2014). Sept de ces gènes d'avirulence sont regroupés en deux clusters génétiques distincts : *AvrLm1-AvrLm2-AvrLm6* et *AvrLm3-AvrLm4-AvrLm7-AvrLm9* (Balesdent *et al.*, 2002). La totalité de ces gènes est localisée au sein d'isochores AT. Les gènes d'avirulence de *L. maculans* présentent des caractéristiques communes aux effecteurs fongiques : ils codent pour des petites protéines sécrétées riches en cystéine (à l'exception d'*AvrLm1*) et sont spécifiquement exprimés lors des phases précoces de l'infection de *B. napus*. De plus, ils ne présentent que de faibles homologies de séquence avec ceux d'autres espèces fongiques. En tant que gènes codant pour des effecteurs, les gènes d'avirulence de *L. maculans* sont supposés jouer un rôle dans la pathogénie du champignon. Toutefois, si leur implication dans la fitness fongique a parfois été démontrée (Huang *et al.*, 2006 ; 2010; Chapitre 2), leur mode d'action reste inconnu.

4.3 Les méthodes de lutte contre *L. maculans*

Les agriculteurs disposent de différents leviers pour limiter l'impact de *L. maculans* sur les rendements.

4.3.1 Gestion agronomique

La mise en place de pratiques agronomiques optimisées est un des moyens de lutte contre *L. maculans*. Notamment, l'enfouissement des résidus de cultures, où a lieu la reproduction sexuée, diminue la quantité d'inoculum primaire à l'origine des épidémies (West *et al.*, 2001). La rotation des cultures permet également de limiter l'impact de la maladie. Toutefois, les pratiques agricoles actuelles ont plutôt tendance à favoriser le développement de *L. maculans*. En effet, depuis plusieurs années, le travail simplifié du sol prend le pas sur la technique du labour. De plus, dans les grandes zones de culture de colza, les rotations sont fortement raccourcies.

4.3.2 Lutte chimique

Bien qu'étant efficace contre *L. maculans*, la lutte chimique est peu utilisée actuellement en France. Cela s'explique par son coût élevé et la difficulté du positionnement des traitements, devant coïncider avec les périodes de dispersion des ascospores (West *et al.*, 2002). De plus, les volontés politiques croissantes pour encourager la baisse de l'utilisation des produits pesticides poussent à favoriser d'autres méthodes de lutte.

4.3.3 Lutte variétale

La lutte génétique est de loin la méthode de lutte la plus utilisée et la plus efficace contre *L. maculans*. Elle repose sur le déploiement de cultivars possédant des gènes de résistances majeurs contre *L. maculans* (*Rlm*), ou des niveaux de résistances quantitatives élevés.

La résistance quantitative permet aux cultivars de colza de tolérer la maladie ; malgré l'infection des plantes par *L. maculans*, celles-ci ne présentent que peu de symptômes au niveau du collet en fin de saison de culture, limitant donc le risque de verse parasitaire. Les résistances quantitatives étant supposées multigéniques, elles sont considérées comme plus durables. Toutefois, les mécanismes à la base de ces résistances sont encore peu connus. La résistance qualitative repose sur la sélection ou l'introgession de gènes de résistance *Rlm* dans les cultivars de colza. La HR induite par la reconnaissance des gènes d'avirulence correspondants au niveau foliaire empêche la colonisation des plantes par *L. maculans* et est donc très efficace et largement déployée dans les cultivars de colza. Seuls deux gènes de résistances alléliques ont actuellement été clonés chez *B. napus*, *Rlm2* et *LepR3* (Larkan *et al.*, 2013, 2015)

4.4 Le contournement des résistances variétales de *B. napus* par *L. maculans*

Les fréquences des allèles de neuf gènes d'avirulence de *L. maculans* ont été évaluées à l'échelle française et européenne en 2000/2001 et 2002/2003 respectivement (Balesdent *et al.*, 2006; Stachowiak *et al.*, 2006) (Figure 21). Ces deux études ont mis en évidence une même structuration des populations au niveau français et européen. La totalité des souches analysées possédaient un phénotype avirulent vis-à-vis de *Rlm6* et *Rlm7*. Les allèles des gènes *AvrLm1*, *AvrLm2*, *AvrLm3*, *AvrLm4* et *AvrLm9* étaient quant à eux totalement ou majoritairement virulent au sein des populations. Ces études mettent en exergue le faible nombre gènes de résistance majeurs efficaces contre les populations européennes de *L. maculans*. Par le passé, des gènes de résistance majeurs ont déjà été contournés. La prédominance des allèles virulents des gènes d'avirulence *AvrLm1*, *AvrLm4* et sans doute *AvrLm2* résulte du large déploiement au champ de variétés possédant les gènes de résistance *Rlm1*, *Rlm4* et *Rlm2* (Rouxel *et al.*, 2003).

La variété Jet Neuf est l'une des premières variétés de colza ayant bénéficié d'un travail de sélection, visant à diminuer la teneur en acide érucique de ses grains (Pinochet et Renard, 2012). Elle a été commercialisée dans les années 1970 et a rencontré un grand succès, représentant jusqu'à 60% des surfaces de colza cultivées en Europe (Doré & Varoquaux, 2006). Cette variété présente aussi une résistance contre *L. maculans*, assurée par le gène de résistance *Rlm4*, ainsi qu'un très bon niveau de résistance générale. L'importante pression de sélection résultant du large déploiement de ce cultivar au champ explique la prédominance du phénotype virulent vis-à-vis de *Rlm4* dans les populations de *L. maculans* actuelles. *Rlm1* est une résistance qualitative de *L. maculans* introduite dans les cultivars de *B. napus* dans les années 90 en parallèle de travaux démontrant pour la première fois l'existence relations gène-pour-gène dans le modèle *L. maculans*-colza, et démontrant en particulier que la résistance des cultivars Vivol et Capitot était due au gène majeur *Rlm1* (Ansan-Melayah et al., 1995). Or, cette résistance a été largement contournée en l'espace de seulement trois saisons de culture (entre 1998 et 2001), à la fois en Europe et en Australie (Rouxel et al., 2003; Sprague et al., 2006), introduisant ainsi de nombreuses discussions au sein de l'INRA et dans la profession quant à l'intérêt d'utiliser des gènes majeurs de résistance dans ce modèle.

Ces deux exemples de contournement de gènes de résistance majeurs par *L. maculans* illustrent son grand potentiel adaptatif. Celui-ci est favorisé par l'importance de la reproduction sexuée dans le cycle de vie du champignon et la production d'une grande quantité de spores pouvant être disséminées sur de grandes distances par le vent. De plus l'environnement génomique des gènes d'avirulence de *L. maculans* joue un rôle dans sa rapide adaptation vis-à-vis des résistances variétales. En effet, outre qu'ils sont le lieu favorisé de délétions ou d'insertion d'ET dans les séquences codantes (Gout et al., 2007; Fudal et al., 2009; Daverdin et al., 2012), les isochores AT dans les lesquels ont été localisés les gènes d'avirulence sont soumis au mécanisme de RIP (cf. 3.2.1). Or, le RIP mis en place lors de la reproduction sexuée peut également affecter les gènes situés à proximité des ET et son rôle a été décrit comme un des mécanismes moléculaires majeurs dans l'acquisition de la virulence vis-à-vis des gènes *Rlm7* et *Rlm6* (Fudal et al., 2009; Daverdin et al., 2012).

Les gènes majeurs de résistances vis-à-vis de *L. maculans* peuvent donc avoir une faible durée d'efficacité au champ. Cela constitue l'un des principaux obstacles dans les stratégies de lutte contre cet agent pathogène. Des expérimentations au champ visant à étudier la durabilité de la résistance *Rlm6*, qui n'est pas encore introduit dans les variétés commerciales, ont été menées. Cela a mis en évidence que la combinaison de ce gène de résistance avec des résistances quantitatives est un moyen efficace de prolonger la durabilité de ce gène de résistance (Delourme *et al.*, 2006; Brun *et al.*, 2010).

4.5 *Rlm7* une résistance spécifique plus durable ?

Suite au contournement rapide et massif de la résistance *Rlm1*, des variétés contenant le gène de résistance majeur *Rlm7* ont été introduites sur le marché en 2004. Ces cultivars ont connu un rapide succès de par leur grande efficacité contre *L. maculans*. En effet, en 2002/2003, l'évaluation des fréquences alléliques des gènes d'avirulence avait montré que la quasi-totalité des souches européennes de *L. maculans* étaient avirulentes vis-à-vis de *Rlm7*. Le rapide contournement de *Rlm1* faisait craindre la faible durabilité de cette résistance. Toutefois, dix ans après l'introduction des variétés, très peu de souches étaient devenues virulentes vis-à-vis de *Rlm7*.

L'article suivant dresse l'état des lieux de l'évolution des populations françaises de *L. maculans* face à la pression de sélection exercée par *Rlm7*. Il a été publié en mai 2015 dans la revue « Phytoma ». Cette revue française est spécialisée dans le domaine de la protection des cultures à destination des acteurs du monde agricole.



Résistance du colza au phoma : où en est l'efficacité de Rlm7 ?

Aujourd'hui, en France, de nombreuses parcelles de colza bénéficient de la résistance variétale au phoma apportée par le gène Rlm7. Cela va-t-il durer ?

MARIE-HÉLÈNE BALESSENT*, CLÉMENCE PLISSONNEAU*, LAURENT COUDARD*, GUILLAUME DAVERDIN*, LOÏC LE MEUR**, JULIEN CARPEZAT***, MARTINE LEFLON***, XAVIER PINOCHET***, MAGALI ERMEL****, HORTENSE BRUN**** ET THIERRY ROUXEL*

La nécrose du collet du colza, ou phoma du colza, est l'une des principales maladies cryptogamiques de cette culture (Fitt *et al.*, 2006). Face à cette maladie, la résistance variétale est un outil... à utiliser avec vigilance. Preuve ci-après, à propos du gène Rlm7.

Des histoires de génétique Régression de l'impact du phoma grâce à la génétique

Ces dix dernières années, la maladie est restée discrète. Cette situation est liée à des conditions météorologiques peu favorables aux épidémies, mais surtout à l'amélioration génétique des variétés de colza pour leur résistance à la maladie.

En effet, le comportement variétal du colza vis-à-vis du phoma est un des critères principaux pris en compte par les sélectionneurs. Par ailleurs, le CTPS a mis en place de longue date un règlement qui promeut l'inscription de variétés résistantes et élimine les variétés trop sensibles.





Résistance variétale : les deux types

Deux types de résistance au phoma sont généralement décrits (Delourme *et al.*, 2006). – d'une part les résistances quantitatives, efficaces vis-à-vis de toutes les souches de l'agent pathogène, mais n'apportant qu'un niveau partiel de résistance (les plantes peuvent être infectées, mais l'intensité de

1 – Les interactions gène pour gène dans le modèle phoma-colza

Lorsque la plante possède un gène de résistance spécifique Rlm, elle développe une réaction de résistance vis-à-vis des souches possédant l'allèle avirulent du gène d'avirulence correspondant, noté AvrLm (case verte).

Dans tous les autres cas, la plante ne détecte pas la présence de l'agent pathogène. Ce dernier peut alors induire les symptômes typiques de la maladie (macules foliaires, cases rouges).

	Rlm	rlm
AvrLm		
avrLm		

la nécrose au collet reste réduite et impacte peu le rendement). Le niveau de résistance quantitative des variétés est en constante augmentation.

– d'autre part, les résistances contrôlées par des gènes majeurs de résistance, qui bloquent l'infection primaire donc apportent une protection totale, mais uniquement vis-à-vis de la fraction de la population pathogène portant les allèles avirulents des gènes d'avirulence correspondants (Encadré 1) (Balesdent *et al.*, 2002).

Le gène Rlm1, grandeur et décadence

Le gène de résistance spécifique Rlm1 avait été introduit dans les variétés de colza au début des années 1990, dans un contexte où plus de 90% des souches de phoma portaient l'allèle avirulent du gène correspondant, AvrLm1 (Rouxel *et al.*, 2003).

Ce gène s'est révélé très efficace. Il a donc été très utilisé, avec 20% des surfaces de colza françaises portant Rlm1 en 1995 et 40-45% en 1999 (Rouxel *et al.*, 2013).

Ce gène a ainsi exercé une pression très forte sur le champignon. Celle-ci a conduit à une sélection rapide de souches virulentes dans les populations de phoma. Cela s'est traduit par un contournement de la résistance en quelques années.

Ce phénomène est une illustration typique d'un cycle de « boom-and-bust » et du potentiel adaptatif des parasites aériens en grande culture (Rouxel *et al.*, 2003).

En 2004, arrivée de Rlm7

Depuis cet épisode de contournement, un nouveau gène de résistance spécifique, Rlm7, a été introduit dans des hybrides de colza commercialisés à partir de 2004,

RÉSUMÉ

♦ **CONTEXTE** - Depuis dix ans, un gène de résistance spécifique du colza au phoma, Rlm7, est largement déployé sur le territoire français. Actuellement, des macules sont parfois observées sur des génotypes Rlm7, suggérant que la résistance pourrait être contournée.

♦ **ÉTUDE** - Cet article fait le point des connaissances actuelles sur les populations virulentes sur Rlm7 en France.

Il se base sur un suivi national sur trois campagnes entre 2000 et 2013, un suivi annuel depuis 2004 en région Centre et un essai sur deux sites en Île-de-France avec analyses PCR. Il propose des pistes pour préserver la durabilité de ce gène.

♦ **MOTS-CLÉS** - Colza, phoma, *Phoma lingam*, *Leptosphaeria maculans*, résistance, gène Rlm7, durabilité, contournement.

SUMMARY

♦ **RESISTANCE TO CONTROL PHOMA ON OILSEED RAPE** - In France, the major resistance gene Rlm7 has been deployed on a wide scale these last 10 years to control phoma (stem canker) on oilseed rape. It was successful but, now, phoma leaf spots can be observed on some Rlm7 genotypes.

This fact suggests that the resistance could be overwhelmed.

This paper summarizes our current knowledge on virulent isolates toward Rlm7 in French phoma populations. The ways to increase Rlm7 durability are discussed.

♦ **KEYWORDS** - Oilseed rape, France, phoma (stem canker), *Phoma lingam*, *Leptosphaeria maculans*, resistance, virulent isolates, Rlm7 genotypes, overwhelmed, durability.



2 – Méthode d'obtention et de caractérisation de populations de *Leptosphaeria maculans*

1/Découpage d'une macule de phoma typique sur feuille de colza, et mise en « chambre humide » pendant 48 heures.

2/Observation à la loupe des pycnides sporulantes (gouttelettes rosées), prélevement à l'aide d'une aiguille stérile et dépôt des spores sur milieu de culture.

3/Purification et mise en culture des souches en boîte de Petri.

4/Phénotypage des souches par inoculation sur variétés différentielles puis observation à l'oeil nu (ici, la souche est virulente sur le génotype de colza représenté par le cotylédon de gauche cf. les macules, mais avirulente sur celui du cotylédon de droite).

5/Alternativement, caractérisation par analyse moléculaire, ici méthode HRM (Carpezat *et al.*, 2014).

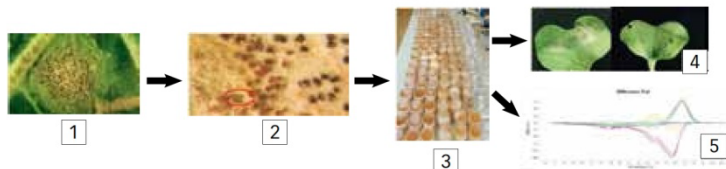


Fig. 1 : Localisation des sites analysés en 2009-2010 et 2013, et fréquence des souches virulentes (en rouge) vis-à-vis de Rlm7

L'intensité du grisé traduit l'intensité de la culture de colza sur chaque département en 2013 (source : Geves).

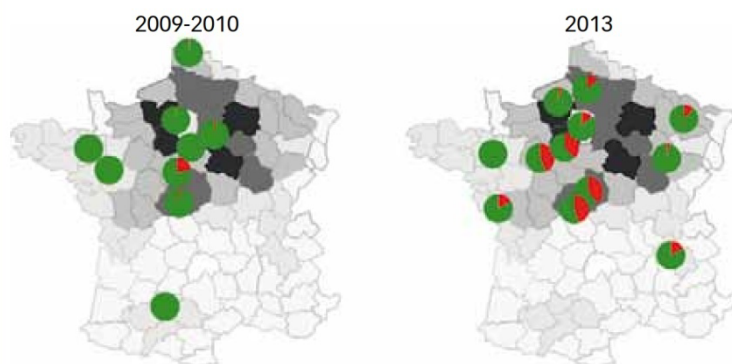


Tableau 1 : Fréquence des allèles virulents vis-à-vis du gène Rlm7 dans les populations françaises de phoma (*Leptosphaeria maculans*)

Années d'échantillonnage	2000-2001	2009-2010	2013
Nombre de sites étudiés	20	8	12
Variétés échantillonnées	Drakkar	Drakkar	Drakkar, Falcon
Nombre de souches analysées	1787	577	1172
Fréquence moyenne (%) des souches virulentes sur Rlm7 (entre parenthèses, % minimal et maximal)	0,06 % (0-1 %)	3,99 % (0-22,5 %)	19,5 % (0-45 %)

dans un contexte où 99,9% des souches de phoma étaient avirulentes vis-à-vis de Rlm7 (Balesdent *et al.*, 2006). Ces hybrides ont donc connu un très large succès. Les enquêtes du Cetiom évaluaient leurs parts de marché à 27% en 2009. Aujourd'hui

ces hybrides occupent environ 50 % des surfaces au niveau national et peuvent atteindre localement 70%.

Dans cet article, nous ferons un bilan des études de populations de phoma réalisées ces quinze dernières années, pour illustrer

l'état actuel du contournement de Rlm7 à l'échelle du territoire, en comparaison avec le contournement passé de Rlm1.

Analyse des populations de phoma

À l'échelle nationale, trois campagnes à quelques années d'intervalle

Trois grandes campagnes d'analyses de populations de phoma ont été menées à l'échelle du territoire : en 2000-2001, en 2009-2010 et en 2013 (Tableau 1).

Pour chaque campagne, une variété sans gène de résistance (Drakkar) ou avec un gène de résistance déjà contourné (Falcon) est semée.

À l'automne, des feuilles portant des macules typiques de phoma sont prélevées, chacune sur une plante différente. L'effectif visé est de 80 à 100 souches par site.

Des isolaments monopycnidiens sont alors réalisés sous loupe binoculaire à partir de ces macules, et les souches sont ensuite caractérisées soit par inoculation de suspensions de spores sur une gamme de variétés différentielles (Balesdent *et al.*, 2006), soit à l'aide d'outils moléculaires (Carpezat *et al.*, 2014) (Encadré 2).

Résultats : une évolution indéniable

En 2000-2001, une seule souche analysée sur plus de 1 700 était virulente vis-à-vis de Rlm7.

Dix ans plus tard, la fréquence des souches virulentes atteint 4%. Leur présence est détectée dans la moitié des sites échantillonnés, avec de très grandes variations suivant les sites (0% à 22,5%, Figure 1).

À l'automne 2013, la moyenne nationale se situe autour de 19% (Tableau 1), et des souches virulentes sont détectées dans tous les sites sauf Rennes, à des fréquences très variables (4 à 45%) suivant les sites.

Au plan régional, les quatre sites du centre et de la Beauce montrent des fréquences de virulence proches (37,6 à 45%), suggérant un réel contournement de Rlm7 dans cette zone (Figure 1). En Normandie et dans l'est, les fréquences sont inférieures à 10%. Pour le reste des sites les fréquences sont comprises entre 12% et 17%.

Suivi annuel en région Centre depuis 2004

Dans une zone de la région Centre fréquemment atteinte par le phoma, à l'échelle de quelques communes, le Cetiom a réalisé un suivi annuel depuis 2004.

Si aucun individu virulent n'a été détecté jusqu'à l'automne 2009 sur les variétés sans le gène Rlm7, quelques individus virulents ont été détectés lors des automnes 2010 et 2011 (fréquence inférieure à 3%).

Ensuite, on note une explosion des individus virulents : 49% et 45% à l'automne 2012 et 2013, respectivement.



Pratiques culturales et contournement : étude d'un cas extrême

Deux sites en Île-de-France, deux conduites de culture différentes

Pour tenter de comprendre les facteurs favorisant la sélection et le succès des souches virulentes, un essai a été conduit sur plusieurs années à l'Inra, sur les sites expérimentaux de Versailles et Grignon, distants d'une vingtaine de kilomètres.

Cette expérimentation visait à mesurer l'impact de pratiques culturales favorables à la maladie sur la vitesse de sélection des souches virulentes. Sur ces deux sites, les variétés Rlm7 Roxet (2004-2005) puis Exagone (2005-2008) ont été cultivées.

Sur le site de Versailles les cultures ont été implantées avec une rotation colza-céréales, un intervalle supérieur à trois ans entre deux cultures de colza et un labour après colza pour enfouir les résidus.

Sur le site de Grignon, les variétés Rlm7 ont été semées sur la même parcelle, et seul un travail simplifié du sol est réalisé entre deux cultures.

Ces deux sites représentent donc des situations extrêmes, soit très prudentes en terme de contrôle de la maladie (Versailles) soit très risquées (Grignon).

Dans les deux sites, une bande de 10 mètres de large, contiguë aux parcelles portant Rlm7, est semée avec une variété « piège », ne portant pas Rlm7, sur laquelle sont réalisés chaque année des échantillonnages de populations de phoma à partir de macules foliaires développées à l'automne.

Au cours de ce travail, 1 309 souches de phoma ont été ainsi isolées et phénotypées pour leur virulence vis-à-vis de Rlm7. Les populations locales avaient été caractérisées sur les deux sites avant l'expérimentation. Enfin, des populations locales ont été échantillonnées à proximité de la parcelle expérimentale de Grignon, pendant et quelques années après la fin de l'expérience (2006, 2009, 2011, 2012 et 2013).

Résultat : oui, les pratiques culturales ont un effet sur le contournement !

Cet essai a révélé une différence très significative entre les évolutions des fréquences de souches virulentes sur les deux sites :

- à Versailles, les souches virulentes restent indétectables pendant toute la durée de l'expérimentation.

- à Grignon, la fréquence de souches virulentes atteint 9,3% dès la seconde année de pratiques culturales « risquées », soit en 2006 ; elle triple en 2007 (Figure 2).

Cette évolution des fréquences de virulence reste très localisée à la parcelle expérimentale elle-même. En effet, aucune souche virulente n'est détectée en 2006 dans une parcelle de colza située à 500 m de la parcelle expérimentale (Figure 2).

Fig. 2 : Évolution des fréquences de virulence vis-à-vis de Rlm7 selon les pratiques culturales

La fréquence de souches virulentes a été estimée sur des populations échantillonnées sur variétés pièges sans Rlm7.

Losanges : populations sur le site de Grignon ; les rouges correspondent à la population de la parcelle expérimentale soumise aux « pratiques culturales risquées » ; les jaunes correspondent aux populations prélevées sur le site (distance maximale à la parcelle expérimentale = 800 mètres) soumises à des pratiques standard (rotation, labour).

Carrés bleus : populations échantillonnées à Versailles (pratiques standard).

Barres verticales : intervalle de confiance exact calculé en fonction des effectifs analysés. Flèche grise : période d'expérimentation « pratiques culturales risquées » sur Grignon.

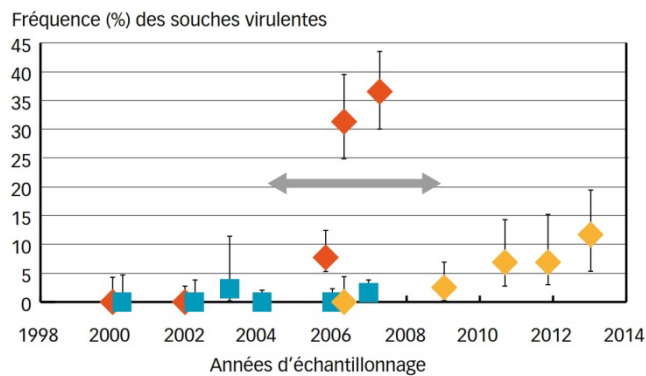


Tableau 2 : Type et fréquence des événements mutationnels dans le gène AvrLm7, responsables de l'acquisition de la virulence vis-à-vis des variétés Rlm7

Type d'événement moléculaire	Fréquence dans la population virulente (Grignon)	Nombre d'haplotypes différents	Rôle de la reproduction sexuée sur la génération de cet événement
Délétion complète d'AvrLm7 (gène + régions flanquantes)	45,8 %	ND	Oui
Mutations multiples par mécanisme de « RIP »	24,1 %	98	Oui
Délétion de deux bases nucléotidiques	7,2 %	2	?
Mutation ponctuelle non synonyme	3,9 %	7	Non
Délétion partielle (région promotrice)	17 %	ND	Oui
Dérégulation (sous expression)	0,8 %	ND	Non
Insertion d'un élément transposable dans AvrLm7	0,7 %	ND	Oui
Délétion d'une base nucléotidique	0,5 %	2	?

Effet du passage à des pratiques « prudentes »

Fin 2008, la parcelle expérimentale de Grignon a été labourée après récolte du colza. Les fréquences de virulence ont été suivies sur des parcelles de colza proches de 2009 à 2013. En 2009, le pourcentage de souches virulentes est très faible (1,25%). Ensuite, les fréquences de virulences vont progresser au rythme de l'évolution à l'échelle nationale (losanges jaunes Figure 2).

Quel est le moteur de la génération d'isolats virulents ?

Analyse moléculaire des souches virulentes

Pour identifier les événements moléculaires responsables de l'acquisition de la virulence vis-à-vis de Rlm7, 769 souches virulentes issues de la parcelle expérimentale de Grignon ont été caractérisées. L'analyse moléculaire a été réalisée par amplification PCR du gène AvrLm7 et séquençage de l'allèle si



> Les souches virulentes seraient générées par reproduction sexuée sur les résidus.



Photo : T. Rouxel - Inra

le gène était amplifié (Daverdin *et al.*, 2012). Ce travail a montré l'existence d'un grand nombre d'événements moléculaires différents responsables de l'acquisition de la virulence (Tableau 2). De plus, pour chaque type d'événement, un très grand nombre d'allèles différents est observé. Cette diversité a été observée sur une population isolée de l'unique parcelle expérimentale de Grignon, ceci dès la première année d'étude.

Rôle de la reproduction sexuée du champignon

Parmi ceux-ci, la délétion totale ou partielle du gène, l'inactivation par mutations multiples dues au mécanisme de RIP (Repeat-induced point mutation) (Fudal *et al.*, 2009) et l'insertion d'éléments transposables dans la séquence du gène sont générés spontanément au cours de la méiose donc de la

reproduction sexuée. Ces événements totalisent à eux seuls 87,6% des cas de virulence observés (Tableau 2).

Il est donc suggéré que des souches virulentes peuvent être générées localement chaque année suite à la reproduction sexuée du champignon, laquelle a lieu sur les résidus de culture.

Les ascospores, produits de la méiose, constituent en effet l'inoculum primaire. Les souches virulentes ainsi générées risqueront d'autant plus d'être sélectionnées qu'une variété portant Rlm7 sera cultivée à proximité immédiate de la culture précédente.

Durabilité de Rlm7 : les quatre hypothèses

L'analyse de l'évolution des fréquences de virulence dans les populations de phoma en France suggère une durabilité poten-

tielle plus élevée de la résistance Rlm7 que de Rlm1 : en trois ans d'usage de Rlm1, les souches virulentes vis-à-vis de ce gène ont constitué plus de 80% de la population française, alors qu'après dix ans de Rlm7 la fréquence moyenne des souches virulentes reste inférieure à 25% (Figure 3). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cela.

Hypothèse « suivi des conseils » ?

La première serait l'effet positif des conseils d'alternance variétale (alterner résistances quantitatives et résistances spécifiques) et de rotations évitant des retours trop fréquents du colza sur la même parcelle.

Néanmoins, en pratique, l'évolution tend plutôt vers le raccourcissement des rotations et l'augmentation des superficies cultivées avec du colza Rlm7 !

Rôle du climat : hypothèse recevable

Des conditions climatiques différentes, plus ou moins favorables à la maladie, ont pu davantage favoriser le contournement de Rlm1 que celui de Rlm7.

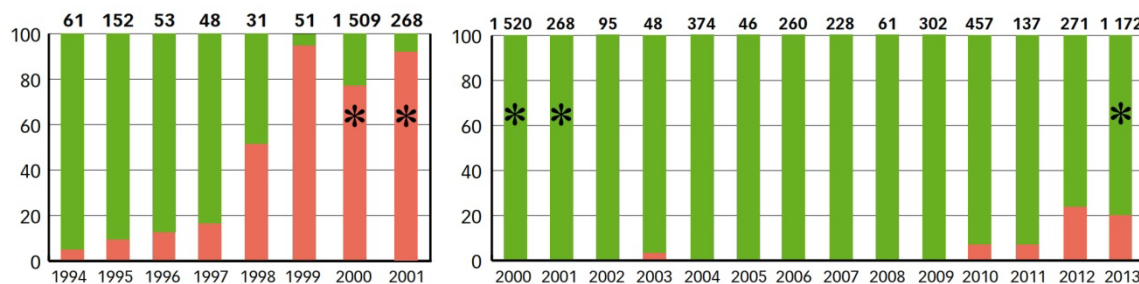
Effet « construction des variétés »

Une troisième hypothèse serait la construction des variétés Rlm7 commercialisées.



Fig. 3 : Évolution comparée des fréquences des souches virulentes vis-à-vis de Rlm1 et Rlm7

Les étoiles indiquent les échantillonnages nationaux. Les chiffres en gras représentent le nombre de souches analysées par année. Les barres rouges correspondent aux fréquences de souches virulentes ; diagramme de gauche, virulence sur Rlm1 ; à droite, virulence sur Rlm7.



En effet, il a été démontré que l'association d'une résistance spécifique avec un fort niveau de résistance quantitative accroît nettement la durabilité de la résistance spécifique (Brun *et al.*, 2010). Des variétés Rlm7 pourraient être dans ce cas. Tant que leur résistance Rlm7 n'est pas contournée, il est impossible d'évaluer leur résistance quantitative. Avec des sites approchant 50% de souches virulentes en 2013, des informations objectives sur la composante quantitative des variétés Rlm7 devraient être disponibles à court terme.

Fréquence initiale des virulences

La quatrième hypothèse réside dans le niveau initial de fréquence des virulences lors du début de l'utilisation commerciale du gène de résistance.

Quand les premières variétés Rlm1 ont été introduites en France, les fréquences de souches virulentes avoisinaient 10% et il n'a fallu que trois années pour constater une inversion des fréquences de virulence à l'échelle nationale (Figure 3). On peut supposer qu'il faut une période de temps assez longue pour que les fréquences de virulence

atteignent un niveau décelable (dans le cas de Rlm7, pour passer de 0,06% de virulentes en 2000 à environ 4% en 2010), mais que le contournement s'accélère une fois atteint des fréquences avoisinant 5-10%.

Le suivi du Cetiom en région Centre depuis 2004 appuie cette hypothèse.

Elle sera testée par suivi des populations sur les sites échantillonnés en 2013 durant deux années supplémentaires dans le cadre du projet « Dynamic-Rlm7 »⁽¹⁾.

Faire face à la nouvelle phase Risque d'accélération

Les résultats menés dans le site-pilote du Cetiom, ainsi que l'observation à l'échelle du territoire de l'évolution entre 2009 et 2013 des fréquences des virulences, suggèrent que l'on pourrait être arrivé dans une phase de contournement accéléré.

En conditions expérimentales maximisant le succès des souches virulentes, l'évolution a été très rapide : de 0 à 36% en trois ans.

Alternance variétale, rotation et destruction des résidus

Dans cet essai, les parcelles situées à quelques kilomètres et sur lesquelles des pratiques culturales optimales ont été appliquées (rotations > 3 ans, enfouissement des résidus par labour) ont été préservées de l'apparition de souches virulentes.

Il est donc crucial de préserver les régions dans lesquelles les fréquences de virulence sont encore faibles par un respect des délais de retour du colza, des règles de diversification et d'alternance des variétés et des pratiques culturales visant à la destruction des résidus de cultures.

En effet, ces derniers sont le lieu non seulement de la génération de l'inoculum de l'année suivante, mais aussi de la diversification allélique conduisant à la génération de souches virulentes.

Existe-t-il une cinquième hypothèse ?

Par ailleurs, un autre mécanisme a pu contribuer à ralentir l'apparition des souches virulentes vis-à-vis de Rlm7 : il s'agit de la relation entre l'acquisition de la virulence avrLm7 et la résurgence du phénotype avirulent sur les variétés possédant Rlm3 (Daverdin, 2011).

Ce mécanisme et ses conséquences en termes de gestion des résistances sont développés dans l'article suivant.

REMERCIEMENTS Ce travail a bénéficié d'un soutien financier du CTPS (Projet Evolep C3-2008-Phoma, Projet Icoscop 2012-2015), de l'ANR (Projet Gester) et du métaprogramme Inra SMaCH (Projet K-masstec). Les auteurs remercient C. Montagnier (Unité expérimentale Inra-Grignon) pour la gestion des parcelles expérimentales de Versailles et Grignon.

(1) Projet 2015-2016, financé par le progr. ANR « Investissements d'avenir » (LabEXBASC ; ANR-11-LABX-0034).

POUR EN SAVOIR PLUS

AUTEURS : *M.-H. BALESDENT, *C. PUISSONNEAU, *L. COUDARD, *G. DAVERDIN, *T. ROUXEL, Inra - UMR 1290 Bioger 78850 Thiverval-Grignon.

**L. LE MEUR, InVivo Agrosolutions - 83, avenue de la Grande-Armée 75782 Paris Cedex 16.

***J. CARPEZAT, ***M. LEFLON, ***X. PINOCHET, Cetiom 78850 Thiverval-Grignon.

****M. ERMEL, ****H. BRUN, Inra - UMR 1349 Igepp - domaine de la Motte - BP 35327 35653 Le Rheu Cedex.

CONTACT : marie.helene.balesdent@versailles.inra.fr

LIENS UTILES : <http://www6.versailles-grignon.inra.fr/bioger/Recherches/Leptosphaeria-maculans>

BIBLIOGRAPHIE : - Balesdent M.-H., Attard A., Kuhn M. L., Rouxel T. (2002). New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 92 : 1122-1133.

Balesdent M.-H., Louvard K., Pinochet X., Rouxel T. (2006). A large-scale survey of races of *Leptosphaeria maculans* occurring on oilseed rape in France. *Eur J Plant Pathol* 114 : 53-65.

Brun H., Chèvre A.-M., Fitt B. D. L., Powers S., Besnard A.-L., Ermel M., Huteau V., Mar-

quer B., Eber F., Renard M., Andrivon D. (2009). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol* 185 : 285-299.

Carpezat J., Bothorel S., Daverdin G., Balesdent M.-H., Leflon M. (2014). Use of high resolution melting analysis to genotype the avirulence AvrLm4-7 gene of *Leptosphaeria maculans*, a fungal pathogen of *Brassica napus*. *Ann Appl Biol* 164 : 430-440.

Daverdin G. (2011). Évolution moléculaire sous pression de sélection et implication dans la reconnaissance AvrLm3/Rlm3 du gène d'avirulence AvrLm4-7 chez *Lep-*

tosphaeria maculans. Thèse, université Paris-Sud, Orsay, France.

Daverdin G., Rouxel T., Gout L., Aubertot J.-N., Fudal I., Meyer M., Parlangue F., Carpezat J., Balesdent M.-H. (2012). Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *PLoS Pathog* 8 : e1003020.

Delourme R., Chèvre A.-M., Brun H., Rouxel T., Balesdent M.-H., Dias J.-S., Salisbury P., Renard M. and Rimmer S. R. 2006. Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Eur J Plant Pathol* 114 : 41-52.

5 Objectif de la thèse

Lorsqu'elles sont disponibles et identifiées, les résistances variétales sont une méthode de lutte efficace et sans impact sur l'environnement pour limiter les pertes de rendement causées par les agents pathogènes des plantes. Toutefois le déploiement à grande échelle de variétés contenant des gènes majeurs de résistance exerce une forte pression de sélection sur les populations d'agents pathogènes (cf. 3.1). De plus, les ressources génétiques disponibles efficaces contre une espèce d'agent pathogène sont limitées, ou alors présentes dans des espèces plus ou moins proches de l'espèce cultivée, nécessitant donc de lourds travaux d'introgression puis de sélection variétale. La définition de stratégies de déploiement des gènes de résistance visant à accroître leur durabilité est donc l'un des enjeux majeurs de l'agriculture.

En particulier, la lutte variétale est le moyen de lutte le plus efficace pour limiter l'impact de *L. maculans* sur le rendement des cultures de colza. Or, plusieurs gènes majeurs précédemment introduits au champ ont été contournés (cf. 4.4). A l'heure actuelle, la résistance *Rlm7* est largement utilisée en Europe et elle est efficace depuis son introduction au début des années 2000. Un précédent projet de thèse réalisé dans l'équipe d'accueil avait néanmoins montré que dans le cas de conditions de forte pression de sélection, le champignon avait la capacité de rapidement s'adapter. Après trois ans d'essais au champ, 30% des souches de la parcelle expérimentale étaient devenues virulentes vis-à-vis de *Rlm7*, alors que la population initiale était totalement avirulente (Daverdin *et al.*, 2012).

Le phénotypage des souches virulentes vis-à-vis de *Rlm7* isolées par Daverdin *et al.* (2012) sur divers génotypes de colza avait mis en évidence la présence d'un allèle avirulent d'*AvrLm3* chez plus de 98% d'entre elles. Cette observation avait tout d'abord fait émerger l'hypothèse qu'*AvrLm3* pouvait être un allèle d'*AvrLm4-7*, expliquant ainsi son absence dans les populations européennes (Balesdent *et al.*, 2006; Stachowiak *et al.*, 2006). Cependant, l'identification d'une grande diversité d'évènements moléculaires responsables du contournement de *Rlm7* (délétion, RIP, SNP,...) (Daverdin *et al.*, 2012) a invalidé cette hypothèse. Il a alors été postulé que la présence d'un allèle fonctionnel du gène *AvrLm4-7* entraînerait la suppression de la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3*. Ce mécanisme a actuellement été identifié chez une seule autre espèce de champignon, *F. oxysporum*, chez

qui la présence d'*Avr1* supprime les phénotypes d'incompatibilité dus à *Avr2* et *Avr3*. Ainsi, le contournement actuel de la résistance *Rlm7* entraîne la résurgence du phénotype avirulent *AvrLm3* dans les populations de *L. maculans*. L'interaction entre les phénotypes *AvrLm3* et *AvrLm4-7* offre donc une opportunité pour la modélisation et la construction de stratégies visant à pérenniser la durabilité des résistances majeures de *B. napus* face à *L. maculans*, par l'alternance spatio-temporelle de cultivars possédant *Rlm3* ou *Rlm7* ou par le pyramidage de ces deux gènes dans des variétés de colza.

Sur ces bases, l'objectif de ma thèse est de comprendre l'interaction entre les gènes *AvrLm3* et *AvrLm4-7* chez *L. maculans* et de fournir des éléments de connaissance qui seront à la base d'approches de modélisation prenant en compte la complexité de ce phénomène biologique, pour proposer des scénarios d'utilisation des résistances *Rlm3* et *Rlm7* dans le but d'accroître leur durabilité.

(i) Au début de mon projet de thèse, seul *AvrLm4-7* avait été cloné (Parlange *et al.*, 2009). Le clonage d'*AvrLm3* était donc un premier objectif nécessaire à l'analyse de cette interaction entre deux gènes d'avirulence.

AvrLm3 avait été identifié par cartographie génétique à proximité d'*AvrLm4-7*, dans une région subtélomérique riche en éléments transposables. Toutefois, il n'avait pas été possible d'identifier un gène candidat par cette seule approche. Le premier chapitre de ce manuscrit rapporte le clonage d'*AvrLm3*. Celui est rédigé sous la forme de l'article « **A game of hide and seek between the avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*** », qui a été soumis à la revue « *New Phytologist* » et est actuellement en cours de révision. *AvrLm3* a les caractéristiques classiques des gènes d'avirulence de *L. maculans* : il code pour une petite protéine sécrétée riche en cystéine, est fortement exprimé lors des phases précoces de l'infection et ne présente pas d'homologies avec d'autres espèces.

Cette étude a également mis en évidence l'absence de régulation de l'expression d'*AvrLm3* par *AvrLm4-7*, ainsi que l'absence d'interaction directe entre les deux protéines d'avirulence.

(ii) La suppression de la reconnaissance d'*AvrLm3* par *AvrLm4-7* est un mécanisme original de contournement de résistance variétale, qui suggère une grande importance de cet effecteur dans la fitness fongique. Le deuxième chapitre de cette thèse analyse la diversité du gène *AvrLm3* ainsi que les mécanismes complexes permettant à *L. maculans* d'échapper à l'ETI induite par la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3* et son importance dans

la pathogénie. Ce chapitre est écrit sous la forme d'un article en cours de finalisation
**« Unusual evolutionary mechanisms to escape Effector-Triggered-Immunity in the fungal
phytopathogen *Leptosphaeria maculans* ».**

Chapitre I :
Identification et clonage
d'*AvrLm3*

Introduction

Lorsque les premières variétés contenant *Rlm7* ont été commercialisées en 2002, une grande majorité des souches européennes de *Leptosphaeria maculans* possédaient un allèle avirulent d'*AvrLm4-7*. A l'inverse, *AvrLm3* était considéré comme totalement absent dans ces populations (Balesdent *et al.*, 2006 ; Stachowiak *et al.*, 2006).

Lors d'un précédent projet de thèse effectué dans l'équipe, Guillaume Daverdin avait analysé l'évolution moléculaire d'*AvrLm4-7* sous pression de sélection *Rlm7*. Après trois saisons de monoculture de colza *Rlm7*, dans des conditions favorisant l'évolution rapide du champignon (c'est-à-dire une absence de rotation et d'enfouissement des résidus de culture, lieu de la reproduction sexuée de *L. maculans*), 36% des souches isolées sur la parcelle expérimentale étaient virulentes vis-à-vis de *Rlm7*.

Le phénotypage de ces souches sur des génotypes de colza possédant *Rlm3* avait montré que 98% des souches virulentes vis-à-vis de *Rlm7* étaient avirulentes vis-à-vis de *Rlm3*. *AvrLm4-7* a la spécificité d'être perçu par le produit de deux gènes de résistances distincts de *B. napus*, *Rlm4* et *Rlm7*. Il échappe à la reconnaissance par *Rlm4* suite à une mutation ponctuelle entraînant un changement d'acide aminé G¹²⁰R dans la protéine d'avirulence.

Il avait donc tout d'abord été envisagé qu'*AvrLm3* pouvait être un nouvel allèle d'*AvrLm4-7*. Toutefois, l'identification d'une grande diversité de mécanismes moléculaires menant à la virulence vis-à-vis de *Rlm7*, notamment les importantes proportions de délétions et d'inactivation causée par le RIP avait conduit à rejeter cette idée.

Nous avons alors émis l'hypothèse d'une interaction fonctionnelle entre *AvrLm3* et *AvrLm4-7*, conduisant à une suppression du phénotype avirulent *AvrLm3* malgré la présence de *Rlm3*. Une souche avirulente vis-à-vis de *Rlm3* a alors été complétée par un allèle fonctionnel du gène *AvrLm4-7*, entraînant la restauration du phénotype avirulent *AvrLm4-7*, mais également la perte de reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3*, permettant ainsi de valider cette hypothèse.

AvrLm3 et *AvrLm4-7* ont été identifiés comme appartenant à un même cluster génétique (Balesdent *et al.* 2002). Une marche chromosomique avait été initiée dans le cadre de la thèse

de Guillaume Daverdin, en se basant sur les marqueurs moléculaires identifiés dans la région d'*AvrLm4-7*, dans un croisement entre une souche avirulente vis-à-vis de *Rlm3* et une souche virulente vis-à-vis de *Rlm3* et *Rlm7*. Toutefois, il n'avait pas été possible d'identifier le locus du gène *AvrLm3* par cette seule méthode.

Au début de mon projet de thèse, j'ai affiné la cartographie du gène *AvrLm3* et développé des approches alternatives: séquençage *de novo* de la souche A3 du croisement analysé pour identifier le locus d'*AvrLm3*, RNA-seq des phases précoces de l'infection par des souches de *L. maculans* virulentes ou avirulentes vis-à-vis de *Rlm3* et *Rlm7* et identification et séquençage de clones BAC correspondant à la région où a été localisé *AvrLm3*. La mise en place conjointe de ces approches de génétique et de génomique a permis d'identifier le gène *AvrLm3*, qui était absent de l'assemblage du génome de référence de *L. maculans* (en réalité localisé dans un gap de l'assemblage de référence). *AvrLm3* code pour une petite protéine sécrétée, riche en cystéine, sans homologie de séquence avec des gènes d'autres espèces fongiques et est spécifiquement exprimé dans les phases précoces de l'infection.

Le clonage d'*AvrLm3* a permis de mettre en évidence l'absence de régulation de l'expression de ce gène par *AvrLm4-7*, mais également l'absence d'interaction directe entre les deux protéines d'avirulence.

Ces résultats sont ici présentés sous la forme de l'article « A game of hide and seek between the avirulence genes *AvrLm3* and *AvrLm4-7* in *Leptosphaeria maculans* », qui a été soumis à la revue « New Phytologist » et est actuellement en cours de révision.

Une analyse fonctionnelle du gène *AvrLm3* a également été initiée, notamment afin de déterminer la localisation subcellulaire d'*AvrLm3* *in planta* et d'identifier ses cibles végétales. Les résultats préliminaires de ces travaux sont présentés à la fin de ce chapitre.

A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*

Authors

Clémence Plissonneau, Guillaume Daverdin, Bénédicte Ollivier, Françoise Blaise, Alexandre Degrave, Isabelle Fudal, Thierry Rouxel and Marie-Hélène Balesdent*

INRA, UMR INRA-AgroParisTech 1290-Biogger, Avenue Lucien Brétignières, BP 01, F-78850 Thiverval-Grignon, France

* Corresponding author; Tel 33 (1) 30 81 45 73, mhb@versailles.inra.fr

Word count :

Introduction 783

Material and Methods: 1872

Results: 1909

Discussion: 1787

Acknowledgements: 87

Total: 6438

Summary

- Extending the durability of plant resistance genes towards fungal pathogens is a major challenge. We identified and investigated the relationship between two avirulence genes of *Leptosphaeria maculans*, *AvrLm3* and *AvrLm4-7*. When an isolate possesses both genes, the *Rlm3*-mediated resistance of oilseed rape (*Brassica napus*) is not expressed due to the presence of *AvrLm4-7* while virulent isolates toward *Rlm7* recover the *AvrLm3* phenotype.
- Combining genetic and genomic approaches (genetic mapping, RNA-seq, BAC clone sequencing and *de novo* assembly) we cloned *AvrLm3*, a telomeric avirulence gene of *L. maculans*. *AvrLm3* is located in a gap of the *L. maculans* reference genome assembly, is surrounded by repeated elements, encodes for a small secreted cysteine-rich protein and is highly expressed at early infection stages.
- Complementation and silencing assays validated the hiding of *AvrLm3* by *AvrLm4-7* and we showed that the presence of *AvrLm4-7* does not impede *AvrLm3* expression *in planta*. Y2H assays suggest the absence of physical interaction between the two avirulence proteins.
- This unusual interaction is the basis for field experiments aiming to evaluate strategies to increase *Rlm7* durability.

Key words (5-8) (words in the title must be in)

Leptosphaeria maculans, *Brassica napus*, oilseed rape, avirulence, interaction, durable resistance, NGS

Introduction

During plant colonization, pathogens secrete molecules, called effectors, that facilitate infection (de Jonge *et al.*, 2011; Koeck *et al.*, 2011). In the course of plant-pathogen co-evolution, some of these effectors, named avirulence (Avr) proteins, have been specifically "recognized" by plant resistance (R) proteins encoded by major resistance genes. The gene-for-gene relationship between an Avr gene and its cognate R gene results in a highly efficient plant response against the pathogen, called the Effector-Triggered-Immunity (ETI). These last years, many Avr/R interactions have been described in a variety of plant-pathogen interactions including plant-bacteria, -oomycetes, -fungi or nematodes (Catanzariti & Jones, 2010; Wu *et al.*, 2014). Breeding cultivars carrying major resistance genes against pathogens is a common and powerful tool to control disease. However, the massive deployment of a single source of resistance in the agronomical practice exerts a strong selection pressure against avirulent pathogens and populations can evolve quickly from avirulence to virulence (McDonald & Linde, 2002).

Leptosphaeria maculans is a Dothideomycete responsible for phoma stem canker, a damaging disease on oilseed rape (*Brassica napus*). Breeding for resistance is the most effective and environmental friendly way to control the disease (Delourme *et al.*, 2006). However, major-gene resistance may be short-lived in the agronomical practice due to the extremely high evolutionary potential of *L. maculans* (Daverdin *et al.*, 2012). In addition the number of efficient qualitative resistance sources is limited in *B. napus* (Balesdent *et al.*, 2006). Fourteen avirulence (*AvrLm*) genes have been identified in *L. maculans*, and six have been cloned: *AvrLm1*, *AvrLm2*, *AvrLm4-7*, *AvrLm6*, *AvrLm11* and *AvrLmJ1* (Gout *et al.*, 2006; Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009; Balesdent *et al.*, 2013; Ghanbarnia *et al.*, 2014; Van de Wouw *et al.*, 2014). All of them encode for small cysteine-rich (except for *AvrLm1*) secreted proteins and are highly expressed at early infection stages. The sequencing of *L. maculans* genome revealed its massive invasion by transposable elements (TE), which represent about 30 % of

the genome (Rouxel *et al.*, 2011). In the genome, TEs are clustered and inactivated by Repeat Induced Point mutations (RIP), a premeiotic mechanism specific to fungi (Galagan & Selker, 2004). The RIP mechanism is responsible for the isochore structure of the *L. maculans* genome: GC-isochores display an equilibrated GC content and contain 95 % of the predicted genes, while AT-rich isochores are composed of a mosaic of truncated and RIP-degenerated TEs and contain very few genes. They however contain all currently cloned avirulence genes (Rouxel *et al.*, 2011). Eight of the *L. maculans AvrLm* genes are genetically clustered in two distinct regions. The first one contains *AvrLm1*, *AvrLm2*, *AvrLm6*, along with *LmCys2*, encoding a candidate effector protein with similar characteristics to those encoded by *AvrLm* genes (Fudal *et al.*, 2007). The second cluster contains *AvrLm3*, *AvrLm4*, *AvrLm7*, *AvrLm9* and *AvrLepR1* (Balesdent *et al.*, 2002, 2005; Ghanbarnia *et al.*, 2012). These clusters can represent hundreds of Kbs due to the lack of meiotic recombination in such regions (Rouxel *et al.*, 2011).

Following the cloning of *AvrLm7*, it has been demonstrated that *AvrLm4* and *AvrLm7* are two distinct alleles of a single gene, renamed *AvrLm4-7*. A single base mutation, leading to the change of a glycine to an arginine residue in the avirulence protein, is responsible for the breakdown of *Rlm4* resistance whereas *Rlm7* resistance is unaltered (Parlange *et al.*, 2009). A large scale survey performed in France in 2000-2001 showed that more than 99.5% of isolates were avirulent towards *Rlm7* (Balesdent *et al.*, 2006). Only one isolate out of the 1797 sampled was virulent towards *Rlm7*. This isolate showed an avirulent phenotype towards *Rlm3*, while this phenotype was extremely rare (<0.1%) at the country scale. Surveys of worldwide populations of *L. maculans*, e.g. in Central Canada indicated higher frequencies of virulent isolates towards *Rlm7* at some locations. A retrospective analysis of 909 American isolates indicated that more than 95% of the isolates are either virulent towards *Rlm7* and avirulent towards *Rlm3* or avirulent towards *Rlm7* and virulent towards *Rlm3* (Dilmaghani *et al.*, 2009). These data, the absence of European field isolates avirulent towards both *Rlm3* and *Rlm7* and

the lack of recombination between *AvrLm3* and *AvrLm4-7* (Balesdent *et al.*, 2002) questioned whether *AvrLm3* could be a novel allele of *AvrLm4-7*.

In this paper, we report on an unusual gene-for-gene interaction involving the avirulence genes *AvrLm3* and *AvrLm4-7*. We mapped and cloned *AvrLm3*, a novel avirulence gene of *L. maculans* distinct from *AvrLm4-7*. *AvrLm3* is located in a telomeric genomic region, genetically linked to the avirulence gene *AvrLm4-7* and is absent from the reference sequence genome assembly. The presence of a functional allele of *AvrLm4-7* suppresses the *Rlm3*-mediated recognition, in spite of the presence and unaltered expression of *AvrLm3* in *L. maculans* isolates.

Material and Methods

Terminology

A specific terminology is employed hereafter to facilitate the distinction between isolate interaction phenotypes and genotypes. Considering the interaction between the avirulence gene *AvrLmi* and the resistant gene *Rlmi*, the phenotype of an isolate is termed ‘Ai’ or ‘ai’, where ‘Ai’ corresponds to an avirulent phenotype and ‘ai’ to a virulent phenotype. The genotype of an isolate with an avirulent allele of an avirulence gene ‘i’ is written *AvrLmi* whereas *avrLmi* is assigned to isolates harbouring a virulent allele, whatever the molecular event.

L. maculans isolates

The isolate collection from Daverdin *et al.* (2012) originated from an oilseed rape experimental field located in Grignon (France) where one cultivar harboring the resistance gene *Rlm7*

(Exagone) and one without *Rlm7* (Campala) were grown. *L. maculans* isolates were sampled during three continuous years (2006-2008) on both cultivars. This collection has been phenotyped for virulence towards *Rlm4* and *Rlm7* and the mutational events generating virulence at the *AvrLm7* locus have been determined (Daverdin *et al.*, 2012). From this collection, 1524 isolates (732 A7 and 792 a7) were phenotyped for their virulence towards *Rlm3*. Two A3a7 isolates from this collection (G06-E101 and G06-E107) that were collected from leaf lesions in 2006 on cv. Exagone (*Rlm7*) were used in complementation experiments and for *in vitro* crosses. These isolates display two different inactivating mutations in the *AvrLm4-7* gene sequence (Daverdin *et al.*, 2012). Both mutation events introduce premature stop codons in the gene sequence. The reference sequenced isolate v23.1.3 ('JN3', a3A7), from which *AvrLm4-7* was cloned (Parlange *et al.*, 2009), was used for RNA-seq experiments. The a3a7 isolate Nz-T4, in which *AvrLm4-7* is present but displays numerous RIP-induced mutations preventing its PCR amplification (Parlange *et al.*, 2009; data not shown) was used for *in vitro* crosses and for complementation with *AvrLm3*. Isolates G06-E107 (A3a7) and v23.1.2 (a3A7) were used as controls in inoculation tests. All isolates were maintained on V8-agar plates (Ansan-Melayah *et al.*, 1995).

Inoculation tests

All isolates were phenotyped for their virulence towards *Rlm3*, *Rlm4* and *Rlm7* oilseed rape genotypes using a cotyledon-inoculation test (Balesdent *et al.*, 2002). Spore suspensions of each isolate were inoculated on 10-12 plants of each of the *B. napus* cvs or lines Westar (no R gene), 02.23.3.1 (*Rlm7*), Pixel (*Rlm4*) and 03.22.3.1 (*Rlm3*). Symptoms were scored 12-21 days after inoculation using a semi-quantitative 1 (avirulent) to 6 (virulent) rating scale in which scores 1-3 represent different levels of resistance (from typical HR to delayed resistance) and 4-6

different levels of susceptibility (mainly evaluated by the intensity of sporulation on lesions) (Balesdent *et al.*, 2005; Method S1).

In vitro cross

Segregation analysis of *AvrLm3* was performed following an *in vitro* cross between the isolates Nz-T4 (a3a7) and G06-E107 (A3a7) (cross #69; Table 1). The cross was performed as described by Gall *et al.* (1994) and Balesdent *et al.* (2001). When pseudothecia had developed and ascospores started to be ejected, mature pseudothecia were stuck upside down on the top of a Petri dish containing 2% water-agar. One to two hours later, ejection of ascospores was checked using a stereo microscope (Olympus SZH10, 70X). Ungerminated, well separated ascospores were randomly selected and moved away from the others, a few millimeters from the ejection spot. After 24 h at room temperature, single germinated ascospores were transferred onto individual V8-agar Petri dishes.

DNA manipulation

Genomic DNA was extracted from conidia suspensions using the DNeasy 96 Plant Kit and the QIAGEN BioRobot 3000 or DNeasy Plant Mini Kit according to manufacturer's recommendations. Sequencing was performed using a Beckman Coulter CEQ 8000 automated sequencer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) according to the manufacturer's instructions or performed by Eurofins Genomics (Eurofins, Ebersberg, Germany).

Design of markers and genetic mapping

The *AvrLm4-7* PCR fragment was used as a marker in cross #69 (Table S1). From the molecular markers used by Parlange *et al.* (2009) for *AvrLm4-7* map-based cloning, one minisatellite (*MinLm9*), physically close to *AvrLm4-7*, and three Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

(CAPS) markers were found to be polymorphic in cross #69 (Fig. 1). CAPS fragments (Table S1) were amplified and the PCR products were digested with *AvaII*, *DdeI* and *BgIII* for markers 46F10_R, 133E3_R and 124F12_F, respectively. Five additional minisatellite markers were designed using the FONZIE pipeline (Bally *et al.*, 2010), one of them, Min12-96, being polymorphic in cross #69. Nineteen single-locus PCR markers spanning two truncated copies of degenerated transposons were generated as described by Gout *et al.* (2006) and using the annotation of repeated elements described in Rouxel *et al.* (2011) (Fig. 1; Table S1). All primers were generated using Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Linkage analyses among loci were performed using the MapMaker/EXP version 3.0b software (available online; Whitehead/MIT Center for Genome Research, Cambridge, MA, USA) with a LOD score of 3.0 and a maximum recombination frequency of 30 cM.

HRM experiments and analyses

High Resolution Melting (HRM) was performed to analyse polymorphic SNPs in cross #69 or expression levels in transformed isolates. The HRM mix was composed of 2 μ L of DNA or cDNA template (i.e 20ng of DNA or cDNA), 4 μ L of each primer (2 μ M, Table S1) and 10 μ L of SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, United States). PCR amplification was done with a Bio-Rad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System according to the manufacturer's instructions: an initial denaturation step at 98°C for two minutes, followed by 40 cycles at 98°C for 5 seconds, 60°C for 5 seconds and a final melting step from 60°C to 95°C with an increase of 0.2°C every 5 seconds. HRM curve analysis was performed by collecting data from the melting step and results were analysed with the Bio-Rad Melt Curve Analysis™ Software.

RNA extraction, reverse transcription and qRT-PCR analysis

Total RNA was extracted from mycelium or infected cotyledons of the compatible *B. napus* cv. Westar, Darmor or Darmor-*bzh* using the TRIzol® Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to manufacturer's protocol. Total RNA was treated with DNase I RNase-Free (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). All samples were adjusted to 3 µg of RNA and single-strand cDNA was generated using oligo-dT primed reverse transcription with PrimerScript Reverse Transcriptase (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.) according to the manufacturer's protocol.

Quantitative RT-PCR was performed using a 7700 real-time PCR equipment (AppliedBiosystems, Foster City, CA, U.S.A.) and ABsolute SYBR Green ROX dUTP Mix (ABgene, Courtaboeuf, France) as described by Fudal *et al.* (2007). For each value measured, two to three technical replicates from two biological replicates were performed. Water and uninfected cotyledons were used as negative controls. All primers used for qRT-PCR are detailed in Table S2. Samples were analysed from a 10-fold dilution of the original RT products as described by Fudal *et al.* (2007). The fluorescence threshold (Ct) value was determined at 0.1 of fluorescence intensity.

To evaluate the expression profile of avirulence genes over infection, Ct values were analysed according to the method described by Muller *et al.* (2002). In silencing assays, the residual expression of *AvrLm3* and *AvrLm4-7*, compared to those of the wild type isolate, were analysed according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). Fungal Actin or β -tubulin were used as a constitutive reference gene and *L. maculans* EF1- α relative expression to Actin was used as a supplementary control, to verify that there is no variation in the level of expression of Actin between conditions and between biological replicates.

Screening of a BAC clone library

The v23.1.3 *L. maculans* BAC clone library has been described previously (Attard *et al.*, 2002; Gout *et al.*, 2006) and represents a 16-x genome coverage. The library was PCR-screened using 3D-pools (Gout *et al.*, 2006) with primers used for *AvrLm3* genetic mapping : SC12-14, SC12-16, SC12-19, Min12-96, 86520 and 86530 (Fig. 1). Positive BAC clones were extracted using NucleoBond® Xtra Midi / Maxi (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to manufacturer's recommendations.

NGS Sequencing

BAC clone sequencing (100 bp paired-end reads) was performed using Illumina Mi-Seq technology at Integragen (Evry, France) and generated 1 Gb of sequences. For RNA-seq analysis, cotyledons of the compatible *B. napus* cv. Darmor-*bzh* were inoculated with isolates G06-E107 (A3a7), Nz-T4 (a3a7), v23.1.3 (a3A7), G06-E107 complemented with *AvrLm4-7* (G06-E107+*AvrLm7*; a3A7), or water (mock condition). Plant tissues around inoculation points were sampled 7 days after inoculation, which is the time when the maximal expression of *AvrLm* genes is usually found (Rouxel *et al.*, 2011), and RNA was extracted. cDNA library construction and sequencing of 50 bp single-reads were performed by the Beijing Genomics Institute (BGI, Shenzhen, China), using Illumina HiSeq2000 technology. A total of 5.2 Gb, 4.2 Gb, 3.9 Gb, 9.2 Gb and 4.1 Gb were obtained for the plant samples inoculated respectively with G06-E107, Nz-T4, v23.1.3, G06-E107+A7 and mock condition.

Bioinformatics analysis

The CLC Genomics Workbench v7.5.1 (Qiagen, Venlo, Netherlands) was used to analyse NGS data, including *de novo* assembly, gene prediction, RNA-seq mapping and gene annotation.

Fungal transformation

L. maculans transformation was performed using *Agrobacterium tumefaciens* (Gout *et al.*, 2006). Fungal transformants were selected on 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nourseothricin (WERNER BioAgents, Jena, Germany). Vectors and isolates used for transformations are listed in Table S3. Two constructs from Parlange *et al.* (2009) were used in complementation experiments. Both constructs are based on the vector pPZPnat1 and differ for the allele of *AvrLm4-7* they carry. The first one termed pPZPnat1-A4A7 carries the v23.1.3 wild-type *AvrLm4-7* allele (*AvrLm4-AvrLm7*) whereas pPZPnat1-a4A7 carries the wild-type v23.1.2 allele (*avrLm4-AvrLm7*). Vector pPZPnat1-A3 carries a 1357 bp insert containing *AvrLm3* and its promoting and terminating regions, amplified from genomic DNA of G06-E107 with the *AvrLm3ext-SpeIF* and *AvrLm3ext-XhoI* primers (Table S2). This insert was ligated in pPZPnat1 previously excised with *SpeI* and *XhoI*. Vector pPZPnat1-sil*AvrLm4-7* and pPZPnat1-sil*AvrLm3* were constructed for RNA-mediated gene silencing of *AvrLm4-7* and *AvrLm3*, using the method described by Fudal *et al.* (2007). Vector pJK11 was used for the construction of inverted repeats of the target genes. The hairpin inverted fragments for each construct were obtained using the primers described in Table S2. Vectors pJK11-*AvrLm4-7* and pJK11-*AvrLm3* were constructed after ligation in pJK11 previously digested by *XmaI* and *BamHI* and *HindIII* and *EcoRI*, respectively. These vectors were incised with *SpeI* and *XhoI* and the fragments containing the hairpin, the *gdpA* promoter and the *trpC* terminator of pJK11 were ligated into *SpeI-XhoI* digested pPZPnat1 to create the final vectors pPZPnat1-sil*AvrLm4-7* and pPZPnat1-sil*AvrLm3*. All plasmids were introduced into *A. tumefaciens* C58-pGV2260 by electroporation at 2.5 kV, 200 Ohms and 25 μF .

Yeast two-Hybrid Assay

Yeast two-Hybrid (Y2H) assay was performed using the Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System kit (ClonTech, Takara, Shiga, Japan) according to manufacturer's recommendations. The genes *AvrLm3* and *AvrLm4-7* were amplified from cDNA of isolate v23.1.3 (Table S2) and introduced into vectors pGBKT7 and pGADT7. Vectors pGBKT7 (prey protein) and pGADT7 (bait protein) were introduced into *Saccharomyces cerevisiae* strains Y2HGold and Y187, respectively. Crosses between Y187-*AvrLm3* and Y2HGold-*AvrLm7*, or between Y187-*AvrLm4-7* and Y2HGold-*AvrLm3*, were performed by co-culture of both strains for 24 hours in 2x YPDA broth at 30°C and 200 rpm. Serial dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , and 10^{-4}) were spotted on selective media and incubated for 3-5 days at 30°C. The strain Y2H-Gold-*AvrLm4-7* was also used for Y2H screen to identify *AvrLm4-7* putative interactors in a cDNA library from a pool of cotyledons of line 02.23.2.1 (*Rlm7*) inoculated with the isolate 19.4.24 (A3a7) and harvested at 3 dpi, 7 dpi and 14 dpi.

Results

AvrLm4-7 suppresses the expression of the *AvrLm3* phenotype

From 2004 to 2008, a field experiment was conducted in France to monitor the evolution of fungal populations towards the newly released *Rlm7* resistance gene when submitted to an increased and constant *Rlm7* pressure (Daverdin *et al.*, 2012). After four years of *Rlm7* selection pressure, the frequency of isolates virulent towards *Rlm7* had reached 36.2%. The mutational events responsible for virulence were diverse, with a majority of complete deletion of *AvrLm4-7* or inactivating RIP-mutations (Daverdin *et al.*, 2012). A selection of 1524 isolates (734 A7 and 790 a7) from that study was phenotyped for their virulence towards *Rlm3*. All A7 isolates displayed an a3 phenotype, while 785 of the 790 a7 isolates displayed an A3 phenotype, and 5

were virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7*. These results led us to hypothesize that the avirulence gene *AvrLm3*, which was regarded as absent in European field populations (Balesdent *et al.*, 2006), is present in most isolates, but that their A3 phenotype is ‘hidden’ by the presence of a functional allele of *AvrLm4-7*. When *AvrLm4-7* is deleted or inactivated, the gene-for-gene interaction between *AvrLm3* and *Rlm3* is restored.

To validate the hypothesis of a negative interaction between the two avirulence phenotypes, two A3a7 isolates with an inactivated *AvrLm4-7* gene, G06-E101 and G06-E107, were complemented with two different alleles of *AvrLm4-7*. All transformants were still virulent on the susceptible cv. Westar (Fig. 2e and 2f). Complementation with a functional *AvrLm4-7* allele restored the avirulent phenotype towards *Rlm7* for all isolates but two (Fig. 2a and 2b; Fig. S1). In the two transformants in which the avirulence phenotype towards *Rlm7* was not restored, the absence of integration of the *AvrLm4-7* copy was checked by PCR of the nourseothricin resistance marker gene (Table S2). Inoculation of the transformants on *Rlm3* plants showed that the presence of a functional copy of *AvrLm4-7*, regardless of its allele, resulted in the loss of expression of the *AvrLm3* phenotype (Fig. 2c and 2d). As a complementary approach, *AvrLm4-7* was silenced in the reference a3A7 isolate v23.1.3. The avirulence towards *Rlm3* was restored whenever the expression level of *AvrLm4-7* was lower than 10% of that of the wild-type isolate (Fig. S2). These results confirmed the hypothesis that *AvrLm3* phenotype is hidden by the presence of *AvrLm4-7* and suggested that *AvrLm3* is present in the genome of the sequenced v23.1.3 isolate.

Genetic mapping of the *AvrLm3* locus

The *in vitro* cross #69 was performed between isolates G06-E107 (A3a7; for which the inactivated allele can still be amplified by PCR) and Nz-T4 (a3a7; for which no PCR

amplification of *AvrLm4-7* can be obtained). One hundred and twenty-two progeny were phenotyped for their avirulence towards *Rlm3* and the 63:59 virulent:avirulent segregation ratio confirmed that the *AvrLm3* phenotype is under a single gene control ($\text{Chi}^2 = 0.131$, $p\text{-value} = 0.717$) (Table 1). PCR analysis of the *AvrLm4-7* locus segregation revealed that recombination occurred between *AvrLm4-7* and *AvrLm3*, proving that *AvrLm3* and *AvrLm4-7* are not allelic (Table 1). The low number of recombinant isolates compared to parental types confirmed the tight genetic linkage between *AvrLm3* and *AvrLm4-7* loci.

Progeny of cross #69 was used to initiate a map-based cloning of *AvrLm3*. Twelve polymorphic markers were identified in the 5' end of the SuperContig (SC) 12 of the *L. maculans* assembly where *AvrLm4-7* is located. They were used to construct a genetic map of the region, composed of two linkage groups (LG) (Fig. 1a). One LG contained the three markers (Min12_96, 86520 and 86530) located in the last GC-isochores of SC12, GC_14 (Fig. 1). This LG covered a genetic distance of 31.2 cM for a physical distance of 50 kb. The second LG contained *AvrLm3* along with nine molecular markers and marker order in this LG was consistent with the physical map deduced from the genome assembly of the reference v23.1.3 isolate (Rouxel *et al.*, 2011) (Fig. 1a,c). Three of these markers were designed at the junction of two repetitive elements (SC12_2, SC12_14 and SC12_16; Fig. 1) in the last AT-isochores of SC12. Genetic mapping indicated that *AvrLm3* is located in the 3' region of AT_13 (Fig. 1). AT_13, sized 162 kb, encompassed the typical mosaics of RIP degenerated and truncated transposable elements making up AT-isochores in *L. maculans*. Markers SC12_2, SC12_14 and SC12_16 co-segregated but covered a physical distance of 125 kb, in which no ORF was predicted. RNA-seq reads generated from infected cotyledons were mapped on the genome but no additional unpredicted ORFs could be identified in this region. No additional polymorphic marker could be designed to border the *AvrLm3* genetic interval on its 3' side.

Construction of BAC contigs containing the *AvrLm3* locus and identification of an *AvrLm3* candidate

PCR markers located in AT_13 and GC_14 of SC12 were used to identify BAC clones potentially containing the *AvrLm3* locus. Six BAC clones were identified (Fig. 1f). The clones contained either markers from AT_13 or markers from GC_14. No BAC clone linking the two LG could be identified (Fig. 1f). Sequencing and *de novo* assembly of the BAC clones generated 13 contigs covering a total size of 160 kb. These contigs are mainly composed of RIP-degenerated retrotransposons RLC_ *Pholy*, RLG_ *Olly* and RLG_ *Polly* and the telomere-associated repeat *LmTelo2*. The lack of genetic linkage between the two LGs in the *AvrLm4-7-AvrLm3* region was confirmed, with the absence of overlapping sequence between contigs assembled from the BAC clones from each side of Gap_2 (Fig. 1). The fragmentation of the BAC clone assembly in 13 contigs did not allow us to validate the assembly of isochore AT_13. The BAC clone assembly contained a 2.5 kb sequence absent from the genome assembly of *L. maculans*.

RNA-seq reads from cotyledons infected with isolates displaying, or not, an A3 phenotype (Nz-T4, G06-E107, G07-E107+*AvrLm4-7*, v23.1.3) were mapped on the 13 contigs and only one expressed gene was identified. This gene is one of the 20 most highly expressed genes of *L. maculans* at early infection stages (Table S4) for all isolates used in RNA-seq experiments, whether expressing an A3 or an a3 interaction phenotype. This gene displayed sequence polymorphism in the a3a7 isolate Nz-T4 compared to other isolates, with eight polymorphic nucleotides, of which five are responsible for non-synonymous mutations (Fig. 3c, Table S5). This sequence polymorphism was used to map the gene in cross #69 using the HRM method (Table S1, Fig. S3a). The candidate gene co-segregated with the *AvrLm3* phenotype in the whole progeny.

The *AvrLm3* candidate gene (Accession number KP939098) is 480 nt long and encodes for a 160 amino acids, cystein-rich (ten cysteins in the mature protein) secreted protein (SignalP 4.1, Petersen *et al.*, 2011) (Fig. 3b). The 91-bp 3' UTR, 164-bp 5' UTR and the intron of the candidate gene were annotated using the mapping of RNA-seq reads. The 56-bp intron is bordered by the TA and G bases of the STOP codon (Fig. 3a). *AvrLm3* showed no homology with other proteins, except a 29 % identity with the newly characterized *L. maculans* avirulence protein *AvrLmJ1* (Van de Wouw *et al.*, 2014), with a conservation of the position of six cysteine residues (Fig. S4).

Functional validation of the *AvrLm3* candidate

The *AvrLm3* candidate gene and its promoting and terminating region (1357 bp) were cloned and transformed into Nz-T4. Ten transformants were recovered and phenotyped on an *Rlm3* genotype or on the susceptible cultivar Pixel. All transformants showed an unaltered virulent phenotype on Pixel (Fig. 4). Avirulence towards *Rlm3* was restored in seven transformants while three transformants induced variable plant responses with only part of the plants expressing a resistance response (Fig. 4). Because the a3a7 Nz-T4 isolate possesses a virulent allele of the *AvrLm3* candidate gene which is expressed *in planta*, we checked the expression level of each allele (i.e the virulent and the avirulent one) in all transformants. This was done by HRM analysis on cDNA of the plant-fungus interaction 7 days after inoculation of the compatible cv. Darmor (Fig. S3b). Both alleles of *AvrLm3* were expressed in all transformants, as revealed by the intermediate melting curves obtained with complemented isolates compared to each wild type isolate (Fig. S3b). For the seven transformants in which avirulence towards *Rlm3* is restored, the intermediate melting curves are clustered together, whereas for the three isolates displaying intermediate phenotypes, the melting curves are grouped in a distinct cluster, closer to the melting curves obtained for the virulent isolate Nz-T4 (Fig. 3b), suggesting a lower

expression of the avirulent allele of *AvrLm3* in these transformants, probably not sufficient to fully restore the avirulence phenotype (Fig. S3c).

As a complementary approach, the *AvrLm3* candidate gene was silenced in the A3a7 isolate G06-E107. Eight transformed isolates showing different levels of silencing of the *AvrLm3* gene were assessed for pathogenicity towards *Rlm3* and *Rlm7* *B. napus* lines. Silencing levels of *AvrLm3* ranged from 80% to 8% of that of the wild-type isolate (Fig. S5a). Intermediate levels of silencing led to the development of intermediate resistance phenotypes on *Rlm3*. The two isolates with the lowest level of expression of *AvrLm3* were able to induce susceptibility symptoms on more than 50% of the inoculated *Rlm3* plants (Fig. S5a). Consistently with the very high level of expression of *AvrLm3* seven dpi (Table S4), the level of silencing obtained here was probably not sufficient to lead to a fully virulent phenotype. A similar effect has been previously observed for the *AvrLm6* avirulence gene of *L. maculans* (Fudal *et al.*, 2007).

Both complementation and silencing experiments suggest that the candidate gene encodes for the avirulence protein AvrLm3.

AvrLm4-7 does not modify *AvrLm3* expression profile during infection

AvrLm3 shows the same expression kinetics in G06-E107 (A3a7), Nz-T4 (a3a7) and v23.1.3 (a3A7), with low expression during *in vitro* growth and over-expression during early infection stages, especially at seven dpi (Fig. 5). Compared to that of *AvrLm4-7*, the expression level of *AvrLm3* is 3.4 higher and the over-expression of *AvrLm3* takes place earlier during the infection process (Fig. 5). While the gene is expressed at a higher level during axenic growth in Nz-T4 compared to G06-E107 or v23.1.3, the expression kinetics of *AvrLm3* is comparable whether the gene encodes for a virulent or an avirulent allele, confirming that the virulence towards *Rlm3* in isolates devoid of a functional allele of *AvrLm4-7* is due to sequence polymorphism in *AvrLm3*. In v23.1.3, showing an a3 phenotype, but no *AvrLm3* sequence polymorphism

compared to G06-E107, *AvrLm3* has the same kinetics of expression as in the A3 isolate G06-E107 (Fig. 5). This observation is in agreement with RNAseq data 7 dpi, showing a high level of *AvrLm3* expression both in the wild type G06-E107 A3a7 isolate, and in the complemented isolate G06-E107+*AvrLm4-7* (a3A7) (Table S4). Therefore, the presence of a functional allele of *AvrLm4-7* does not modify *AvrLm3* expression, strongly suggesting that the a3 phenotype does not result from a suppression of *AvrLm3* expression caused by the presence of *AvrLm4-7*.

Absence of physical interaction between the *AvrLm3* and *AvrLm4-7* proteins *in vitro*

Diploid yeast strains from the cross between Y187-*AvrLm3* and Y2HGold-*AvrLm4-7* or between Y187-*AvrLm4-7* and Y2HGold-*AvrLm3* did not grow in selective media (Fig. S6). In addition, *AvrLm3* was not found as a putative *AvrLm4-7* interactor in the Yeast two-hybrid screen of a cDNA library originating from cotyledons infected with an A3a7 isolate. These data suggest that *AvrLm3* and *AvrLm4-7* proteins do not physically interact, and that the masking of *AvrLm3* phenotype by *AvrLm4-7* is not linked with the ability of *AvrLm4-7* to form a heterodimer with *AvrLm3*.

Discussion

In this paper, we report on the identification and the cloning of *AvrLm3*, an avirulence gene of *L. maculans*. Similar to other avirulence genes cloned in *L. maculans* (Gout *et al.*, 2006; Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009; Balesdent *et al.*, 2013; Ghanbarnia *et al.*, 2014; Van de Wouw *et al.*, 2014), *AvrLm3* is surrounded by RIP-degenerated TEs and encodes for a cysteine-rich small secreted protein. *AvrLm3* is highly expressed at early infection stages and it has no recognizable homologues in other fungal species including in the closely related species *Leptosphaeria biglobosa* and *Leptosphaeria maculans* sp. *lepidii* (Grandaubert *et al.*, 2014). While showing all features common to avirulence genes and proteins of *L. maculans*, *AvrLm3*

is found in numerous isolates as a functional avirulence gene but the presence of a functional allele of *AvrLm4-7* 'hides' the *Rlm3*-mediated recognition of *AvrLm3*. In contrast, inactivated alleles (or lack) of *AvrLm4-7* leads to re-emergence of the *AvrLm3* avirulence phenotype.

The first cloned avirulence genes of *L. maculans* *AvrLm1*, *AvrLm6* and *AvrLm4-7* were identified by map-based cloning strategies (Gout *et al.*, 2006; Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009). The features of these genes allowed us to postulate *a priori* characteristics common to all avirulence genes of *L. maculans*, i.e., their isolation in TE-rich environments, their overexpression in the first stages of plant infection and their coding for small secreted proteins unrelated to known fungal genes. On these bases, the whole genome sequence was the source of a repertoire of candidate effector genes that were primary candidates in map-based cloning strategies of Avr genes. This for instance allowed the cloning of *AvrLm11*, located on a dispensable chromosome, which prevented any fine mapping in crosses involving virulent isolates missing the whole dispensable chromosome (Balesdent *et al.*, 2013). However, the location in these large AT isochores impedes in some cases the rapid identification of a gene via map-based cloning. This was illustrated by the recent cloning of *AvrLm2* which was not immediately confused with the previously identified candidate effector *LmCys1* following wrong map position due to a combination of contig misassemblies and gene conversion events. *AvrLm2* could only be unambiguously cloned by combining genetic mapping with NGS resequencing of multiple isolates to identify SNPs coincident with the virulent/avirulent phenotypes (Ghanbarnia *et al.*, 2014).

Cloning of *AvrLm3* combined additional levels of difficulties. First, the hiding of the avirulent *AvrLm3* phenotype in the presence of *AvrLm4-7* complicated the gene mapping. Previous crosses aiming at mapping *AvrLm3* were performed between isolates also polymorphic for *AvrLm4-7*. Balesdent *et al.* (2002) reported a full co-segregation between the two genes, but

indeed the phenotyping only revealed the *AvrLm4-7* segregation, whose presence or absence hid, or not, the *Rlm3-AvrLm3* recognition. Here, a cross was set up between two isolates virulent towards *Rlm7* which allowed us to phenotype the *AvrLm3-Rlm3* interaction without any interference due to the presence of *AvrLm4-7*. This cross allowed us to demonstrate a single gene control for *AvrLm3* with a genetic distance of 14.9 cM between *AvrLm3* and *AvrLm4-7*. Genetic mapping, examination of the reference genome sequence, the use of the repertoire of candidate effector genes, and mapping of RNA-seq reads on the reference genome did not allow us to identify any candidate, nor to border the genetic interval on the 3' side. Moreover, the 3' end of the SC12 of the reference sequence, where *AvrLm3* is located, comprised unresolved gaps. We demonstrated here by genetic mapping and BAC clone sequencing that the last SC12 isochore is wrongly assembled with the rest of SC12 (Fig. 1). The presence of telomere-specific repeats such as *LmTelo2* (Rouxel *et al.*, 2011) at both sides of the last gap of SC12 and in the BAC clones covering this region strongly suggests that *AvrLm3* is located in a telomeric region, which are often poorly assembled. Additional misassemblies (inversions) were identified (data not shown) reminiscent of what was also observed in the *AvrLm1-AvrLm6* large genomic region (Balesdent *et al.*, unpublished data). To solve the problem we used 'old-fashioned' identification of BAC clones screened with the markers of the genetic map, followed by NGS sequencing of BAC clones and mapping RNA-seq reads on the BAC contigs. This showed us that *AvrLm3* is located in a gap of the reference genome as well as in that of resequenced *L. maculans* genomes (data not shown). This illustrates that whichever the power of the NGS tools, it may still be extremely tedious to pick up a gene of interest in some specific genomic regions.

We functionally validated the negative interaction occurring between *AvrLm3* and *AvrLm4-7* phenotypes, the *Rlm3*-mediated resistance being 'hidden' by the presence of a functional allele of *AvrLm4-7*. This is a new illustration of the complex arms race co-evolution of plant and

pathogens. Houterman *et al.* (2008) demonstrated that the *Avr1* Avr gene of *F. oxysporum*, inducing *I-1* triggered resistance, also suppresses the protective effect of two other tomato resistance genes, *I-2* (when faced to *Avr2* isolates) and *I-3* (when faced to *Avr3* isolates). The effect of *AvrLm4-7* on the *Rlm3-AvrLm3* recognition seems similar but probably even more specific since the presence of *AvrLm4-7* does not prevent expression of other avirulence phenotypes such as those due to *AvrLm1*, *AvrLm5* or *AvrLm6* (Balesdent *et al.*, 2006). Thus *AvrLm4-7* and *AvrLm3* are parts of the arms race between *L. maculans* and *B. napus*, with two distinct strategies to escape recognition by the resistance genes. While the *Rlm7*-mediated recognition is prevented by a range of mutational events leading in most cases to the lack of, or production of altered forms of the protein (Daverdin *et al.*, 2012), the most commonly observed strategy to escape the *Rlm3*-mediated resistance does not affect *AvrLm3* coding sequence nor its expression *in planta*, but necessitates the presence of *AvrLm4-7*. In *F. oxysporum*, no evidence of direct interaction has been found between *Avr1*, *Avr2* and *Avr3* avirulence proteins and the mechanism of interference remains still unexplained since its description (Houterman *et al.*, 2008). Similarly, we could not find evidence of direct interaction between *AvrLm3* and *AvrLm4-7* using *in vitro* Y2H approaches. Several hypotheses could be proposed to explain this unusual exclusion between avirulence phenotypes. Firstly, the *Rlm3*-mediated resistance could be specifically suppressed by *AvrLm4-7* as proposed by Houterman *et al.* (2008) for *Avr1* being a potential suppressor of *I-2* and *I-3*-based immunity. That mechanism also occurs in the phytopathogenic bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Szczesny *et al.*, 2010). The avirulence protein *AvrBsT* interacts in the plant cell cytosol with SnRK1, an ABC transporter and a sucrose non-fermenting 1 (SNF1)-related kinase 1 to inhibit the HR induced by *AvrBs1* recognition. In the *AvrLm3-AvrLm4-7* model, we found an earlier and higher level of *in planta* expression for *AvrLm3* compared to *AvrLm4-7*, which would not be in favor of an activity of *AvrLm4-7* on suppression of plant defense responses. However, the correlation between

transcript and protein abundance is only partial and can be modulated by regulatory processes such as mRNA and protein degradation, or post-transcriptional modifications (Vogel & Marcotte, 2012). Another hypothesis would be the competition between AvrLm3 and AvrLm4-7 for a same receptor in case of direct interaction between AvrLm3 and Rlm3 and a higher affinity of AvrLm4-7 with the target compared to AvrLm3 which would then prevent subsequent fixation of *AvrLm3* to *Rlm3*. This hypothesis again does not seem to be the most probable in view of the earlier expression of *AvrLm3* compared to *AvrLm4-7*. A third hypothesis would imply *AvrLm3* and *AvrLm4-7* have the same target in the plant and they act differently on the target, in the frame of a ‘guard model’ of interaction. This case has never been reported in fungal-plant interactions, but it has been described for the *Pseudomonas syringae* effector proteins AvrRpm1, AvrRpt2, AvrB, AvrPto and HopF2, which all target the *Arabidopsis thaliana* protein RIN4, a key regulator of plant immunity (Mackey *et al.*, 2002; Axtell & Staskawicz, 2003; Wilton *et al.*, 2010; Deslandes & Rivas, 2012). AvrB and AvrRPM1 trigger the RPM1-mediated resistance by phosphorylating RIN4. AvrRpt2-triggered immunity results from the cleavage of RIN4 by AvrRpt2, which therefore prevents the RPM1-mediated resistance. Finally, the effector protein HopF2 interferes with AvrRpt2 induced ETI. Future investigations of AvrLm3 and AvrLm4-7 plant targets and signaling pathways activated by both *Rlm3* and *Rlm7* mediated resistance will allow us to better understand mechanisms underlying that complex gene-for-gene interaction.

The location of *AvrLm3* in a telomeric region is consistent with the assumption that *L. maculans* effectors are located within RIP-affected AT-rich isochores (Rouxel *et al.*, 2011) but such a telomeric location was not reported yet for *L. maculans* avirulence genes. Telomeres are often enriched in genes involved in niche adaptation in eukaryotes (Farman, 2007). For instance, many avirulence genes, including *AVR-Pii* and *AVR-Pita*, have been found in telomeric regions in *Magnaporthe oryzae*, and loss of chromosome tips is suggested to be one frequent

mechanism for gain of virulence (Orbach *et al.* 2000; Farman, 2007; Yoshida *et al.*, 2009). In *L. maculans*, avirulence genes located in AT-rich regions generally evolve by complete deletions when submitted to the resistance gene selection (e.g., Gout *et al.*, 2007) and one could expect an even greater instability due to its location within a telomeric AT isochores. Maintenance of *AvrLm3* in populations in spite of its genome location suggests *AvrLm3* is likely to have an important role in the pathogenic or life cycle of the fungus, so that loss of *AvrLm3* would lead to a serious fitness penalty, or that the presence of *AvrLm4-7* strongly contributes to its ability to escape selection even in the constant presence of ca. 20 % of *Rlm3*-harbouring cvs in French field (MH Balesdent and X Pinochet, unpublished data). Such a fitness penalty is known for *Avr3* and *Avr2* of *F. oxysporum*, escaping to their recognition by resistance genes *I-3* and *I-2* through acquisition of *Avr1*, which suppresses the *Avr2* and *Avr3* triggered immunity, and not through loss of *Avr3* (Houterman *et al.*, 2008, 2009). As discussed by Houterman *et al.* (2008), such a complex interplay may lead to initially unpredicted strategies for disease control. Until now, the use of specific R genes to control *L. maculans* has resulted in very rapid breakdown of these resistances, as shown for *Rlm1*, *Rlm6* or the *B. rapa* resistance source *RlmS* (Sprague *et al.*, 2006). Experimental trials using artificially increased selection pressure also revealed that the *Rlm7* resistance can be rapidly overcome whenever agronomic practices favour *L. maculans* sexual reproduction and increase population size (Daverdin *et al.*, 2012). The fact that breakdown of *Rlm7* gives birth to A3 isolates provides us with an unprecedented template to evaluate, using field experiments and modelling approaches, different strategies to increase the durability of a major resistance gene in the field in these cases of complex gene for gene interactions.

Acknowledgments

The authors wish to thank Laurent Coudard (INRA BIOGER) for his major contribution to management of isolate collection, Bertrand Auclair (INRA BIOGER) for plant management, Régine Delourme (INRA, UMR IGEPP) for *B. napus* Darmor-*bzh* seeds. This work was funded by the CTPS project “ICOSCOP”, the INRA-SmaCh metaprogram “K-masstec” and a grant from the Santé des Plantes et Environnement (SPE) INRA department. GD was funded by the French Ministère de la Recherche et de l’Enseignement Supérieur and CP by a young scientist grant (Contrat Jeune Scientifique) from INRA.

References

- Ansan-Melayah D, Balesdent M-H, Buée M, Rouxel T. 1995.** Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **85**: 1525.
- Attard A, Gout L, Gourgues M, Kühn M-L, Schmit J, Laroche S, Ansan-Melayah D, Billault A, Cattolico L, Balesdent M-H, et al. 2002.** Analysis of molecular markers genetically linked to the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm1* in field populations indicates a highly conserved event leading to virulence on *Rlm1* genotypes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 672–682.
- Axtell MJ, Staskawicz BJ. 2003.** Initiation of *RPS2*-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the *AvrRpt2*-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**: 369–377.
- Balesdent MH, Attard A, Kühn ML, Rouxel T. 2002.** New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **92**: 1122–1133.
- Balesdent M-H, Barbetti M, Li H, Sivasithamparam K, Gout L, Rouxel T. 2005.** Analysis of *Leptosphaeria maculans* race structure in a worldwide collection of isolates. *Phytopathology* **95**: 1061–1071.

- Balesdent M-H, Fudal I, Ollivier B, Bally P, Grandaubert J, Eber F, Chèvre A-M, Leflon M, Rouxel T. 2013.** The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytologist* **198**: 887–898.
- Balesdent M-H, Louvard K, Pinochet X, Rouxel T. 2006.** A large-scale survey of races of *Leptosphaeria maculans* occurring on oilseed rape in France. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 53–65.
- Bally P, Grandaubert J, Rouxel T, Balesdent M-H. 2010.** FONZIE: An optimized pipeline for minisatellite marker discovery and primer design from large sequence data sets. *BMC Research Notes* **3**: 322.
- Catanzariti A, Jones DA. 2010.** Effector proteins of extracellular fungal plant pathogens that trigger host resistance. *Functional Plant Biology* **37**: 901–906.
- Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, Parkin IAP, Tang H, Wang X, Chiquet J, Belcram H, Tong C, Samans B, et al. 2014.** Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* **345**: 950–953.
- Césari S, Thilliez G, Ribot C, Chalvon V, Michel C, Jauneau A, Rivas S, Alaux L, Kanzaki H, Okuyama Y, et al. 2013.** The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. *The Plant Cell Online*: tpc.112.107201.
- Daverdin G, Rouxel T, Gout L, Aubertot J-N, Fudal I, Meyer M, Parlange F, Carpezat J, Balesdent M-H. 2012.** Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *Plos Pathogens* **8**: e1003020.

- Delourme R, Chèvre A-M, Brun H, Rouxel T, Balesdent M-H, Dias J, Salisbury P, Renard M, Rimmer SR. 2006.** Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 41–52.
- Deslandes L, Rivas S. 2012.** Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science* **17**: 644–655.
- Dilmaghani A, Balesdent MH, Didier JP, Wu C, Davey J, Barbetti MJ, Li H, Moreno-Rico O, Phillips D, Despeghel JP, et al. 2009.** The *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathology* **58**: 1044–1058.
- Farman ML. 2007.** Telomeres in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* : the world of the end as we know it. *FEMS Microbiology Letters* **273**: 125–132.
- Galagan JE, Selker EU. 2004.** RIP: the evolutionary cost of genome defense. *Trends in Genetics* **20**: 417–423.
- Ghanbarnia K, Fudal I, Larkan NJ, Links MG, Balesdent M-H, Profotova B, Fernando WGD, Rouxel T, Borhan MH. 2014.** Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm2*, using an intraspecific comparative genomics approach. *Molecular Plant Pathology*.
- Ghanbarnia K, Lydiate DJ, Rimmer SR, Li G, Kutcher HR, Larkan NJ, McVetty PBE, Fernando WGD. 2012.** Genetic mapping of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene corresponding to the *LepRI* resistance gene of *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* **124**: 505–513.
- Grandaubert J, Lowe RG, Soyer JL, Schoch CL, Wouw APV de, Fudal I, Robbertse B, Lapalu N, Links MG, Ollivier B, et al. 2014.** Transposable element-assisted evolution and

adaptation to host plant within the *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex of fungal pathogens. *BMC Genomics* **15**: 891.

Houterman PM, Cornelissen BJC, Rep M. 2008. Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *Plos Pathogens* **4**: e1000061.

Houterman PM, Ma L, Van Ooijen G, De Vroomen MJ, Cornelissen BJC, Takken FLW, Rep M. 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *The Plant Journal* **58**: 970–978.

de Jonge R, Bolton MD, Thomma BP. 2011. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 400–406.

Koeck M, Hardham AR, Dodds PN. 2011. The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular Microbiology* **13**: 1849–1857.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)* **25**: 402–408.

Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL. 2002. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for *RPM1*-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**: 743–754.

Manning VA, Ciuffetti LM. 2015. Necrotrophic effector epistasis in the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction. *PLoS ONE* **10**: e0123548.

McDonald BA, Linde C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349–379.

Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* **32**: 1372–1374, 1376, 1378–1379.

Orbach MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG, Valent B. 2000. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *The Plant Cell* **12**: 2019–2032.

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* **8**: 785–786.

Rouxel T, Grandaubert J, Hane JK, Hoede C, van de Wouw AP, Couloux A, Dominguez V, Anthouard V, Bally P, Bourras S, et al. 2011. Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nature Communications* **2**.

Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* **132**: 365–386.

Sprague SJ, Balesdent M-H, Brun H, Hayden HL, Marcroft SJ, Pinochet X, Rouxel T, Howlett BJ. 2006. Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 33–40.

Stachowiak A, Olechnowicz J, Jedryczka M, Rouxel T, Balesdent M-H, Happstadius I, Gladders P, Latunde-Dada A, Evans N. 2006. Frequency of avirulence alleles in field

populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 67–75.

Szczesny R, Büttner D, Escolar L, Schulze S, Seiferth A, Bonas U. 2010. Suppression of the *AvrBs1*-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytologist* **187**: 1058–1074.

Vogel C, Marcotte EM. 2012. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics* **13**: 227–232.

Wilton M, Subramaniam R, Elmore J, Felsensteiner C, Coaker G, Desveaux D. 2010. The type III effector HopF2Pto targets *Arabidopsis* RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 2349–2354.

Van de Wouw AP, Lowe RGT, Elliott CE, Dubois DJ, Howlett BJ. 2014. An avirulence gene, *AvrLmJ1*, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Molecular Plant Pathology* **15**: 523–530.

Wu L, Chen H, Curtis C, Fu ZQ. 2014. Go in for the kill How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence* **5**: 710–721.

Yoshida K, Saitoh H, Fujisawa S, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Tosa Y, Chuma I, Takano Y, Win J, et al. 2009. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell Online* **21**: 1573–1591.

Table 1 Segregation of avirulence of *Leptosphaeria maculans* towards *Rlm3* in cross #69

	Parental	Parental	Phenotypic classes in the progeny			
	isolate	isolate				
	G06-E107	Nz-T4				
A3 (phenotype) ^a	A	V	A	A	V	V
A7 (phenotype) ^b	V	V	V	V	V	V
<i>AvrLm7</i> ^c	+	-	+	-	+	-
Number of isolates in each class			56	3	6	57
Total			59		63	

^a A, avirulent phenotype towards *Rlm3*; V, virulent phenotype towards *Rlm3*.

^b V, virulent phenotype towards *Rlm7*; V, virulent phenotype towards *Rlm7*.

^c + : the *AvrLm7* gene (virulent allele of G06-E107 towards *Rlm7*) can be amplified by PCR; - the *AvrLm7* gene cannot be amplified.

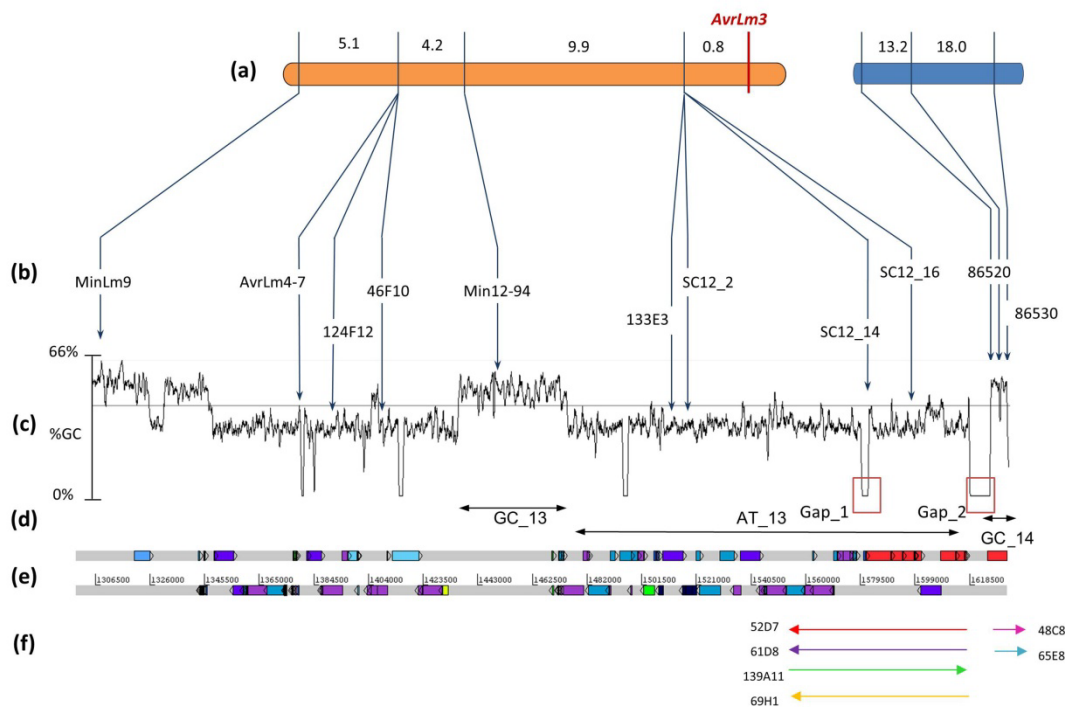


Figure 1: Genetic and physical maps of the *AvrLm4-7 – AvrLm3* genomic region of *Leptosphaeria maculans*.

(a) Genetic linkage groups of the *AvrLm3-AvrLm4-7* region in cross #69, with genetic distances in cM. **(b)** Marker names. The lines connect the genetic location of the markers to their physical position in the corresponding genomic region (3' end of Super-Contig 12 [SC12] of the sequenced isolate v23.1.3). **(c)** GC content (%) of the sequence along the region (sliding window of 500 bp); the horizontal line indicates the mean GC content (43.74%) of SC12. **(d)** Position of the last three isochores of SC12, GC_13 and AT_13 and GC_14, as defined by their homogeneous GC content, and gaps in the sequence surrounding *AvrLm3* (Gap_1 and Gap_2). **(e)** Graphical representation of the location of repeated elements as defined by Rouxel *et al.* (2011) on both strands. Each colour corresponds to a given family of repeat. Red boxes correspond to telomere specific repeats (*LmTelo2*). Numbers indicate the scale in bp from the beginning of SC12. **(f)** Genomic region screened for BAC clones identification and BAC clone names and location.

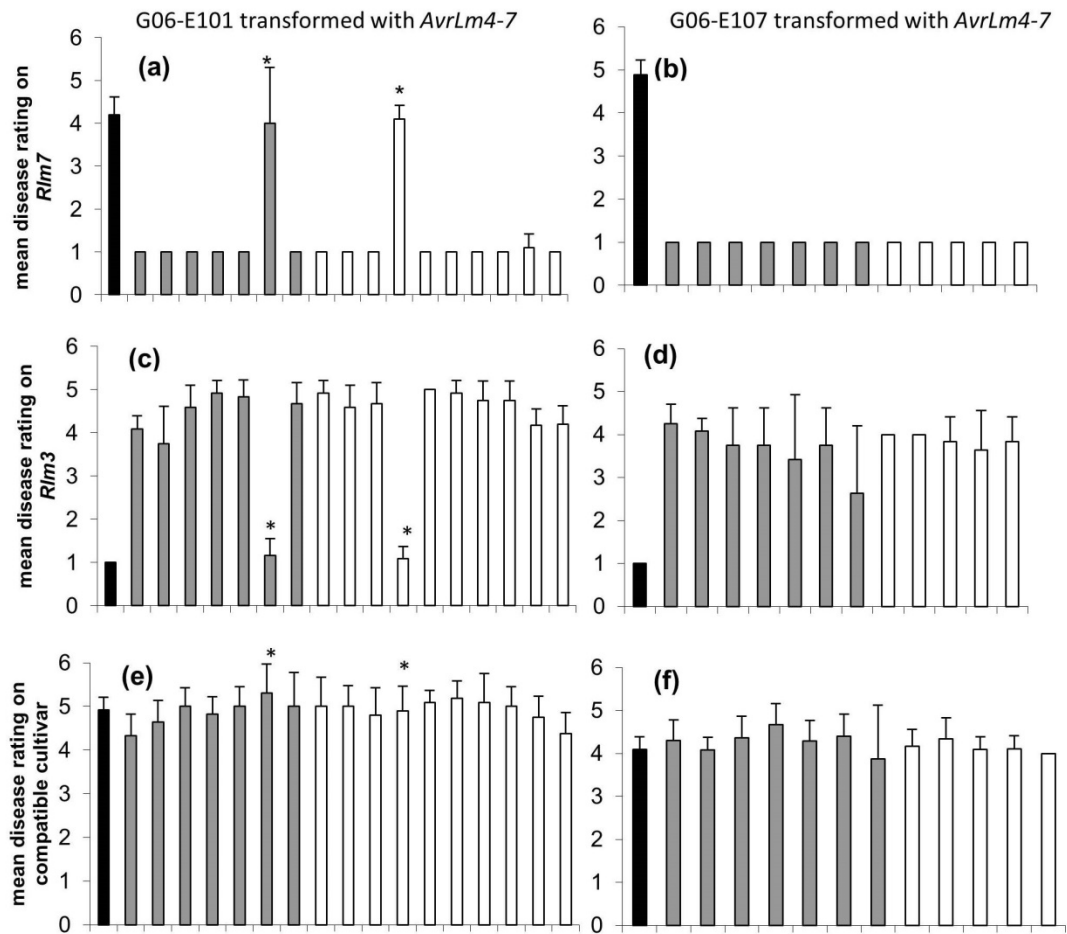


Figure 2: Interaction phenotypes between *Brassica napus* lines and *Leptosphaeria maculans* isolates complemented with the a4A7 and A4A7 alleles of the *AvrLm4-7* gene.

Two field A3a7 isolates, i.e. displaying a virulent phenotype towards *Rlm7* and an avirulent phenotype towards *Rlm3* (G06-E101 ((a), (c) and (e)) and G06-E107 ((b), (d) and (f), black bars) were transformed with the a4A7 (grey bars) or A4A7 (white bars) alleles of the *AvrLm4-7* gene. Isolates were inoculated on *Brassica napus* lines containing *Rlm7* ((a) and (b)), *Rlm3* ((c) and (d)) or on the compatible cultivar Westar ((e) and (f)). The symptoms were assessed 14 dpi on a 1-6 scale with 1-3 corresponding to resistance responses of the plant and 4-6 to susceptibility. The stars indicate false positive transformants that did not integrate the

AvrLm4-7 copy. The experiment was repeated twice and error bars represent standard deviation.

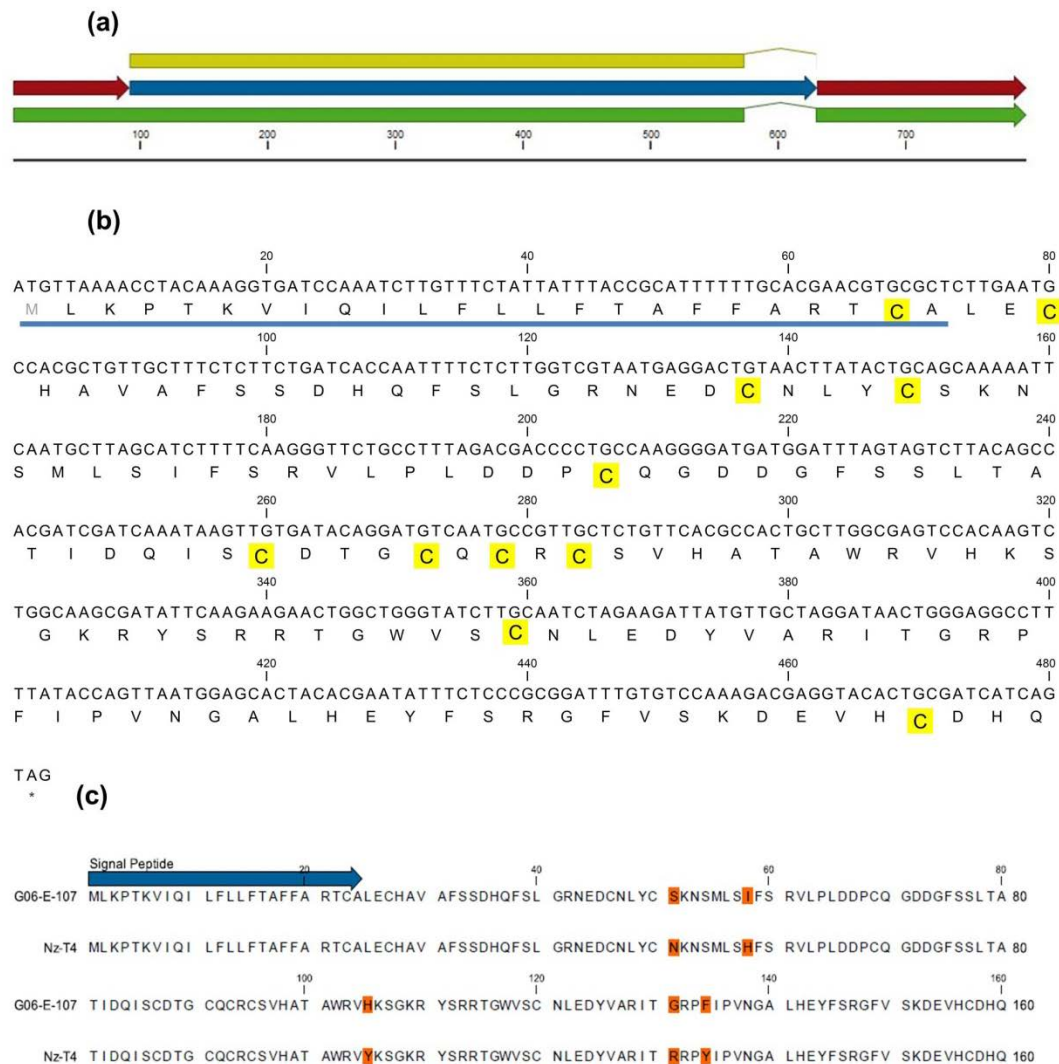


Figure 3: *AvrLm3* annotation, sequence and polymorphism.

(a) The gene, mRNA, CDS and UTR are respectively in blue, green, yellow and red. (b) Nucleotide sequence of *AvrLm3* and corresponding amino acids. The signal peptide is marked by the blue line and cysteine residues are highlighted in yellow. (c) The five polymorphic amino acids between the virulent isolate Nz-T4 and the avirulent isolate G06-E107 are highlighted in orange.

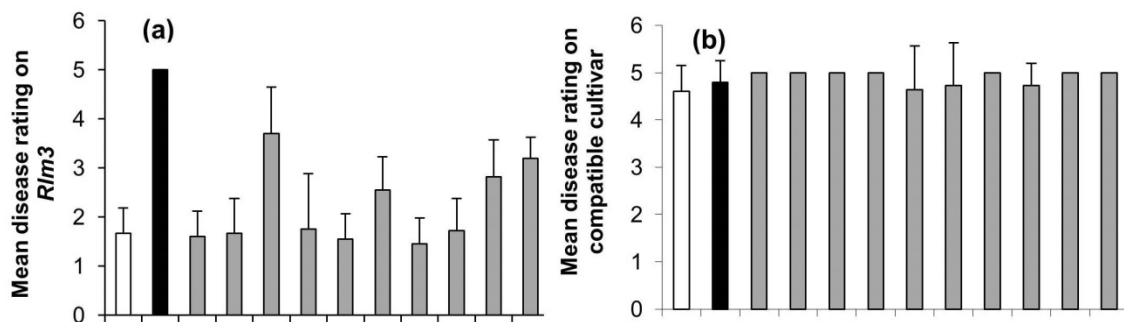


Figure 4: Interaction phenotypes between *Brassica napus* lines and *Leptosphaeria maculans* a3a7 isolate Nz-T4 complemented with the *AvrLm3* gene.

The a3a7 isolate Nz-T4 (black bars), possessing a virulent allele of *AvrLm3* was transformed with the avirulent allele of *AvrLm3* (grey bars). G06-E107 was used as a A3a7 control (white bars). Isolates were inoculated on *Brassica napus* lines containing *Rlm3* (a) or the compatible cultivar Pixel (b). The symptoms were assessed 14 dpi on a 1-6 scale with 1-3 corresponding to resistance responses of the plant and 4-6 to susceptibility. The three isolates marked with a star are isolates in which the expression of the avirulent allele of *AvrLm3* is lower than that of the virulent allele and do not fully restore the avirulence phenotype (see Supplementary Fig. S3). The experiment was repeated twice and error bars represent standard deviation.

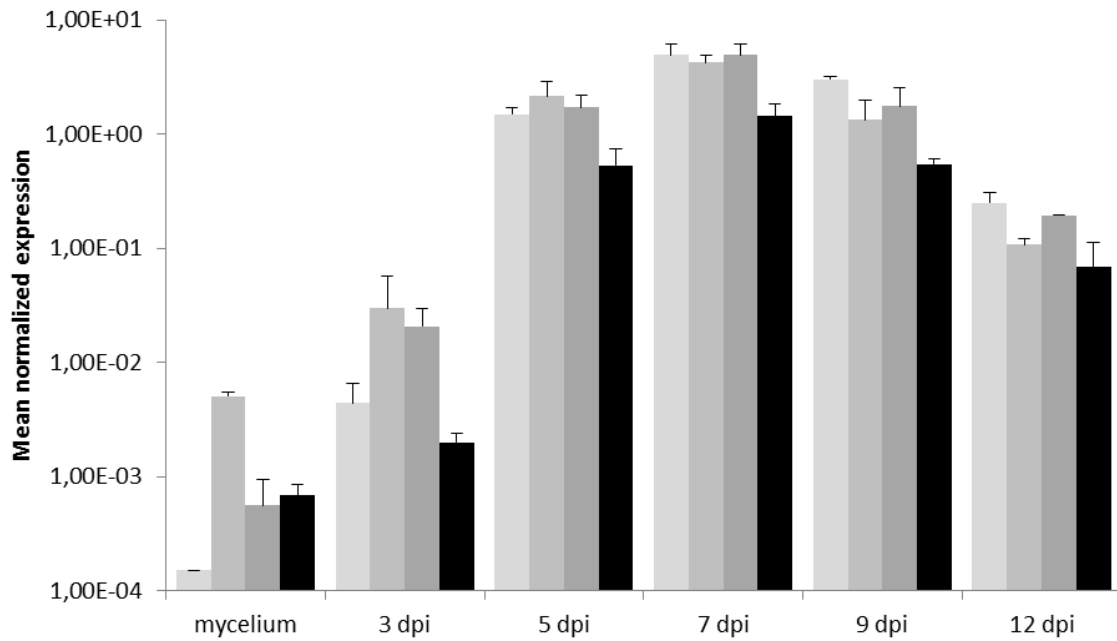


Figure 5: *AvrLm3* and *AvrLm4-7* expression during *in vitro* growth and plant colonization.

Light grey bars are *AvrLm3* expression data from the A3a7 isolate G06-E107, i.e. displaying a virulent phenotype towards *Rlm7* and an avirulent phenotype towards *Rlm3*, medium grey bars, Nz-T4 isolate (a3a7 phenotype) and dark grey bars, v23.1.3 isolate (a3A7 phenotype). Black bars, *AvrLm4-7* expression for v23.1.3. Gene expression was assessed by qRT-PCR. Expression levels were measured relatively to actin and EF1- α was used as a control. Error bars represent standard deviation for two to three technical replicates from two biological replicates.

Supporting Information

Table S1 List and characteristics of polymorphic molecular markers used for *AvrLm3* mapping in cross #69

Table S2 Primers used for vector constructions and qRT-PCR

Table S3 List of transformation experiments of *Leptosphaeria maculans* isolates

Table S4 Top 25 genes expressed by four *L. maculans* isolates at 7 days after inoculation of the compatible *Brassica napus* cultivar Darmor-bzh.

Table S5 *AvrLm3* sequence polymorphism between G06-E107 and Nz-T4, the parent isolates of cross #69

Fig. S1 Interaction phenotype of wild type and transformed *Leptosphaeria maculans* isolates on *Rlm3* and *Rlm7* lines.

Fig. S2 Characterization of *Leptosphaeria maculans* isolates silenced for *AvrLm4-7*

Fig. S3 Genetic mapping and relative expression of *AvrLm3* using HRM method

Fig. S4 Sequence alignment between the avirulence proteins *AvrLm3* and *AvrLmJ1* of *Leptosphaeria maculans*.

Fig. S5 Functional validation of *AvrLm3* by silencing experiments

Fig. S6 Absence of physical interaction between *AvrLm3* and *AvrLm4-7* proteins in Yeast-Two-Hybrid heterologous system

Table S1 List and characteristics of polymorphic molecular markers used for *AvrLm3* mapping in cross #69

Marker	Forward / Reverse	Primer sequence ^a	Hybridization temperature (°C)	Elongation time (s)	Reference
<i>AvrLm4-7</i>	F R	TATCGCATACCAAACATTAGGC GATGGATCAACCGCTAACAA	60	60	Parlange <i>et al.</i> 2009
<u>Minisatellite</u>					
MinLm9	F R	GCATTTGTTGGCTGGCATTGGA TGCGTTGGCGTGTGACATGACT	60	60	Parlange <i>et al.</i> 2009
Min12-94	F R	GGCCTTTTACCTGTTGGCTT GGTGAGAGAGATGTCGAGGC			
Min12-96	F R	CCAGCACGAATCGATTGAC AGGGCATCCTCATGCTCTTT	60	60	This study
<u>CAPS</u>					
124F12_F	F R	AGAGAGCTGCTAATAACCTGC AATCCATCTCCTAAATTATTC	56	60	Parlange <i>et al.</i> 2009
133E3_R	F R	GATCTAAATAGAGCAAGATAGT GTTGCTTAGTAGTGGT	48	60	Parlange <i>et al.</i> 2009
46F10_R	F R	TATATCTTTCTCCTTTTACC AGGAGCTCTAGTAAGGAAGGTC	48	60	Parlange <i>et al.</i> 2009
<u>Transposon junction</u>					
SC12-2	F R	CCCCTAGAAAGACAATTTACAG CGCCTAGTATAGTGTCCCTACGC	60	60	This study
SC12-14	F R	GCTGCACGTGGATTCAAAC TCCTCGCACAGTATTTCCTG AACTTTACTAGCCTTCTAGCTTTCCT	60	60	This study
SC12-16	F R	C TTTAGGTAGGGGTTGCAGGA	60	60	This study
SC12-19	F R	AAACATCTAGTGCCTCCATCTCT TTTCGCGCTTAAGGTGATCT	60	60	This study
<u>Gene</u>					
86520	F R	TCGGATTGAAGAAGGGACTG GCTGAGGGTGTGAGGAGAAG	60	60	This study
86530	F R	TCCAAATCTCGGTCCTTAC ACATGGCCAAGGATTACTCG	60	60	This study
<u>HRM</u>					
A3-SNP	F R	AAGCAGTGGCGTGAACAGA CTGCCAAGGGGATGATGGA	60	5	This study

Table S2 Primers used for vector constructions and qRT-PCR

Experiment	Primer
pPZPnat1-silAvrLm4-7	
Sense	F GAGAGACCCGGGCTTCCACCAAGTATAAACCC R GAGAGAGGCGCGCCTAGTCGCAACCACGAGTCCT
Antisense	F GAGAGAGGATCCCTTCCACCAAGTATAAACCC R GAGAGAGGCGCGCCCAGGCACGTTGATGCGATTG
pPZPnat1-AvrLm3	
Sense	F GAGAGAAAGCTTCTGATGATCGCAGTGTAC R GAGAGAGGATCCGCTTAGCATCTTTTCAAG
Antisense	F GAGAGAAAGCTTCTGATGATCGCAGTGTAC R GAGAGAGGATCCCTGTTACGCCACTGCTTG
pPZPnat1-A3	
AvrLm3ext-SpeIF	F GAGAGAACTAGTCTGTAAATGCCTGCTGT
AvrLm3ext-XhoIR	R GAGAGACTCGAGCGCGCTTATGTTAGAATC
Nourseothricin	F TGGCGGCTTCGTGGTCATC R TCGTACAGGGCGGTGTCCAG
Yeast-two-Hybrid	
pGDAT7-A3	F GAGAGAGAATTCCTTGAATGCCACGCTGTTG R GAGAGAGGATCCCCTGATGATCGCAGTGTAC
pGADT7-A7	F GAGAGACATATGTGTAGAGAGGCCTCAATATCTG R GAGAGAGGATCCCGTCGCAACCACGAGTCCTTGC
pGBKT7-A3	F GAGAGAGAATTCCTTGAATGCCACGCTGTTG R GAGAGAGGATCCCCTGATGATCGCAGTGTAC
pGBKT7-A7	F GAGAGACCATGGAGTGTAGAGAGGCCTCAATATCTG R GAGAGAGTCGACGGTCGCAACCACGAGTCCTTGC
qRT-PCR	
qAvrLm4-7	F GCCCTGCATAACTACCGAC R TCCTGGCCAAATATAACTCC
qAvrLm3	F AAGCAGTGGCGTGAACAGA R CTGCCAAGGGGATGATGGA
qsilAvrLm4-7	F CTCCGTATCTTTAGTCGCAACC R GCAGCTTTAGCTCAGCACCT
qsilAvrLm3	F CGAACGTGCGCTCTTGAATG R CAGGGGTCGTCTAAAGGCAG
qActin	F AGTGCGATGTCGATGTCAG R AAGAGCGGTGATTTCTTCT
qEF1- α	F ACAAATTGAAGGCCGAGCGTGAAC R TACCGGCGGCAATGATGAGGATA
β Tubuline	F AAGAACTCATCCTACTTCGA R TGAATAGCTCCTGAATGG

Table S3 List of transformation experiments of *Leptosphaeria maculans* isolates

Construction	Isolate	No of transformants	Aim
	transformed	analysed	
pPZPnat1-A4A7 ^a	G06-E101	7	<i>AvrLm4-7</i>
	G06-E107	7	complementation
pPZPnat1-a4A7 ^a	G06-E101	10	
	G06-E107	5	
pPZPnat1-A3 ^b	Nz-T4	10	<i>AvrLm3</i>
			complementation
pPZPnat1-sil <i>AvrLm4-7</i> ^b	V23.1.3	12	<i>AvrLm4-7</i> silencing
pPZPnat1-sil <i>AvrLm3</i> ^b	G06-E107	8	<i>AvrLm3</i> silencing

^a Constructions from Parlange *et al.* (2009). A4A7, *AvrLm4-7* allele conferring avirulence towards *Rlm4* and *Rlm7*, a4A7, allele conferring avirulence toward *Rlm7* only, A3, *AvrLm3* allele conferring avirulence towards *Rlm3*.

^b this study.

Table S4 Top 25 genes expressed by four *L. maculans* isolates at 7 days after inoculation of the compatible *Brassica napus* cultivar Darmor-bzh.

Feature ID	Gene name	Pfam	Rank ^a	G06-E107 ^b	v23.1.3 ^b	G06-E107+A7 ^b	Nz-T4 ^b
Lema_P076380.1	predicted protein	-	1	8 138.99 ^c	4 155.69	5 528.90	7 592.51
Lema_P070100.1	hypothetical protein	PF01476	2	5 963.64	4 821.61	6 178.38	4 923.62
Lema_P023250.1	predicted protein	-	3	5 454.70	5 725.89	4 617.42	5 948.73
Lema_P072760.1	EF1- α	PF00009	4	5 448.18	6 438.64	5 258.86	5 611.99
Lema_P113130.1	Predicted protein	-	5	5 330.28	15 045.40	6 169.36	3 764.76
Lema_P014660.1	Ubiquitin	PF00240	6	5 041.03	11 310.03	4 926.24	6 756.50
KP939098	AvrLm3		7	4 505.82	3 832.93	4 024.95	3 690.97
Lema_P113090.1	Putative uncharacterized protein	-	8	4 325.87	11 305.01	4 830.97	3 225.39
Lema_P113200.1	Putative uncharacterized protein	-	9	4 269.24	3 043.43	3 288.77	4 287.32
Lema_P005960.1	Putative uncharacterized protein	PF00043	10	4 162.21	3 288.78	2 945.12	4 133.75
Lema_P030740.1	Similar to ubiquitin / ribosomal protein S27a	PF01599, PF00240	11	3 959.72	7 144.45	3 943.86	5 101.64
Lema_P049940.1	AvrLm6		12	3 855.41	2 374.98	3 623.69	2 612.98
Lema_P006160.1	Predicted protein	-	13	3 699.21	3 915.66	3 676.85	3 283.16
Lema_P003800.1	Similar to amine oxidase	-	14	3 616.48	3 128.44	4 125.80	2 879.30
Lema_P083280.1	Similar to ubiquitin/ribosomal L40 fusion protein	PF01020, PF00240	15	3 567.72	6 414.11	3 616.19	4 468.58
Lema_P073150.1	Putative uncharacterized protein	-	16	3 149.07	3 206.34	3 552.03	2 793.75
Lema_P092260.1	Predicted protein	-	17	2 984.17	1 311.65	2 209.90	1 610.60
Lema_P102640.1	Similar to Ecp7	PF01476	18	2 759.87	1 438.80	1 880.31	2 704.18
Lema_P113110.1	Putative uncharacterized protein	-	19	2 655.10	8 945.06	3 018.44	1 855.41
Lema_P084480.1	Putative uncharacterized protein	-	20	2 643.85	3 916.19	1 987.45	2 039.31
Lema_P106790.1	Putative uncharacterized protein	-	21	2 609.16	1 764.40	2 649.02	2 131.91
Lema_uP086550.1	Uncharacterized protein	-	22	2 442.69	1 758.30	2 668.05	1 454.04
Lema_P049950.1	AvrLm2/LmCys1	-	23	2 290.27	1 266.57	2 182.16	2 293.31
Lema_P106630.1	predicted protein	-	24	2 268.36	1 345.52	1 814.10	2 552.30
Lema_P097490.1	Similar to 40s ribosomal protein s20	PF00338	25	2 112.71	2 313.66	2 192.36	2 671.84

^aRank of expression for the A3a4a7 isolate G06-E107; ^bPhenotype of isolates : G06-E107 (A3a7), v23.1.3 (a3A7), G06-E107+A7 (a3A7), Nz-T4 (a3a7)^c values are RPKM (Reads per Kilobase per Million reads)

Table S5 *AvrLm3* sequence polymorphism between G06-E107 and Nz-T4, the parent isolates of cross #69

Nucleotide position	G06-E107	Nz-T4	Corresponding amino acid change and position
152	G	A	51 ^{S→N}
172-173	AT	CA	58 ^{I→H}
228	T	C	SYN ^a
313	C	T	105 ^{H→Y}
391	G	C	131 ^{G→R}
396	G	A	SYN ^a
401	T	A	134 ^{F→Y}

^aSYN = Synonymous mutation







Phenotype	(a3A7)	(a3A7)	(A3a7)	(A3a7)	(a3a7)	(A3a7)
Isolate	JN2	G06-E107 +AvrLm4-7	G06-E107	Nz-T4 +AvrLm3	Nz-T4	G06-E-107
03.22.3.1 (<i>Rlm3</i>)						
02.23.2.1 (<i>Rlm7</i>)						

Fig. S1 Interaction phenotype of wild type and transformed *Leptosphaeria maculans* isolates on *Rlm3* and *Rlm7* lines.

Wild type and transformed *L. maculans* isolates were inoculated on *Brassica napus* lines harboring *Rlm3* or *Rlm7*. Pictures of infected cotyledons were taken 14 dpi.

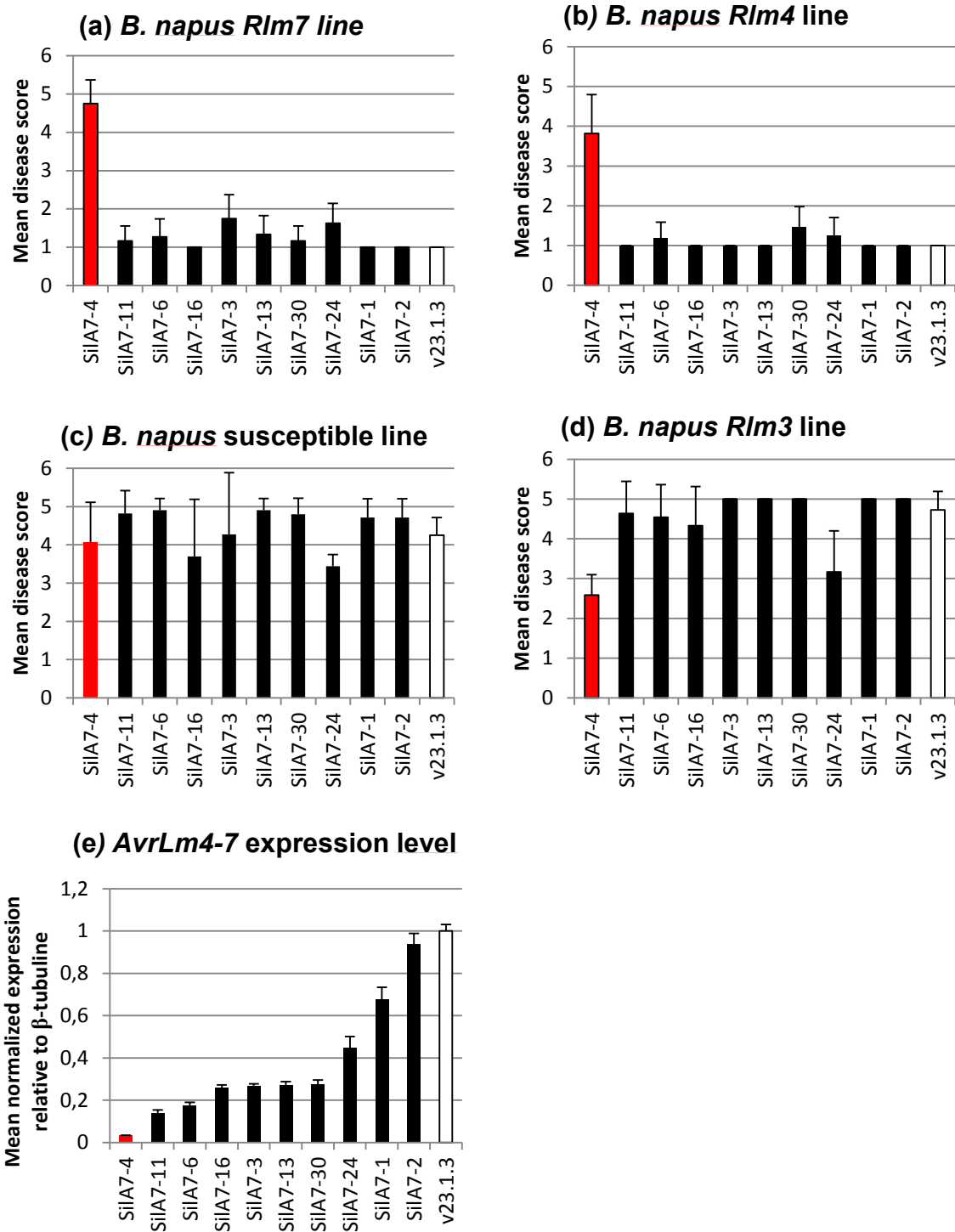


Fig. S2 Characterization of *Leptosphaeria maculans* isolates silenced for *AvrLm4-7*.

RNAi silencing of *AvrLm4-7* was undertaken and a total of 30 transformants were recovered. They were first phenotyped following inoculation on *Rlm7* and *Rlm4* *B. napus* lines in order to identify isolates with a potentially high level of silencing, i.e for which the *AvrLm4-7* protein

was no more detected by the corresponding resistance genes, as exemplified in **(a)** and **(b)**. Only one isolate, SilA7-4 (in red) was found to be virulent on *Rlm4* and *Rlm7* lines (i.e. with a mean disease score >3.5) **(a, b)** as well as towards the compatible control line, Darmor **(c)**. A selection of 10 transformants including SilA7-4 were further analysed by qRT-PCR to determine their silencing level, i.e. residual expression level of *AvrLm4-7* (relative to β -tubuline) 7 days after inoculation of the susceptible *B. napus* cv (Darmor) **(e)**. Although most isolates had *AvrLm4-7* expression levels lower than that of the wild-type isolate v23.1.3, only one isolate, Sil7-4, had a residual level of *AvrLm4-7* expression lower than 5% **(e)**. Sil7-4 was the only silenced isolate that produced resistance responses on the *Rlm3 B. napus* line, i.e. symptoms belonging to phenotypic classes 1 to 3, leading to a mean disease score <3 on this line **(d)**. In **(e)** values are means of three technical replicates and the experiment has been repeated twice with similar results.

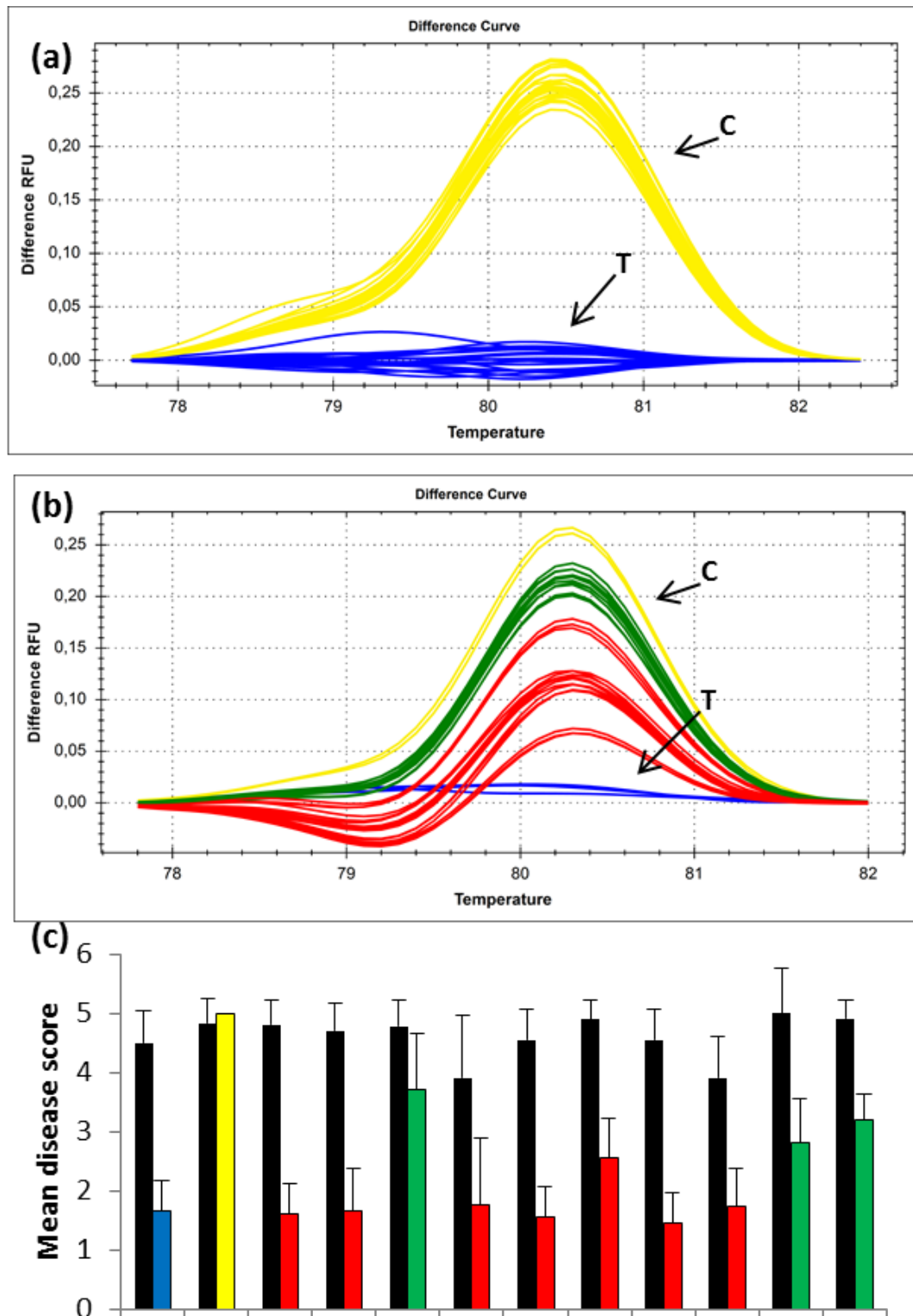


Fig. S3 Genetic mapping and relative expression of *AvrLm3* using HRM method

(a) Clustering of melting curves of the progeny of cross #69 after amplification of *AvrLm3* on genomic DNA. *AvrLm3* was mapped by HRM in cross #69 using the polymorphic nt 228 of the coding region (T→C, Table S5). Isolates displaying the a3 allele, including the parental

isolate Nz-T4, are clustered in yellow and isolates displaying the avirulent allele, including the parental isolate G06-E107 are clustered in blue.

(b) Relative expression of *AvrLm3* alleles in wild type isolates G06-E107 (blue, avirulent) and Nz-T4 (yellow, virulent) and in Nz-T4-complemented isolates (green and red lines).

Nz-T4 was transformed with the G06-E107 allele of *AvrLm3*. HRM assay was done on cDNA of each wild type or transformed isolate following RNA extraction from infected cotyledons of cv. Darmor at seven dpi. Since transformants have two distinct copies of *AvrLm3*, intermediate melting curves are obtained, their position on the graph being representative of the relative expression of each allele compared to those of the wild type isolates. As compared to phenotyping results (see below), avirulent transformants are grouped in the red cluster, those presenting a virulent or intermediate phenotype are grouped in the green cluster. A total of two technical replicates per isolates are displayed on the graph and two biological repeats were done with similar results.

(c). Mean disease rating following inoculations of *B. napus* lines. Wild type and transformed isolates were inoculated on *B. napus* lines harboring *Rlm3* and *Rlm7* (here, used as a susceptible control) and symptoms were assessed 12 dpi on a 1-6 scale with 1-3 corresponding to resistance responses of the plant and 4-6 to susceptibility. All transformants were virulent towards the *Rlm7* line (black bars). Seven transformants were avirulent towards *Rlm3* (red bars) and three displayed a virulent or intermediate phenotype (green bars). G06-E107 (A3a4a7, blue bar) and Nz-T4 (a3a4a7, yellow bar) were used as controls. The experiment was repeated twice and error bars represent the standard deviation.

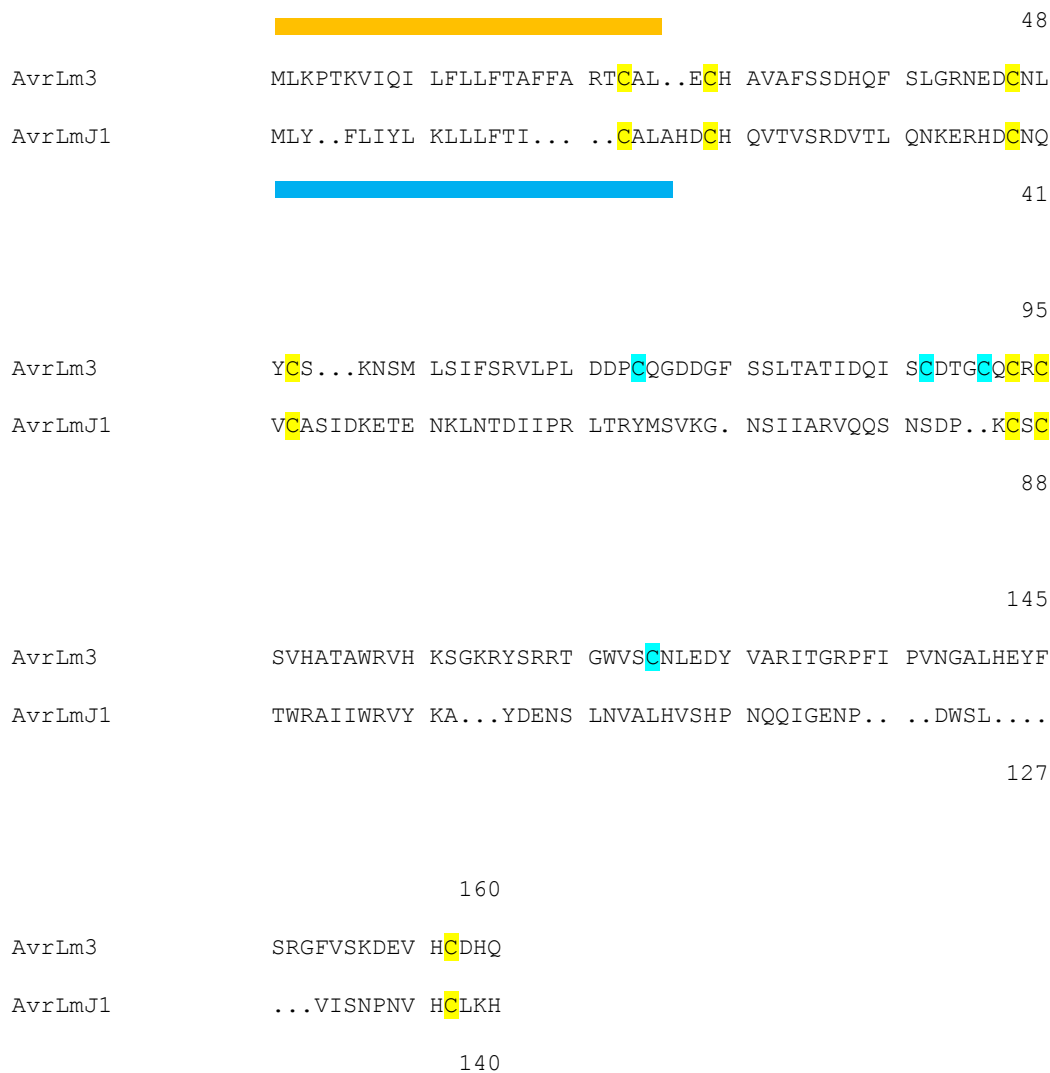


Fig. S4 Sequence alignment between the avirulence proteins AvrLm3 and AvrLmJ1 of *Leptosphaeria maculans*.

The signal peptide of AvrLm3 and AvrLmJ1 proteins are respectively represented by orange and blue rectangle. Conserved cysteines are highlighted in yellow and the others are highlighted in blue.

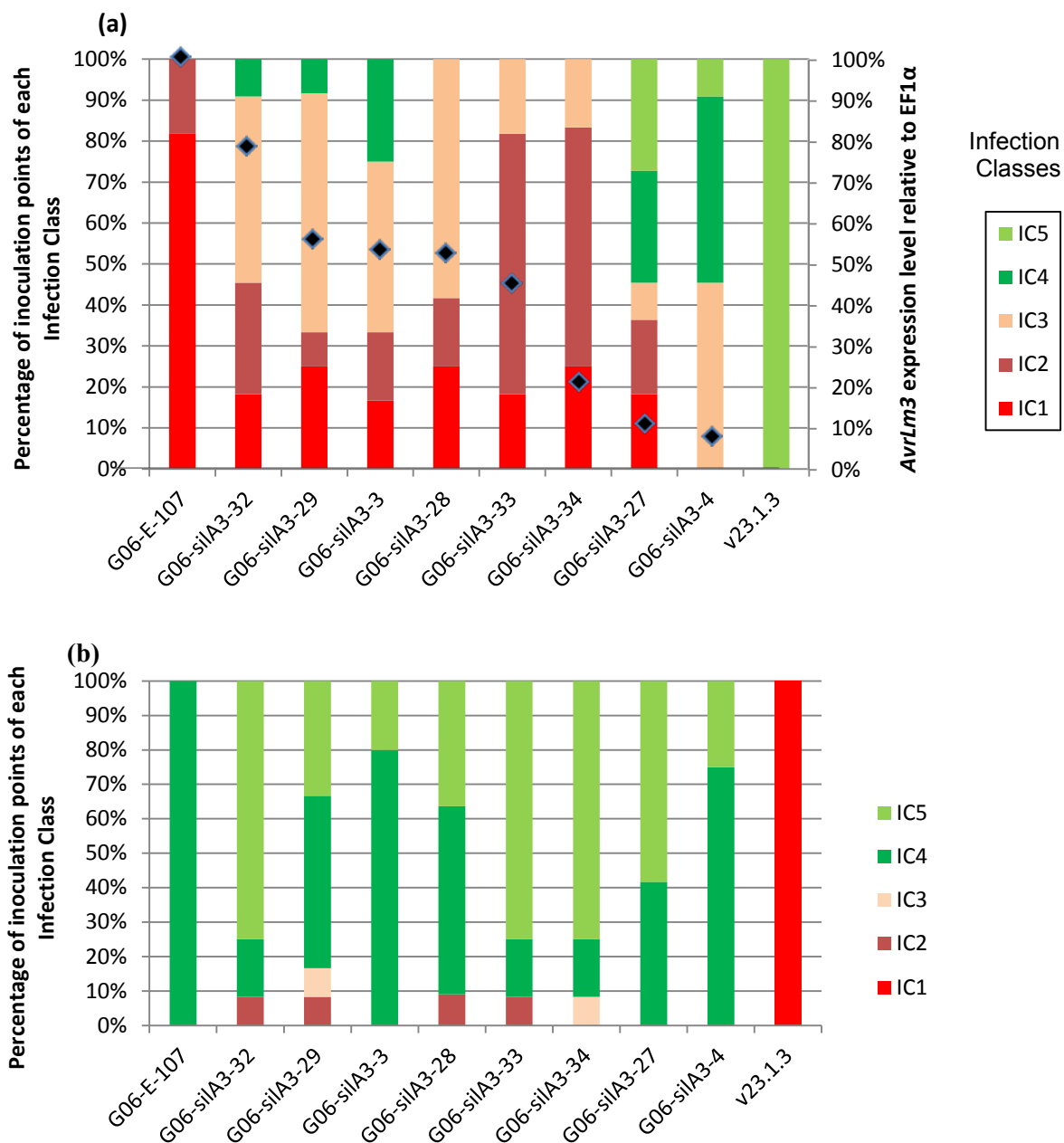


Fig. S5 Functional validation of *AvrLm3* by silencing experiments

RNAi silencing of *AvrLm3* was undertaken in the wild-type A3a7 isolate G06-E107 (i.e. avirulent towards *Rlm3* and virulent towards *Rlm7*). **(a)**. Following a first screen of the transformants by inoculation tests on the susceptible *B. napus* line Darmor, eight transformants with full virulence on Darmor were selected and further assessed for expression level of *AvrLm3* by qRT-PCR (Black diamonds) and for virulence on the *B. napus* *Rlm3* line. The wild-type (WT) avirulent isolate and the virulent control v23.1.3 are included Symptoms were scored

using the 1 to 6 rating scale in which infection classes (IC) 1 to 3 correspond to resistant reactions of the plant (dark necrotic responses, symptom size ranging from <1.5 mm (IC1) to > 3 mm (IC3) while IC4-6 correspond to susceptibility of the plant (lack of dark spots within the leaf lesion; grey-green collapse of the plant tissue without (IC4) or with (IC5-6) pycnidia. Compared to the WT avirulent isolate, silenced isolates produced either more intermediate-type resistance responses of the plant (IC2-3), or a few (10%) to more than 50% of susceptibility symptoms (IC4-6). Only the two transformants with the highest level of silencing (i.e. *AvrLm3* expression level <20% of the WT) were able to produce more than 50% of susceptibility symptoms on *Rlm3*. **(b)** Pathogenicity on the *Rlm7* line was not affected whichever the level of silencing. *AvrLm3* expression values in **(a)** are means of three technical and two biological replicates.

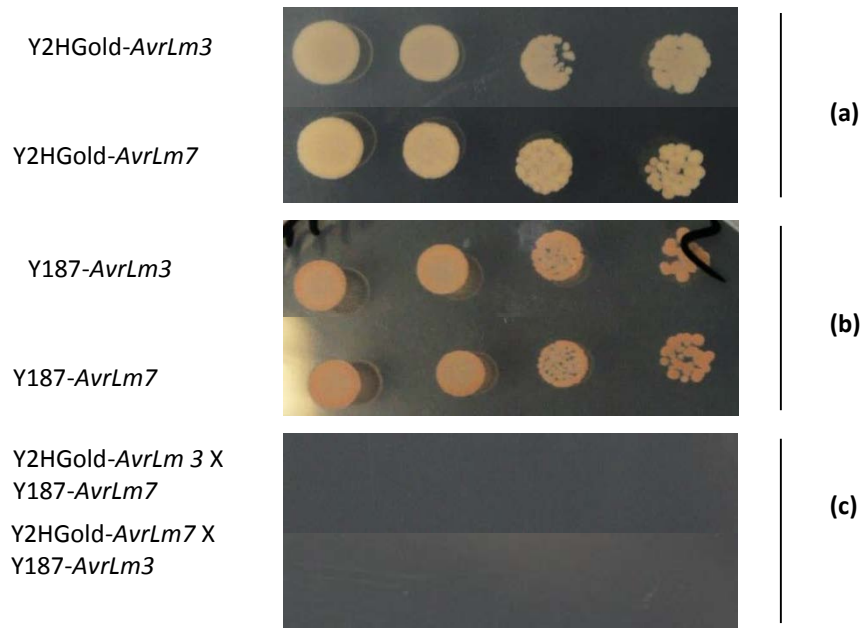


Fig. S6 Absence of physical interaction between *AvrLm3* and *AvrLm4-7* proteins in Yeast-Two-Hybrid heterologous system

(a). Y2HGold strains were grown on SD-Tryptophan, selective media for plasmid pGBKT7-*AvrLm3* and pGBKT7-*AvrLm4-7*. **(b).** Y2HGold strains were grown on SD-Leucine, selective media for plasmid pGADT7-*AvrLm3* and pGADT7-*AvrLm4-7*. **(c).** Diploids strains do not have the ability to grow on selective media SD-Leucine-Tryptophan-Histidine, suggesting the absence of activation of the HIS-3 reporter gene and therefore the absence of physical interaction between *AvrLm3* and *AvrLm4-7*. From left to right, four serial 10-fold dilutions are displayed.

Résultats complémentaires

Identification de cibles végétales d'AvrLm3 et AvrLm4-7 par crible double hybride

Afin d'identifier les cibles végétales d'AvrLm3 et AvrLm4-7, nous avons réalisé un crible double hybride en utilisant ces deux protéines comme « proie ». Les interactants d'AvrLm3 ont été criblés dans une banque de cDNA générée à partir de cotylédons de *B. napus* de la variété Darmor (compatible) inoculée par la souche v23.1.3 (a3A7). Les interactants d'AvrLm4-7 ont quant eux été criblés dans une banque de cDNA générée à partir de cotylédons de *B. napus* de la lignée 02.23.3.1 (*Rlm7*) infectés par la souche 19.4.24 (A3a7).

Le crible double hybride des interactants potentiels d'AvrLm3 et AvrLm4-7 a mis en évidence respectivement 9 et 36 cibles potentielles chez *B. napus*. Aucune cible commune n'a identifiée entre AvrLm3 et AvrLm4-7.

Afin de discriminer les cibles « vraies » des faux positifs, dont la présence est courante dans le cas de la méthode double hybride, les plasmides contenant les séquences candidates ont été extraits et retransformés dans la souche de levure « proie » Y187. Les souches Y187 ont été croisées avec les souches « appât » Y2HGold-AvrLm3 ou Y2HGold-AvrLm4-7, mais également avec la souche Y2HGold-p53, utilisée comme contrôle négatif. Ces vérifications ont permis de ne conserver que quatre cibles végétales potentielles pour la protéine AvrLm3 et six cibles végétales potentielles pour AvrLm4-7 (Tableau 1).

Les cibles végétales potentielles d'AvrLm3 et AvrLm4-7 occupent des compartiments cellulaires variés, et aucune d'entre elles n'a été décrite comme interagissant avec des effecteurs d'autres espèces.

La validité de ces interactions reste toutefois à confirmer par des approches complémentaires. La confirmation de ces cibles potentielles sera notamment prochainement effectuée par le biais de la méthode Bimolecular Fluorescence Complementation (BIFC), ainsi que par co-immunoprécipitation.

Tableau 1 : Cibles végétales potentielles d'AvrLm3 et AvrLm4-7 identifiées par crible double hybride.

Interactant	Fonction	Compartiment cellulaire
Crible AvrLm3		
BnaC06g13840D	Endoplasmic Reticulum Membrane protein	Réticulum endoplasmique
BnaC06g06760D	Myrosinase Associated protein	Apoplasme
BnaC01g38670D	ATPase	Unknown
BnaA09g55550D	Unknown	Unknown
Crible AvrLm4-7		
BnaC02g04820D	Ribosomal protein L10 family protein	Intracellulaire
BnaC08g28500D	Glycosyl hydrolase	Plasmodesme
BnaA09g19810D	Ubiquitine	Nucleocytoplasmique
BnaCnng33260D	Trypsin-like serine protease	Choloroplastes
BnaA08g15930D	Cinnamyl alcohol dehydrogenase 8	Unknown
BnaC08g15940D	Unknown	Unknown

Localisation subcellulaire d'AvrLm3

Bien que le mode d'action d'AvrLm4-7 reste inconnu, il a récemment été montré que cet effecteur était transloqué au sein des cellules de l'hôte (Blondeau *et al.*, 2015). Afin de déterminer si AvrLm3 est également transloqué dans les cellules végétales ou au contraire reste localisé dans l'espace apoplastique, nous avons exprimé transitoirement cet effecteur fusionné à la RFP dans *Nicotiana Benthamiana*.

Cela a permis de déterminer que suite à sa sécrétion hors des cellules végétales, AvrLm3 s'accumule dans l'espace extracellulaire sans être réinternalisé au sein des cellules de l'hôte (Figure 1).

Toutefois, la validation de la localisation d'AvrLm3 dans l'espace apoplastique nécessite de répéter cette expérience. De plus, la vérification par Western Blot de l'absence de clivage de la RFP reste à mettre en œuvre.

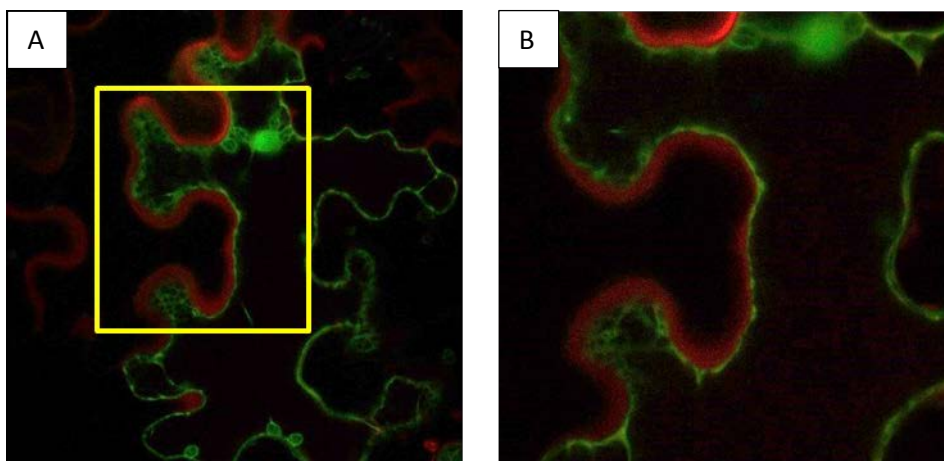


Figure 1 : Localisation subcellulaire d'AvrLm3

La protéine AvrLm3 fusionnée à la RFP par son extrémité C-terminale a été exprimée dans *Nicotiana Benthamiana* par agroinfiltration. La GFP dépourvue de son peptide signal a été utilisée comme témoin de localisation nucléo-cytoplasmique. Les feuilles de *N. benthamiana* ont été observées à 48 hpi (heures post-inoculation) au microscope confocal, sous un laser émettant à 488 nm pour la détection de la GFP et à 532 nm pour la détection de la RFP. (A) La GFP dépourvue de son peptide signal est accumulée dans l'espace intracellulaire nucléocytoplasmique, tandis que la protéine AvrLm3 est sécrétée dans l'apoplasme, où elle s'accumule. (B) Focus sur la région marquée en jaune.

Matériel et méthode

Souches de *L. maculans*

La souche v23.1.3 est issue d'un croisement *in vitro* (Balesdent *et al.*, 2001). Les souches G06-E107 et G06-E107 complétée avec *AvrLm4-7* sont décrites dans Plissonneau *et al.* (submitted). Les souches de *L. maculans* ont été cultivées et mises à sporuler sur milieu V8 tel que décrit par Ansan-Melayah *et al.* (1995).

Manipulations d'ADN et d'ARN

L'ADN génomique a été extrait à partir de suspensions de conidies à l'aide du kit DNeasy 96 Plant Kit et du Biorobot QIAGEN 3000 ou avec le kit DNeasy Plant Mini, en suivant les recommandations du fabricant. Le séquençage de produits PCR a été effectué en utilisant le séquenceur automatique Beckman Coulter CEQ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) selon les recommandations du fabricant ou ont été sous-traitées à la société Eurofins Genomics (Eurofins, Ebersberg, Allemagne).

Les ARN totaux ont été extraits à partir de culture liquide de mycélium dans du milieu Fries ou de cotylédons de *B. napus* infectés par *L. maculans* avec du TRIzol® Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) selon les recommandations du fabricant. Les ARN totaux ont été traités avec de la DNase I RNase-Free (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Les échantillons d'ARN totaux ont été ajustés à une quantité de 3µg et le cDNA synthétisé en utilisant des primers oligo-dT avec la Transcriptase reverse PrimerScript (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.) selon les recommandations du fabricant.

Cribles double hybride

Les cribles double hybride ont été effectués avec le kit Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (ClonTech, Takara, Shiga, Japan), selon les recommandations du fabricant. Les séquences codantes des protéines matures (c'est-à-dire dépourvues de leur peptide signal) des gènes *AvrLm3* et *AvrLm4-7* ont été amplifiées à partir de cDNA de la souche v23.1.3 (*AvrLm3-AvrLm4-7*) et introduites dans le vecteur « appât » pGBKT7 (Table S1). Les vecteurs pGBKT7-*AvrLm3* et pGBKT7-*AvrLm4-7* ont ensuite été introduits dans la souche Y2HGold de *Saccharomyces cerevisiae* et l'absence d'autoactivation du promoteur GAL4 par ces constructions a été vérifiée.

Deux banques de cDNA ont été construites pour cribler les interactants potentiels des protéines AvrLm3 et AvrLm4-7 à l'aide du kit Make Your Own "Mate & Plate™" Library System kit (ClonTech, Takara, Shiga, Japan) et introduites dans le vecteur « proie » pGADT7-Rec puis transformées dans la souche Y187 de *S. cerevisiae*.

La banque de cDNA générée à partir d'un pool d'ARN totaux extraits de cotylédons du cultivar 02.23.3.1 (*Rlm7*) infecté par la souche 19.4.24 (A3a7) à 3, 7 et 14 jours post-inoculation (jpi) et a été utilisée pour identifier les interactants d'AvrLm4-7. La banque générée à partir d'un pool d'ARN totaux extraits de cotylédons du cultivar compatible Darmor infecté par la souche v23.1.3 (a3A7) à 3, 7 et 14 jpi et a quant à elle été utilisée pour identifier les interactants d'AvrLm3.

Après le croisement entre les souches Y2HGold et les banques Y187, les levures diploïdes ont été sélectionnées sur milieu sélectif SD dépourvu de Leucine, Histidine et contenant de l'Auréobasidine (125 ng.mL^{-1}), puis sur milieu SD dépourvu de Leucine, Histidine, Tryptophane et Adénine contenant du 3-Amino-1,2,4-triazole (25mM). Les plasmides des colonies sélectionnées ont été extraits et séquencés. Les séquences ont ensuite été assignées par BLAST à des gènes de *L. maculans* ou de *B. napus* (Rouxel *et al.*, 2011 ; Chalhoub *et al.*, 2014). Pour valider les interactants potentiels, les plasmides extraits ont été retransformés dans la souche Y187 et directement croisées avec les souches Y2HGold-pGBKT7-*AvrLm3* ou Y2HGold-pGBKT7-*AvrLm4-7* et Y2HGold-pGBKT7-*p53*, utilisé comme contrôle négatif, avant d'être à nouveau sélectionnées sur milieu sélectif.

Pour chaque crible, un minimum de 28 millions de clones a été testé.

Construction des vecteurs utilisés pour les transformations

Les plasmides utilisés dans cette étude ont été construits à l'aide de la technologie Gateway (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), en suivant les recommandations du fabricant. Pour l'expérience de localisation subcellulaire d'AvrLm3, la séquence codante du gène a été amplifiée à partir de cDNA de la souche v23.1.3 et introduite dans le vecteur pDONOR221, puis dans le vecteur destination pSITEII-6C1 permettant ainsi de fusionner l'extrémité C-terminale d'AvrLm3 à la RFP. Les constructions ont été transformées dans la souche GV3101 d'*Agrobacterium tumefaciens* par électroporation à 2,5 kV, 200 Ohms et 25 μF .

Expression transitoire dans le tabac

Les souches d'*A. tumefaciens* GV3101 transformées ont été cultivées 16h dans du milieu YEB contenant les antibiotiques appropriés à 28°C, puis diluées au 10^{ème} dans du YEB medium (Bacto-beef extract: 5g/l, Bacto-yeast extract: 1g/l, Bacto peptone: 5g/l, Saccharose: 5g/l, MgSO4: 1M). Après 4h d'agitation à 28°C, les cultures ont été centrifugées 10 min à 5000 rpm et les culots ressuspendus dans du milieu d'agroinfiltration (MES: 10mM, MgCl2: 10mM, Acétosyringone: 200µM) à une DO₆₀₀ de 0,5. Après 2-3h d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, les suspensions bactériennes ont été infiltrées à l'aide de seringue de 1 mL dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* âgées de 4 à 5 semaines.

Microscopie confocale

L'observation des feuilles de *N. benthamiana* en microscopie confocale a été effectuée avec un microscope Leica TCS SPE en utilisant un grossissement de 63, de 24 à 72h post-infiltration. Les longueurs d'onde d'excitation suivantes ont été utilisées : GFP: excitation 488 nm, émission 489 to 509 nm ; RFP : excitation 532 nm, émission 558 to 582 nm; chlorophylle : excitation 432 nm, émission 660 to 690 nm. Le gain du détecteur était fixé entre 800 et 900 avec une amplification de décalage de -0,6.

Tableau S1 : Liste des amorces utilisées

Amorces	Séquence
Double Hybride	
pGADT7-EcoRI-A3F	GAGAGAGAATTCATGCTTGAATGCCACGCTGTTG
pGADT7-BamHI-A3R	GAGAGAGAATTCATGCTTGAATGCCACGCTGTTG
pGADT7-NdeI-A7F	GAGAGACATATGTGTAGAGAGGCCTCAATATCTG
pGADT7-BamHI-A7R	GAGAGAGGATCCCGTCGCAACCACGAGTCCTTGC
pGBKT7-EcoRI-A3F	GAGAGAGAATTCATGCTTGAATGCCACGCTGTTG
pGBKT7-BamHI-A3R	GAGAGAGAATTCATGCTTGAATGCCACGCTGTTG
pGBKT7-NcoI-A7F	GAGAGACCATGGAGTGTAGAGAGGCCTCAATATCTG
pGBKT7-SalI-R	GAGAGAGTCGACGGTCGCAACCACGAGTCCTTGC
Gateway pour localisation subcellulaire	
AvrLm3-up	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTTAAAACCTACAAAGGTGATC
AvrLm3-low	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTGATGATCGCAGTGTACCTC

Chapitre II :
Analyse de la diversité d'
***AvrLm3* et identification**
des mécanismes
moléculaires impliqués
dans la virulence vis-à-vis
de *Rlm3*

Introduction

L. maculans a la capacité de rapidement s'adapter aux gènes de résistance majeurs du colza. Ainsi, la résistance *Rlm1* a été contournée à peine trois ans après son déploiement au champ (Rouxel *et al.*, 2003). Dix ans après la commercialisation des premiers cultivars de colza possédant *Rlm7*, cette résistance est toujours largement utilisée et peu de souches virulentes sont isolées dans les populations françaises de *L. maculans*. Toutefois, un suivi de l'évolution moléculaire d'*AvrLm4-7* sous pression de sélection *Rlm7* renforcée a montré que le champignon pouvait également rapidement d'adapter à cette source de résistance (Daverdin *et al.*, 2012) et l'évolution actuelle des populations suggère que le contournement de *Rlm7* est en cours à l'échelle du territoire (cf. Introduction 4.5).

Une analyse préliminaire des souches virulentes isolées dans le cadre de l'étude réalisée par Daverdin *et al.* (2012) a mis en évidence que chez la très grande majorité des souches françaises, le contournement de la résistance *Rlm7* s'accompagne d'une résurgence d'un phénotype avirulent vis-à-vis de *Rlm3* (cf. Chapitre 1). Dans ce contexte, l'antagonisme entre les phénotypes d'avirulence *AvrLm3* et *AvrLm4-7* offre une opportunité pour la gestion durable des résistances variétales de *L. maculans*, par l'alternance spacio-temporelle de variétés possédant *Rlm3* ou *Rlm7* ou par le pyramidage de ces deux gènes de résistance dans des variétés de colza.

Toutefois, l'existence d'une telle opportunité dépend des mécanismes évolutifs agissant sur *AvrLm3* et du coût de fitness associé à la perte de fonctionnalité d'*AvrLm3* en tant qu'effecteur. Sur la base des travaux présentés dans le Chapitre 1, on peut *a priori* supposer que la présence d'*AvrLm3* est nécessaire lors de la colonisation de *B. napus* par *L. maculans*. En effet, *L. maculans* semble avoir mis en place un mécanisme complexe et original qui lui permet d'échapper à la reconnaissance par *Rlm3* sans perdre le gène d'avirulence *AvrLm3*. De plus, la présence du gène *AvrLm4-7* n'entraîne pas de modification de l'expression d'*AvrLm3*. Ce résultat laisse supposer que chez les souches pour lesquelles la virulence vis-à-vis de *Rlm3* résulte de la présence d'un allèle fonctionnel d'*AvrLm4-7*, la protéine *AvrLm3* est produite et secrétée.

L'objectif était donc de mieux appréhender le polymorphisme allélique d'*AvrLm3*, d'analyser son effet sur la fitness fongique et d'identifier les mécanismes évolutifs qui permettent le contournement de la résistance *Rlm3*.

Plusieurs stratégies ont été mises en place pour répondre à ces questions :

- (i) Suivi de l'évolution des fréquences des gènes d'avirulence *AvrLm3* et *AvrLm4-7* au champ
- (ii) Evaluation de la présence d'un allèle d'*AvrLm3* dans une collection de souches a3A7 ou virulentes vis-à-vis de *Rlm3* et *Rlm7* et caractérisation de ces allèles
- (iii) Mesure de l'impact du silencing du gène *AvrLm3* sur la fitness fongique
- (iv) Identification des mécanismes moléculaires permettant la virulence vis-à-vis de *Rlm3* et *Rlm7*.

Les résultats obtenus sont présentés sous la forme de l'article "Unusual evolutionary mechanisms to escape Effector-Triggered-Immunity in the fungal phytopathogen *Leptosphaeria maculans*", qui est en cours de finalisation et sera prochainement soumis à *Environmental Microbiology*.

Unusual evolutionary mechanisms to escape Effector-Triggered-Immunity in the fungal phytopathogen *Leptosphaeria maculans*

Authors

Clémence Plissonneau^a, Juliette Linglin^a, Françoise Blaise^a, Bénédicte Ollivier^a, Martine Leflon^b, Julien Carpezat^b, Thierry Rouxel^a, Marie-Hélène Balesdent^a

^a INRA, UMR INRA-AgroParisTech 1290-Biogger, Avenue Lucien Brétignières, BP 01, F-78850 Thiverval-Grignon, France

^bTerres Inovia, Avenue Lucien Brétignières, BP 01, F-78850 Thiverval-Grignon, France

Word count

Summary : 200

Introduction : 1035

Results : 2331

Discussion : 1638

Experimental Procedure : 1069

Acknowledgements : 65

Summary :

Leptosphaeria maculans is responsible for the stem canker disease of oilseed rape (*Brassica napus*). *AvrLm3* and *AvrLm4-7*, two avirulence genes of *L. maculans* are involved in an unusual relationship: the presence of *AvrLm4-7* suppresses the *Rlm3*-mediated recognition. To investigate this relationship, we firstly assessed the diversity of *AvrLm3* in *L. maculans* populations. The analysis of 238 isolates revealed a high level of allele polymorphism for this gene, but no deletion event or inactivating mutations were found. This contrasts with the presence/absence polymorphism usually observed for other avirulence genes in *L. maculans* and questioned its role in fungal fitness. Two distinct mechanisms responsible for the “double virulent” phenotype were identified. In isolates displaying an inactivation of *AvrLm4-7*, amino acid changes in *AvrLm3* were responsible for the virulence phenotype towards *Rlm3*. However, 56% of the “double virulent” isolates displayed an avirulent allele of *AvrLm3*, but mutations in the sequence of *AvrLm4-7* allowed escaping *Rlm7*-mediated resistance while maintaining the suppression of the *AvrLm3* phenotype effective. The complex evolutionary mechanisms displayed by *L. maculans* to escape *Rlm3*-mediated resistance while preserving *AvrLm3* sequence integrity, along with the reduced virulence in isolates silenced for *AvrLm3* confirmed the importance of this effector in pathogenicity towards *B. napus*.

Introduction

The Dothideomycete *Leptosphaeria maculans* is the causal agent of phoma stem canker disease on oilseed rape (*Brassica napus*). It is the most damaging fungal disease of *B. napus*, causing yield losses ranging from 5 to 20% (Fitt *et al.*, 2006). *L. maculans* is a hemibiotrophic fungus with a complex life cycle. Sexual reproduction takes place every year on stem residues, producing a large amount of ascospores that can be spread on large distances by the wind (West & Fitt, 2005). The ascospores germinate on young leaves of oilseed rape and hyphae penetrate then through stomata. The fungus causes leaf spot, resulting in asexual pycnidia formation responsible for secondary infections. This stage is followed by a systemic endophytic development until a necrotrophic switch occurs at the end of the growing season, potentially causing the rupture of the plant stem and then yield loss.

The interaction between *L. maculans* and *B. napus* is exemplary of typical gene-for-gene interactions (Flor, 1955). The recognition of an avirulence protein (*AvrLm*) of *L. maculans* by its cognate resistance gene of *B. napus* (*Rlm*) triggers a strong and rapid localized cell death, called hypersensitive response (HR), that prevents tissue invasion by the fungus and subsequent colonization of stem tissues. To date, fourteen *AvrLm-Rlm* interactions have been genetically identified between *L. maculans* and *Brassicaceae* species. Seven *AvrLm* genes have been cloned: *AvrLm1*, *AvrLm2*, *AvrLm3*, *AvrLm4-7*, *AvrLm6*, *AvrLm11* and *AvrLmJ1* (Gout *et al.*, 2006; Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009; Balesdent *et al.*, 2013; Ghanbarnia *et al.*, 2014; Van de Wouw *et al.*, 2014; Plissonneau *et al.*, submitted) while only the two allelic resistance genes *Rlm2* and *LepR3* have been cloned (Larkan *et al.*, 2014; 2015). All *AvrLm* genes have the common characteristics of fungal effector genes: they encode for small secreted protein, which are highly up-regulated at early stages of infection and show low homologies with genes of other fungal species. Avirulence proteins belong to a class of molecules called effectors that are secreted by the pathogens during plant colonization and

interact with host metabolism to suppress plant defenses or to increase nutrient uptake (Lo Presti *et al.*, 2015).

The deployment of resistant cultivars in the field is the most effective method to control *L. maculans* impact on *B. napus* (Delourme *et al.*, 2006). However, *L. maculans* can rapidly adapt to major resistance genes : the breakdown of the resistance gene *Rlm1/LepR3* occurred only three years after the deployment of resistant cultivars, causing dramatic yield losses in France and in Australia (Rouxel *et al.*, 2003; Sprague *et al.*, 2006). Despite the established role of *AvrLm4-7* in fungal fitness (Huang *et al.*, 2010), a rapid breakdown of *Rlm7* has been shown under strong selection pressure and cropping conditions that favored the disease (Daverdin *et al.*, 2012). A similar result was observed in field experiments in which cultivars harboring *Rlm6* were grown (Fudal *et al.*, 2009; Brun *et al.*, 2010). The high evolutionary potential of *L. maculans* results both from its life cycle and its genome structure. Firstly, the large amount of ascospores produced by sexual reproduction allows recombinant virulent isolates to be spread massively. Furthermore, the avirulence genes of *L. maculans* locate in large “AT-rich” isochores (Rouxel *et al.*, 2011), composed of mosaics of degenerated transposable elements (TE). This genomic location is responsible for the rapid evolution of avirulence genes towards virulence by Repeat Induced Point mutation (RIP) and gene deletion (Gout *et al.*, 2007; Fudal *et al.*, 2009; Daverdin *et al.*, 2012). RIP is a premeiotic mechanism occurring in fungi to inactivate TEs and that can “overlap” on genes located nearby (Irean *et al.*, 1994; Galagan & Selker, 2004). The lack of durability of *Rlm6* and *Rlm7* in controlled field experiments, with increased selection pressure (Fudal *et al.*, 2009; Daverdin *et al.*, 2012) must however be compared to the long-lasting resistance conferred by the use of *Rlm7* in the agricultural practice in France (Balesdent *et al.*, 2015).

The avirulence gene *AvrLm4-7* triggers both *Rlm4* and *Rlm7*-mediated resistance in *B. napus*. The *Rlm4*-mediated resistance can be circumvented by a unique G¹²⁰R amino acid change in

the avirulence protein (Parlange *et al.*, 2009). Large scale population survey of French and European populations of *L. maculans* in 2000/2001 and 2002/2003 respectively, showed that more than 99% of isolates were avirulent towards *Rlm7*, while *AvrLm3* was almost completely absent from populations, with only one isolate avirulent towards *Rlm3* identified in France (Balesdent *et al.*, 2006; Stachowiak *et al.*, 2006). Recently, we showed that the postulated absence of *AvrLm3* in field populations in fact results from the hiding of the avirulence effect of *AvrLm3* in presence of a functional allele of *AvrLm4-7*, while the gene is present and expressed in isolates. We also found that the absence or the inactivation of *AvrLm4-7* leads to a resurgence of the *AvrLm3* phenotype in French *L. maculans* populations (Plissonneau *et al.*, submitted). These results suggested that the *Rlm3* resistance could be an efficient genetic control of the disease, if alternating with *Rlm7* at the landscape level or using pyramiding strategies. In France, the *Rlm7* resistance is currently widely used in commercial hybrids and cultivars harboring both *Rlm3* and *Rlm7* have been recently marketed (M.H Balesdent and X. Pinochet, personal communication).

The recent cloning of *AvrLm3* (Plissonneau *et al.*, submitted) is the starting point to investigate its allele diversity and events responsible for *Rlm3* breakdown in fungal populations. A preliminary analysis indicated that all field isolates possess a copy of *AvrLm3*, contrasting with many previous examples of avirulence genes of *L. maculans* located in similar genomic environment, usually showing presence/absence polymorphism, even in the absence of selection pressure. It is then unclear on whether being hidden by *AvrLm4-7* protects *AvrLm3* from evolving under selection pressure or if *AvrLm3* is conserved due to its importance for fungal fitness. In this paper, we address this issue by surveying populations currently submitted to the *Rlm7* pressure or from a worldwide collection and by evaluating their allelic diversity at the *AvrLm3* locus. We also investigate the importance of *AvrLm3* in fungal fitness. Our results suggest the importance of *AvrLm3* in fungal fitness and illustrate

unconventional evolutionary mechanisms displayed by the fungus to circumvent *Rlm3*-mediated resistance while maintaining the *AvrLm3* integrity and its effector function.

Results

Dynamic survey of the occurrence of *AvrLm3* and *AvrLm4-7* in *L. maculans* populations

Large scale studies of the occurrence of avirulence genes in *L. maculans* populations were previously done by sampling isolates from leaf spot naturally occurring on susceptible cultivars (i.e without *Rlm3* or *Rlm7*) (Balesdent *et al.*, 2006; Stachowiak *et al.*, 2006; Dilmaghani *et al.*, 2009). In France in 2001/2002 and in Europe in 2003/2004 (Balesdent *et al.*, 2006; Stachowiak *et al.*, 2006) (Table 1), all but one of the characterized isolates were avirulent towards *Rlm7*, therefore preventing the *AvrLm3* phenotype to be expressed. In America and Australia, the frequency of isolates virulent towards *Rlm7* was higher than in Europe, with about 36% of isolates virulent towards *Rlm7* but only 1.1 % of isolates that were virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7* (Dilmaghani *et al.*, 2009; Table 1).

Additional sampling performed in Grignon (France) in 2012 and 2013 on cultivars without *Rlm3* and *Rlm7* (Table 1 and Table S1) revealed the current increase of isolates virulent towards *Rlm7*, with a frequency of 9.8% in 2012 and 10.5% in 2013, respectively. Concomitantly, isolates avirulent towards *Rlm3* emerged and increased in *L. maculans* populations (Table 1). However, the frequency of isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7* remained very low, with no isolates identified in 2012 and only one found in 2013, despite the increasing presence of cultivars harboring both *Rlm3* and *Rlm7* in the fields.

AvrLm3 is present in all *L. maculans* isolates

The presence of *AvrLm3* and *AvrLm4-7* was assessed by PCR amplification using the primers described in Table S2, in a selection of 592 isolates from French or worldwide origin and

displaying a A3a7, a3A7 or a3a7 phenotypes (i.e virulent or avirulent towards *Rlm3* or *Rlm7*) (Table 2). All isolates amplified the mating type region, used as a positive control (data not shown). The coding sequence of *AvrLm4-7* was amplified in all a3A7 isolates, while only 43.4% of the isolates virulent towards *Rlm7* amplified this region (Table 2). This frequency is similar to that found by Daverdin *et al.* in 2012 (45.8%), substantiating the fact that the common evolutionary mechanisms leading to virulence towards *Rlm7* are deletions and multiple RIP mutations preventing PCR amplification. The coding sequence of *AvrLm3* was always amplified in the isolates, whether being avirulent or virulent towards *Rlm3* (Table 2), and in all isolates avirulent towards *Rlm7* (i.e in which the *AvrLm3* phenotype is hidden by the presence of a functional allele of *AvrLm4-7*). All isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7* amplified *AvrLm3*, contrasting with the usual presence/absence pattern of *L. maculans* avirulence genes (Table 2).

AvrLm3 is highly polymorphic and shows marks of positive selection

AvrLm3 was sequenced in a selection of 238 isolates displaying diverse avirulence phenotypes towards *Rlm3* and *Rlm7* and from worldwide origin (Table 3). An unusual high degree of allele diversity was found, strongly contrasting with other avirulence genes of *L. maculans*, with 28 nucleotides being polymorphic in the coding sequence of *AvrLm3*. The nucleotide polymorphism defined 22 different alleles, corresponding to eleven isoform, termed *AvrLm3.A* to *AvrLm3.K* (Fig. 1). Within each isoform, the alleles encompassing series of synonymous mutations were further subdivided as *AvrLm3.Xi* (Fig. 1; 2 and S1; Table S1). The reference allele *AvrLm3.A1*, which corresponds to the avirulent reference isolate G06-E107 was the most frequently found (54.2 %) (Fig. 2). The allele *AvrLm3.D* was found in 11.3 % of the *L. maculans* isolates characterized and displayed five non synonymous mutations compared to the reference allele *AvrLm3.A1* (Fig. 2). The isoform *AvrLm3.F*

grouped two alleles and represented 10.5 % of the isolates (Fig. 2). The rest of the alleles were found at low frequency (less than 5% of the isolates) (Fig. 2). Alleles *AvrLm3.A1* to *A8*, *AvrLm3.B* and *AvrLm3.C* were closely related according to Neighbor Joining analysis while all other alleles were more divergent and formed three separated clades grouping alleles *AvrLm3-D, E, F1* and *F2*; *AvrLm3-H, I1* and *I2, J1* to *J3* and *K* and *AvrLm3-G* (Fig.2).

RIPcal analyses revealed the absence of RIP mutations in the sequence of *AvrLm3* (Figure S2). Moreover, none of the alleles displayed mutations responsible for premature codon stop or likely responsible for major modification of the tri-dimensional structure of the protein (i.e mutations in cysteine residues which could impact disulfide bridging). These observations suggested that *AvrLm3* codes for a functional protein regardless of which allele is present.

The high level of polymorphism observed for *AvrLm3* suggested that this gene could have been submitted to positive selection. To evaluate this hypothesis we used the maximum likelihood codon-based model implemented in PAML (Yang, 2007) and the sitewise likelihood ratio (SLR) (Massingham & Goldman, 2005). The likelihood ratio test (LRT) between models M0 (Single rate) and M2 (positive selection), showed that *AvrLm3* has evolved under positive selection ($P=0.0169$). We then compared models M7 and M8 to identify positively selected sites in the *AvrLm3* protein. The LRT test between these two models confirmed the positive selection at the *AvrLm3* locus ($P=0.0184$). The Naïve Empirical Bayes (NEB) method identified all of the polymorphic amino acid identified in *AvrLm3* as positively selected with a posterior probability superior to 1 % (Table 4). However, only one amino acid, the I⁵⁸L/H was identified as positively selected using the Bayes Empirical Bayes (BEB) analysis (Table 4), which shows a higher stringency compared to the NEB method (Nielsen & Yang, 1998; Yang, 2007).

The SLR approach identified six amino acids that evolved under positive selection (Table 4). Intragenic recombination can be responsible for overinterpretation in positive selection tests.

We therefore inferred the evidence of intragenic recombination using the genetic algorithm for recombination detection (GARD) (Pond *et al.*, 2006) and no sign of intragenic recombination was identified at the *AvrLm3* locus.

Polymorphism of *AvrLm3* in isolates avirulent towards *Rlm3*

Eight polymorphic amino acids were identified in the *AvrLm3* protein in isolates avirulent towards *Rlm3* (Table 5), corresponding to six amino acids changes in the mature protein (S⁵¹N, I⁵⁸L, L⁷⁸F, I⁸⁵L, H¹⁰⁵Y and P¹³³T). The two polymorphic amino acids located in the signal peptide (Q⁹P and L¹¹F) have no predicted impact on the secretion signal integrity (Petersen *et al.*, 2011). The most common isoforms of *AvrLm3*, *AvrLm3-A* and *AvrLm3-D*, were present in 68.2 % and 24.5 % of the isolates avirulent towards *Rlm3*, respectively (Fig.2). The *AvrLm3-A* isoform was mostly found in European isolates, while the isoform *AvrLm3-D* was more specific to North American isolates and the isoform *AvrLm3-F* was mostly found in South American isolates (Table 5).

Polymorphism of *AvrLm3* in isolates virulent towards *Rlm3*

Two series of isolates showing a virulent phenotype towards *Rlm3* were distinguished: those displaying an avirulent *AvrLm4-7* allele, preventing the expression of the *AvrLm3* phenotype (a3A7 phenotype) and the “double virulent” isolates (a3a7 phenotype).

Six isoforms were found in a3A7 isolates, including three of the isoforms previously identified in A3a7 isolates. Similarly to what was observed for A3a7 isolates, the isoform *AvrLm3-A* was the most frequently found (58.4 %) and it was present in all sampled locations (Table 5). The isoform *AvrLm3-F* was also mainly found in South American isolates, along with the isoform *AvrLm3-G*, which was specific to a3A7 isolates (Table 5). Nevertheless, the presence of a functional allele of *AvrLm4-7* in the isolates harboring the

isoform AvrLm3-G, showing the two specific polymorphic sites F¹⁴⁹Y and V¹⁵⁰A did not allow us to assess the impact of these mutations in virulence towards *Rlm3*.

The “double virulent” isolates only represented 39 isolates in the collection. Interestingly, part of these isolates showed alleles grouped in the same clade “*AvrLm3-H-I-J-K*”, suggesting a common evolution of the ancestor allele (Fig. 2). The substitutions responsible for the amino acid change I⁵⁸H and G¹³¹R found in these isoforms were specific to isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7*, in which no copy of *AvrLm4-7* was identified. Thus, they are likely to be responsible for the virulent phenotype towards *Rlm3* (Table 5; Fig. 1). However, while isoforms AvrLm3-H and AvrLm3-I were specific to “double virulent” isolates, the isoform AvrLm3-J and AvrLm3-K were also found in three a3A7 isolates.

Nevertheless, the AvrLm3-H-I-J-K isoforms were only present in 43.6 % of the “double virulent” isolates. The 22 remaining isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7* displayed the very common isoform AvrLm3-A or the related isoform AvrLm3-C, only differing from AvrLm3-A by a S⁵¹N amino acid change. While sequence variation in the AvrLm3 protein could not explain the change of virulence phenotype, we observed that these 22 isolates were characterized by novel isoforms of AvrLm4-7, not previously identified by Daverdin *et al.* (2012) and showing non inactivating SNPs (i.e no premature stop codon) in the *AvrLm4-7* coding sequence (Fig.3). The five amino acid showing polymorphism in the AvrLm4-7 protein in “double virulent” isolates, Q³⁵H/K, P³⁹R, E⁴³K, Q¹²¹K and E¹²²K/G located at the external loops of the protein (Fig.4) (Blondeau *et al.*, 2015). All of these isoforms displayed the additional T⁸⁰I amino acid change, which was postulated to have no impact on virulence towards *Rlm7* (Parlange *et al.* 2009). These amino acid changes have no predicted impact on the tridimensional structure integrity of AvrLm4-7, suggesting that the protein is likely to still retain its effector function. We thus hypothesized that the mutations of *AvrLm4-7* displayed in

a3a7 isolates could allow escaping the *Rlm7*-mediated resistance while maintaining the suppression of the *Rlm3*-mediated resistance.

SNPs in the *AvrLm4-7* coding sequence allow to escape both *Rlm3* and *Rlm7*-mediated resistance

To investigate the hypothesis that amino acid changes in *AvrLm4-7* allow to escape *Rlm7*-mediated resistance while maintaining the suppression of the *AvrLm3* phenotype, we chose to evaluate the involvement of the Q³⁵H amino acid change, which was the most frequently found (36,4%, Table S1 and Fig. 3).

Site directed mutagenesis of *AvrLm4-7* alleles on reference isolates v23.2.1 (a4A7) and v23.1.3 (A4A7) allowed creating the v23.1.3.MD35 and v23.2.1.MD35 alleles, which carry the A¹⁰⁵→T¹⁰⁵ mutation, corresponding to a Q³⁵H change in the avirulence protein (Fig. 3 and 4, Table 6, Fig. S3). All the “double virulent” isolates characterized displayed the T⁸⁰I amino acid change, which was postulated to have no impact on virulence towards *Rlm7* (Parlange *et al.*, 2009). The presence of the T⁸⁰ amino acid in v23.2.1 allowed us to evaluate its potential impact on virulence along with the Q³⁵H amino acid change (Fig.S3) compared to the “native” a3a7 allele displayed by the a3a7 isolates (Fig.3, Table 6). Indeed, it is located close to the 35th residue in the tri-dimensional structure of *AvrLm4-7* (Fig.4 and S3) (Blondeau *et al.*, 2015).

These three constructs were introduced in the A3a7 isolate G06-E107, which displays an inactivated RIPPed allele of *AvrLm4-7* (premature stop codon) to assess the consequences of the three following amino acid combinations: H³⁵I⁸⁰R¹²⁰, H³⁵T⁸⁰R¹²⁰ and H³⁵I⁸⁰G¹²⁰ on the avirulence phenotypes *AvrLm3* and *AvrLm4-7* (Table 6). Ten transformants were recovered from each transformation assay and phenotyped on *Rlm3*, *Rlm4* and *Rlm7* lines of *B. napus* (Fig.5 and Fig.S4). In the transformants carrying the allele responsible for the amino acid

changes H³⁵T⁸⁰R¹²⁰ and H³⁵I⁸⁰G¹²⁰, the avirulence phenotype towards *Rlm7* was restored (Fig.5C and E), with concomitant loss of the *AvrLm3* phenotype (Fig.5D and F), as previously described (Plissonneau *et al.*, submitted). On the contrary, the transformants carrying the allele responsible for the amino acid changes H³⁵I⁸⁰R¹²⁰ showed a virulent phenotype towards both *Rlm3* and *Rlm7* (Figure 5.A and B).

These results suggest that the G¹²⁰R mutation, which is responsible for the breakdown of *Rlm4* also likely play a role in *Rlm7*-mediated recognition. Moreover, the T⁸⁰I amino acid change, which is displayed by isolates both avirulent and virulent towards *Rlm7*, is likely to be necessary for the “double virulent” phenotype, along with the Q³⁵H mutation.

AvrLm3 has a role in virulence towards *B. napus*

The absence of field isolates displaying a deletion of *AvrLm3* did not allow us to assess the role of *AvrLm3* in virulence using functional complementation. Therefore, we silenced *AvrLm3* by RNAi in isolates showing diverse phenotypic interaction towards *Rlm3*: the A3a7 isolate G06-E107, the a3A7 isolate v23.1.3 and the a3a7 isolate Nz-T4. Residual expression of *AvrLm3* in transformants was determined by comparing the level of expression of *AvrLm3* in silenced transformants with its level of expression in wild type isolate by qRT-PCR from RNA extracted from infected cotyledons of the compatible cv. Darmor at 7dpi (Fig. S5).

For each silencing assay, we selected three silenced transformants and a non or moderately silenced transformant used as positive control. Transformants were inoculated onto the two compatible *B. napus* cultivars cv. Darmor and cv. ES Astrid (i.e without *Rlm3*), along with the corresponding wild type isolate. Twelve days after inoculation, the cotyledons were scanned and the area of symptoms was measured (Fig. 6). In the isolate G06-E107, the silencing of *AvrLm3* had a significant effect on virulence. The transformant sil27, which showed the strongest level of silencing of *AvrLm3* (11.0 % of residual expression), caused symptoms

significantly smaller than the wild type isolate G06-E107 on both cultivars (p-value = 0.0083 and p-value = 0.0003 respectively, Tukey HSD test). The transformant sil20, which displayed 13.9% of *AvrLm3* residual expression showed significantly smaller symptoms on ES Astrid (p-value = 10^{-7}), but not on Darmor (p-value = 0.0892). The transformant sil34 (21 % of *AvrLm3* residual expression) showed no difference compared to the wild type isolate, similarly to the moderately silenced transformant sil33 (45.4% of *AvrLm3* residual expression), used as a control. The relationship between the level of expression of *AvrLm3* and the virulence of the A3a7 isolate G06-E107 is strongly correlated ($R^2 = 0.9459$ for cv. Darmor and $R^2 = 0.9006$ in cv. ES Astrid) following a logarithmic regression model (Figure S5.A).

The silencing of *AvrLm3* in isolates Nz-T4 and v23.3.1 had no significant impact on virulence on either of the cultivars Darmor and ES Astrid. However, the area of symptoms caused by the wild type isolates Nz-T4 and v23.3.1 were significantly smaller than these caused by the wild type isolate G06-E107 on both susceptible cultivars (p-value = 0.0089 for Nz-T4 and p-value = 0.0157 for v23.1.3 on ES Astrid and p-value = 0.0701 for Nz-T4 and p-value = 0.0260 for v23.3.1 on Darmor, respectively).

Discussion

The recent cloning of *AvrLm3* enabled the evaluation of its diversity in *L. maculans* populations and its impact on fungal fitness. *AvrLm3* is involved in an unusual relationship with *AvrLm4-7*: the *Rlm3*-mediated resistance is hidden when an isolate possesses a functional allele of *AvrLm4-7*. Because of the predominance of *AvrLm4-7* in *L. maculans* European populations (more than 99%), *AvrLm3* was previously considered to be absent (Balesdent *et al.*, 2006; Stachowiak *et al.*, 2006). However, preliminary analyses suggested

that *AvrLm3* could be present in most of *L. maculans* French isolates (Plissonneau *et al.*, submitted).

In this study, the evaluation of the frequency of the avirulence genes *AvrLm3* and *AvrLm4-7* in field isolates sampled in 2012 and 2013 from susceptible cultivars in Grignon (France) confirmed the large presence of *AvrLm3* in *L. maculans* populations, with more than 99% of the isolates virulent towards *Rlm7* being avirulent towards *Rlm3*. It also showed the ongoing breakdown of the *Rlm7* resistance, with about 10 % of virulent isolates. In that context, the deployment of cultivars harboring the *Rlm3* resistance gene alternating with those harboring *Rlm7* at the landscape scale, or the pyramiding of both resistance genes in commercial varieties appears to be an opportunity to increase the durability of major resistance genes in *B. napus*, mainly if we can identify an important role of at least one of the two genes in fungal fitness.

However, these observations also question the durability of the *Rlm3*-mediated resistance and the capacity of *L. maculans* to rapidly circumvent this resistance. Our first question was about the presence of the avirulence phenotype towards *Rlm3* in *L. maculans* populations in a context of continuously growing of *Rlm3* cultivars since early 1990's (X. Pinochet and M.H Balesdent, personal communication). We assessed the presence of *AvrLm3* in a selection of isolates displaying virulent or avirulent phenotype towards *Rlm3* and *Rlm7*. A copy of *AvrLm3* was present in all of the 592 isolates tested, regardless of the phenotype displayed. *AvrLm3* was then sequenced in a selection of 238 isolates to assess its diversity in avirulent isolates but also to identify which molecular mechanisms are responsible for virulence towards *Rlm3* in isolates displaying an inactivated allele of *AvrLm4-7* (i.e “double virulent” isolates). RIPcal analysis revealed the absence of RIP mutations as one of the molecular mechanism responsible for virulence towards *Rlm3*. The absence of deletion and RIP or other

inactivating mutations (i.e premature stop codon or disruption of disulfide bridging) in isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7* contrasts strongly with the molecular mechanisms responsible for virulence found in the other avirulence genes of *L. maculans*. The deletion of a 260 kb region containing the avirulence gene *AvrLm1* has been reported as the most frequent event leading to virulence towards *Rlm1* (Gout *et al.*, 2007; Van de Wouw *et al.*, 2010). Deletions also occur in the case of virulence towards *Rm6* and *Rlm7*, along with the appearance of premature codon stop due to mutations caused by the RIP mechanism (Fudal *et al.*, 2009; Van de Wouw *et al.*, 2010; Daverdin *et al.*, 2012). No amino acid change concerned cysteine residues in *AvrLm3*, while it was previously observed in *AvrLm4-7* (Daverdin *et al.*, 2012), but also in the fungus *Cladosporium fulvum*, in which several mutations in the avirulence gene *Avr4*, causing the loss of cysteine residue and subsequently disruption of disulfide bridges have been reported to be responsible for the virulence towards *Cf-4* in tomato (van den Burg *et al.*, 2003; Iida *et al.*, 2015). Moreover, none of the mutations identified in *AvrLm3* resulted from RIPed induced mutations, suggesting that *AvrLm3* always code for a functional protein and therefore that its effector function could be maintained.

We identified 22 alleles for the coding sequence of *AvrLm3*, corresponding to 11 isoforms of the protein and fourteen amino acids were polymorphic within the protein sequence. This level of polymorphism is quite rare in *L. maculans* avirulence genes (Van de Wouw *et al.*, 2010). However, 14 of the 22 alleles identified were found at very low frequency (less than 2%). Six amino acids are likely to be the result of positive selection ($S^{51}N$, $I^{58}L/H$, $L^{78}F$, $G^{131}R$, $P^{133}T$ and $F^{133}Y$), considering the results inferred with the software SLR, though PAML analysis indicated that only the $I^{58}L/H$ site have evolved under positive selection. Effectors from many species have been described to have evolved under positive selection (Stukenbrock & McDonald, 2009; Aguilera *et al.*, 2009; Stergiopoulos *et al.*, 2014), and evidence for positive selection is now considered as a criteria to identify candidate effector

genes (Chen *et al.*, 2013; Sperschneider *et al.*, 2014), even though a low level of diversity is usually displayed by *L. maculans* avirulence genes. However, positive selection has often been described to act concomitantly with intragenic recombination to increase effector diversification (Stukenbrock & McDonald, 2009; Stergiopoulos *et al.*, 2014). In *AvrLm3*, no evidence of intragenic recombination has been found. This might be linked with its location in an AT-rich isochores, in which the frequency of recombination is significantly lower than that of in GC-rich isochores (Rouxel *et al.*, 2011). The high level of polymorphism identified at *AvrLm3* locus led us to postulate that the common presence of *AvrLm4-7* could protect *AvrLm3* from the selection pressure exerted by *B. napus*.

The sequencing of *AvrLm3* in isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7* revealed the presence of two distinct evolutionary mechanisms leading to virulence (Fig. 7). In the isolates in which *AvrLm4-7* was deleted or inactivated by the RIP mechanism, the virulence towards *Rlm3* is likely to result from two amino acid changes: I⁵⁸H and G¹³¹R. These two sites are those with the strongest *p*-value in test for sites under positive selection inferred with the SLR package (<0.001). In the case of absence of *AvrLm4-7* the suppression of the *AvrLm3* phenotype is no longer effective and selection pressure can act on the *AvrLm3* locus. It results in a “classical” arms race between *Rlm3* and *AvrLm3*, the mechanism allowing virulence towards *Rlm3* being amino acid change in the avirulence protein. That mechanism of virulence has been described in several pathogen species. For an example, in *Melampsora lini*, the avirulence gene *AvrL567* escape *L5*, *L6* and *L7*-mediated recognition through amino acid changes (Dodds *et al.*, 2006). In *L. maculans*, *AvrLm2* and *AvrLm4* circumvent the *Rlm2* and *Rlm4*-mediated resistance by point mutations (Parlange *et al.*, 2009; Ghanbarnia *et al.*, 2014).

Surprisingly, in 22 of the 39 isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7*, the allele of *AvrLm3* was similar to that found in avirulent isolates. In these isolates, the “double virulent” phenotype resulted from amino acid changes in the AvrLm4-7 protein, allowing to escape *Rlm7*-mediated recognition while the suppression of the AvrLm3 phenotype remains effective (Fig. 7). The role of *AvrLm4-7* in fungal fitness has been previously demonstrated (Huang *et al.*, 2010; Thomas Mongin, personal communication) and the presence of *AvrLm3* in all isolates analyzed in this study suggest also an important role of *AvrLm3* in fungal fitness. This original mechanism evolved by *L. maculans* to escape simultaneously the recognition by two resistance genes of *B. napus* is likely to maintain at least partially the effector function of AvrLm3 and AvrLm4-7 and then their intrinsic role in fungal fitness. The silencing of *AvrLm3* in the A3a7 isolates G06-E107 revealed a significantly lower virulence of silenced isolates on compatible cultivars as compared with the wild type isolate. This result is also consistent with the general presence of *AvrLm3* in *L. maculans* populations and the unusual mechanism that *L. maculans* evolved to hide the presence of avirulent alleles of *AvrLm3* in populations. In *Fusarium oxysporum*, a similar relationship has been described between the avirulence genes *Avr1*, *Avr2* and *Avr3*. The presence of *Avr1* is responsible for the suppression of *I2* and *I3*-mediated resistance (Houterman *et al.*, 2008). The presence of *Avr2* and *Avr3* is required for full virulence on susceptible cultivars and in fungal populations, only amino acid changes in *Avr2* have been identified in isolates virulent towards both *I1* and *I2* (Rep *et al.*, 2005; Houterman *et al.*, 2009). Therefore, although only two example of suppression of Effector-Triggered-Immunity by a fungal effector have been demonstrated, it could be more common than previously postulated in the arms race between plant and pathogenic fungi and may allow non dispensable effectors to evade the selection pressure exerted by resistance genes in the field.

AvrLm3 has characteristics similar to that of the other avirulence genes of *L. maculans* : it codes for a small secreted and cystein rich protein, has no homologies with genes of other fungal species and is specifically expressed at early infection stages. However, in the case of the majority of either *L. maculans* avirulence genes, the selection pressure exerted by corresponding resistance genes leads to the loss or the inactivation of the gene in fungal populations. The important role of *AvrLm3* in fungal fitness could have favored the evolution of a complex mechanism allowing it to escape selection pressure while preserving its integrity. However, the capacity of *L. maculans* to overcome both *Rlm3* and *Rlm7* resistance through a limited number of SNP in the coding region of *AvrLm4-7* must be taken into consideration for the deployment of these resistance genes in fields. Indeed, the pyramiding of resistance genes in cultivars is generally considered to increase the durability of these resistance (Mundt, 2014). In the context of the complex relationship between *AvrLm3* and *AvrLm4-7* phenotype, the pyramiding of *Rlm3* and *Rlm7* in cultivars could lead to increase the frequency of these “double virulent” isolates and then reduce the duration of the efficiency of these cultivars.

Experimental procedure

L. maculans isolates

Field populations of *L. maculans* used in this study have been isolated from plants of *B. napus* submitted to natural or reinforced inoculum as follow and are described in Table S1. The isolates described in Daverdin *et al.* (2012) were sampled in 2006-2008 in an experimental field in which *Rlm7* cultivars were grown without crop rotation and in which stem residues were maintained in the field to artificially increase the *Rlm7* selection pressure. A representative selection of the worldwide collection of *L. maculans* isolates described in Dilmaghani *et al.* (2009) and several reference isolates (Balesdent *et al.*, 2005) were also analyzed to evaluate the diversity of the *AvrLm3* locus.

To evaluate the current frequency of the avirulence genes *AvrLm3* and *AvrLm4-7* of *L. maculans* in French populations, isolates have been sampled from susceptible commercial cultivars (Drakkar, Falcon, Pamela and Attletick) in 2012, 2013 and 2014 and from several locations. Additional isolates have been sampled from cultivars carrying the resistance genes *Rlm4* (Adriana), *Rlm7* (Dk Excellium) or both *Rlm3* and *Rlm7* (Dk Explicit and Dk Exstorm) to assess the molecular events leading to virulence towards *Rlm3* and *Rlm7*. These isolates were sampled from leaf lesions or stem residues (Supplementary Method 1). To increase the number of isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7*, ascospores from stem residues were ejected on plantlets harboring *Rlm3* and *Rlm7* (Supplementary method 1). Due to the scarcity of “double virulent” isolates in *L. maculans* population, we also characterized 11 additional isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7* sampled in 2104 on *Rlm7* hybrids from France, in a region with intense use of *Rlm7* and *Rlm3+Rlm7* cultivars, which have been provided by CETIOM.

Isolates were maintained on V8-agar plates and conidia were produced as described by Ansan-Melayah *et al.* (1995).

Inoculation tests

Isolates were phenotyped for their virulence towards *Rlm3*, *Rlm4* and *Rlm7* using a cotyledon-inoculation test as described by Balesdent *et al.* (2002). Ten days old cotyledons were inoculated with a droplet of 10 μ L of conidia suspensions adjusted at 10^7 spores/mL. Ten to twelve plants of *B. napus* lines 03.22.3.1 (*Rlm3*), 02.23.3.1 (*Rlm7*), Pixel (*Rlm4*) or Westar (no *Rlm* gene) were inoculated. Symptoms were assessed at 14 dpi using a semi-quantitative 1 to 6 scale (Balesdent *et al.*, 2005), with score from 1 to 3 and from 4 to 6 corresponding to avirulent and virulent phenotypes, respectively.

DNA extraction and sequencing

Genomic DNA was extracted from conidia using the DNeasy 96 Plant Kit and the QIAGEN BioRobot 3000 or DNeasy Plant Mini Kit according to manufacturer's recommendations. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed in an Eppendorf Mastercycler EP Gradient thermocycler (Eppendorf, Le Pecq, France), as previously described (Fudal *et al.*, 2007). Methods for gel electrophoresis of PCR products have been reported. Amplification of *AvrLm3* and *AvrLm4-7* regions by PCR were performed using the primers described in Table S2. The amplification of the mating type region was used as a positive control for PCR experiments. Sequencing was done by Eurofins Genomics (Eurofins, Ebersberg, Germany).

RNA extraction and qRT-PCR analysis

Total RNA was extracted from 7 dpi infected cotyledons of the compatible *B. napus* cv. Darmor using the TRIzol® Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to manufacturer's protocol. Total RNA was treated with DNase I RNase-Free (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). All samples were adjusted to 3 µg of RNA and single-strand cDNA was generated using oligo-dT primed reverse transcription with PrimerScript Reverse Transcriptase (Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A.) according to the manufacturer's protocol.

Quantitative RT-PCR was performed using a 7700 real-time PCR equipment (AppliedBiosystems, Foster City, CA, U.S.A.) and ABsolute SYBR Green ROX dUTP Mix (ABgene, Courtaboeuf, France) as described by Fudal *et al.* (2007). For each value measured, three technical replicates from two biological replicates were performed. Water and uninfected cotyledons were used as negative controls. The primers used for qPCR assays are described in Table S2. Samples were analysed from a 10-fold dilution of the original RT products as described by Fudal *et al.* (2007). The fluorescence threshold (Ct) value was determined at 0.1 of fluorescence intensity. In silencing assays, the residual expression of *AvrLm3* and *AvrLm4-7*, compared to the wild type isolate, Ct values were analyzed according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001).

Actin was used as a constitutive reference gene and EF1- α relative expression to Actin was used as a supplementary control, to verify that there is no variation in the level of expression of Actin between conditions and between biological replicates.

Sequence analysis

Sequences were analyzed using CLC Workbench v7.5.1 (Qiagen, Venlo, Netherlands) and compared using CLUSTAL Omega (Sievers *et al.*, 2011) or Multalin (Corpet, 1988). Research for Repeat Induced Point Mutations (RIP) signatures on *AvrLm4-7* and *AvrLm3* alleles was achieved using the software RIPcal (Hane & Oliver, 2008). Tests for evidence of positive selection on the *AvrLm3* coding sequence was computed using the softwares PAML4 (Yang, 2007) and SLR (Massingham & Goldman, 2005). The search of breakpoints resulting from intragenic recombination was inferred using the genetic algorithm for recombination detection (GARD) (Pond *et al.*, 2006), from the webserver Datamonkey (Datamonkey.org).

Fungal transformation assays

L. maculans transformation was performed using *Agrobacterium tumefaciens* (Gout *et al.*, 2006). Fungal transformants were selected on 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nourseothricin (WERNER BioAgents, Jena, Germany).

The PCR-mediated site-directed mutagenesis experiment was performed using the method described by Parlange *et al.* (2009). The three vectors pPZPnat1-v23.1.2.MD35, pPZPnat1-v23.3.1.MD35 and pPZPnat1-G12-365 were constructed using the primers described in Table S1. The vectors differ for the allele of *AvrLm4-7* they carry, which confer different amino acid sequence in the *AvrLm4-7* protein (Figure S4). For the silencing of *AvrLm3*, we use the vector pPZPnat1-sil*AvrLm3* described in Plissonneau *et al.* (submitted). All plasmids were introduced into *A. tumefaciens* C58-pGV2260 by electroporation at 2.5 kV, 200 Ohms and 25 μF .

Virulence assay

To test the impact of the silencing of *AvrLm3* on the aggressivity of *L. maculans* towards compatible cultivars, we selected three silenced isolates and a non-silenced one as a positive control. The transformants and the wild type isolates were inoculated on 10 to twelve cotyledons of cv. Darmor and ES Astrid and cotyledons were scanned at 12 dpi. For each isolate, three technical replicates and two biological replicates were performed. Symptoms area was assessed using the software Dplan and mean areas were compared using an HSD Tukey test.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the software R (Cran, v3.2.0), using the package agricolae.

Acknowledgments

The authors want to thank Laurent Coudard (INRA BIOGER) for its major contribution to management of isolate collection and Bertrand Auclair (INRA BIOGER) for plant management. This work was funded by the CTPS project “ICOSCOP”, the INRA-SmaCh metaprogram “K-masstec” and a grant from the Santé des Plantes et Environnement (SPE) INRA department. CP was funded by a young scientist grant (Contrat Jeune Scientifique) from INRA.

References

- Aguileta G, Refrégier G, Yockteng R, Fournier E, Giraud T. 2009.** Rapidly evolving genes in pathogens: methods for detecting positive selection and examples among fungi, bacteria, viruses and protists. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* **9**: 656–670.
- Ansan-Melayah D, Balesdent M-H, Buée M, Rouxel T. 1995.** Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **85**: 1525.
- Balesdent M-H, Attard A, Kühn ML, Rouxel T. 2002.** New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **92**: 1122–1133.
- Balesdent M-H, Barbetti M, Li H, Sivasithamparam K, Gout L, Rouxel T. 2005.** Analysis of *Leptosphaeria maculans* race structure in a worldwide collection of isolates. *Phytopathology* **95**: 1061–1071.
- Balesdent M-H, Fudal I, Ollivier B, Bally P, Grandaubert J, Eber F, Chèvre A-M, Leflon M, Rouxel T. 2013.** The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytologist* **198**: 887–898.
- Balesdent M-H, Louvard K, Pinochet X, Rouxel T. 2006.** A large-scale survey of races of *Leptosphaeria maculans* occurring on oilseed rape in France. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 53–65.
- Balesdent M-H, Plissonneau C, Coudard L, Daverdin G, Le Meur L, Carpezat J, Leflon M, Pinochet X, Ermel M, Brun H, et al. 2015.** Résistance du colza au phoma : où en est l'efficacité de *Rlm7*? *Phytoma* **684**: 20–24.
- Blondeau K, Blaise F, Graille M, Kale SD, Linglin J, Ollivier B, Labarde A, Lazar N, Daverdin G, Balesdent M-H, et al. 2015.** Crystal structure of the effector AvrLm4-7 of

Leptosphaeria maculans reveals insights into its translocation into plant cell and recognition by resistance proteins. *The Plant Journal*.

Brun H, Chèvre A-M, Fitt BD, Powers S, Besnard A-L, Ermel M, Huteau V, Marquer B, Eber F, Renard M, et al. 2010. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* **185**: 285–299.

Van den Burg HA, Westerink N, Francoijs K-J, Roth R, Woestenenk E, Boeren S, Wit PJGM de, Joosten MHAJ, Vervoort J. 2003. Natural disulfide bond-disrupted mutants of *AVR4* of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent *Cf-4*-mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 27340–27346.

Chen C, Lian B, Hu J, Zhai H, Wang X, Venu RC, Liu E, Wang Z, Chen M, Wang B, et al. 2013. Genome comparison of two *Magnaporthe oryzae* field isolates reveals genome variations and potential virulence effectors. *BMC Genomics* **14**: 887.

Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**: 10881–10890.

Daverdin G, Rouxel T, Gout L, Aubertot J-N, Fudal I, Meyer M, Parlange F, Carpezat J, Balesdent M-H. 2012. Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *Plos Pathogens* **8**: e1003020.

Delourme R, Chèvre A-M, Brun H, Rouxel T, Balesdent M-H, Dias J, Salisbury P, Renard M, Rimmer SR. 2006. Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 41–52.

Dilmaghani A, Balesdent MH, Didier JP, Wu C, Davey J, Barbetti MJ, Li H, Moreno-Rico O, Phillips D, Despeghel JP, et al. 2009. The *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathology* **58**: 1044–1058.

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

Fitt BDL, Brun H, Barbetti MJ, Rimmer SR. 2006. World-Wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 3–15.

Flor HH. 1955. Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology* **45**: 680–685.

Fudal I, Ross S, Brun H, Besnard A-L, Ermel M, Kuhn M-L, Balesdent M-H, Rouxel T. 2009. Repeat-Induced Point mutation (RIP) as an alternative mechanism of evolution toward virulence in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 932–941.

Fudal I, Ross S, Gout L, Blaise F, Kuhn ML, Eckert MR, Cattolico L, Bernard-Samain S, Balesdent MH, Rouxel T. 2007. Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: Map-based cloning of *AvrLm6*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 459–470.

Galagan JE, Selker EU. 2004. RIP: the evolutionary cost of genome defense. *Trends in Genetics* **20**: 417–423.

- Ghanbarnia K, Fudal I, Larkan NJ, Links MG, Balesdent M-H, Profotova B, Fernando WGD, Rouxel T, Borhan MH. 2014.** Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm2*, using an intraspecific comparative genomics approach. *Molecular Plant Pathology*.
- Gout L, Fudal I, Kuhn M-L, Blaise F, Eckert M, Cattolico L, Balesdent M-H, Rouxel T. 2006.** Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Microbiology* **60**: 67–80.
- Gout L, Kuhn ML, Vincenot L, Bernard-Samain S, Cattolico L, Barbetti M, Moreno-Rico O, Balesdent M-H, Rouxel T. 2007.** Genome structure impacts molecular evolution at the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environmental Microbiology* **9**: 2978–2992.
- Hane JK, Oliver RP. 2008.** RIPCAL: a tool for alignment-based analysis of repeat-induced point mutations in fungal genomic sequences. *BMC Bioinformatics* **9**: 478.
- Houterman PM, Cornelissen BJC, Rep M. 2008.** Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *Plos Pathogens* **4**: e1000061.
- Houterman PM, Ma L, Van Ooijen G, De Vroomen MJ, Cornelissen BJC, Takken FLW, Rep M. 2009.** The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *The Plant Journal* **58**: 970–978.
- Huang Y-J, Balesdent M-H, Li Z-Q, Evans N, Rouxel T, Fitt BDL. 2010.** Fitness cost of virulence differs between the *AvrLm1* and *AvrLm4* loci in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology* **126**: 279–291.

Iida Y, van 't Hof P, Beenen H, Mesarich C, Kubota M, Stergiopoulos I, Mehrabi R, Notsu A, Fujiwara K, Bahkali A, et al. 2015. Novel mutations detected in avirulence genes overcoming tomato *Cf* resistance genes in isolates of a Japanese population of *Cladosporium fulvum*. *PLoS ONE* **10**: e0123271.

Irelan JT, Hagemann AT, Selker EU. 1994. High frequency repeat-induced point mutation (RIP) is not associated with efficient recombination in *Neurospora*. *Genetics* **138**: 1093–1103.

Larkan NJ, Lydiate DJ, Yu F, Rimmer SR, Borhan MH. 2014. Co-localisation of the blackleg resistance genes *Rlm2* and *LepR3* on *Brassica napus* chromosome A10. *BMC Plant Biology* **14**: 387.

Larkan NJ, Ma L, Borhan MH. 2015. The *Brassica napus* receptor-like protein RLM2 is encoded by a second allele of the *LepR3/Rlm2* blackleg resistance locus. *Plant Biotechnology Journal*: 1–10.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)* **25**: 402–408.

Massingham T, Goldman N. 2005. Detecting amino acid sites under positive selection and purifying selection. *Genetics* **169**: 1753–1762.

Mundt CC. 2014. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution* **27**: 446–455.

Nielsen R, Yang Z. 1998. Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. *Genetics* **148**: 929–936.

Parlange F, Daverdin G, Fudal I, Kuhn M-L, Balesdent M-H, Blaise F, Grezes-Besset B, Rouxel T. 2009. *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual

recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents *Rlm4*-mediated recognition through a single amino acid change. *Molecular Microbiology* **71**: 851–863.

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* **8**: 785–786.

Pond SLK, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH, Frost SDW. 2006. GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* **22**: 3096–3098.

Lo Presti L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, Kahmann R. 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* **66**: 513–545.

Rep M, Meijer M, Houterman PM, van der Does HC, Cornelissen BJC. 2005. *Fusarium oxysporum* evades *I-3*-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 15–23.

Rouxel T, Grandaubert J, Hane JK, Hoede C, van de Wouw AP, Couloux A, Dominguez V, Anthouard V, Bally P, Bourras S, et al. 2011. Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nature Communications* **2**.

Rouxel T, Penaud A, Pinochet X, Brun H, Gout L, Delourme R, Schmit J, Balesdent M-H. 2003. A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 871–881.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, et al. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* **7**: 539.

Sperschneider J, Ying H, Dodds PN, Gardiner DM, Upadhyaya NM, Singh KB, Manners JM, Taylor JM. 2014. Diversifying selection in the wheat stem rust fungus acts predominantly on pathogen-associated gene families and reveals candidate effectors. *Frontiers in Plant Science* **5**.

Sprague SJ, Balesdent M-H, Brun H, Hayden HL, Marcroft SJ, Pinochet X, Rouxel T, Howlett BJ. 2006. Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 33–40.

Stachowiak A, Olechnowicz J, Jedryczka M, Rouxel T, Balesdent M-H, Happstadus I, Gladders P, Latunde-Dada A, Evans N. 2006. Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 67–75.

Stergiopoulos I, Cordovez V, Ökmen B, Beenen HG, Kema GHJ, de Wit PJGM. 2014. Positive selection and intragenic recombination contribute to high allelic diversity in effector genes of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of the black leaf streak disease of banana. *Molecular Plant Pathology* **15**: 447–460.

Stukenbrock EH, McDonald BA. 2009. Population genetics of fungal and oomycete effectors involved in gene-for-gene interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 371–380.

West JS, Fitt BDL. 2005. Population dynamics and dispersal of *Leptosphaeria maculans* (blackleg of canola). *Australasian Plant Pathology* **34**: 457–461.

Van de Wouw AP, Cozijnsen AJ, Hane JK, Brunner PC, McDonald BA, Oliver RP, Howlett BJ. 2010. Evolution of linked avirulence effectors in *Leptosphaeria maculans* is affected by genomic environment and exposure to resistance genes in host plants. *PLoS Pathogens* **6**: e1001180.

Van de Wouw AP, Lowe RGT, Elliott CE, Dubois DJ, Howlett BJ. 2014. An avirulence gene, *AvrLmJ1*, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Molecular Plant Pathology* **15**: 523–530.

Yang Z. 2007. PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1586–1591.

Table 1 : Repartition of avirulence towards *Rlm3* or *Rlm7* in collections of *Leptosphaeria maculans*

Nb of isolates ^a	a3A7 ^b	A3a7 ^b	a3a7 ^b	Reference ^c
909	578 (63.6%)	321 (35.3%)	10 (1.1%)	Dilmaghani <i>et al.</i> 2009
1514	707 (46.6%)	785 (51.8%)	5 (0.9%)	Daverdin <i>et al.</i> 2012
603	600 (99.5%)	0 (0%)	3 (0.5%)	Stachowiak <i>et al.</i> 2006
1797	1796 (99.95%)	1 (0.05%)	0 (0%)	Balesdent <i>et al.</i> 2006
164	148 (90.2%)	16 (9.8%)	0 (0%)	Grignon 2012 (This Study)
209	186 (89%)	22 (10.5%)	1 (0.5%)	Grignon 2013 (This Study)

^aNumber of isolates described in each collection.

^bAi = Avirulent phenotype towards the corresponding *Rlmi* resistance; ai = Virulent phenotype towards the corresponding *Rlmi* resistance.

^c Study from which originated the isolates; for isolates sampled in this study, the occurrence of avirulence genes in *L. maculans* populations was estimated from the phenotype of the isolates sampled on susceptible cultivars; detailed information about isolates are provided in Table S1.

Table 2 : Presence of the avirulence genes *AvrLm3* and *AvrLm4-7* in a selection of *Leptosphaeria maculans* isolates evaluated by PCR amplification of the genes.

Phenotype ^a	Nb of isolates	<i>AvrLm3</i>		<i>AvrLm4-7</i>	
		Presence	Absence ^b	Presence	Absence ^b
a3A7	155	155	0	155	0
A3a7	396	396	0	156	240
a3a7	41	41	0	24	17
Total	592	592	0	335	257

^aAi = Avirulent phenotype towards the corresponding *Rlmi* resistance; ai = Virulent phenotype towards the corresponding *Rlmi* resistance.

^bLack of PCR amplification

Table 3 : Geographic origin and phenotype of isolates in which *AvrLm3* was sequenced.

Phenotype ^a	Nb of isolates	Origin				
		E ^b	NA ^b	SA ^b	A ^b	I ^b
a3A7	89	11	18	36	22	2
A3a7	110	75	29	3	3	0
a3a7	39	32	0	0	6	1
Total	238	118	47	39	31	3

^aAi = Avirulent phenotype towards the corresponding *Rlmi* resistance; ai = Virulent phenotype towards the corresponding *Rlmi* resistance.

^b E = Europe; NA = North America; SA = South America; A = Australia; I = *In vitro* cross progeny

```

      10      20      30      40      50      60      70
AvrLm-A  1 MLKPTKV I Q I L F L L F T A F F A R T C A L E C H A V A F S S D H Q F S L G R N E D C N L Y C S K N S M L S I F S R V L P L D D P C Q G D D G F S S L T A 80
AvrLm-B  1 MLKPTKV I Q I F L L F T A F F A R T C A L E C H A V A F S S D H Q F S L G R N E D C N L Y C S K N S M L S I F S R V L P L D D P C Q G D D G F S S L T A 80
AvrLm-C  1 MLKPTKV I Q I L F L L F T A F F A R T C A L E C H A V A F S S D H Q F S L G R N E D C N L Y C N K N S M L S I F S R V L P L D D P C Q G D D G F S S L T A 80
AvrLm-D  1 MLKPTKV I Q I L F L L F T A F F A R T C A L E C H A V A F S S D H Q F S L G R N E D C N L Y C N K N S M L S I F S R V L P L D D P C Q G D D G F S S L T A 80
AvrLm-E  1 MLKPTKV I P I L F L L F T A F F A R T C A L E C H A V A F S S D H Q F S L G R N E D C N L Y C N K N S M L S I F S R V L P L D D P C Q G D D G F S S L T A 80
AvrLm-F  1 MLKPTKV I Q I L F L L F T A F F A R T C A L E C H A V A F S S D H Q F S L G R N E D C N L Y C N K N S M L S L F S R V L P L D D P C Q G D D G F S S L T A 80
AvrLm-G  1 MLKPTKV I Q I L F L L F T A F F A R T C A L E C H A V A F S S D H Q F S L G R N E D C N L Y C S K N S M L S I F S R V L P L D D P C Q G D D G F S S L T A 80
AvrLm-H  1 MLKPTKV I Q I L F L L F T A F F A R T C A L E C H A V A F S S D H Q F S L G R N E D C N L Y C N K N S M L S H F S R V L P L D D P C Q G D D G F S S L T A 80
AvrLm-I  1 MLKPTKV I Q I L F L L F T A F F A R T C A L E C H A V A F S S D H Q F S L G R N E D C N L Y C N K N S M L S H F S R V L P L D D P C Q G D D G F S S L T A 80
AvrLm-J  1 MLKPTKV I Q I L F L L F T A F F A R T C A L E C H A V A F S S D H Q F S L G R N E D C N L Y C N K N S M L S H F S R V L P L D D P C Q G D D G F S S L T A 80
AvrLm-K  1 MLKPTKV I Q I L F L L F T A F F A R T C A L E C H A V A F S S D H Q F S L G R N E D C N L Y C N K N S M L S H F S R V L P L D D P C Q G D D G F S S L T A 80

      90      100      110      120      130      140      150
AvrLm-A  81 T I D Q I S C D T G C Q C R C S V H A T A W R V H K S G K R Y S R R T G W V S C N L E D Y V A R I T G R P F I P V N G A L H E Y F S R G F V S K D E V H C D H Q 160
AvrLm-B  81 T I D Q I S C D T G C Q C R C S V H A T A W R V H K S G K R Y S R R T G W V S C N L E D Y V A R I T G R P F I P V N G A L H E Y F S R G F V S K D E V H C D H Q 160
AvrLm-C  81 T I D Q I S C D T G C Q C R C S V H A T A W R V H K S G K R Y S R R T G W V S C N L E D Y V A R I T G R P F I P V N G A L H E Y F S R G F V S K D E V H C D H Q 160
AvrLm-D  81 T I D Q L S C D T G C Q C R C S V H A T A W R V Y K S G K R Y S R R T G W V S C N L E D Y V A R I T G R T F I P V N G A L H E Y F S R G F V S K D E V H C D H Q 160
AvrLm-E  81 T I D Q L S C D T G C Q C R C S V H A T A W R V Y K S G K R Y S R R T G W V S C N L E D Y V A R I T G R T F I P V N G A L H E Y F S R G F V S K D E V H C D H Q 160
AvrLm-F  81 T I D Q L S C D T G C Q C R C S V H A T A W R V Y K S G K R Y S R R T G W V S C N L E D Y V A R I T G R T F I P V N G A L H E Y F S R G F V S K D E V H C D H Q 160
AvrLm-G  81 T I D Q I S C D T E C Q C R C S V H A T A W R V Y K S G K R Y S R R T G W V S C N L E D Y V A R I T G R T F I P V N G A L H E Y F S R G Y A S K D E V H C D H Q 160
AvrLm-H  81 T I D Q I S C D T G C Q C R C S V H A T A W R V Y K S G K R Y S R R T G W V S C N L E D Y V A R I T R R T F I P V N G A L H E Y F S R G F V S K D E V H C D H Q 160
AvrLm-I  81 T I D Q I S C D T G C Q C R C S V H A T A W R V Y K S G K R Y S R R T G W V S C N L E D Y V A R I T R R P Y I P V N G A L H E Y F S R G F V S K D E V H C D H Q 160
AvrLm-J  81 T I D Q I S C D T G C Q C R C S V H A T A W R V Y K S G K R Y S R R T G W V S C N L E D Y V A R I T R R T Y I P V N G A L H E Y F S R G F V S K D E V H C D H Q 160
AvrLm-K  81 T I D Q I S C D T G C Q C R C S V H A T A W R V Y K S G K R Y S R R T G W V S C N L E D Y V A R I T R R T Y I P V N G A L H E Y F S R G F V S K D E V H C D H Q 160

```

Figure 1: Isoforms of the avirulence protein AvrLm3. Polymorphic amino acids as compared to the reference avirulent isoform AvrLm3-A are marked in red.

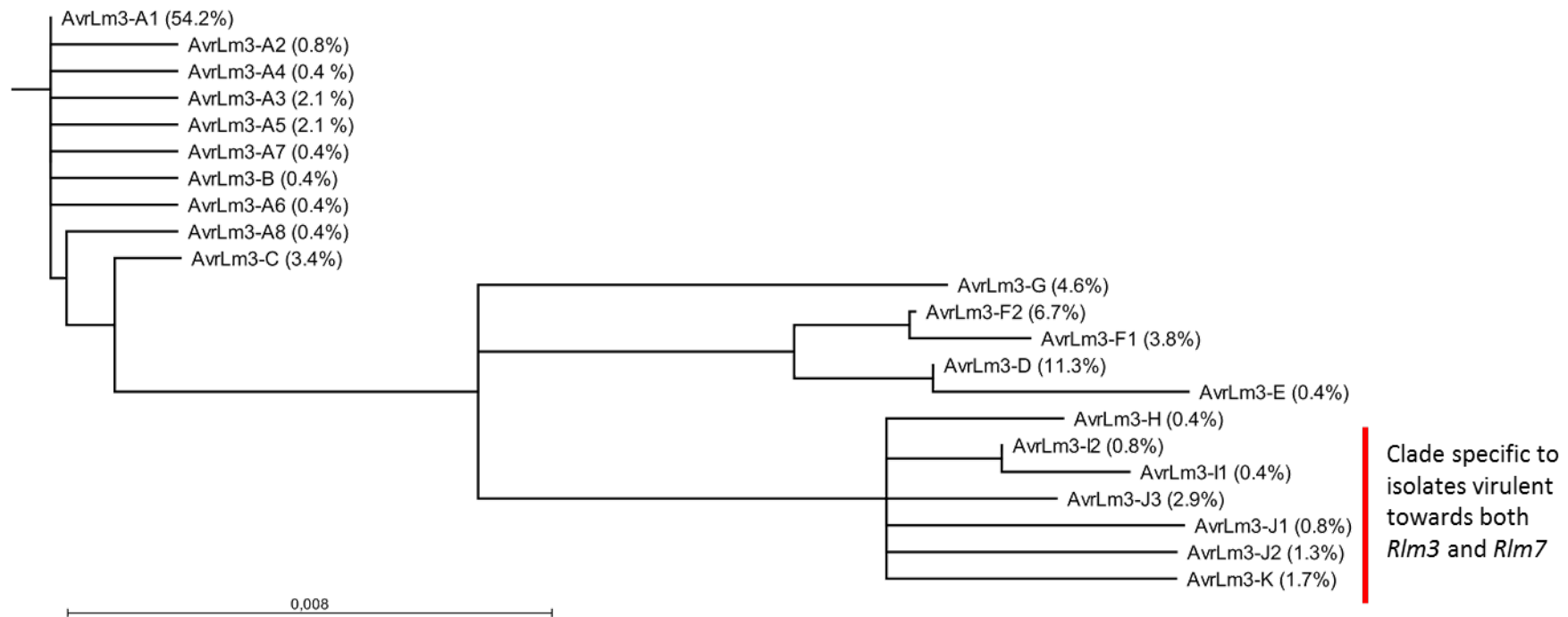


Figure 2: Phylogenetic relationship between *AvrLm3* alleles.

Analysis of the phylogenetic relationship between *AvrLm3* alleles was performed using the Neighbor-Joining distance method on the sequence alignment described in Fig.S1 and is a consensus of 1000 bootstrap replicates (ln L = -920.45). Nodes with a bootstrap value <50% have been collapsed. Percentages represent the frequency of each allele in this study.

Table 4: Analysis of positive selection in the *AvrLm3* coding sequence.

Positively selected site	PAML ^a		SLR
	NEB	BEB	p-value ^c
8	1	0.854	0.734
9	1	NA	0.734
11	1	NA	0.734
51	1	NA	0.005
58	1	0.975	<0.001
78	1	0.774	0.045
85	1	NA	0.293
90	1	0.868	0.734
105	1	NA	0.051
131	1	0.536	<0.001
133	1	0.806	0.027
134	1	NA	0.086
149	1	NA	0.734
150	1	0.519	0.734

^aThe PAML method compared the likelihood estimated by the M7 model (neutral null model) and the M8 model (positive selection model), using a likelihood ratio test and a χ^2 test with two degrees of freedom.

^bProbability that $\omega=dN/dS$ is >1 (i.e positively selected site)

^cp-value of the likelihood ratio test compared against a χ^2 distribution with two degrees of freedom.

Table 5: Polymorphic sites identified in AvrLm3 protein sequence and the associated phenotypes.

Phenotype	Allele of <i>AvrLm3</i> ^a	AvrLm3													AvrLm4-7 ^c	Number of isolates ^e						
		Signal Peptide			Mature Protein											Total	E	NA	SA	A	I	
		8	9	11	51	58	78	85	90	105	131	133	134	149								150
A3a7	AvrLm3-A	I	Q	L	S	I	L	I	G	H	G	P	F	F	V	Inactivation ^d	75	70	1	-	3	-
	AvrLm3-B	I	Q	F	S	I	L	I	G	H	G	P	F	F	V	Inactivation ^d	1	1	-	-	-	-
	AvrLm3-C	I	Q	L	N	I	L	I	G	H	G	P	F	F	V	Inactivation ^d	3	3	-	-	-	-
	AvrLm3-D	I	Q	L	N	I	F	L	G	Y	G	T	F	F	V	Inactivation ^d	27	-	27	-	-	-
	AvrLm3-E	I	P	L	N	I	F	L	G	Y	G	T	F	F	V	Inactivation ^d	1	-	1	-	-	-
	AvrLm3-F	I	Q	L	N	L	F	L	G	Y	G	T	F	F	V	Inactivation ^d	3	-	-	3	-	-
a3A7	AvrLm3-A	I	Q	L	S	I	L	I	G	H	G	P	F	F	V	Avirulent	52	11	16	6	17	2
	AvrLm3-C	I	Q	L	N	I	L	I	G	H	G	P	F	F	V	Avirulent	1	-	-	-	1	-
	AvrLm3-F	I	Q	L	N	L	F	L	G	Y	G	T	F	F	V	Avirulent	22	-	2	20	-	-
	AvrLm3-G	I	Q	L	S	I	F	I	E	Y	G	T	F	Y	A	Avirulent	11	-	-	10	1	-
	AvrLm3-J	I	Q	L	N	H	L	I	G	Y	R	T	Y	F	V	Avirulent	2	-	-	-	2	-
	AvrLm3-K	F	Q	L	N	H	L	I	G	Y	R	T	Y	F	V	Avirulent	1	-	-	-	1	-
a3a7	AvrLm3-A	I	Q	L	S	I	L	I	G	H	G	P	F	F	V	SNP	18	18	-	-	-	-
	AvrLm3-C	I	Q	L	N	I	L	I	G	H	G	P	F	F	V	SNP	4	4	-	-	-	-
	AvrLm3-H	I	Q	L	N	H ^b	L	I	G	Y	R ^b	T	F	F	V	Deletion	1	1	-	-	-	-
	AvrLm3-I	I	Q	L	N	H ^b	L	I	G	Y	R ^b	P	Y	F	V	Deletion	3	2	-	-	-	1
	AvrLm3-J	I	Q	L	N	H ^b	L	I	G	Y	R ^b	T	Y	F	V	Deletion	10	7	-	-	3	-
	AvrLm3-K	F	Q	L	N	H ^b	L	I	G	Y	R ^b	T	Y	F	V	Deletion	3	-	-	-	3	-

^aAlleles displaying the same amino acid sequence were grouped (i.e A3-A.1 to 15, A3-F.1 to 4 and A3-J.1 to 3).

^bPolymorphic amino acids specific to isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7*, in which *AvrLm4-7* is deleted.

^cMolecular event responsible for virulence towards *Rlm7* in A3a7 and a3a7 isolates.

^dIn A3a7 isolates, inactivation of *AvrLm4-7* resulted from one of the molecular event responsible for virulence towards *Rlm7* previously described by Daverdin *et al.* (2012); ie deletion, RIP mutation or SNP.

^eE = Europe; NA = North America; SA = South America; A = Australia; I = *In vitro* cross progeny

		10	20	30	40	50	60	70	80	
v23.2.1	1	MPLSLEIILTL	LALS	PTITACREASIS	SGEIRYPQGT	CPTKTEALNDCNKVTKGLIDFSQSHQRAWGIDMTAKVQC	APCI	T	TTD	83
v23.1.3	1	MPLSLEIILTL	LALS	PTITACREASIS	SGEIRYPQGT	CPTKTEALNDCNKVTKGLIDFSQSHQRAWGIDMTAKVQC	APCI	T	TTD	83
G12-365	1	MPLSLEIILTL	LALS	PTITACREASIS	SGEIRYP	H	GT	CPTKTEALNDCNKVTKGLIDFSQSHQRAWGIDMTAKVQC	APCI	TTD 83
G13-494	1	MPLSLEIILTL	LALS	PTITACREASIS	SGEIRYPQGT	CPTKTEALNDCNKVTKGLIDFSQSHQRAWGIDMTAKVQC	APCI	T	TTD	83
INV.14.197	1	MPLSLEIILTL	LALS	PTITACREASIS	SGEIRYPQGT	CPTKTEALNDCNKVTKGLIDFSQSHQRAWGIDMTAKVQC	APCI	T	TTD	83
OEM12	1	MPLSLEIILTL	LALS	PTITACREASIS	SGEIRYP	K	GT	CPTKTEALNDCNKVTKGLIDFSQSHQRAWGIDMTAKVQC	APCI	TTD 83
LEM64	1	MPLSLEIILTL	LALS	PTITACREASIS	SGEIRYPQGT	R	TK	TEALNDCNKVTKGLIDFSQSHQRAWGIDMTAKVQC	APCI	TTD 83
INV.14.278	1	MPLSLEIILTL	LALS	PTITACREASIS	SGEIRYPQGT	CPTK	K	ALNDCNKVTKGLIDFSQSHQRAWGIDMTAKVQC	APCI	TTD 83
JF31	1	MPLSLEIILTL	LALS	PTITACREASIS	SGEIRYPQGT	CPTKTEALNDCNKVTKGLIDFSQSHQRAWGIDMTAKVQC	APCI	T	TTD	83
		90	100	110	120	130	140			
v23.2.1	84	PWDVV	LCTCK	ITAHRYREFV	PKIPYSS	FSSAPGVIFRQ	ETGLDHDPEWVV	NMKART	RGCD	143
v23.1.3	84	PWDVV	LCTCK	ITAHRYREFV	PKIPYSS	FSSAPGVIFR	Q	ETGLDHDPEWVV	NMKART	RGCD 143
G12-365	84	PWNVV	LCTCK	ITAHRYREFV	PKIPYSS	FSSAPGVIFRQ	ETGLDHDPEWVV	NMKART	RGCD	143
G13-494	84	PWNVV	LCTCK	ITAHRYREFV	PKIPYSS	FSSAPGVIFRQ	K	TGLDHDPEWVV	NMKART	RGCD 143
INV.14.197	84	PWNVV	LCTCK	ITAHRYREFV	PKIPYSS	FSSAPGVIFRQ	G	TGLDHDPEWVV	NMKART	RGCD 143
OEM12	84	PWNVV	LCTCK	ITAHRYREFV	PKIPYSS	FSSAPGVIFRQ	ETGLDHDPEWVV	NMKART	RGCD	143
LEM64	84	PWNVV	LCTCK	ITAHRYREFV	PKIPYSS	FSSAPGVIFRQ	ETGLDHDPEWVV	NMKART	RGCD	143
INV.14.278	84	PWNVV	LCTCK	ITAHRYREFV	PKIPYSS	FSSAPGVIFRQ	ETGLDHDPEWVV	NMKART	RGCD	143
JF31	84	PWNVV	LCTCK	ITAHRYREFV	PKIPYSS	FSSAPGVIFR	K	ETGLDHDPEWVV	NMKART	RGCD 143

Figure 3 : Polymorphic amino acids of the avirulence protein AvrLm4-7 in isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7* displaying an avirulent allele of *AvrLm3*.

The five amino acid change Q³⁵H/K, P³⁹R, E⁴³K, Q¹²¹K and E¹²²K/G were specifically found in isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7*, while the T⁸⁰I is also found in isolates avirulent towards *Rlm7*. The G¹²⁰R amino acid change is responsible for the breakdown of the *Rlm4*-mediated recognition. The isolates v23.2.1 and v23.1.3 are reference isolates avirulent towards *Rlm7*. Details about isolates are provided in Table S1.

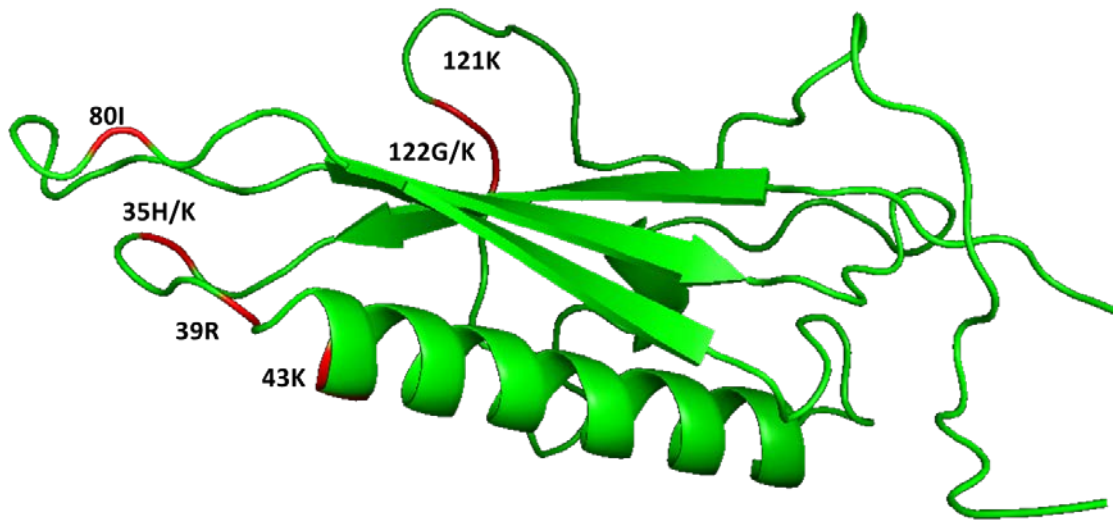


Figure 4: 3D Structure of AvrLm4-7 avirulence protein. The amino acids marked in red correspond to amino acid changes identified in a3a7 isolates displaying a functional copy of *AvrLm3*.

Table 6 : Amino acid polymorphism of AvrLm4-7 between isolates used for *L. maculans* transformation.

Isolate	Polymorphic amino acid			Avirulence phenotype ^a		
	35	80	120	<i>Rlm3</i>	<i>Rlm4</i>	<i>Rlm7</i>
v23.1.3	Q	I	G	V	A	A
v23.1.3.MD35	H	I	G	V	A	A
v23.1.2	Q	T	R	V	V	A
v23.1.2.MD35	H	T	R	V	V	V
“native” a3a7	H	I	R	V	V	V

^aA = Avirulent phenotype towards *Rlmi*, V = Virulent phenotype towards *Rlmi*

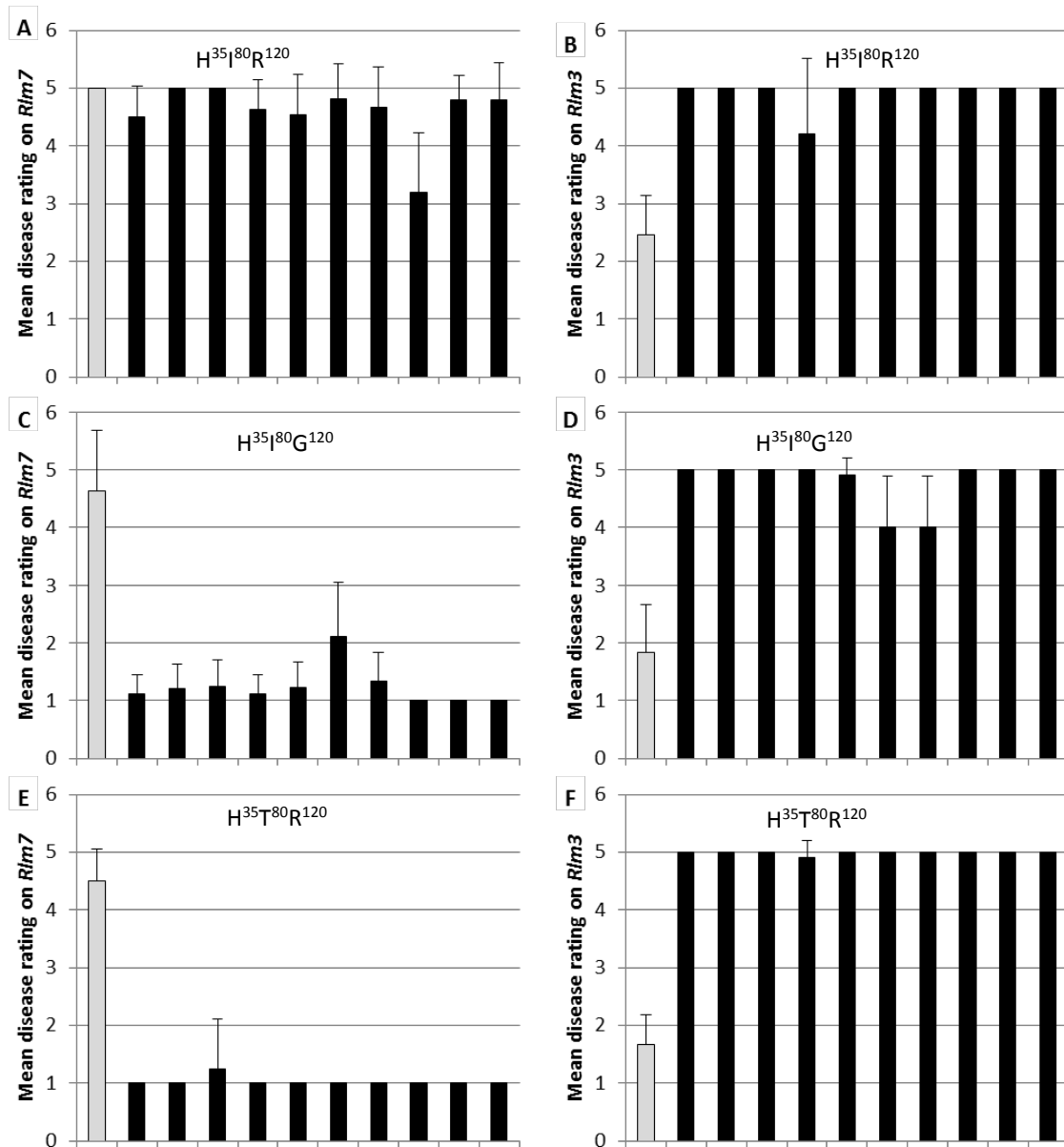


Figure 5: Interaction phenotypes on *Rlm3* and *Rlm7* *Brassica napus* lines of *Leptosphaeria maculans* isolates complemented with alleles of *AvrLm4-7*. The A3a7 natural fields isolate G06-E107 i.e. displaying a virulent phenotype towards *Rlm7* and an avirulent phenotype towards *Rlm3* (grey bars), was transformed with alleles of *AvrLm4-7* displaying different amino acid sequence: H³⁵I⁸⁰R¹²⁰ (A and B, black bars), H³⁵I⁸⁰G¹²⁰ (C and D, black bars) and H³⁵T⁸⁰R¹²⁰ (E and F, black bars). Isolates were inoculated on *Brassica napus* lines harboring *Rlm3* (B, D and F) or *Rlm7* (A, C and E). The symptoms were assessed 14 dpi on a 1 to 6 scale, with 1-3 scores corresponding to resistant response of the plant and 4-6 corresponding to susceptible response. Errors bars indicate the standard deviation of the disease rating on 10 to 12 plants.

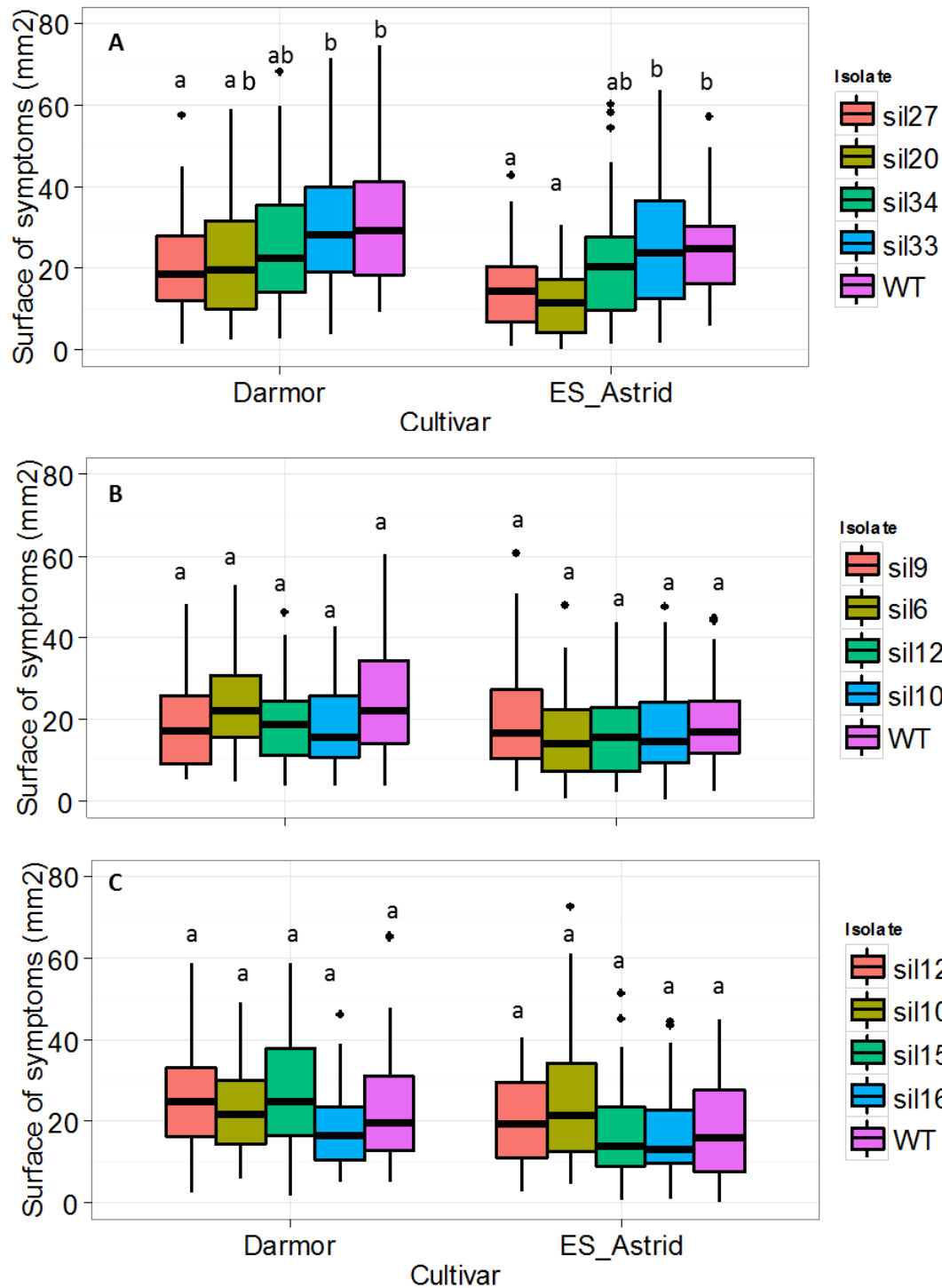


Figure 6: Relationship between expression level of *AvrLm3* and virulence of *L. maculans* isolates on susceptible cultivars. *AvrLm3* has been silenced in three isolates of *L. maculans*: (A) the A3a7 isolate G06-E107, (B) the a3a7 isolate Nz-T4 (i.e displaying a virulent allele of *AvrLm3*) and (C) the a3A7 isolate v23.1.3. Transformants were inoculated on the two susceptible cultivars Darmor and ES Astrid. Cotyledons were scanned at 12 dpi and symptom areas were measured using the software Dplan. Each boxplot correspond to three technical

replicates and two biological replicates of 10 to 12 plants inoculation. Letters correspond to significantly different isolates following a Tukey HSD test. Isolates are ranged from the most to the less efficiently silenced for *AvrLm3* expression.

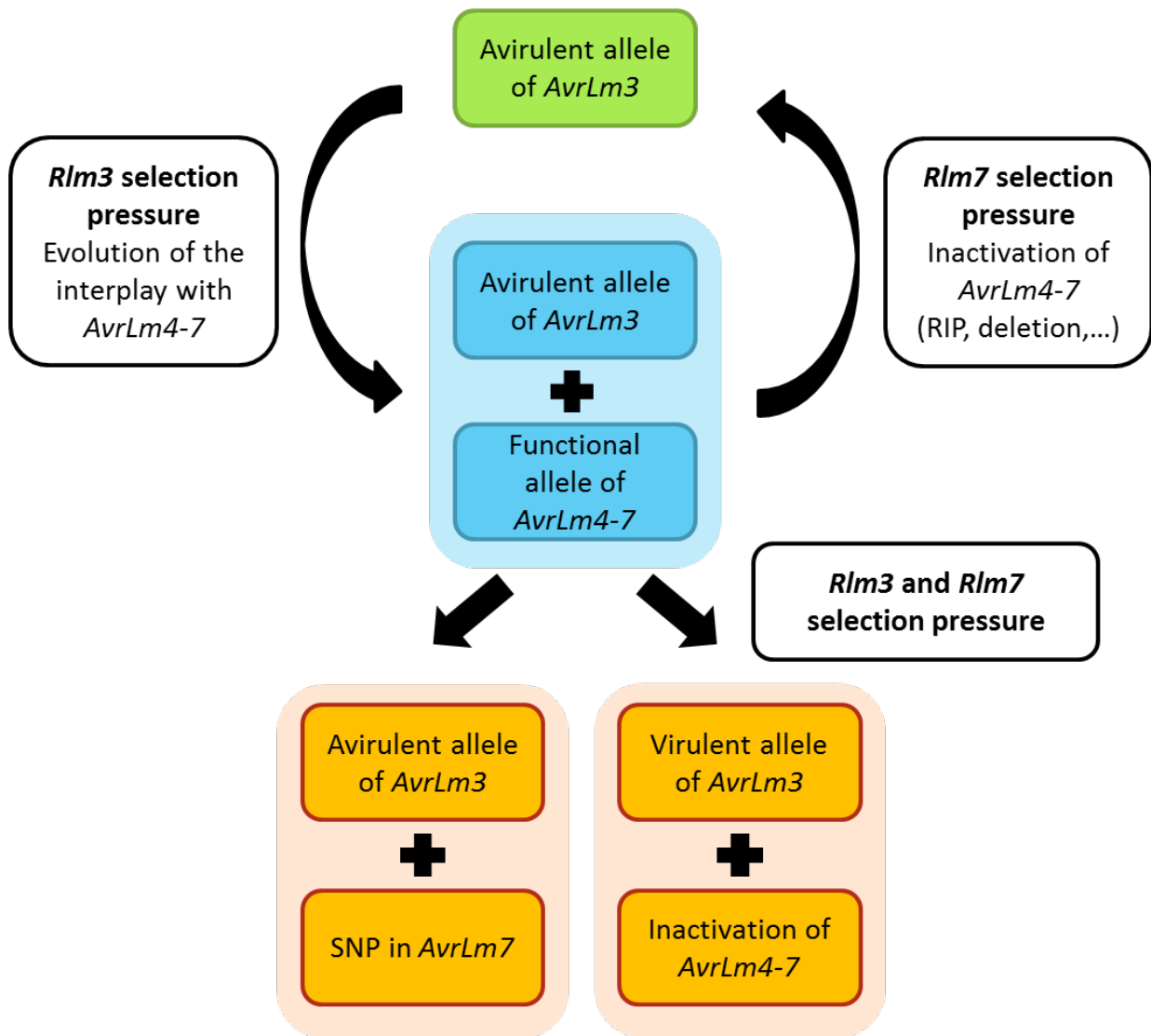


Figure 7 : Model for evolution of *AvrLm3* and *AvrLm4-7* in *Leptosphaeria maculans*. The presence of avirulent alleles of *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in a large majority of natural isolates suggests that the presence of a functional allele of *AvrLm4-7* has been a first way for *L. maculans* to escape *Rlm3* recognition. Following the *Rlm7* selection pressure, there is a reappearance of isolates avirulent towards *Rlm3*. However, the concomitant *Rlm3* and *Rlm7* selection pressures are responsible for the appearance of isolates virulent towards both *AvrLm3* and *AvrLm4-7*, resulting either from mutations in *AvrLm3* coding sequence or from mutations in *AvrLm4-7* coding sequence, circumventing *Rlm7* recognition without impacting the effect on the suppression of the *AvrLm3* phenotype.

Table S1 : List and characteristics of isolates used in this study.

Souche	Phenotype	Collection	Isolated from	<i>Rlm</i> gene	Region	<i>AvrLm7</i> ^a	<i>AvrLm3</i> ^a
AD1177	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD1178	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	RIP	A3-D
AD1180	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD1181	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD1182	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD1183	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD1184	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD1186	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD1187	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD1189	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	RIP	A3-D
AD1190	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	RIP	A3-D
AD1192	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	RIP	A3-D
AD1194	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	RIP	A3-D
AD1195	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	RIP	A3-D
AD1196	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	RIP	A3-D
AD839	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	RIP	A3-A.1
AD842	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD854	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD865	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD909	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD917	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD1018	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD105	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD109	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD1120	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD1198	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	RIP	A3-D
AD126	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.5
AD1294	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	RIP	A3-D
AD134	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD1366	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD190	a3A7	Dilmaghani 2009	Surpass 400	<i>Rlm1</i>	South America	SNP	A3-A.1
AD194	a3A7	Dilmaghani 2009	Surpass 400	<i>Rlm1</i>	South America	-	A3-A.1
AD2	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD217	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	South America	SNP	A3-A.1
AD219	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	South America	SNP	A3-A.1
AD258	a3A7	Dilmaghani 2009	Surpass 400	<i>Rlm1</i>	South America	SNP	A3-A.1
AD323	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD336	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD372	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	-	-
AD378	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD4	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD420	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	South America	SNP	A3-A.1

AD46	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD493	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-F.1
AD539	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD66	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD70	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD717	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	RIP	A3-E
AD847	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD87	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD879	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-A.1
AD917	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	del	A3-D
AD951	a3A7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	SNP	A3-F.1
AD987	A3a7	Dilmaghani 2009	Westar	-	North America	RIP	A3-D
FCP09	a3a7	CETIOM	DK Expertise	<i>Rlm7</i>	Europe	del	A3-H
JG10	a3a7	CETIOM	Diffusion	<i>Rlm7</i>	Europe	del	A3-J.3
LV15	a3a7	CETIOM	Dk Exstorm	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
JF31	a3A7	CETIOM	Manzanna	-	Europe	SNP	A3-A.1
CAB.OMR.166	A3a7	Dilmaghani 2009	Broccoli	-	South America	del	A3-F.2
CAB.OMR.167	a3A7	Dilmaghani 2009	Broccoli	-	South America	SNP	A3-G
CAB.OMR.178	A3a7	Dilmaghani 2009	Broccoli	-	South America	del	A3-F.2
CAB.OMR.180	A3a7	Dilmaghani 2009	Broccoli	-	South America	del	A3-F.2
G13.100	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.101	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.103	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.104	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.105	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	SNP	A3-A.5
G13.106	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.107	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	del	A3-A.1
G13.108	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.109	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.110	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.111	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	RIP	A3-A.1
G13.112	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.115	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.116	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.117	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.118	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.119	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.120	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.123	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.135	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.139	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.141	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.142	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.144	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.146	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-

G13.147	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.148	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.149	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.152	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.154	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.156	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.157	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.158	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.159	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.160	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.184	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.187	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	del	A3-A.1
G13.195	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.196	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.20	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.211	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.212c	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.226	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.236	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.237	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.242	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.243	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.255	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.261	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.266	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	SNP	A3-C
G13.273	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.274	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.275	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.304	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.305	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.307	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.308	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.309	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.31	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.310	a3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.312	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.314	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	RIP	A3-A.1
G13.315	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.316	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.317	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.319	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.320	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.321	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.322	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.323	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-

G13.445	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.446	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.447	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.448	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.449	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.450	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.452	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.453	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.454	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.457	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.458	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.465	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.466	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.467	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.468	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.469	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.470	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.472	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.473	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.474	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.475	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.476	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.477	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.478	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.479	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.480	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.481	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.482	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.484	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.485	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.486	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.488	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.489	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.490	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.492	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.493	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.494	a3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G13.495	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.496	a3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-C
G13.497	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.499	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.500	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.501	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.502	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.503	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-

G13.506	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.507	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.508	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.509	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.513	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.514	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.515	A3a7	Grignon 2013	Dk Excellium	<i>Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.516	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.517	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.518	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.519	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.520	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.521	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.524	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.525	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.526	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.529	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.53	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.530	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.531	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.532	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.533	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.534	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.535	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.536	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.537	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.538	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.539	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.541	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.543	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.544	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.545	A3a7	Grignon 2013	Dk Explicit	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	-	-
G13.57	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.59	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.644	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.645	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.647	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.648	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.649	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.650	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.651	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.652	A3a7	Grignon 2013	Alpaga	<i>Rlm4</i>	Europe	-	-
G13.89	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.9	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.90	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-

G13.93	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G13.99	A3a7	Grignon 2013	Drakkar	-	Europe	-	-
G06.C1036	A3a7	Daverdin 2012	Campala	-	Europe	del	A3-A.1
G06.C292	a3A7	Daverdin 2012	Campala	-	Europe	SNP	A3-A.1
G06.C294	a3A7	Daverdin 2012	Campala	-	Europe	SNP	A3-A.1
G06.C835	a3A7	Daverdin 2012	Campala	-	Europe	SNP	A3-A.1
G06.E107	A3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	RIP	A3-A.1
G06.E202	a3A7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	del	A3-A.1
G07.E1006	A3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G07.E1051	a3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	del	A3-J.3
G07.E1055	A3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	SN P	A3-A.1
G07.E1056	A3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G07.E1057	A3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G07.E1058	A3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G07.E247	a3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	del	A3-J.3
G07.E294	a3A7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	-	A3-A.1
G07.E431	a3A7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	-	A3-A.1
G08.C1006	A3a7	Daverdin 2012	Campala	<i>Rlm7</i>	Europe	del	A3-A.1
G08.C1023	A3a7	Daverdin 2012	Campala	<i>Rlm7</i>	Europe	Insertion promotor	A3-A.2
G08.C1024	A3a7	Daverdin 2012	Campala	<i>Rlm7</i>	Europe	del	A3-A.1
G08.C1025	A3a7	Daverdin 2012	Campala	<i>Rlm7</i>	Europe	del	A3-C
G08.C1026	A3a7	Daverdin 2012	Campala	<i>Rlm7</i>	Europe	del	A3-A.2
G08.C1209	A3a7	Daverdin 2012	Campala	<i>Rlm7</i>	Europe	del dinuc	A3-A.1
G08.E1287	a3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	del	A3-J.3
G08.C1229	A3a7	Daverdin 2012	Campala	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G08.E1068	A3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	del	A3-A.1
G08.E1089	A3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G08.E1090	A3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G08.E1095	A3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G08.E1096	A3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G08.E1270	a3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	del	A3-J.3
G08.E1380	A3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G08.E1465	A3a7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	del	A3-A.1
G08.E1489	a3A7	Daverdin 2012	Exagone	<i>Rlm7</i>	Europe	-	A3-A.1
G12.346	A3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	RIP	A3-A.1
G12.356	a3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G12.361	A3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	del	A3-A.1
G12.365	a3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G12.366	a3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G12.368	A3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	RIP	A3-A.1
G12.379	A3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	del	A3-A.1
G12.395	A3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	RIP	A3-A.1
G12.398	a3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G12.404	a3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G12.435	a3a7	Grignon 2012	Dk Exstorm	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1

G12.437	A3a7	Grignon 2012	Dk Exstorm	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	RIP	A3-A.1
G12.508	A3a7	Grignon 2012	Dk Exstorm	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	RIP	A3-A.1
G12.524	A3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	del	A3-A.1
G12.527	a3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G12.529	A3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	del	A3-B
G12.553	a3A7	Grignon 2012	Dk Exstorm	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G12.573	a3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	SNP	A3-A.1
G12.593	A3a7	Grignon 2012	Adriana	<i>Rlm4</i>	Europe	partial deletion	A3-A.1
IBCN14	a3a7	Balesdent 2005	NA	-	Australia	del	A3-J.2
IBCN18	a3A7	Balesdent 2005	NA	-	Australia	-	A3-G
INV.13.1	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.13	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.15	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.16	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.197	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	del	A3-A.1
INV.13.2	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.200	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.203	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	RIP	A3-A.1
INV.13.207	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.217	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.218	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.231	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.236	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.24	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.242	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.243	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.244	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.245	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.246	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.25	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.260	A3a7	IN VIVO 2013	Pamela	-	Europe	-	-
INV.13.27	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.272	A3a7	IN VIVO 2013	Pamela	-	Europe	del promoteur	A3-A.1
INV.13.28	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	del	A3-A.1
INV.13.288	A3a7	IN VIVO 2013	Pamela	-	Europe	del	A3-A.1
INV.13.29	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.290	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.3	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	del partielle	A3-A.1
INV.13.30	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.305	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.307	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.317	a3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	SNP	A3-C
INV.13.334	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.350	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.356	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	RIP	A3-A.1

INV.13.358	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.360	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.361	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	A3-A.5
INV.13.37	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.38	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.4	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	RIP	A3-A.1
INV.13.42	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.43	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.44	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.46	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	RIP	A3-A.1
INV.13.49	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.51	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	RIP	A3-A.1
INV.13.57	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.575	a3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	SNP	A3-A.1
INV.13.629	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	RIP	A3-C
INV.13.635	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	del	A3-A.1
INV.13.65	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.67	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	del	A3-A.4
INV.13.677	a3A7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	A3-A.1
INV.13.68	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.70	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	RIP	A3-A.1
INV.13.71	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.72	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.79	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.80	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	RIP	A3-A.8
INV.13.84	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.86	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
INV.13.91	A3a7	IN VIVO 2013	Falcon	-	Europe	-	-
V23.2.1	a3A7	In vitro cross	na	-	Reference	-	A3-A.1
V23.1.3	a3A7	In vitro cross	na	-	Reference	-	A3-A.1
Nz-T4	a3a7	Balesdent 2005	na	-	Reference	del	A3-I.1
OMR186	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.1
OMR192	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.1
OMR199	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.2
OMR203	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.1
OMR211	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.2
OMR215	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.1
OMR222	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.1
OMR238	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.2
OMR243	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.1
OMR249	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.1
OMR45	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.2
OMR48	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	-
OMR51	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.2
OMR56	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.2

OMR61	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.2
OMR75	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.2
OMR79	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.2
OMR87	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.2
OMR92	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.2
OMR98	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.2
PAT.OMR.105	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-G
PAT.OMR.110	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-G
PAT.OMR.111	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-G
PAT.OMR.113	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-G
PAT.OMR.119	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-G
PAT.OMR.124	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-G
PAT.OMR.131	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-G
PAT.OMR.134	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-G
PAT.OMR.139	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-F.2
PAT.OMR.142	a3A7	Dilmaghani 2009	broccoli	-	South America	-	A3-G
WAC4094	A3a7	Balesdent 2005	na	-	Australia	del	A3-A.1
WT3	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-J.2
WT5	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.3
WT8	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.3
WT13	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-K
WT15	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.1
WT21	a3a7	WT	Westar	-	Australia	del	A3-J.1
WT28	a3a7	WT	Westar	-	Australia	del	A3-K
WT30	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.1
WT31	a3A7	WT	Westar	-	Australia	AV	A3-C
WT32	a3a7	WT	Westar	-	Australia	del	A3-J.1
WT33	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.3
WT40	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-J.2
WT42	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.1
WT47	A3a7	WT	Westar	-	Australia	del	A3-A.6
WT48	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.1
WT50	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.1
WT51	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.1
WT74	a3a7	WT	Westar	-	Australia	del	A3-K
WT75	a3a7	WT	Westar	-	Australia	del	A3-K
WT78	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.1
WT86	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.1
WT91	A3a7	WT	Westar	-	Australia	del	A3-A.1
WT100	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.1
WT101	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.1
WT102	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.5
WT103	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.3
WT107	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.1
WT110	a3A7	WT	Westar	-	Australia	-	A3-A.3

G07.C261	A3a7	Daverdin 2012	campala	-	Europe	SNP	A3-A.1
G07.E1020	A3a7	Daverdin 2012	campala	-	Europe	SNP	A3-A.1
INV.14.160	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	AVR	A3-A.1
INV.14.167	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	del promotor	A3-A.7
INV.14.169	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	del	A3-A.1
INV.14.170	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.171	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.172	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	del	A3-A.1
INV.14.173	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.174	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	RIP	A3-A.1
INV.14.175	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.176	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.177	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	del	A3-A.1
INV.14.178	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.179	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.180	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.181	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.182	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.184	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	del	A3-A.1
INV.14.185	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	A3-A.1
INV.14.186	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.187	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.188	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.189	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.190	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.191	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.192	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	del	A3-A.1
INV.14.193	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.194	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	RIP	A3-A.1
INV.14.195	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.196	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	del	A3-A.1
INV.14.197	a3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	SNP	A3-C
INV.14.198	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.199	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.200	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.201	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.202	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.203	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.204	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.205	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.206	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.207	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.208	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.209	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.211	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-

INV.14.212	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.213	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.257	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	del	A3-A.1
INV.14.260	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.261	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.263	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.264	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	del	A3-A.1
INV.14.265	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.266	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	del	A3-A.1
INV.14.267	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.268	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	RIP	A3-A.1
INV.14.269	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.270	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.272	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.273	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.276	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.277	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.278	a3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	SNP	A3-A.1
INV.14.279	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.280	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.281	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	RIP	A3-A.1
INV.14.282	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.283	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.284	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.285	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.286	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	RIP	A3-A.1
INV.14.287	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.288	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.289	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.290	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.291	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.292	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	del	A3-A.5
INV.14.293	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.294	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.295	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.296	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.297	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.298	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.299	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.300	a3A7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
INV.14.301	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	del	A3-A.1
INV.14.164	A3a7	IN VIVO 2014	attletick	-	Europe	-	-
OEM13	a3a7	CETIOM	Dk Exstorm	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	RIP	A3-J.3
LMA2	a3a7	CETIOM	Manzanna	-	Europe	del	A3-J.3
LMA30	a3a7	CETIOM	Manzanna	-	Europe	del	A3-I.2

FEM118	a3a7	CETIOM	Dk Exstorm	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	RIP	A3-I.2
LMA60	a3a7	CETIOM	Manzanna	-	Europe	SNP	A3-A.1
0EE33	a3a7	CETIOM	DK Expertise	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
GAL10	a3a7	CETIOM	Arsenal	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
GAL21	a3a7	CETIOM	Arsenal	<i>Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
OEM12	a3a7	CETIOM	Dk Exstorm	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
LEM64	a3a7	CETIOM	Dk Exstorm	<i>Rlm3+Rlm7</i>	Europe	SNP	A3-A.1
LMA63	a3a7	CETIOM	Manzanna	-	Europe	SNP	A3-C

^aAllele of *AvrLm3* or *AvrLm4-7*. “-“ = Isolate non sequenced, A3-Xi= Allele of *AvrLm3*, del= Absence of PCR amplification, SNP= Single Nucleotide Polymorphism, RIP= Repeat Induced Point Mutations.

Table S2: Primers used in this study

Markers		Sequence
PCR amplification and sequencing		
<i>AvrLm4-7</i>	F	TATCGCATACCAAACATTAGGC
	R	GATGGATCAACCGCTAACAA
<i>AvrLm3</i>	F	AAGCAGTGGCGTGAACAGA
	R	CTGCCAAGGGGATGATGGA
Mating type	F	TGGCGAATTAAGGGATTGCTG
	R1	CTCGATGCAATGTACTTGGAGC
	R2	CGGAGGTGAAGTTGAAGCCG
Directed mutagenesis		
	MG ^a	CGCTATCCTCATGGCACTTGTCC
pZPNAT-MD35	R1	TTAAGTGTTGAGTTGCCTAAC
	R2	GATGGATCAACCGCTAACAA
qPCR		
<i>qsilAvrLm3</i>	F	CGAACGTGCGCTCTTGAATG
	R	CAGGGGTCGTCTAAAGGCAG
qActin	F	AGTGCGATGTCGATGTCAG
	R	AAGAGCGGTGATTCCTTCT
qEF1- α	F	ACAAATTGAAGGCCGAGCGTGAAC
	R	TACCGGCGGCAATGATGAGGATA

^aPrimer used for generating the Megaprimer

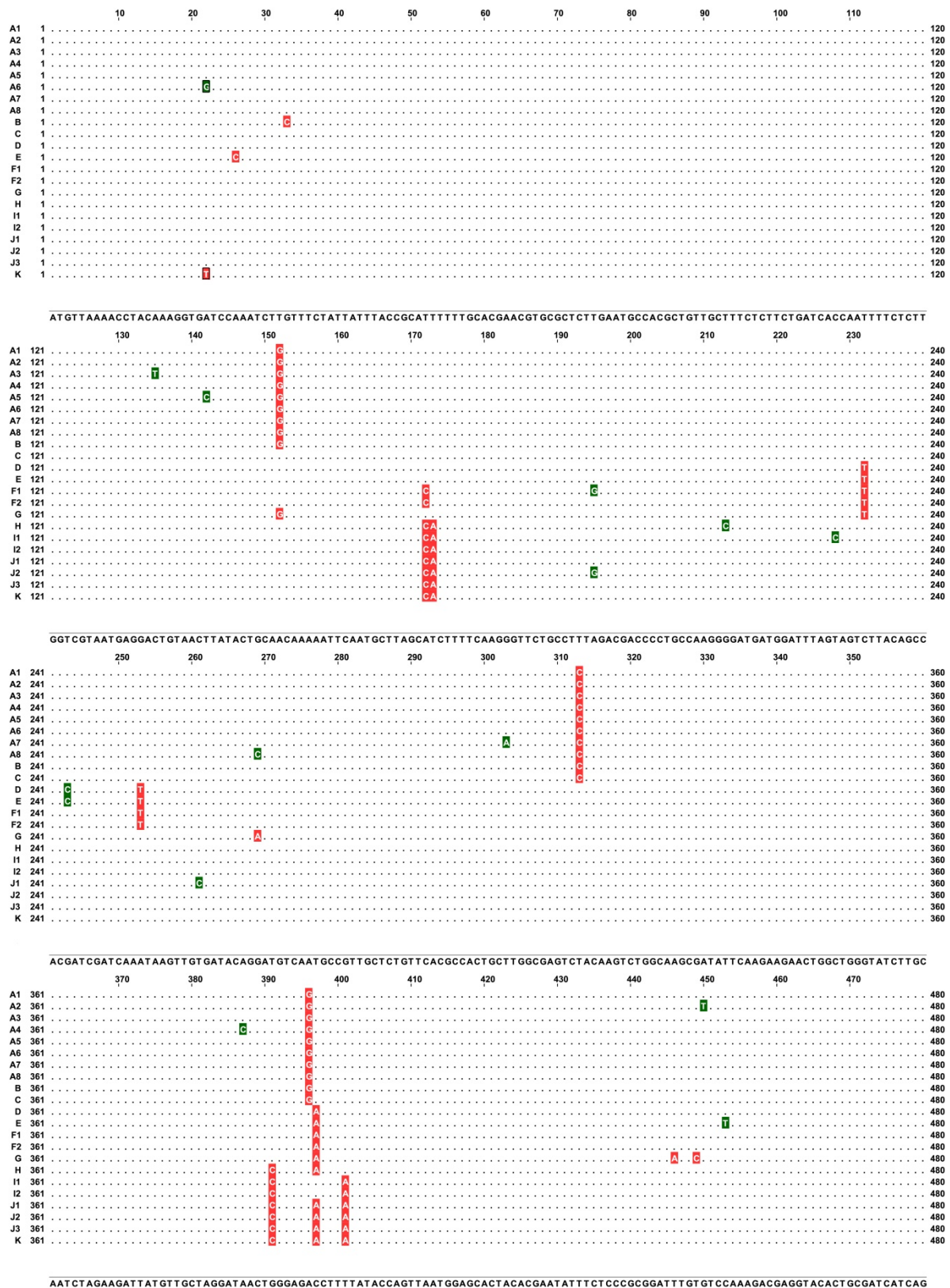


Figure S1 : Nucleotide polymorphism between the 22 alleles of *AvrLm3* characterized. Synonymous mutations are marked in green and non synonymous mutations are marked in red. The consensus sequence is represented below the alignment.

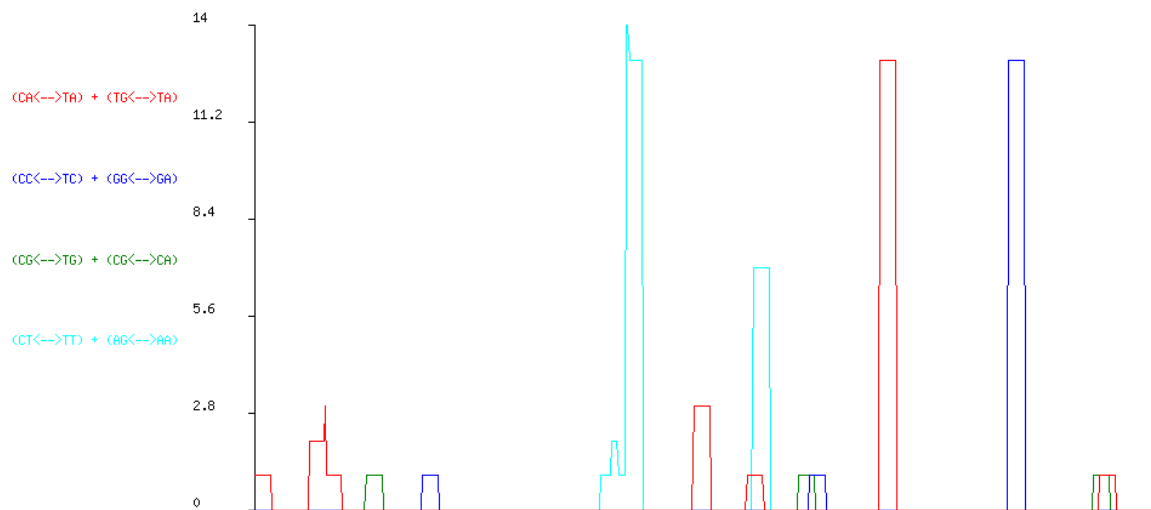


Figure S2 : RIPcal analyses of *AvrLm3* alleles. The sequence with the highest GC content (A3-20; GC content = 39.8%) was chosen as the reference for alignment based RIP analyses. The physical distribution of RIP mutation along the gene *AvrLm3* is represented by the overall RIP mutation frequency over a 50 bp scanning window. The absence of over representation of CpA/TpG <-> TpA mutations (red curve) over CpN <->TpN or NpG <->NpA mutations suggest the absence of RIP in *AvrLm3* alleles identified in this study.

			10		20		30								
pPZPnat1-365	1	MPLS	LEI	ILTL	LALS	IP	ITAC	REAS	ISGE	IRYP	PH	HG	TC	P	40
pPZPnat1-v23.1.2.MD35	1	MPLS	LEI	ILTL	LALS	IP	ITAC	REAS	ISGE	IRYP	PH	HG	TC	P	40
pPZPnat1-v23.3.1.MD35	1	MPLS	LEI	ILTL	LALS	IP	ITAC	REAS	ISGE	IRYP	PH	HG	TC	P	40
			50		60		70								
pPZPnat1-365	41	KTEAL	NDCNK	VTKGL	IDF	SQSH	QRAWG	IDMTAK	VQCAP	CI	I				80
pPZPnat1-v23.1.2.MD35	41	KTEAL	NDCNK	VTKGL	IDF	SQSH	QRAWG	IDMTAK	VQCAP	CI	I				80
pPZPnat1-v23.3.1.MD35	41	KTEAL	NDCNK	VTKGL	IDF	SQSH	QRAWG	IDMTAK	VQCAP	CI	I				80
			90		100		110								
pPZPnat1-365	81	TTDPW	NVVL	CTCK	I	TAHRY	REFVPK	I	PYS	SFSS	APGV	IFR			120
pPZPnat1-v23.1.2.MD35	81	TTDPW	VDVVL	CTCK	I	TAHRY	REFVPK	I	PYS	SFSS	APGV	IFR			120
pPZPnat1-v23.3.1.MD35	81	TTDPW	VDVVL	CTCK	I	TAHRY	REFVPK	I	PYS	SFSS	APGV	IFG			120
			130		140										
pPZPnat1-365	121	QETGL	DHDPE	WVVNM	KARTR	GCD									143
pPZPnat1-v23.1.2.MD35	121	QETGL	DHDPE	WVVNM	KARTR	GCD									143
pPZPnat1-v23.3.1.MD35	121	QETGL	DHDPE	WVVNM	KARTR	GCD									143

Figure S3 : Amino acid polymorphism between the three alleles of *AvrLm4-7* generated by directed mutagenesis.

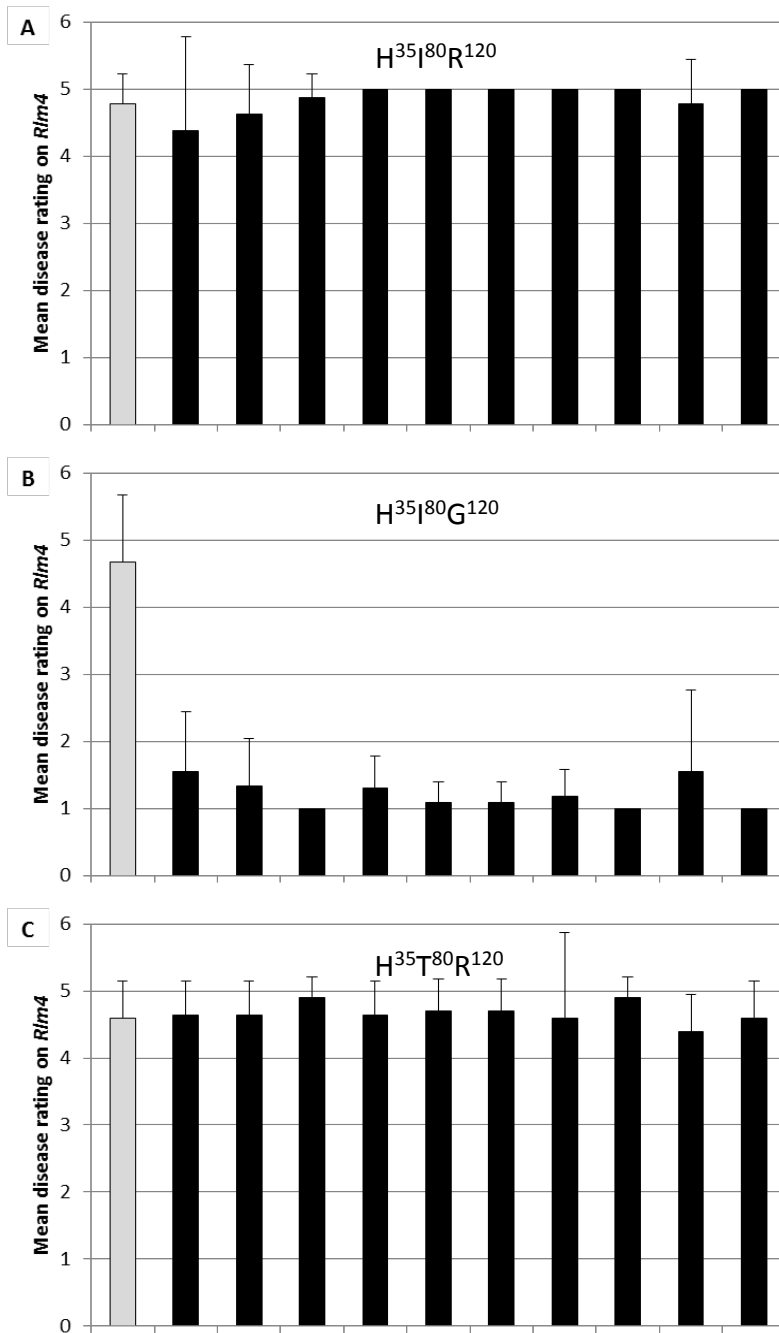


Figure S4 : Interaction phenotypes between *Rlm4 Brassica napus* lines and *Leptosphaeria maculans* isolates complemented with alleles of *AvrLm4-7*.

The A3a7 natural fields isolate G06-E107 i.e. displaying a virulent phenotype towards *Rlm7* and an avirulent phenotype towards *Rlm3* (grey bars), was transformed with alleles of *AvrLm4-7* displaying different amino acid sequence: $H^{35}I^{80}R^{120}$ (A, black bars), $H^{35}I^{80}G^{120}$ (B, black bars) and $H^{35}T^{80}R^{120}$ (C, black bars). Isolates were inoculated on *Brassica napus* lines harboring *Rlm3* (A, B and C). The symptoms were assessed 14 dpi on a 1 to 6 scale, with 1-3 scores corresponding to resistant response of the plant and 4-6 corresponding to susceptible response. Errors bars indicate the standard deviation of the disease rating on 10 to 12 plants.

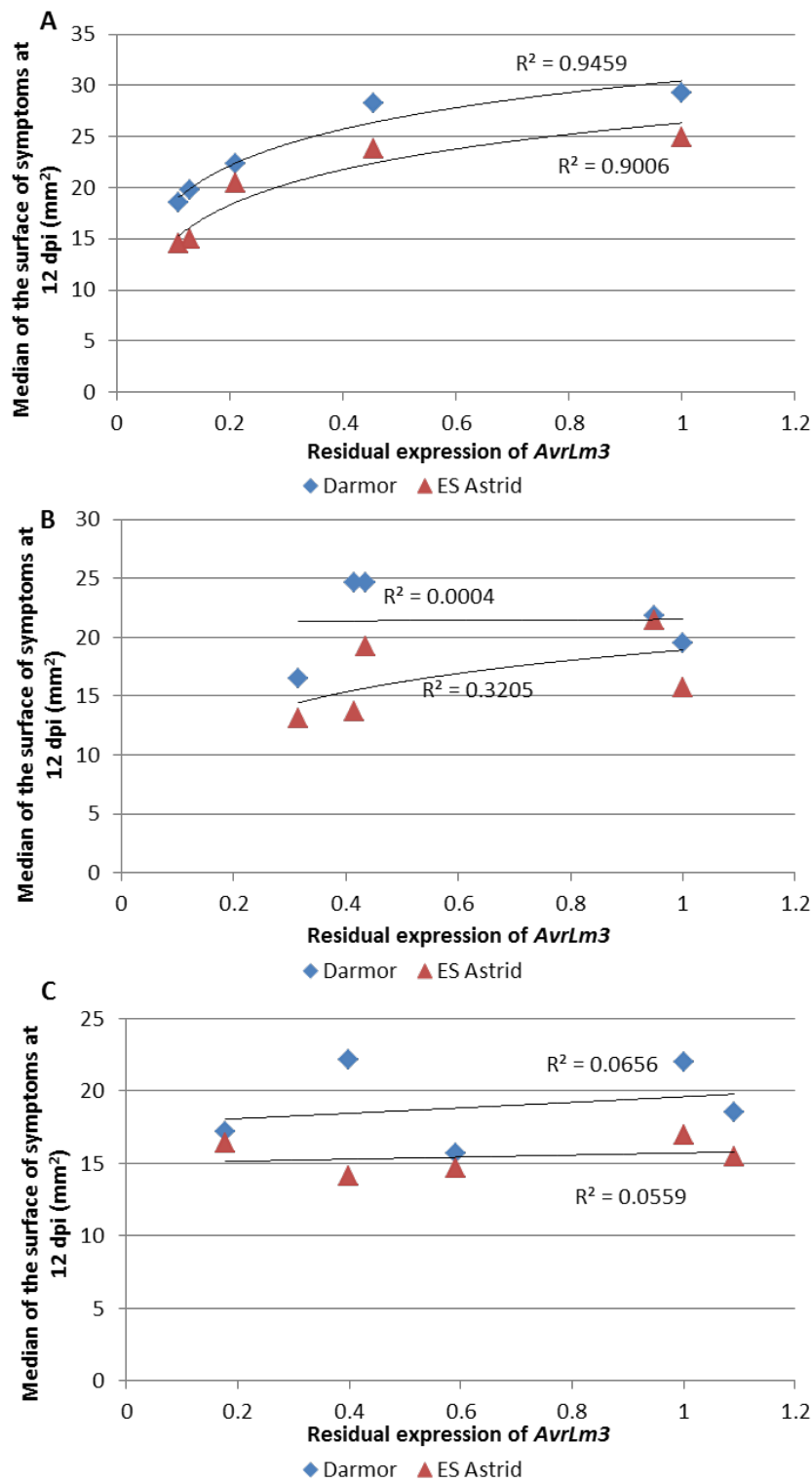
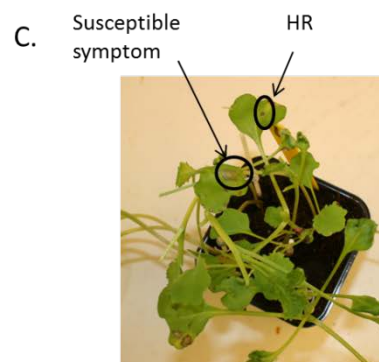
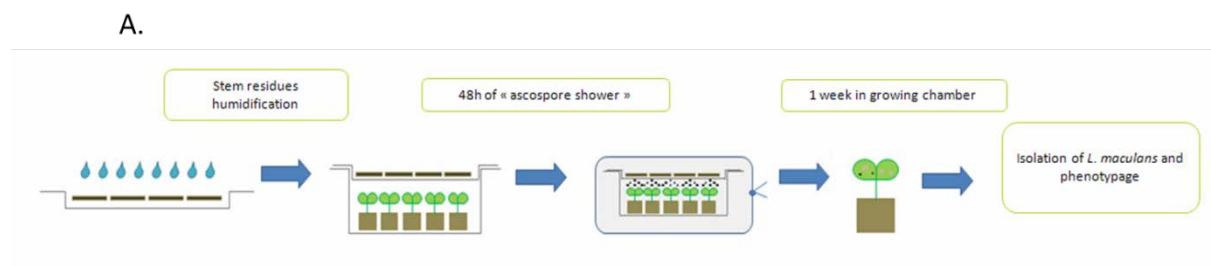


Figure S5: Correlation between the level of residual expression of *AvrLm3* and the virulence of *L. maculans* isolates. A. Silencing of *AvrLm3* in the A3a7 isolate G06-E107. B. Silencing of *AvrLm3* in the a3A7 isolate v23.1.3. C. Silencing of *AvrLm3* in the a3a7 isolate Nz-T4. Black lines indicated the logarithmic correlation the level of residual expression of *AvrLm3* and the virulence of *L. maculans* isolates on susceptible cultivars.

Supplementary method 1 : Sampling of *L. maculans* isolates from ascospores released from stem residues on plantlets of *B. napus*. **A.** Schematic representation of the method used for ascospore isolations. Stem residues are humidified to activate the ascospores release from perithecia. Stem residues are put on the top of one week old *B. napus* plantlets in plastic boxes. Boxes are packages for two days to maintain the high humidity level to enhance the fungus infection. After two days, plantlets are placed in growth chamber and symptoms are assessed after one week. Leaf spots are sampled and isolates are sampled from single pycnidia using a stereo microscope and then maintained on V8-agar plates. **B.** Stem residues (right) are placed on the top of *B. napus* plantlets. **C.** Symptoms are assessed after one week in growth chamber. The use of *B. napus* cultivars harboring *Rlm* genes allowed to recover isolates virulent towards the corresponding resistance gene.



Discussion générale

L'objectif de ma thèse était d'analyser l'interaction entre *AvrLm3* et *AvrLm4-7* et d'élucider les mécanismes moléculaires conduisant à la virulence vis-à-vis de *Rlm3* et *Rlm7*, de façon à en tirer des données biologiques exploitables pour la modélisation. En effet, l'interaction entre les gènes d'avirulence *AvrLm3* et *AvrLm4-7* chez *L. maculans* constitue une illustration originale de la course aux armements entre les plantes et leurs agents pathogènes et offre des opportunités de mise en place de stratégies originales de déploiement des résistances variétales *Rlm3* et *Rlm7*, visant à accroître leur durabilité au champ.

Lorsque que j'ai débuté mon projet de thèse, seul le gène *AvrLm4-7* avait été cloné (Parlange *et al.*, 2009). Le clonage d'*AvrLm3* constituait donc une première étape nécessaire à une meilleure compréhension de l'antagonisme entre ces deux phénotypes d'avirulence, ainsi qu'un premier challenge sachant que malgré des efforts conséquents, la thèse de G. Daverdin n'avait pas permis son clonage ni même le bornage génétique du locus.

Les résultats obtenus lors de ma thèse ont permis d'identifier le gène *AvrLm3*, qui code pour une petite protéine sécrétée riche en cystéines et est fortement exprimé lors des phases précoces de l'infection. J'ai également mis en évidence le rôle important d'*AvrLm3* dans le pouvoir pathogène du champignon, qui est conforté par l'originalité et la complexité des mécanismes moléculaires mis en place par *L. maculans* pour contourner la résistance *Rlm3* tout en gardant *a priori* fonctionnelle la protéine effectrice *AvrLm3*. De plus, j'ai identifié des mécanismes moléculaires par lesquels, dans des conditions de double pression de sélection, *L. maculans* parvient à contourner simultanément les résistances *Rlm3* et *Rlm7*, tout en conservant la fonctionnalité d'*AvrLm3* et *AvrLm4-7*, validant ainsi également l'importance déjà démontrée d'*AvrLm4-7* dans la pathogénie (Huang *et al.*, 2006, 2010).

Enfin, bien que le mécanisme par lequel *AvrLm4-7* supprime la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3* n'ait pas été élucidé, plusieurs hypothèses ont pu être invalidées, suggérant ainsi une absence d'interaction directe entre les deux protéines d'avirulence. Ces travaux offrent des bases solides et de nouvelles pistes pour un projet de thèse récemment débuté dans l'équipe, qui a pour but l'analyse fonctionnelle d'*AvrLm3* et *AvrLm4-7*, afin d'améliorer la compréhension des mécanismes permettant à *AvrLm4-7* d'inhiber la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3*.

Identification d'AvrLm3

De même que pour d'autres espèces fongiques telles que *Magnaporthe oryzae* ou *Melampsora lini* (Böhnert *et al.*, 2004; Catanzariti *et al.*, 2006), les premiers gènes d'avirulence clonés chez *L. maculans* (*AvrLm1*, *AvrLm4-7* et *AvrLm6*) ont été identifiés grâce à la stratégie du clonage positionnel, nécessitant une cartographie génétique précise, puis une « marche sur le chromosome » à l'aide d'une banque de clones BAC (Gout *et al.*, 2006; Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009). Le séquençage du génome de *L. maculans* (Rouxel *et al.* 2011) a permis l'établissement d'un répertoire de gènes codant pour des effecteurs putatifs en se basant sur les caractéristiques communes identifiées pour les gènes d'avirulence déjà clonés chez cet organisme, ainsi que chez ceux d'autres espèces fongiques : gènes spécifiquement exprimés lors des phases précoces de l'infection et codant pour des petites protéines sécrétées potentiellement riches en cystéines, avec une absence ou une faible homologie de séquence avec celles d'autres espèces. L'exploitation de ce répertoire de gènes codant pour des effecteurs putatifs a fortement accéléré le clonage de nouveaux gènes d'avirulence par clonage positionnel, tels qu'*AvrLm10* ou *AvrLmMex* (A. Degrave, non publié). Par contre, pour des gènes tels qu'*AvrLm11*, la stratégie de clonage positionnel, basée sur une analyse de la recombinaison méiotique entre marqueurs génétiques n'était pas possible. En effet, ce gène est localisé sur le chromosome dispensable de *L. maculans*, caractérisé par une absence de recombinaison intrachromosomique. L'exploitation du répertoire d'effecteurs, des données de ségrégation du chromosome dispensable dans une descendance et l'analyse de données de transcriptomique ont donc été nécessaires pour son identification (Balesdent *et al.*, 2013).

De façon similaire aux gènes d'avirulence déjà clonés chez *L. maculans*, *AvrLm3* a été localisé au sein d'un isochoire AT, en extrémité de supercontig. Le marqueur moléculaire le plus proche d'*AvrLm3* avait été identifié à 0,8 cM de celui-ci et aucun gène candidat n'était prédit dans cette région. Toutefois, les isochoires AT présentent un faible de taux de recombinaison (Rouxel *et al.* 2011) et de faibles distances génétiques peuvent correspondre à d'importantes distances physiques. Par exemple, lors du clonage positionnel du gène *AvrLm1*, des marqueurs en ségrégation totale avec le phénotype d'avirulence représentaient un contig d'une taille totale de 266 kb (Gout *et al.*, 2006). De plus, deux portions

manquantes de séquence de 2 kb et 10 kb étaient observées dans la région génomique où *AvrLm3* avait été identifié et l'absence de liaison génétique entre les marqueurs situés de part et d'autre du trou de 10 kb laissait supposer une erreur dans l'assemblage du génome de référence.

Lorsque j'ai débuté mon projet de thèse, j'ai tout d'abord cherché à identifier des effecteurs putatifs de *L. maculans* présentant un polymorphisme de type présence/absence entre les deux souches parentales du croisement utilisé pour cartographier *AvrLm3*, dans l'optique d'identifier des gènes candidats. Toutefois, cette démarche n'a pas abouti, aucun gène codant pour une PPS polymorphe n'étant située dans la région où avait été localisé *AvrLm3*.

Des approches alternatives ont donc été développées pour localiser ce gène d'avirulence :

- (i) Poursuite de la cartographie génétique de la région d'*AvrLm3* par génération de nouveaux marqueurs, principalement basés sur la séquence de jonctions d'éléments transposables ;
- (ii) En l'absence de certitude quant à la présence d'*AvrLm3* dans la souche de référence v23.1.3, exprimant *AvrLm4-7*, séquençage et assemblage *de novo* de la souche G06-E-107 (avirulente vis-à-vis de *Rlm3* et souche parentale dans le croisement analysé pour le clonage positionnel d'*AvrLm3*) ;
- (iii) Analyse RNA-seq comparative des phases précoces de l'infection entre souches virulentes ou avirulentes vis-à-vis de *Rlm3* : G06-E-107 et Nz-T4 (souches parentales du croisement analysé pour le clonage positionnel d'*AvrLm3*), G06-E-107 complémentée avec *AvrLm4-7*, et la souche de référence v23.1.3 ;
- (iv) Marche chromosomique puis séquençage et assemblage *de novo* de six clones BAC amplifiant des marqueurs situés à l'extrémité du supercontig dans lequel a été localisé *AvrLm3*.

La combinaison de l'ensemble de ces approches de génétique et de génomique m'a finalement permis d'identifier le gène *AvrLm3* qui est localisé sur un contig de 11 kb absent de la séquence de référence du génome de *L. maculans*, alors que le gène est effectivement présent et exprimé chez la souche v23.1.3. La difficulté de l'identification du locus d'*AvrLm3* met en exergue les limites techniques de l'assemblage des régions génomiques riches en

éléments transposables, et les conséquences que cela entraîne pour les stratégies de clonage positionnel. Le séquençage du génome de *L. maculans* a été effectué en utilisant la technologie Sanger (Sanger *et al.*, 1977), permettant ainsi la génération de plus longs fragments que par le biais des techniques NGS (Next Generation Sequencing), et ainsi l'assemblage des isochores AT du génome de *L. maculans*. Toutefois, des erreurs dans l'assemblage du génome de référence ont été identifiées dans ces régions riches en éléments transposables par cartographie génétique et par la génération d'une carte optique du génome (Grandaubert *et al.*, 2014 ; MH. Balesdent, communication personnelle), que ce soit dans la région d'*AvrLm3*, ou dans une grande région regroupant les gènes d'avirulence *AvrLm1*, *AvrLm2* et *AvrLm6*, sur un autre chromosome de *L. maculans*. Ces erreurs d'assemblage dans des régions fortement répétées ne dépendent pas seulement des technologies de séquençage utilisées, mais également des algorithmes choisis pour l'assemblage.

Au-delà des erreurs d'assemblage, sur une taille de génome estimée à 45,1 Mb, 1,1 Mb de l'assemblage de référence correspondent à des portions de séquence non résolues, celles-ci étant principalement situés dans des isochores AT au sein des chromosomes ou dans les régions télomériques. La totalité des gènes d'avirulence de *L. maculans* identifiée à ce jour est localisée dans des isochores AT. De plus, *AvrLm3* est le premier gène d'avirulence de *L. maculans* situé en extrémité télomérique de chromosome. Plus encore que les régions AT présentes au sein des chromosomes, les extrémités télomériques sont fortement répétées et sont donc à la fois mal assemblées et comportent une forte proportion de séquences non résolues.

Plusieurs versions du génome de *L. maculans* avaient été générées par le Génoscope. La « v3 » finale était considérée comme étant l'assemblage de meilleure qualité, car elle possédait un plus faible nombre de Supercontigs, qui étaient de taille maximale par rapport aux autres versions. Toutefois, nous avons identifié *a posteriori* que la séquence d'*AvrLm3* était présente dans le premier assemblage du génome de *L. maculans*, mais n'avait pas été conservée à cause de la mauvaise qualité de l'assemblage général (correspond à une séquence non résolue dans la version finale de l'assemblage).

L'émergence des technologies de séquençage NGS offre une alternative à l'identification de gènes d'avirulence par clonage positionnel, soit en corrigeant des annotations défectueuses,

soit en permettant d'assembler un transcriptome, ou encore en identifiant des polymorphismes alléliques. Ainsi, l'utilisation du RNA-seq a notamment permis le clonage d'*AvrLmJ1*, un autre gène d'avirulence de *L. maculans* (Van de Wouw *et al.*, 2014). Le gène Lema_uP070880.1 était initialement prédit comme codant pour une protéine de 57 acides aminés dépourvue d'un peptide signal, des analyses RNA-seq ont mis en évidence sa mauvaise annotation. Il code en réalité pour une petite protéine sécrétée de 141 acides aminés et identifiée comme correspondant au gène d'avirulence *AvrLmJ1* (Van de Wouw *et al.*, 2014). Chez *Cladosporium fulvum*, la majorité des 12 gènes d'avirulence qui ont été clonés a été identifiée par des approches de génétique inverse. Toutefois, malgré de nombreux efforts, il n'avait pas été possible d'identifier le gène *Avr5* par cette stratégie. L'assemblage de son transcriptome RNA-seq a permis d'identifier *Avr5* (Mesarich *et al.*, 2014). De façon similaire à *AvrLm3*, ce gène est localisé dans une région très riche en éléments transposables et sa séquence était tronquée dans l'assemblage de référence du génome de *C. fulvum* (Mesarich *et al.*, 2014).

L'utilisation de la génomique comparative, suite au reséquençage massif de souches par technologie NGS, est également une stratégie émergente pour l'identification de gènes codants pour des effecteurs et est de plus en plus fréquemment utilisée. Par exemple, le gène d'avirulence *AvrPi9* de *M. oryzae* a été récemment cloné grâce à cette stratégie (Wu *et al.*, 2015). Chez *Puccinia striiformis*, des analyses de polymorphisme entre souches présentant différents profils de virulence ont permis l'identification de cinq gènes d'avirulence potentiels, parmi un répertoire de près de 3000 PPS prédites (Cantu *et al.*, 2013). Enfin, chez *L. maculans*, le gène *AvrLm2* était précédemment décrit sous le nom de *LmCys1* et des erreurs lors de la cartographie génétique d'*AvrLm2* avaient conduit à le rejeter en tant que gène candidat (Ghanbarnia *et al.*, 2014). Le reséquençage de 36 souches de *L. maculans* virulentes ou avirulentes vis-à-vis de *Rlm2* a permis l'identification d'un site polymorphe dans la séquence protéique de *LmCys1*, responsable du phénotype d'avirulence vis-à-vis de *Rlm2* (Ghanbarnia *et al.*, 2014).

Le progrès constant des technologies de séquençage et leur démocratisation financière est donc un atout majeur pour l'identification des gènes impliqués dans l'avirulence chez les champignons, et des progrès sont attendus à court terme dans la cartographie génétique,

l'assemblage et l'annotation des gènes de *L. maculans*. (i) En parallèle avec la génération par le Génoscope d'une carte optique du génome de *L. maculans*, le reséquençage de la descendance d'un croisement entre deux souches de référence de *L. maculans* a récemment permis d'obtenir une carte génétique haute définition du génome (M. H. Balesdent, non publié), sécurisant une nouvelle version de l'assemblage. Ces données faciliteront la cartographie et le clonage de nouveaux gènes d'avirulence, sous réserve qu'ils soient présents dans l'assemblage. (ii) Plus récemment, le reséquençage du génome de la souche de référence de *L. maculans* par la technique du nanopore a été initiée par le Génoscope. Cette technique récente permet la génération de reads de grande taille (jusqu'à 50 kb) et peut donc permettre de valider ou de corriger l'assemblage du génome dans les isochores AT. L'ensemble de ces approches laisse envisager l'opportunité de l'obtention d'un génome de *L. maculans* « fini » (i.e séquence complète de chacun des chromosomes). (iii) Enfin, un projet de transcriptomique RNA-seq portant sur l'ensemble du cycle de développement de *L. maculans* est actuellement en cours dans l'équipe. Les données obtenues permettront notamment d'appréhender les phases tardives du cycle de développement de *L. maculans* (développement systémique dans la plante et nécrose au collet), mais également d'affiner l'annotation des gènes prédits comme « unreliable », d'identifier des gènes non prédits, de corriger les annotations automatiques et d'obtenir une annotation « complète » des gènes de *L. maculans*.

Mécanisme gouvernant l'antagonisme entre AvrLm3 et AvrLm4-7

Les effecteurs sécrétés lors de l'infection par les agents pathogènes ont pour rôle de manipuler les processus cellulaires de l'hôte, afin de supprimer ses mécanismes de défense ou de favoriser l'acquisition de nutriments (Jones & Dangl, 2006). Parmi ces effecteurs, certains permettent de supprimer l'ETI. C'est notamment le cas pour une grande majorité des effecteurs sécrétés par la bactérie *Pseudomonas syringae* (Guo *et al.*, 2009). Par exemple, l'effecteur HopD1 de *P. syringae* supprime l'ETI chez *Arabidopsis thaliana* en interagissant avec le facteur de transcription NTL9 (Block *et al.*, 2014). Chez l'oomycète *Phytophthora sojae*, l'effecteur PsCRN70 inhibe l'action de divers inducteurs de mort cellulaire tels que BAX, PsAvh241, PsCRN63, PsojNIP et R3 et R3a/Avr3a (Rajput *et al.*, 2014). Chez les espèces fongiques, seulement deux exemples de suppression de l'ETI par des effecteurs ont été décrits : Avr1 inhibe la reconnaissance d'Avr2 et Avr3 par les protéines de résistance correspondantes I-2 et I-3 chez *Fusarium oxysporum* et AvrLm4-7 supprime quant à lui la reconnaissance d'AvrLm3 par Rlm3 chez *L. maculans* (cf. Chapitre 1). Il est à noter que contrairement à ce qui a été décrit chez les autres espèces d'agents pathogènes la suppression de la RH causée par Avr1 ou AvrLm4-7 agit de façon spécifique sur la reconnaissance des effecteurs Avr2, Avr3 ou AvrLm3 (Plissonneau *et al.*, submitted ; Gonzalez-Cendales, 2015), suggérant ainsi une absence d'interférence avec les mécanismes généraux de mise en place de l'ETI.

Suite à l'identification de l'antagonisme entre les phénotypes d'avirulence AvrLm3 et AvrLm4-7 chez *L. maculans*, plusieurs hypothèses avaient été émises pour expliquer ce mécanisme. AvrLm4-7 ayant la spécificité d'être reconnu par les deux protéines de résistance Rlm4 et Rlm7 de *B. napus*, il avait tout d'abord été envisagé qu'AvrLm3 pouvait aussi être un nouvel allèle d'AvrLm4-7. Un exemple similaire est retrouvé chez *Melampsora lini*, chez lequel la protéine d'avirulence AvrL567 peut être perçue par trois protéines de résistance distinctes du lin L5, L6 et L7 (Dodds *et al.*, 2004). Toutefois, une grande diversité de mécanismes moléculaires responsables de la virulence vis-à-vis de Rlm7 a été identifiée, notamment une grande proportion de délétions ou de mutations dues au RIP (Daverdin *et al.*, 2012). La diversité des mécanismes affectant AvrLm4-7 et permettant la résurgence d'un phénotype avirulent vis-à-vis de Rlm3, et en particulier la grande quantité d'évènements

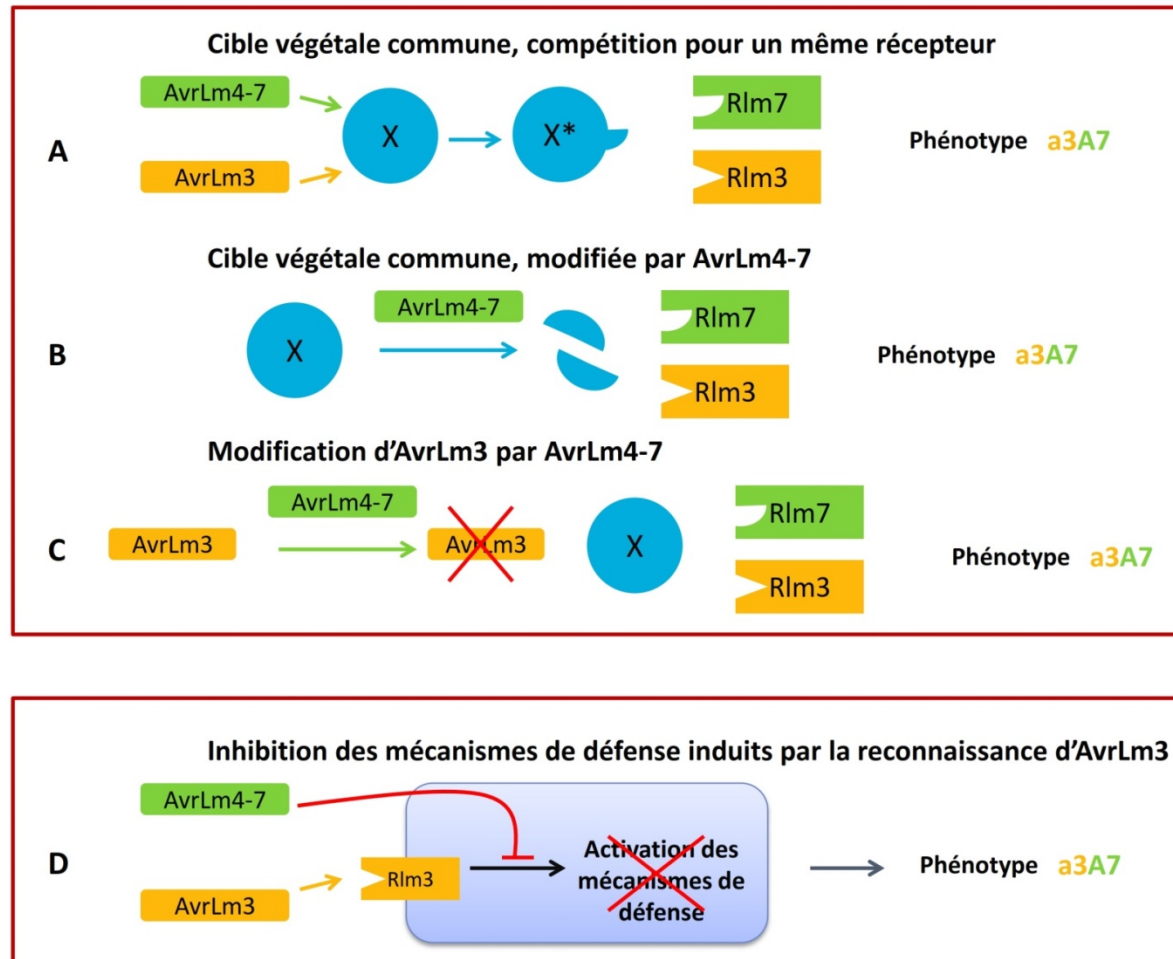


Figure 1 : Hypothèses de mécanismes conduisant à la suppression de l'interaction entre AvrLm3 et Rlm3 par AvrLm4-7.

Trois hypothèses initialement proposées ont été invalidées lors de ces travaux (A, B et C), suggérant une interaction indirecte entre les protéines AvrLm3 et AvrLm4-7, notamment une régulation négative par AvrLm4-7 des mécanismes de défense induits suite à la reconnaissance d'AvrLm3 par Rlm3 (D).

moléculaires correspondant à une inactivation totale du gène, nous a conduits à rejeter l'hypothèse qu'*AvrLm3* soit un allèle particulier d'*AvrLm4-7*.

Nous avons ensuite envisagé que l'absence du phénotype *AvrLm3* chez les souches possédant un allèle fonctionnel d'*AvrLm4-7* pourrait résulter d'une sous-expression d'*AvrLm3*. En effet, lors de l'analyse des mécanismes moléculaires responsables de la virulence vis-à-vis de *Rlm7*, une faible proportion de souches ne montrait aucun polymorphisme de séquence, mais une sous-expression du gène *AvrLm4-7* (Daverdin *et al.*, 2012). De plus, la suppression de l'expression d'un effecteur sans modification de sa séquence a été décrite chez l'oomycète *Phytophthora sojae*, où l'expression du gène *Avr3a* est inhibée par des petits ARN, permettant ainsi d'échapper à la reconnaissance par *Rps3a* (Qutob *et al.*, 2013). L'analyse de la cinétique d'expression du gène *AvrLm3* a toutefois mis en évidence son absence de régulation par *AvrLm4-7*. Le niveau d'expression d'*AvrLm3* est similaire entre les souches avirulentes vis-à-vis de *Rlm3* et les souches pour lesquelles ce phénotype est masqué par la présence d'*AvrLm4-7* (Cf. Chapitre 1).

L'expression concertée des gènes *AvrLm3* et *AvrLm4-7* lors des phases précoces de l'infection indiquait une possible interaction directe entre les deux protéines d'avirulence *in planta* ou une compétition pour une cible végétale commune (Figure 1). Une absence d'interaction directe entre les protéines *AvrLm3* et *AvrLm4-7* a été suggérée par une approche double hybride, ainsi que par les localisations subcellulaires distinctes de ces deux protéines (cf. Chapitre 1). Seuls deux exemples d'interaction directe entre des effecteurs d'agents pathogènes fongiques ont été actuellement décrits, et ils concernent uniquement des activités concertées menant à l'ETI, et non l'interférence avec la mise en place de celle-ci. Chez *F. oxysporum* la présence conjointe des deux protéines *Avr2* et *Six5* est nécessaire pour l'activation des mécanismes de défense par la protéine de résistance *I2* chez la tomate (Ma *et al.*, 2015). De façon similaire, chez *L. maculans*, la présence des effecteurs *AvrLm10_1* et *AvrLm10_2* est requise pour la reconnaissance par *Rlm10* chez *B. nigra* (I. Fudal et M. H. Balesdent, non publié).

Chez *P. syringae* la suppression de la reconnaissance d'*AvrRPM1*, *AvrB* et *AvrRpt2* résulte de leur compétition pour une cible commune. En effet, ces effecteurs interagissent avec la



Figure 2: Symptômes d'incompatibilité sur des cultivars de *Brassica napus* *Rlm3* ou *Rlm7*.

(A) Nécrose de faible diamètre (1 à 2 mm) résultant de la reconnaissance d'AvrLm4-7 par *Rlm7* (B). Nécrose de plus grande taille et moins « typique », suite à la réaction d'incompatibilité induite par l'interaction entre AvrLm3 et *Rlm3*.

protéine RIN4, un régulateur négatif de la PTI chez *A. thaliana*. AvrB et AvrRPM1 entraînent une hyperphosphorylation de RIN4, qui est alors perçue par la protéine de résistance RPM1, déclenchant ainsi l'ETI. Or, la protéine AvrPt2, est quant à elle responsable du clivage de RIN4, ce qui inhibe la reconnaissance d'AvrB et AvrRPM1 par RPM1. Toutefois, l'ETI déclenchée par la reconnaissance d'AvrPt2 par RPS2 est inhibée par HopF2, qui interagit également avec RIN4 (Mackey *et al.*, 2002; Axtell & Staskawicz, 2003; Wilton *et al.*, 2010; Hou *et al.*, 2011; Deslandes & Rivas, 2012). Toutefois, une compétition pour une cible commune est peu envisageable dans le cas d'AvrLm3 et AvrLm4-7. En effet, les cribles doubles hybrides réalisés pour identifier les cibles végétales d'AvrLm3 et AvrLm4-7 n'ont mis en évidence aucune cible commune potentielle. De plus, les deux protéines d'avorulence présentent des localisations subcellulaires distinctes. AvrLm3 semble s'accumuler dans l'apoplasme suite à sa sécrétion (Chapitre 1). AvrLm4-7 est quant à lui transloqué au sein des cellules végétales et perturberait notamment les voies de signalisation de l'acide salicylique et de l'éthylène chez *B. napus*, ainsi que l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (L. Burketova, non publié).

Enfin, il est important de noter que les symptômes résultant de la reconnaissance d'AvrLm3 ou AvrLm4-7 par *B. napus* diffèrent dans leur intensité (Figure 2), suggérant l'activation de voies de signalisation distinctes suite à leur perception par Rlm3 ou Rlm7. En effet, les symptômes induits par la reconnaissance d'AvrLm4-7 sont caractérisés par une nécrose de faible diamètre (1 à 2 mm) circonscrite autour du point d'infection (Figure 2.A), qui correspond à la définition classique de la RH associée à l'ETI. La reconnaissance d'AvrLm3 conduit quant à elle à la formation de nécroses de plus grande taille (4 à 6 mm), dont le diamètre évolue au fil du temps, et qui correspondrait donc plus à la définition de l'ETD (Effector Triggered Defense) que de l'ETI (Figure 2.B). Récemment Stotz *et al.* (2014), ont proposé ce terme pour décrire la reconnaissance des effecteurs apoplastiques par des récepteurs membranaires de type RLP chez la plante hôte. L'ETI et la PTI sont caractérisées par des réponses phénotypiques supposées très contrastées. Or, la réponse des plantes dans le cadre de l'ETD diffère de celle observée pour l'ETI : la mort cellulaire autour du point d'infection est plus lente à se mettre en place et moins « efficace », n'entraînant pas la mort de l'agent pathogène, mais permettant de limiter sa progression dans les tissus végétaux (Stotz *et al.*, 2014). En ce sens, elle se rapproche phénotypiquement des réponses communément associées à la PTI, pour laquelle les PAMP sont également reconnus dans

l'espace extracellulaire par des protéines membranaires de type RLP (Tör *et al.*, 2009), bien que l'ETD résulte de la reconnaissance spécifique d'un effecteur, et non d'un PAMP. La stricte distinction entre ETI et PTI est critiquée par certains auteurs (Thomma *et al.*, 2011; Pritchard & Birch, 2014) et l'ETD correspondrait à une voie médiane qui pourrait être spécifique aux agents pathogènes apoplastiques. Sur ces bases, on peut envisager qu'AvrLm4-7, bien que produit plus tardivement qu'AvrLm3 lors de l'infection et avec une moindre intensité (cf. Chapitre 1), pourrait néanmoins interférer avec la mise en place relativement lente de l'ETD induite par la reconnaissance d'AvrLm3, par rapport avec l'ETI typique.

L'ensemble des données obtenues lors de cette thèse suggère qu'AvrLm4-7 agirait de façon indirecte pour masquer la reconnaissance d'AvrLm3 par Rlm3. Un tel mécanisme a été décrit chez la bactérie *X. campestris* pv. *vesicatoria*, chez laquelle l'effecteur AvrBst supprime spécifiquement l'ETI induite par la reconnaissance d'AvrBs1 en interagissant avec SnRK1, un régulateur du métabolisme du sucre (Szczesny *et al.*, 2010). Pour approfondir l'hypothèse d'une régulation négative l'ETD déclenchées par *Rlm3* nous avons récemment initié une analyse RNA-seq pour comparer les gènes différentiellement exprimés chez un cultivar de *B. napus* possédant *Rlm3* suite à son inoculation par deux souches isogéniques de *L. maculans* différant par la présence ou non d'un allèle fonctionnel d'*AvrLm4-7* (cf. Annexe).

La compréhension mécanistique de la suppression de l'interaction entre AvrLm3 et Rlm3 par AvrLm4-7 nécessite maintenant une analyse fonctionnelle approfondie de ces deux protéines d'avirulence, afin d'identifier leurs cibles végétales et leurs modes d'action *in planta*. La validation de leurs cibles végétales potentielles identifiées par double hybride sera prochainement initiée en utilisant la méthode du BIFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) et par co-immunoprécipitation, le double hybride pouvant mettre en évidence un nombre important de « faux positifs ». En parallèle, de nouveaux interactants putatifs seront recherchés par la technique du pull-down. A plus long terme, la génération de mutants d'*A. thaliana* exprimant *AvrLm3* et *AvrLm4-7* est également envisagée pour mieux comprendre la fonction de ces protéines d'avirulence et leur rôle sur les processus cellulaires de l'hôte.

Rôle d'AvrLm3 et d'AvrLm4-7 dans la pathogénie

Il est généralement postulé que la durabilité d'une résistance variétale est influencée par le coût de fitness associé à son contournement (Leach *et al.*, 2001). Il est toutefois important de noter que la notion de fitness ou l'évaluation de la contribution d'un effecteur dans celle-ci est souvent très dépendante des phases du cycle de développement que l'on peut appréhender dans des conditions expérimentales contrôlées pour un agent pathogène donné. Or, ces phases ne reflètent potentiellement pas tous les stades au cours desquels la présence d'un effecteur impacte la capacité d'un champignon à se multiplier et à se disséminer. De plus, la redondance de fonction supposée entre effecteurs fongiques peut être un obstacle à l'évaluation de leur rôle dans la pathogénie (Dodds *et al.*, 2009; Saitoh *et al.*, 2012; Mirzadi Gohari *et al.*, 2015). L'analyse de l'évolution des gènes d'avirulence sous pression de sélection peut toutefois être une stratégie pour appréhender *a posteriori* leur impact dans fitness fongique.

Le mode d'évolution le plus commun des gènes d'avirulence de *L. maculans* sous pression de sélection est la délétion de l'intégralité ou d'une partie du gène, conduisant à la production d'une protéine d'avirulence tronquée ou non fonctionnelle. Ce mécanisme est la règle pour *AvrLm1* (Gout *et al.*, 2007), dont le rôle dans la fitness fongique semble faible (Huang *et al.*, 2010). La perte du gène d'avirulence, conjointement à l'inactivation du gène par le mécanisme de RIP, a également été décrite comme un mécanisme majeur dans les premières étapes du contournement de *Rlm6* et *Rlm7* (Fudal *et al.*, 2009; Daverdin *et al.*, 2012). Toutefois, ces observations résultent d'expérimentations au champ en condition de pression de sélection renforcée. Elles ne présagent donc pas de l'impact d'AvrLm4-7 et d'AvrLm6 dans la fitness fongique ou de la mise en place à long terme de mécanismes de compensation permettant de conserver la fonction effectrice de la protéine tout en supprimant la reconnaissance par la protéine de résistance correspondante. Un tel mécanisme a été décrit chez *C. fulvum*, qui échappe à la reconnaissance par *Cf-4* suite à des mutations ponctuelles dans la séquence du gène *Avr4*. Bien qu'étant plus sensibles aux protéases de la plante, ces isoformes virulentes conservent la capacité de protéger le champignon de l'action des chitinases (van den Burg *et al.*, 2003).

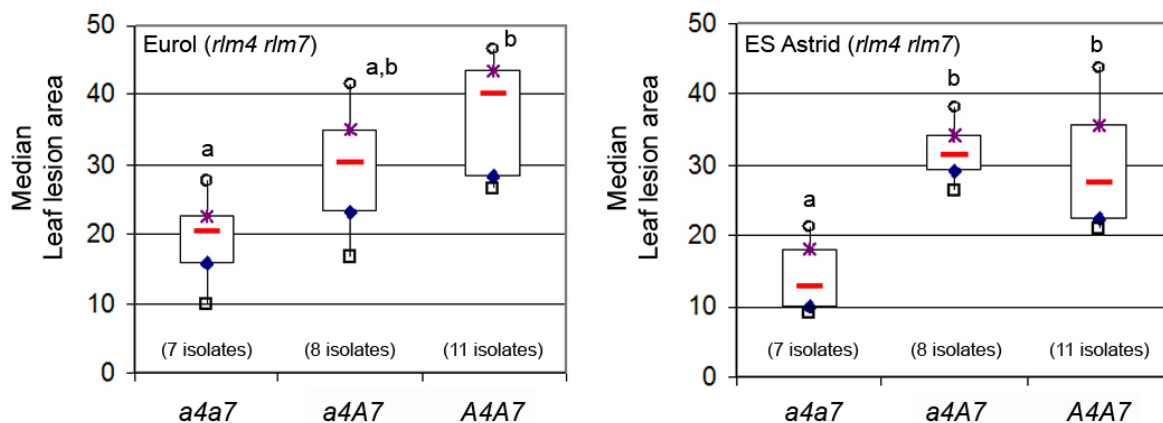


Figure 3: La présence d'AvrLm4-7 entraîne une hausse de la surface des symptômes causés par *L. maculans* sur des cultivars sensibles de *B. napus*.

La souche Nz-T4 (a3a4a7) a été complétée par des allèles fonctionnels d'AvrLm4-7 (a4A7 ou A4A7). Des cotylédons des cultivars compatibles Eurol et ES Astrid ont été inoculés par des transformants ou par la souche sauvage et ont été scannés à 12 jpi (jours post-inoculation), permettant ainsi de mesurer les tailles de lésions foliaires. Les surfaces médianes de symptômes sont représentées sous la forme de « Box-Plot ». La présence d'AvrLm4-7 entraîne une hausse significative de la surface des lésions causées par *L. maculans*.

Adapté de Thomas Mongin (Communication personnelle)

Chez *L. maculans*, les gènes *AvrLm2* et *AvrLm4-7* existent sous diverses formes alléliques et sont donc considérés comme jouant un rôle majeur dans le pouvoir pathogène. Ainsi, *AvrLm2* est toujours présent chez *L. maculans*, sous des formes alléliques permettant ou non sa reconnaissance par *Rlm2* (Ghanbarnia *et al.*, 2014). Chez les populations européennes de *L. maculans*, *AvrLm2* est exclusivement présent sous ses formes alléliques virulentes (Balesdent *et al.*, 2006; Stachowiak *et al.*, 2006). On peut émettre l'hypothèse que la fixation d'un allèle virulent d'*AvrLm2* dans ces populations est liée à une pression de sélection ancienne, *Rlm2* étant le premier gène majeur de résistance contre *L. maculans* à avoir été massivement utilisé dans les années 1970 (Pinochet & Renard, 2012). Dans le cas d'*AvrLm4-7*, la résistance *Rlm4* a été contournée par la fixation d'une mutation ponctuelle sans impact sur la structure de la protéine, également suite à l'utilisation importante et prolongée de cultivars *Rlm4* au champ (Parlange *et al.*, 2009; Pinochet & Renard, 2012; Blondeau *et al.*, 2015). Alors que ce type d'analyse n'a pas été réalisé pour *AvrLm2*, des essais au champ et en conditions contrôlées ont permis de mettre en évidence un fort coût de fitness lié au contournement de *Rlm4* (Huang *et al.*, 2006, 2010). De plus, la complémentation d'une souche a3a7 de *L. maculans* par un allèle fonctionnel d'*AvrLm4-7* entraîne une hausse significative de la surface des symptômes observés après inoculation de *L. maculans* sur un cultivar sensible de *B. napus*, validant ainsi son rôle dans l'agressivité du champignon vis-à-vis du colza (T. Mongin, communication personnelle ; Figure 3).

L'analyse d'une grande collection de souches a mis en évidence que similairement à *AvrLm2*, *AvrLm3* est toujours présent chez *L. maculans* (cf. Chapitre 2). Chez les souches virulentes vis-à-vis de *Rlm3* et *Rlm7*, certaines mutations ponctuelles dans la séquence d'*AvrLm3* permettent d'échapper à la reconnaissance par *Rlm3*. Toutefois, ces mutations n'entraînent pas l'apparition de codons stop prématurés ou la disruption de ponts disulfures. La protéine effectrice codée par *AvrLm3* est donc supposée être toujours fonctionnelle quel que soit le phénotype observé.

Les résultats obtenus lors de cette thèse m'ont également permis de valider l'importance d'*AvrLm3* dans le pouvoir pathogène de *L. maculans*, par le « silencing » d'*AvrLm3*, qui entraîne une diminution de la surface des symptômes causés par *L. maculans* sur des cultivars sensibles de colza. De plus, certaines souches présentant un fort niveau de silencing

d'*AvrLm3* montraient des défauts généraux de pouvoir pathogène (absence totale de symptômes sur cultivar sensible), qui nous avaient conduit à les exclure des analyses. Toutefois ce défaut général de pathogénie pourrait être la conséquence de l'absence d'expression d'*AvrLm3* chez ces souches. Des données similaires avaient été obtenues pour *AvrLm2*, pour lequel le silencing du gène pouvait causer des défauts de croissance végétative (I. Fudal et B. Profotova, non publié).

La présence systématique d'*AvrLm3* dans les populations de *L. maculans* contraste avec sa localisation en extrémité télomérique de chromosome. En effet, chez *M. oryzae* la localisation télomérique de nombreux effecteurs semble jouer un rôle dans leur rapide adaptation aux résistances variétales (Farman, 2007; Chuma *et al.*, 2011b). Il a été montré que ces régions sont soumises à de nombreux réarrangements chromosomiques (translocation, délétion,...) lors de la méiose (Chuma *et al.*, 2011a). De plus, la perte spontanée de gènes situés dans ces régions a également été observée en condition de culture *in vitro* (Orbach *et al.*, 2000), ce que nous n'avons jamais observé pour *AvrLm3*.

Si le rôle d'*AvrLm3* dans la fitness fongique a pu être démontré suite à son silencing chez une souche avirulente vis-à-vis de *Rlm3*, aucun effet n'a été observé suite à son silencing chez une souche possédant *AvrLm4-7*, ou possédant un allèle virulent d'*AvrLm3* (Chapitre 2). Il est toutefois possible que chez les souches a3A7, la présence d'*AvrLm4-7* compense l'absence d'*AvrLm3* lors de l'infection. Par ailleurs, la souche Nz-T4, virulente vis-à-vis de *Rlm3* et *Rlm7*, chez qui *AvrLm3* a été silencé, a été isolée sur rutabaga et elle est connue pour être peu agressive sur colza. Il reste à évaluer si, chez cette souche, les cinq acides aminés polymorphes par rapport à l'allèle avirulent de référence sont responsables du défaut de fitness observé sur colza. Cela pourrait indiquer que des mutations dans la séquence d'*AvrLm3* altèreraient au moins en partie sa fonction effectrice.

Au-delà de la présence systématique d'*AvrLm3* malgré un environnement génomique défavorable, le mécanisme évolutif complexe ayant conduit à la suppression par *AvrLm4-7* de la reconnaissance d'*AvrLm3* suggère l'importance pour *L. maculans* de « protéger » *AvrLm3* de la pression de sélection exercée par *Rlm3* et donc son importance dans le pouvoir pathogène. Chez *F. oxysporum*, il a été démontré que la présence des protéines d'avirulence

Avr2 et Avr3 est nécessaire pour l'expression des symptômes de la maladie sur des variétés sensibles de tomate (Rep *et al.*, 2005; Houterman *et al.*, 2009). De même, chez *X. campestris* pv. *vesicatoria*, un fort coût de fitness est associé à la perte d'AvrBs1 (Wichmann & Bergelson, 2004). Avr1 et AvrBsT, permettant la suppression de la reconnaissance d'Avr2, Avr3 et AvrBs1, ne semblent pas contribuer au pouvoir pathogène (Houterman *et al.*, 2008; Szczesny *et al.*, 2010). On peut donc supposer que ces effecteurs interviennent indirectement dans le pouvoir pathogène, en limitant la pression de sélection exercée sur des effecteurs indispensables à la colonisation de la plante hôte. Ces données contrastent avec ce que l'on observe chez *L. maculans*, puisque AvrLm4-7 joue aussi un rôle significatif dans la fitness fongique (Figure 3) (Huang *et al.*, 2006, 2010).

Dans un contexte de pression de sélection exercé de façon massive et continue par *Rlm3* et *Rlm7*, nous observons la mise en place de mécanismes de compensation complexes et originaux. En effet, plus de la moitié des souches « double virulentes » caractérisées lors de cette thèse possèdent un allèle avirulent d'*AvrLm3* (cf. Chapitre 2). Chez ces souches, ce sont des mutations ponctuelles dans la séquence d'*AvrLm4-7* qui permettent d'échapper à la reconnaissance par *Rlm3* tout en supprimant également la reconnaissance d'*AvrLm4-7* par *Rlm7*. Ce mécanisme de compensation permettant à *L. maculans* de contourner simultanément deux gènes de résistance distincts sans impact potentiel sur la fonction effectrice des gènes d'avirulence correspondants illustre l'importance d'*AvrLm3* et d'*AvrLm4-7* dans la fitness fongique. Dans un contexte où les cultivars possédant *Rlm3* et *Rlm7* en pyramidage sont de plus en plus présents au champ, ces allèles constituent un avantage compétitif aux souches de *L. maculans* les possédants et pourraient à l'avenir se fixer dans les populations. La mise en place d'un suivi des populations de *L. maculans* dans les années à venir permettra d'évaluer l'évolution de la fréquence de ces allèles.

Bien qu'aucune perte d'agressivité n'ai été observée suite au silencing d'*AvrLm3* chez les souches v23.1.3 (a3A7) et Nz-T4 (a3a7), il est important de noter que chez ces souches, nous n'avons pu obtenir que des niveaux de silencing du gène *AvrLm3* modérés par rapport à la souche avirulente vis-à-vis de *Rlm3* (20 % et 30 % d'expression résiduelle maximale). *AvrLm3* étant l'un des gènes les plus exprimés dans les phases précoces de l'infection de *B. napus* par *L. maculans*, il se peut que la quantité de protéine effectrice produite chez ces souches

soit suffisante pour avoir un effet dans le processus infectieux. De plus, malgré l'analyse d'une grande collection de souches de *L. maculans*, nous n'avons pas pu identifier de souches pour lesquelles *AvrLm3* est délété ou présente un allèle non fonctionnel. Cela rendait donc impossible l'évaluation du rôle d'*AvrLm3* dans la fitness par complémentation de ce gène, comme cela a été fait pour *AvrLm4-7* (Figure 3).

Une alternative à la technique du silencing pour évaluer l'impact de l'absence d'un effecteur sur le pouvoir pathogène serait l'inactivation des gènes codant pour des effecteurs par Knock Out (KO) (Houterman *et al.*, 2009; Doehlemann *et al.*, 2011). La localisation des effecteurs de *L. maculans* dans des isochores AT, principalement composés d'une mosaïque d'éléments transposables tronqués et dégénérés par le mécanisme de RIP empêche néanmoins l'utilisation de cette technique pour cet organisme. Le KO requiert en effet la présence de grandes régions homologues spécifiques pour permettre la recombinaison de la cassette d'inactivation du gène. Elle n'est donc réalisable que pour les gènes localisés dans les isochores GC du génome (Feng *et al.*, 2014). Toutefois, le développement récent de la technique d'édition génomique appelée CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) pourrait être une méthode permettant l'inactivation des gènes de *L. maculans* situés dans les isochores AT. L'édition génomique par CRISPR-Cas9 a été adaptée à de nombreux modèles biologiques, dont diverses espèces de champignons, ce qui rend envisageable son utilisation chez *L. maculans*. Cette technique permettrait notamment d'évaluer l'impact sur la fitness fongique des mutations ponctuelles observées dans la séquence d'*AvrLm3* et *AvrLm4-7* chez les souches « double virulentes » et potentiellement d'expliquer le défaut de fitness de la souche Nz-T4. La génération de ces allèles mutés permettrait également de valider l'implication de l'ensemble de ces mutations dans la perte de la reconnaissance par Rlm3 ou Rlm7.

Enfin, la production de la protéine *AvrLm3* en système hétérologue dans *Pichia pastoris* est actuellement en cours afin de déterminer la structure tridimensionnelle de la protéine d'avirulence. Il sera donc possible de vérifier si les acides aminés polymorphes identifiés chez les différents allèles d'*AvrLm3* ont ou non un impact majeur sur la structure et la stabilité de la protéine et donc de déterminer si ces isoformes ont la capacité de contribuer à la fitness fongique de *L. maculans*.

Un modèle pour une gestion durable des résistances variétales ?

En 2004, lorsque les premières variétés possédant *Rlm7* ont été déployées au champ, quasiment 100 % des souches européennes étaient avirulentes vis-à-vis de *Rlm7* (Stachowiak *et al.*, 2006 ; Balesdent *et al.*, 2006). Toutefois, le rapide contournement de la résistance *Rlm1*, en seulement trois saisons de culture (Rouxel *et al.*, 2003) et la faible durabilité généralement postulée pour les résistances variétales spécifiques des grandes cultures laissent craindre une faible durabilité de la résistance *Rlm7*. De plus, le suivi de l'évolution moléculaire d'*AvrLm4-7* en condition de pression de sélection *Rlm7* renforcée (monoculture de colza *Rlm7* et absence d'enfouissement des résidus de culture) avait montré la capacité de *L. maculans* à s'adapter rapidement à cette résistance (Daverdin *et al.*, 2012), malgré le coût de fitness associé à la perte de cet effecteur (Figure 3). Or, après dix ans d'utilisation de plus en plus massive de variétés possédant *Rlm7*, ce gène reste globalement efficace pour contrôler le développement de *L. maculans*, malgré des disparités régionales (cf. Introduction générale 4.5). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la plus grande durabilité de *Rlm7* par rapport à celle de *Rlm1*, indépendamment du coût de fitness associé à la virulence. Tout d'abord, ces dix dernières années, les conditions climatiques ont été plutôt défavorables au développement d'épidémies de *L. maculans*. On peut donc supposer que cette faible pression maladie a pu ralentir le contournement de *Rlm7*. Le fond génétique des variétés dans lesquelles ont été introgressés *Rlm1* et *Rlm7* peut également être une explication. En effet, les variétés possédant *Rlm7* semblent également avoir un bon niveau de résistance quantitative, ce qui n'était pas le cas pour les variétés possédant *Rlm1*. Or, il a été montré que l'association de résistances quantitatives et qualitatives peut permettre d'augmenter la durabilité des résistances variétales de *B. napus* contre *L. maculans* (Brun *et al.*, 2010). Enfin, la fréquence d'allèles virulents lors du déploiement des variétés *Rlm7* était très faible (moins de 1%) alors que lorsque la résistance *Rlm1* a été déployée au champ, environ 10% des souches de *L. maculans* étaient déjà virulentes dans les populations. On peut donc supposer que le temps nécessaire à la propagation des allèles virulents vis-à-vis de *Rlm7* a été plus long que lors du contournement de *Rlm1*.

Le suivi de l'évolution des gènes d'avirulence de *L. maculans* sur une parcelle de Grignon en 2012 et 2013 a montré que le contournement de *Rlm7* est actuellement en cours, avec

environ 10 % de souches virulentes sur le site étudié (Chapitre 2). De plus, dans des régions françaises où la culture de colza est très importante, le taux de souches virulentes vis-à-vis de *Rlm7* peut localement dépasser les 50 % (cf. Introduction générale 4.5). Une dynamique inverse est actuellement observée au Canada, suite à l'utilisation massive de variétés possédant *Rlm3*, dans un contexte où les populations de *L. maculans* étaient majoritairement avirulentes vis-à-vis de *Rlm3* et où la fréquence d'*AvrLm4-7* était faible (Dilmaghani *et al.*, 2009). L'analyse des populations de *L. maculans* dans ce pays a mis en évidence que ce contournement résultait de la hausse de la fréquence d'*AvrLm4-7* (Zhang *et al.*, 2015), confirmant l'importance de ce mécanisme évolutif dans le contournement de *Rlm3*.

Dans ce contexte, l'antagonisme entre les phénotypes *AvrLm3* et *AvrLm4-7* apparaît comme une opportunité pour la mise en place de stratégies originales de gestion durable des résistances variétales et pourrait constituer un modèle à portée plus générique si d'autres types d'interaction négative entre gènes d'avirulence sont mis en évidence chez *L. maculans* ou d'autres champignons phytopathogènes à l'avenir. En effet, *AvrLm3*, qui était supposé être totalement absent des populations européennes de *L. maculans*, s'avère en réalité présent dans la quasi-totalité souches françaises (Chapitre 2) et l'on assiste actuellement à une résurgence du phénotype *AvrLm3* suite au contournement de *Rlm7* dans les populations de *L. maculans*. Le pyramidage de gènes majeurs de résistance est souvent proposé comme une méthode efficace pour augmenter la durabilité des résistances variétales (Mundt, 2014). De plus, l'importance d'*AvrLm3* et d'*AvrLm4-7* dans la fitness fongique, associée à la très faible proportion de souches virulentes vis-à-vis des deux gènes *Rlm3* et *Rlm7* dans les populations françaises peut laisser supposer que le pyramidage de *Rlm3* et *Rlm7* dans des variétés de colza peut être un moyen d'augmenter la durabilité des résistances variétales contre cet agent pathogène. Toutefois, l'identification d'allèles d'*AvrLm4-7* permettant d'échapper à la reconnaissance par *Rlm7* tout en maintenant fonctionnelle la suppression de la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3* suggère que la pression de sélection exercée par ces variétés pourrait faire rapidement augmenter la fréquence de ces souches « double virulentes » dans les populations. En effet, pour effectuer son cycle de développement *L. maculans* effectue chaque année sa reproduction sexuée, produisant ainsi une quantité importante de spores pouvant être disséminées sur de grandes distances par le vent. Il est

donc envisageable que dans un contexte de forte pression de sélection *Rlm3* et *Rlm7*, ces allèles se fixent rapidement dans les populations de *L. maculans*, malgré l'existence potentielle d'un coût de fitness lié à ce mécanisme de compensation, diminuant ainsi drastiquement l'efficacité et la durabilité de ces deux gènes majeurs de résistance. Toutefois, le suivi sur plusieurs saisons de culture des populations de *L. maculans* sur plusieurs sites français semble indiquer que la fréquence de souches doubles virulentes reste stable, à une très faible fréquence (<1%).

Bien que la résistance *Rlm3* soit considérée comme inefficace au champ, environ 20 % des variétés cultivées ces dix dernières possèdent ce gène de résistance (X. Pinochet et M.H. Balesdent, communication personnelle). On peut donc supposer que la longue durabilité de la résistance *Rlm7* en comparaison à celle observée pour *Rlm1* résulte au moins en partie de la contre-sélection des souches virulentes de *L. maculans* par ces cultivars. Plus que leur pyramidage dans un même fond génétique, l'alternance spacio-temporelle de variétés *Rlm3* et *Rlm7* semble donc une stratégie pertinente pour la mise en place de méthodes durables de lutte contre *L. maculans*. En effet, elle permettrait la sélection de souches avirulentes vis-à-vis de *Rlm3* sur les variétés de colza *Rlm7*, et inversement. Cela pourrait notamment permettre le maintien des allèles avirulents dans les populations, selon le modèle du « Trench Warfare » (Brown & Tellier, 2011; Tellier *et al.*, 2014). Dans ce contexte, il serait notamment envisageable de « jouer » artificiellement sur les fréquences des allèles avirulents d'*AvrLm3* et *AvrLm4-7* en jouant sur la proportion des variétés *Rlm3* et *Rlm7* au champ.

En Australie, afin de limiter le risque de contournement des résistances variétales de *B. napus* par *L. maculans*, la rotation des gènes de résistances est encouragée par le GRDC (Grain Research & Development Corporation). Cet organisme fournit aux agriculteurs des préconisations (Blackleg Management Guide) pour le choix des variétés de colza, dans l'objectif d'éviter l'utilisation d'une même source de résistance plus de trois années consécutives. L'adaptation de ce dispositif par Terres Innovia, appliqué au cas particulier de *Rlm3* et *Rlm7* rendrait envisageable la mise en place effective de l'alternance de ces deux gènes de résistances au niveau du paysage agricole français. En effet, les préconisations actuellement fournies par Terres Innovia se basent sur une classification de la sensibilité des

variétés de colza à *L. maculans*, de sensible (S) à très peu sensible (TPS). En réalité, les variétés classées TPS correspondent soit à la présence de *Rlm7* dans ces cultivars, soit à un fort niveau de résistance général. Or, le contournement actuel de la résistance *Rlm7* rend obsolète cette classification.

Une stratégie d'alternance spacio-temporelle entre des cultivars possédant *Rlm3* ou *Rlm7* nécessite toutefois un suivi précis de l'évolution des populations de *L. maculans* au champ, notamment de l'apparition de souches virulentes vis-à-vis de *Rlm3* et *Rlm7*. Dans cette optique, Terres Innovia (précédemment CETIOM), a développé des outils moléculaires permettant la détection rapide des allèles avirulents d'*AvrLm4-7* par la méthode HRM (High Resolution Melting) (Carpezat *et al.*, 2014). Le développement de tels outils pour le suivi de l'évolution d'*AvrLm3* est actuellement en cours. Toutefois, il est à noter que l'existence d'allèles d'*AvrLm4-7* responsables de la virulence vis-à-vis de *Rlm3* et *Rlm7* sans modification de la séquence d'*AvrLm3* peut complexifier le développement de tels outils pour le suivi de ce gène. Une expérimentation au champ est actuellement en cours dans l'équipe pour comparer *in situ* l'impact du pyramidage et de l'alternance de *Rlm3* et *Rlm7* sur l'évolution des populations de *L. maculans*, dans le cadre d'un métaprogramme INRA regroupant des équipes travaillant sur l'interaction *B. napus*/*L. maculans*. Ces résultats, en association avec ceux obtenus lors de ce travail de thèse, fourniront des données pour la modélisation de l'évolution d'*AvrLm3* et *AvrLm4-7* dans les populations de *L. maculans*. Ils permettront le développement de stratégies d'utilisation de *Rlm3* et *Rlm7* les plus durables possibles.

Ce système est par ailleurs complexifié par la possibilité qu'*AvrLm9* soit un allèle d'*AvrLm3*. En effet, le gène *AvrLm9* a été identifié à 22,6 cM du gène *AvrLm4-7* (Balesdent *et al.*, 2002), mais de même que pour *AvrLm3*, il n'a pas été possible d'identifier son locus par une approche de clonage positionnel. Une analyse de la fréquence des gènes d'avirulence chez une collection mondiale de souches de *L. maculans* suggère l'absence de souches simultanément avirulentes vis-à-vis de *Rlm7* et *Rlm9* (Dilmaghani *et al.*, 2009), indiquant que ce gène pourrait être impliqué dans le même mécanisme que celui existant entre *AvrLm3* et *AvrLm4-7*. Le séquençage d'*AvrLm3* chez des souches A3a9, a3A9 et A3A9 est actuellement en cours et permettra d'identifier des allèles potentiellement liés à l'avirulence vis-à-vis de

Rlm9. Si tel était le cas, la mise en place d'un système d'alternance encore plus complexe, faisait intervenir trois gènes majeurs de résistance (*Rlm3*, *Rlm7* et *Rlm9*) serait envisageable.

Un mécanisme courant dans le contournement des résistances variétales ?

Ces travaux de thèse ont permis d'améliorer la compréhension d'un mécanisme évolutif original, par lequel la présence d'*AvrLm4-7* inhibe spécifiquement la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3* chez *L. maculans*. Un tel mécanisme semble rare, et a uniquement été décrits chez deux autres espèces d'agents pathogènes, *F. oxysporum* et *X. campestris* pv. *vesicatora* (Houterman *et al.*, 2008; Szczesny *et al.*, 2010). On peut toutefois postuler qu'un tel mécanisme existe chez d'autres espèces, mais n'ait pas encore été identifié. En effet, malgré le nombre croissant de répertoires de gènes codants pour des effecteurs disponible, un faible nombre d'entre eux a été fonctionnellement caractérisé, notamment chez les espèces fongiques. En particulier, la quantité de gènes Avr caractérisés chez les champignons reste globalement faible. A l'exception de *M. oryzae* et *L. maculans*, il y a peu d'espèces pour lesquelles nous avons accès à suffisamment de gènes Avr effectivement soumis à des pressions de sélection en conditions réelles de culture, pour pouvoir identifier ce type d'interférence complexe.

Dans ce contexte, l'analyse approfondie de l'antagonisme entre *AvrLm3* et *AvrLm4-7*, et potentiellement *AvrLm9*, peut fournir un modèle généralisable à d'autres organismes, pour une meilleure connaissance des processus évolutifs auxquels sont soumis les agents pathogènes, et ainsi permettre la mise en place de solutions durables pour lutter contre les dégâts causés par les agents pathogènes des plantes.

Annexes

Annexe I : Phoma du colza : recyclage du gène de résistance

Cet article est paru en mai 2015 dans la revue « Phytoma » simultanément à l'article « Résistance du colza au phoma : où en est l'efficacité de *Rlm7* ? », dans le cadre d'un dossier traitant du colza.

Il vulgarise les données obtenues sur l'antagonisme entre les phénotypes AvrLm3 et AvrLm4-7 chez *Leptosphaeria maculans*, à l'attention des acteurs du monde agricole.



Phoma du colza : recyclage du gène de résistance Rlm3

Des souches de phoma avirulentes vis-à-vis du gène de résistance spécifique du colza Rlm3 connaissent une résurgence liée au contournement du gène Rlm7. Comment exploiter ce phénomène ?

CLÉMENCE PLISSONNEAU*, GUILLAUME DAVERDIN*, LAURENT COUDARD*, BÉNÉDICTE OLLIVIER*, THIERRY ROUXEL* ET MARIE-HÉLÈNE BALESSENT*

Le gène de résistance Rlm7 du colza est menacé de contournement par l'agent du phoma. Soit. Mais les souches de phoma qui contournent la résistance due à Rlm7 « buttent » contre une autre résistance plus ancienne, due au gène Rlm3. Intéressant...

Virulence vis-à-vis des gènes Rlm7 et Rlm3, quelle relation ? Rappel sur Rlm7

Les hybrides de colza portant le gène de résistance spécifique Rlm7 ont connu un succès croissant depuis dix ans. En effet, face à une population de phoma composée à plus de 99,5% de souches avirulentes sur Rlm7 en 2000 (Figure 1), le contrôle de la maladie par ce gène de résistance a été particulièrement efficace.

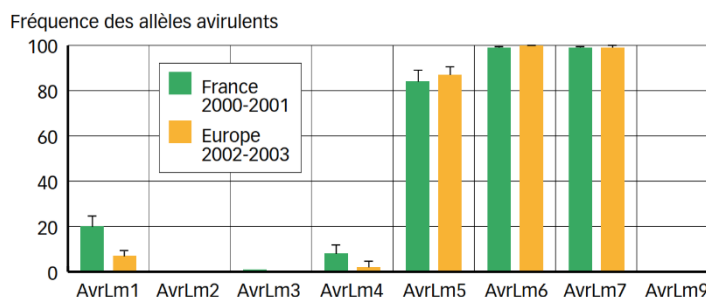
Nous l'avons vu dans l'article p. 20, des souches capables de contourner la résistance Rlm7 commencent à apparaître, mais ce contournement a été plus lent à survenir que ceux précédemment observés pour Rlm1 en France (Rouxel *et al.*, 2003), ou pour la résistance « Surpass » en Australie (Sprague *et al.*, 2006).

Dès le début, une relation inverse

Lors de la première analyse à grande échelle des populations françaises de phoma, en 2000-2001, une seule souche sur plus de

Fig. 1 : Fréquences alléliques des différents gènes d'avirulence dans les populations françaises ou européennes de phoma, avant l'utilisation de la résistance spécifique Rlm7

Les valeurs représentent les moyennes de vingt et six sites d'échantillonnage en France et en Europe, respectivement. Les barres d'erreur représentent l'écart type. Adapté de Balesdent *et al.*, (2006) et Stachowiack *et al.*, (2006).



1 700 était virulente sur Rlm7. Curieusement, cette souche était également la seule souche avirulente sur les variétés portant le gène de résistance spécifique Rlm3 (Balesdent *et al.*, 2006).

Depuis l'introduction de Rlm7 en France, les analyses de populations tendent à confirmer une relation inverse quasi systématique entre les aptitudes des souches à attaquer les variétés Rlm7 et les variétés Rlm3.

Les travaux réalisés par notre équipe viennent de montrer que les gènes d'avirulence

correspondants du champignon, AvrLm7 et AvrLm3, sont deux gènes distincts.

La présence dans une souche du gène d'avirulence AvrLm7 suffit à masquer la présence du gène AvrLm3, mais dès lors que le gène AvrLm7 est inactivé dans une souche virulente vis-à-vis de Rlm7, l'interaction entre AvrLm3 et Rlm3 est rétablie, conduisant à la résistance des génotypes de colza Rlm3 vis-à-vis de ces souches.

Cet article fait le point de l'état des connaissances sur cette « interaction négative » entre

RÉSUMÉ

† **CONTEXTE** - Après dix ans d'utilisation du gène de résistance spécifique Rlm7 chez le colza, les populations françaises de phoma évoluent progressivement vers la virulence. De façon inattendue, l'apparition de souches capables de contourner Rlm7 s'accompagne de la réapparition de souches avirulentes vis-à-vis du gène Rlm3, estimé inutile vis-à-vis des populations de phoma présentes en 2000.

† **ÉTUDE** - La nature de cette interaction « négative » entre les avirulences vis-à-vis

de Rlm3 et Rlm7 a été étudiée par l'analyse de plus de 2 500 souches puis confirmée au niveau moléculaire.

† **RÉSULTATS** - L'état actuel des populations françaises de phoma pour le gène d'avirulence AvrLm3 est donc connu, et la nature de cette interaction précisée.

† **MOTS-CLÉS** - Colza, phoma, *Phoma lingam*, *Leptosphaeria maculans*, résistance, gène Rlm3, gène Rlm7, interaction négative, virulence, avirulence.

SUMMARY

† **ABSTRACT** - After 10 years of deployment of the resistance gene Rlm7 in oilseed rape fields, french populations of *Leptosphaeria maculans* (phoma) have started to evolve towards virulence.

Surprisingly, the selection of isolates virulent towards Rlm7 correlated with the reappearance of isolates avirulent towards Rlm3, which was considered as inefficient to control european populations of *L. maculans* in 2000.

This paper reports on the negative interaction between the avirulence phenotypes towards Rlm3 and Rlm7 and describes the avirulence phenotypes of current french field populations.

† **KEY-WORDS** - Oilseed rape, France, phoma (stem canker), *Phoma lingam*, *Leptosphaeria maculans*, resistance, gene Rlm7, gene Rlm3, negative interaction, virulence, avirulence.



Tableau 1 : Caractérisation de populations de phoma (*Leptosphaeria maculans*) collectées en 2013 dans onze départements français, pour leur virulence vis-à-vis des gènes de résistance du colza Rlm3 et Rlm7

Département	Nombre de souches caractérisées	Phénotypes ⁽¹⁾		
		a3A7	A3a7	a3a7
72	51	29	22	0
18	91	55	36	0
28	92	57	34	1
76	101	97	3	1
54	71	62	9	0
52	95	91	4	0
85	95	78	16	1
38	78	65	13	0
80	97	83	13	1
35	100	100	0	0
78	189	166	22	1
Total (fréquence)	1 060	883 (83,3 %)	172 (16,23 %)	5 (0,47 %)

(1) a3A7 : les souches sont virulentes sur Rlm3 et avirulentes sur Rlm7 ; A3a7, les souches sont avirulentes sur Rlm3 et virulentes sur Rlm7 ; a3a7, les souches sont virulentes sur Rlm3 et Rlm7.

les gènes d'avirulence AvrLm3 et AvrLm7 chez le phoma.

Analyse d'une population de phoma contournant Rlm7 Le constat : deux virulences quasiment incompatibles

Lors de l'expérimentation réalisée entre 2004 et 2008 sur le site de Grignon sous conditions très favorables au contournement de la résistance Rlm7 (Daverdin *et al.*, 2012 ; article précédent), nous avons collecté au fil des ans près de 1 800 souches, dont 1 497 ont été phénotypées pour leur virulence vis-à-vis de Rlm3.

Les 705 souches avirulentes vis-à-vis de Rlm7 (« AvrLm7 ») sont virulentes sur Rlm3. Sur les 792 souches virulentes sur Rlm7 (« avrLm7 ») 778 sont avirulentes vis-à-vis de Rlm3. Seules 14 souches sont virulentes sur Rlm3 et Rlm7 (0,9% de la collection analysée) (Figure 2).

Quelles hypothèses explicatives ?

Compte tenu de la très grande diversité des événements moléculaires responsables de la virulence vis-à-vis de Rlm7, se traduisant principalement par une inactivation d'AvrLm7 (Daverdin *et al.*, 2012 ; article précédent), nous avons écarté l'hypothèse que l'avirulence vis-à-vis de Rlm3 observée chez les souches avrLm7 pouvait être due à un allèle particulier du gène AvrLm7. C'est plutôt l'hypothèse d'une interaction moléculaire entre les gènes AvrLm3 et

AvrLm7, ou entre les protéines d'avirulence produites par ces gènes, qui a été proposée pour expliquer la relation inverse entre les phénotypes avirulents vis-à-vis de Rlm3 et Rlm7, et donc la réapparition de souches avirulentes vis-à-vis de Rlm3 sous pression de sélection Rlm7.

Validation de l'interaction négative AvrLm3/AvrLm7 Expérimentation réalisée

Pour valider cette hypothèse d'interaction moléculaire, nous avons exploité le fait que le gène AvrLm7 avait été cloné (Parlange *et al.*, 2009).

En effet, nous avons pu réintroduire AvrLm7 par transgénése dans deux souches de phoma ayant perdu la fonctionnalité du gène

AvrLm7 (deux événements de mutation différents, souches issues de la parcelle expérimentale de Grignon), donc présentant un phénotype virulent sur Rlm7 mais avirulent sur Rlm3.

Hypothèse « interaction moléculaire » validée

Pour les deux souches étudiées, l'addition d'une copie fonctionnelle d'AvrLm7 non seulement restaure, comme attendu, le phénotype avirulent sur Rlm7, mais également supprime le phénotype avirulent sur Rlm3 (Figure 3).

Cette expérience montre que la présence d'une copie fonctionnelle d'AvrLm7 suffit pour supprimer la reconnaissance d'AvrLm3 par Rlm3. En conséquence, et compte tenu des études de populations menées sur le site

de Grignon montrant l'association quasi systématique entre virulence sur Rlm7 et avirulence sur Rlm3, il est postulé que :

– les populations de phoma présentes en France avant l'introduction de Rlm7 possédaient probablement à fréquence très élevée le gène AvrLm3...

– mais le phénotype avirulent des souches était masqué par la présence d'AvrLm7.

Confirmation de cette relation négative à l'échelle du territoire

L'échantillonnage de la population de phoma réalisée en France en 2013 (article précédent) confirme les observations réalisées en 2004-2008 sur le site de Grignon. En effet plus de 1 000 souches isolées en 2013 sur onze sites ont été phénotypées par test d'inoculation sur des génotypes portant Rlm7 ou Rlm3.

Comme observé sur la parcelle expérimentale de Grignon, plus de 99,5% des souches sont soit avirulentes sur Rlm7, soit avirulentes sur Rlm3.

Seulement cinq souches (< 0,5%), provenant chacune d'un site différent, ont été identifiées comme virulentes sur les génotypes portant Rlm3 ou Rlm7 (Tableau 1).

Comment fonctionne cette interaction négative ?

AvrLm3, un gène d'avirulence classique

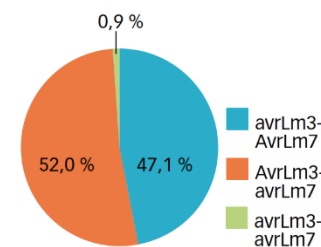
Récemment, le gène d'avirulence AvrLm3 a été cloné (Plissonneau *et al.*, soumis).

Ce gène présente toutes les caractéristiques classiques des gènes d'avirulence du phoma : il code pour une très petite protéine (160 acides aminés), très riche en cystéines (dix résidus cystéine dans la protéine mature). Or, les cystéines sont probablement impliquées dans des liaisons disulfures au sein de la protéine, lui assurant une structure globulaire et une forte stabilité, comme

Plus de 98%
des souches
virulentes
vis-à-vis de
Rlm7 sont
avirulentes
sur Rlm3.

Fig. 2 : Phoma, virulence « au choix »

Fréquence des divers phénotypes d'avirulence vis-à-vis de Rlm3 et Rlm7 au sein d'une population de phoma soumise à une forte pression de sélection Rlm7 (1497 souches analysées).





déjà démontré pour la protéine AvrLm7 (Blondeau *et al.*, soumis).

Tout comme les autres protéines d'avirulence connues de *L. maculans*, cette protéine est prédite comme étant sécrétée hors de la cellule fongique, condition nécessaire pour atteindre sa cible végétale.

Le profil d'expression du gène AvrLm3 a également été étudié : ce gène est fortement surexprimé dans les phases précoces de l'infection du colza, démontrant comme pour les autres gènes d'avirulence du phoma son rôle dans l'établissement de l'infection (Rouxel *et al.*, 2011).

L'interaction négative entre AvrLm3 et AvrLm7 serait indirecte

Mais surtout, cette analyse a révélé qu'AvrLm3 est fortement exprimé même dans les souches de phénotype virulent sur Rlm3 (phénotype résultant de la présence du gène AvrLm7).

Autrement dit, l'interaction négative entre AvrLm3 et AvrLm7 n'est pas due à un effet de la présence du gène AvrLm7 sur la régulation de l'expression d'AvrLm3.

Il ne semble pas non plus y avoir d'interaction physique directe entre les deux protéines d'avirulence (Plissonneau *et al.*, soumis).

Nous nous orientons donc vers l'hypothèse d'une interaction indirecte, faisant intervenir les protéines végétales cibles de ces gènes d'avirulence.

Analyse des populations mondiales de phoma

Disposant de la séquence du gène AvrLm3, nous avons analysé par PCR la présence/absence du gène dans les populations mondiales de phoma.

Sur plus de 760 souches ainsi analysées, seulement sept ne possèdent pas AvrLm3.

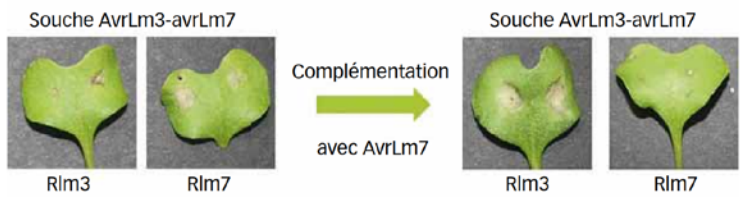


▲ Pour mener cette étude, les chercheurs ont analysé plus de 2500 souches de phoma récoltées sur colza en France, ainsi que plus de 760 souches récoltées ailleurs dans le monde (« populations mondiales ») sur colza ou autres crucifères, moutarde notamment.

Fig. 3 : Démonstration moléculaire de l'interaction à effet antagoniste entre les gènes d'avirulence AvrLm3 et AvrLm7 chez *Leptosphaeria maculans*

À gauche, une souche naturelle est inoculée sur des génotypes de colza Rlm3 et Rlm7, montrant le phénotype avirulent sur Rlm3 et virulent sur Rlm7.

À droite, après complémentation de cette souche avec un allèle fonctionnel avirulent du gène AvrLm7, les transformants inoculés sur les mêmes génotypes montrent un phénotype virulent sur Rlm3 et avirulent sur Rlm7.



Ces souches présentent la particularité d'avoir été isolées sur moutarde, et n'ont en fait pas la capacité de causer de symptômes sur colza. L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle important du gène AvrLm3 pour la pathogenèse du champignon.

Discussion-conclusions

Un gène non pas absent, mais masqué par un autre

L'analyse des populations de phoma sélectionnées suite à l'introduction du gène de résistance Rlm7 dans le colza montre que l'acquisition de la virulence AvrLm7 s'accompagne systématiquement de la restauration du phénotype avirulent sur Rlm3.

Ce phénomène résulte du masquage de la reconnaissance AvrLm3-Rlm3 par le gène

AvrLm7, malgré la présence systématique du gène AvrLm3 dans les populations de phoma.

Ce n'est qu'après pression de sélection Rlm7, conduisant majoritairement à la perte ou à l'inactivation d'AvrLm7, que le phénotype avirulent sur Rlm3 est révélé.

Ce type d'interaction a été très rarement décrit chez les champignons pathogènes, avec un seul cas similaire identifié chez *Fusarium oxysporum* sur la tomate (Houterman *et al.*, 2008).

Le gène AvrLm3 a probablement une fonction biologique importante.

Une interaction négative... à exploiter positivement !

Bien que le mécanisme moléculaire ne soit pas encore élucidé, cette interaction négative offre des perspectives très intéressantes et originales en matière de gestion des résistances Rlm3 et Rlm7.

En effet, non seulement il est envisageable de réutiliser la résistance Rlm3 pour contrôler la maladie dans les situations où Rlm7 serait totalement contourné, mais on peut aussi imaginer des stratégies d'alternance des génotypes Rlm3 et Rlm7, afin de contre-sélectionner à la saison « n+1 » les souches virulentes sélectionnées l'année « n » sur l'une des deux sources de résistance.

Cette stratégie d'alternance devrait accroître la durabilité de la résistance Rlm7.

Peut-être déjà exploitée « inconsciemment »

C'est d'ailleurs ce qui a pu se passer dans la pratique de façon non intentionnelle. En effet, la plupart des variétés commercialisées dans les années 1990 et portant Rlm1, comme Doublol, Maxol, Vivol, Capitol



ou Columbus, portaient également Rlm3. Environ 20% de variétés de colza inscrites en France possèdent le gène de résistance Rlm3 (Pinochet *et al.*, 2009).

Ainsi, les préconisations d'alternance entre variétés avec résistance spécifique efficace (Rlm7) et les variétés TPS (très peu sensibles au phoma) sans résistance spécifique ont pu conduire à des alternances Rlm7-Rlm3, donc contribuer au maintien des souches virulentes avrLm7 à des fréquences assez faibles jusque très récemment.

AvrLm3, gène utile au champignon en l'absence de colza résistant ?

AvrLm3 possède les caractères classiques des gènes d'avirulence de *L. maculans*, considérés comme des effecteurs de la pathogénèse (leur présence chez le champignon favorise leur aptitude à coloniser la plante et compléter leur cycle infectieux tant qu'un gène de résistance spécifique ne leur est pas opposé ;

Rouxel *et al.*, 2011). De plus, étant présent chez toutes les souches de phoma isolées de colza et analysées à ce jour, AvrLm3 a probablement une fonction biologique importante pour le champignon et l'on peut postuler qu'il lui sera difficile de se débarrasser des deux gènes AvrLm7 et AvrLm3.

La course aux armements continue

Cette interaction entre les deux gènes AvrLm3 et AvrLm7 peut être considérée comme une illustration de la « course aux armements » entre les plantes et les agents pathogènes, où des plantes résistantes sont sélectionnées, induisant en retour une sélection de souches capables de contourner ces résistances et ainsi de suite.

La sélection de souches possédant AvrLm7 a pu être par le passé un moyen parcimonieux et efficace pour le champignon de masquer sa présence dans les variétés de colza portant Rlm3.

La question est de savoir comment les souches vont évoluer lorsque les deux gènes de résistance seront présents dans les mêmes variétés, ou utilisées de façon alternée dans les rotations. Autrement dit : quel sera le prochain épisode de la « course aux armements » ?

Des études à la fois biologiques et de modélisation sont en cours dans le cadre du metaprogramme Inra-SMaCH « K-Masstec » et du programme CTPS « Icoscop » pour répondre à ces questions. □

REMERCIEMENTS Ce travail a bénéficié d'un soutien financier du CTPS (Projet Icoscop 2012-2015) de l'INRA (Metaprogramme SMaCH K-masstec). Les auteurs remercient Loïc Le Meur (InVivo AgroSolutions) et le réseau de coopératives InVivo AgroSolutions pour leur contribution aux échantillonnages de populations de phoma en 2013, ainsi que le Cetiom pour leur contribution à la caractérisation des populations des sites de Grignon et Rennes 2013.

POUR EN SAVOIR PLUS

AUTEURS : *C. PLISSONNEAU, *G. DAVERDIN, *L. COUDARD, *B. OLLIVIER, *T. ROUXEL ET *M.-H. BALES-
DENT, Inra, UMR 1290 Bioger 78850 Thiverval-Grignon.

CONTACT : marie-helene.bales-
dent@versailles.inra.fr

LIENS UTILES : www.smach.inra.fr/
Toutes-les-actualites/seminaire-PRE-
SUME-2014

BIBLIOGRAPHIE : - Balesdent MH,
Louvard K., Pinochet X., Rouxel T.
(2006). A large-scale survey of races of
Leptosphaeria maculans occurring on
oilseed rape in France. Eur J Plant Pathol
114 : 53-65.

- Blondeau K., Blaise F., Graille M., Kale S.
D., Juliette J., Ollivier B., Labarde A., Lazar
N., Daverdin G., Balesdent M.-H., Choi D.

H. Y., Tyler B. M., Rouxel T., van Tilbeurgh
H., Fudal I., (soumis). Crystal structure of
the effector AvrLm4-7 of *Leptosphaeria
maculans* reveals insights into its trans-
location into plant cell and recognition by
resistance proteins. Plant J.

- Daverdin G., Rouxel T., Gout L., Aubertot
J.-N., Fudal I., Meyer M., Parlange F., Car-
pezat J., Balesdent M.-H. (2012). Genome
structure and reproductive behaviour
influence the evolutionary potential of a
fungal phytopathogen. PLoS Pathog 8 :
e1003020.

- Houterman P.M., Cornelissen B. J. C., Rep
M. 2008. Suppression of plant resistance
gene-based immunity by a fungal effector.
PloS Pathog 4 : e1000061.

- Pinochet X., Balesdent M.-H., Rouxel T.,
Brun H., Delourme R. (2009). Méthodes
d'évaluation variétale vis-à-vis du phoma

du colza : où en sommes-nous ? AFPP –
9^e conférence internationale sur les mala-
dies des plantes, Tours, 8-9 décembre 2009.

- Plissonneau C., Daverdin G., Ollivier
B., Blaise F., Degrave A., Fudal I., Rouxel
T., Balesdent M.-H. (soumis). A game of
hide and seek : the complex interplay
between the avirulence genes AvrLm4-7
and AvrLm3 in *Leptosphaeria maculans*.
New Phytol.

- Rouxel T., Penaud A., Pinochet X., Brun H.,
Gout L., Delourme R., Schmit J., Balesdent
M.-H. (2003). A ten-year survey of popula-
tions of *Leptosphaeria maculans* in France
indicates a rapid adaptation towards the
Rlm1 resistance gene in oilseed rape. Eur
J Plant Pathol 109 : 871-881.

- Rouxel T., Grandaubert J., Hane J. K.,
Hoede C., van de Wouw A. P., Couloux
A., Dominguez V., Anthouard V., Bally P.,

Bourras S., *et al.*, 2011. Effector diversifi-
cation within compartments of the *Lep-
tosphaeria maculans* genome affected by
Repeat-Induced Point mutations. Nature
Communications 2 : 202.

- Sprague S. J., Balesdent M.-H., Brun H.,
Hayden H. L., Marcroft S. J., Pinochet X.,
Rouxel T., Howlett B. J. (2006). Major gene
resistance in Brassica napus (oilseed rape)
is overcome by changes in virulence of
populations of *Leptosphaeria maculans*
in France and Australia. Eur J Plant Pa-
thol 114 : 33-40.

- Stachowiak A., Olechnowicz J., Jedryczka
M., Rouxel T., Balesdent M.-H., Happstadus
I., Gladders P., Latunde-Dada A., Evans N.
2006. Frequency of avirulence alleles in
field populations of *Leptosphaeria ma-
culans* in Europe. Eur J Plant Pathol 114 :
67-75.

Annexe II : Poster

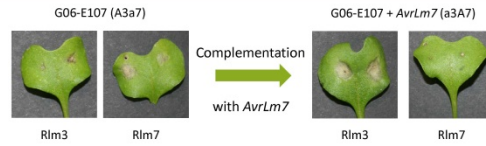
J'ai présenté le poster "Analysis of the interaction between the avirulence genes AvrLm3 and AvrLm7 of the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*" lors du congrès "Fungal Genetics", qui s'est déroulé du 17 au 22 Mars 2015, en Californie.



1. Background

Leptosphaeria maculans is the ascomycete responsible for stem canker, one of the most damaging disease on *Brassica napus*. Genetic control is the major method to limit this disease but pathogen population can quickly overcome R genes. As an example, the resistance gene *Rlm1* was effective only a few years before the majority of isolates overcame the resistance. We identified a negative interaction between the phenotypes of two avirulence genes of *L. maculans* : *AvrLm3* and *AvrLm4-7*. The phenotype *AvrLm3* is hidden when the fungus possesses a functional allele of the *AvrLm4-7* gene. This interaction offers great perspectives for sustainable management of genetic resistances, especially in a context where the *Rlm7* resistance begins to be overwhelmed in field populations. However, the molecular mechanism is still unknown.

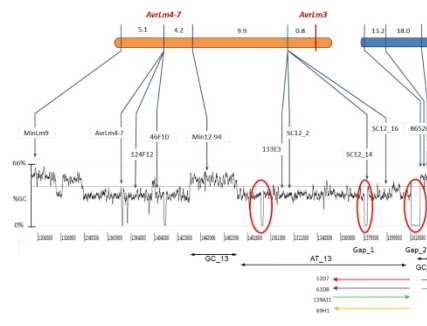
2. Inverse relationship between avirulence phenotypes



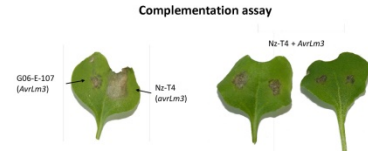
Complementation of an A3a7 isolate with *AvrLm7* :
 → Avirulence towards *Rlm7* cultivars
 → Loss of the avirulence towards *Rlm3*

***AvrLm7* suppresses the *Rlm3*-mediated resistance**

3. Identification of *AvrLm3*

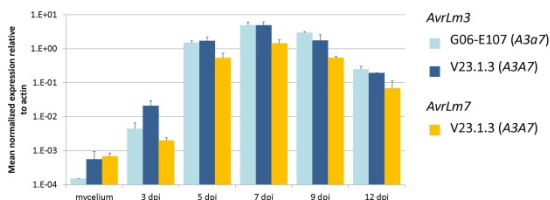


- Genetic mapping of *AvrLm3* :
 - Genetically linked to *AvrLm7*
 - Localized in a TE-rich, subtelomeric region
 - Several gaps in the reference genome of *L. maculans* in that region
- BAC clone sequencing and RNA-seq mapping
 - 6 BAC clones identified in the region of *AvrLm3*
 - Sequencing and *de novo* assembly of the BAC clones
 - RNA-seq mapping on BACs revealed a candidate SSP in a 11kb sequence absent from the reference sequence assembly



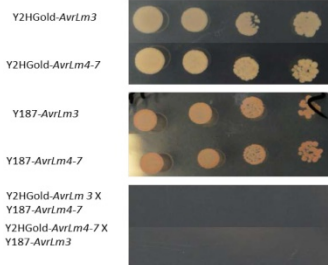
- AvrLm3* characteristics :**
- 10th most expressed gene of *L. maculans* at early infection stage
 - Small secreted, cysteine-rich, protein of 160 amino acids
 - No homologies with known proteins

4. *AvrLm3* and *AvrLm7* expression profile



Similar expression profiles for *AvrLm3* and *AvrLm7*
AvrLm7 does not suppress *AvrLm3* expression

5. Absence of physical interaction



***AvrLm3* and *AvrLm7* proteins do not form an heterodimer in Yeast two-Hybrid heterolog system**

6. Alleles frequencies in field population

Phenotype	2000 France	2012 Grignon	2013 Grignon
a3a7	99.5 %	90.2%	90%
A3a7	0.5%	9.8%	10%
a3a7	0.05%	0%	0.05%

Increase of isolates virulent towards *Rlm7* :
 → Appearance of isolates avirulent towards *Rlm3*
 → Very low frequency of isolates virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7*

Analysis of a worldwide collection of *L. maculans* isolates :
 → 100% of the isolates display a copy of *AvrLm3*
 → a3a7 isolates display non synonymous SNPs in the coding sequence

High impact of *AvrLm3* in the fungal fitness ?

7. Conclusion and perspectives

Negative relationship between *AvrLm3* and *AvrLm7* phenotypes

- *AvrLm7* suppresses the *Rlm3*-mediated resistance in *B. napus*
- Cloning of the 1st telomeric avirulence gene of *L. maculans*, encoding for a cysteine rich SSP
- *AvrLm3* expression is not modified by the presence of *AvrLm7*
- No direct interaction between *AvrLm3* and *AvrLm7*

Deciphering the interaction between *AvrLm3* and *AvrLm7*

- Are both proteins co-localized ? *transient expression in tobacco*
- What are the plant targets of *AvrLm3* and *AvrLm7* ? *Y2H screen, RNA-seq, pull down*

Opportunity for increasing the durability of resistance genes

- Fitness cost associated to virulence against both *Rlm3* and *Rlm7* cultivars ? *Pathogenicity tests on isolates silenced for AvrLm3 and AvrLm7*
- Strategies for increased durability of *Rlm3* and *Rlm7* by alternating or pyramiding resistance genes : *field assays and modelling in progress*



Annexe III : Résultats préliminaires de l'analyse transcriptomique d'AvrLm3 et AvrLm4-7

Les effecteurs sécrétés lors des phases précoces de l'infection par les agents pathogènes ont pour rôle de manipuler les processus cellulaires de l'hôte afin de supprimer ses mécanismes de défense ou de favoriser l'acquisition de nutriments (Jones & Dangl, 2006). Toutefois, de par le manque d'homologies de la plupart des effecteurs fongiques avec des gènes d'autres espèces de champignon, il est difficile de leur affecter une fonction par le biais d'analyses *in silico*. Seul un relativement faible nombre d'effecteurs fongiques a été fonctionnellement caractérisé à ce jour (Rovenich *et al.*, 2014). Le rôle important d'AvrLm4-7 et AvrLm3 dans la fitness fongique (cf. Chapitre 2 ; L. Burketova, communication personnelle) suggère que la présence de ces deux effecteurs est nécessaire au pouvoir pathogène de *L. maculans*. Toutefois, leurs fonctions et leurs cibles végétales respectives restent inconnues, ne permettant donc pas d'expliquer le mécanisme par lequel la présence d'AvrLm4-7 inhibe la perception d'AvrLm3 par Rlm3.

Les résultats obtenus lors du chapitre 1 de ce manuscrit ont néanmoins permis d'invalider deux des hypothèses qui avaient été initialement proposées pour expliquer la relation antagoniste entre les phénotypes AvrLm3 et AvrLm4-7 chez *L. maculans*. En effet, AvrLm4-7 n'a pas d'effet sur l'expression d'AvrLm3, qui est très fortement exprimé dans les phases précoces de l'infection de *B. napus* quel que soit le phénotype d'virulence de *L. maculans* (A3a7, a3A7 ou a3a7). De plus, des approches de double hybride en système hétérologue levure suggèrent une absence d'interaction directe entre les deux protéines d'virulence. Récemment, Blondeau *et al.* (2015), ont montré que la protéine AvrLm4-7 était transloquée dans les cellules de *B. napus* lors de l'infection, AvrLm3 est quant à lui localisé dans l'espace apoplastique (cf. Chapitre 1).

Les différentes localisations subcellulaires d'AvrLm3 et AvrLm4-7 confirmant une interaction indirecte entre les deux protéines d'virulence, nous avons supposé une possible suppression par AvrLm4-7 des mécanismes de défense induits suite à la reconnaissance d'AvrLm3 par Rlm3. Afin d'approfondir cette hypothèse, j'ai récemment initié une expérience de RNA-seq en utilisant deux souches isogéniques de *L. maculans* différant par la présence ou non d'un allèle fonctionnel d'AvrLm4-7 (A3a7 et a3A7) pour déterminer quels étaient les gènes

différentiellement induits chez un cultivar de *B. napus* possédant *Rlm3*, lors d'une interaction compatible (souche a3A7) ou incompatible (souche A3a7). Les résultats préliminaires de cette étude sont présentés ici.

Identification de gènes différentiellement exprimés chez *B. napus* dans le cas d'une interaction compatible ou incompatible

Une approche double hybride a montré l'absence d'interaction directe entre AvrLm3 et AvrLm4-7 (Plissonneau *et al.*, submitted). De plus, les deux protéines d'avirulence ont des localisations subcellulaires distinctes *in planta*. Nous avons donc émis l'hypothèse d'une modulation des réponses de défense de *B. napus* par AvrLm4-7, afin d'inhiber la mise en place de la RH (réaction hypersensible), suite à la reconnaissance d'AvrLm3 par Rlm3.

Afin d'approfondir cette hypothèse, nous avons mis en place une expérience de RNA-seq pour analyser les gènes différentiellement exprimés chez le cultivar 14.22.3.1 (*Rlm3*) lors de l'interaction avec la souche G06-E107 (A3a7 ; interaction incompatible) ou la souche G06-E107 complémentée avec un allèle fonctionnel d'*AvrLm4-7* (« G06-E-107 +A7 », a3A7 ; interaction compatible), en comparaison à la plante saine. Les ARN totaux de cotylédons infectés ou non infectés par ces deux souches quasi-isogéniques ont été séquencés à 7dpi, date correspondant au pic d'expression d'*AvrLm3* et *AvrLm4-7* (Parlange *et al.*, 2009 ; Plissonneau *et al.*, submitted).

L'alignement des reads RNA-seq sur le génome de *B. napus* a permis d'identifier les gènes différentiellement exprimés (p-value ajustée <0.01) lors de l'interaction compatible ou incompatible entre *B. napus* et *L. maculans* (Figure 2).

La réaction incompatible entre la souche G06-E107 (A3a7) et le cultivar *Rlm3* résulte dans la modulation de 2835 gènes à 7dpi, dont la grande majorité est sur-exprimée (2505). La réaction compatible entre G06-E107+A7 et le cultivar *Rlm3*, modifie quant à elle l'expression d'un plus faible nombre de gènes (736), dont seulement sept sont sous-exprimés lors de l'infection (Figure 2B, Tableau S1). Bien que respectivement 2181 et 133 gènes soient identifiés comme spécifiquement différentiellement exprimés suite à l'infection par une souche possédant ou non *AvrLm4-7*, seuls 250 gènes ont été identifiés comme différentiellement exprimés suite à la comparaison des interactions compatibles et incompatibles (Figure 2). Parmi ces gènes, 89 sont sur-exprimés lors de l'interaction compatible et 161 sont surexprimés lors de l'interaction incompatible (Figure 2 et 3).

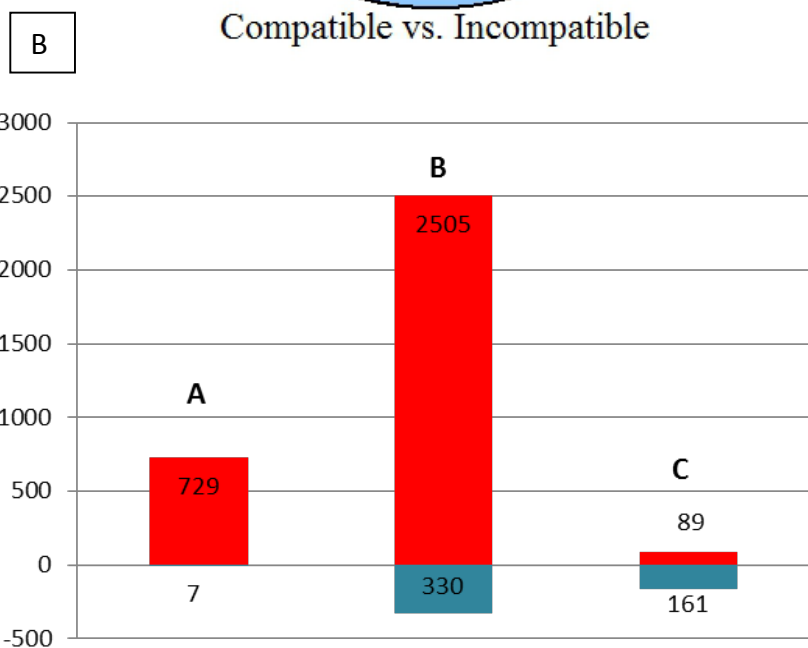
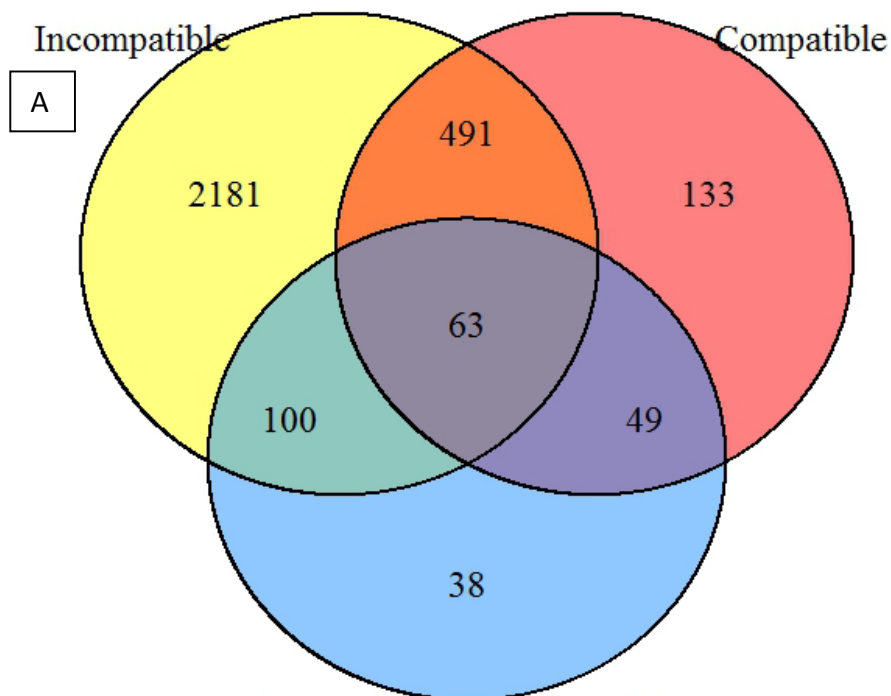


Figure 1: Gènes différentiellement exprimés lors de l'interaction compatible ou incompatible entre *Leptosphaeria maculans* et *Brassica napus*

A. Diagramme de Venn représentant les gènes différentiellement exprimés lors de l'interaction compatible ou incompatible, et selon ces deux conditions. B. Gènes sous ou sur-exprimés selon chaque condition : A : Mock vs. G06-E107+A7 (compatible), B : Mock vs. Les gènes différentiellement exprimés ont été identifiés à l'aide du package DESeq2, à une p-value ajustée < 0.01.

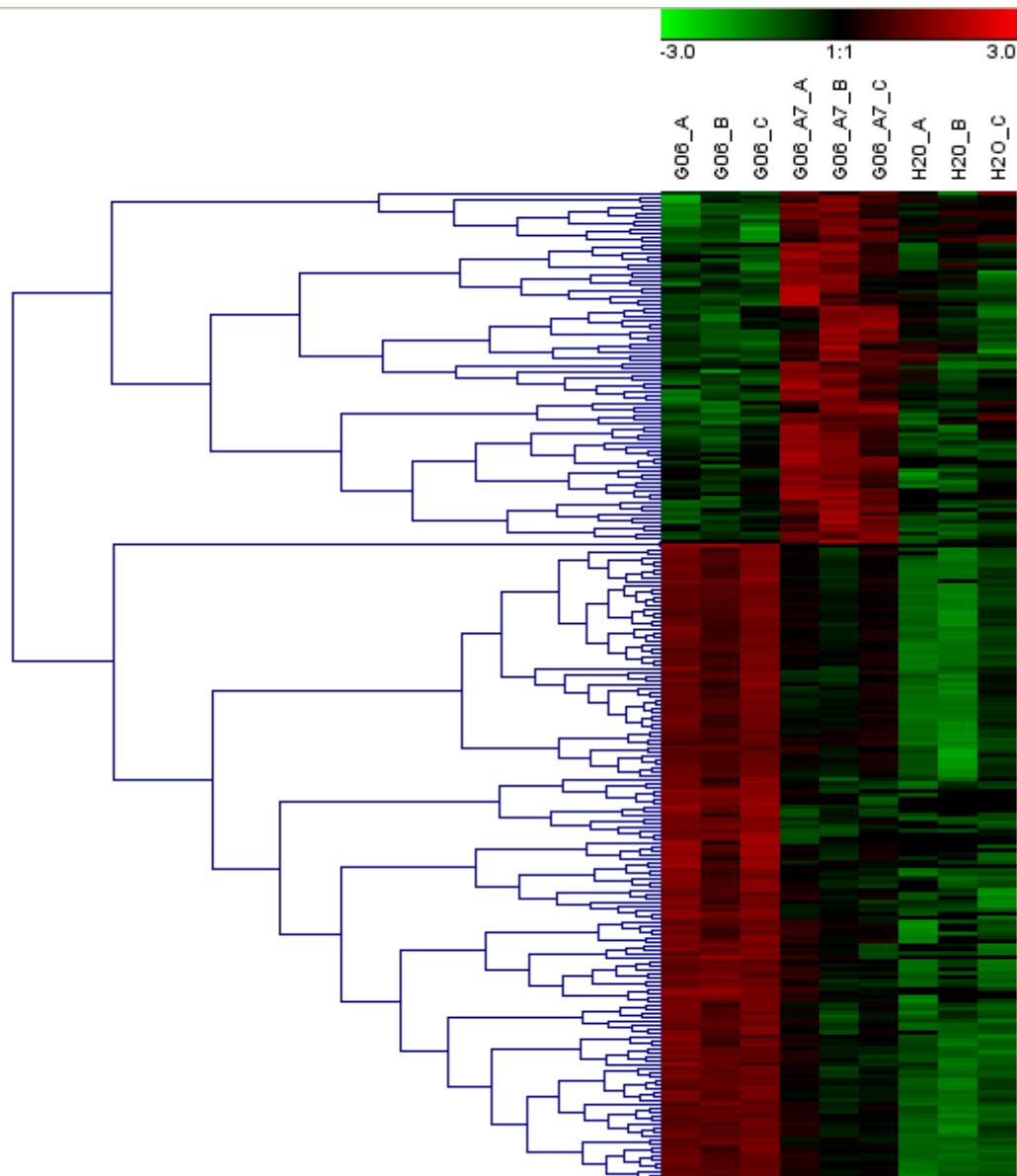


Figure 2: HeatMap des gènes différentiellement exprimés selon la présence ou l'absence d'AvrLm4-7

Les gènes différentiellement exprimés ont été identifiés à l'aide du package DESeq2, à une p-value ajustée < 0.01.

Fonction des gènes différentiellement exprimés chez le cultivar 14.22.3.1 (*Rlm3*) suite à l'infecion par G06-E107 (A3a7) ou G06-E107+AvrLm4-7 (a3A7).

Gene_ID	G06_A	G06_B	G06_C	G06_A7_A	G06_A7_B	G06_A7_C	log2FoldChange	padj	regul	Fonction
BnaC04g16670D	0.960933	0	4.033927	84.51032	187.4238	111.1182	3.571218	1.34E-17	up	Cytochrome P450
BnaCnng54420D	0	0.98549	6.050891	213.2503	128.2901	65.7047	3.031829	1.22E-11	up	Flavine dehydrogenase
BnaA02g20020D	2.8828	4.927449	7.059373	202.9827	153.3467	42.5148	2.716235	1.88E-09	up	Unknown
BnaC07g11830D	28.828	4.927449	45.38168	1172.877	908.0533	278.2787	2.654405	1.16E-08	up	Jacalin_like lectin
BnaA05g33660D	11.5312	15.76784	5.042409	555.2407	274.621	72.46841	2.598195	2.62E-08	up	Kinase
BnaA10g25800D	43.24201	85.73761	44.3732	394.1182	531.2011	435.7767	2.494354	8.34E-14	up	Salicylate/benzoate carboxyl methyltransferase
BnaA07g13320D	49.00761	24.63725	37.31383	182.4475	371.8408	297.6036	2.349417	2.43E-10	up	Cytochrome P450 94C1
BnaC05g24840D	19.21867	10.84039	19.16116	424.1312	140.3173	90.82708	2.341055	4.38E-07	up	Unknown
BnaA09g42520D	4.804667	4.927449	13.11026	30.80283	259.587	167.1605	2.201316	1.00E-05	up	Methyltransferase
BnaC09g40620D	3.843734	0.98549	3.025446	38.70099	33.07479	28.02112	2.178294	4.96E-06	up	Glutamate decarboxylase
BnaA03g42030D	6.726534	3.941959	9.076337	154.0141	122.2765	25.12238	2.168597	1.15E-05	up	CASP-like protein
BnaA07g07060D	0	0.98549	0	30.01301	19.04306	17.39242	2.159593	1.93E-05	up	Flavine dehydrogenase
BnaC09g08360D	4.804667	0.98549	9.076337	70.29363	56.12691	37.68358	2.146841	6.75E-06	up	Unknown
BnaC02g38510D	1.921867	0	5.042409	71.87326	29.06572	31.8861	2.133968	2.13E-05	up	LRR
BnaA03g18540D	3.843734	1.97098	3.025446	14.21669	87.19717	96.62455	2.125319	2.65E-05	up	Jacalin_like lectin
BnaC08g21250D	5.765601	5.912939	2.016964	28.43338	89.2017	46.37979	2.091984	2.08E-05	up	Oxidoreductase
BnaCnng74290D	3.843734	6.898429	6.050891	51.33805	30.06799	63.7722	2.066886	9.40E-06	up	Replication protein A
BnaC06g03020D	2.8828	7.883918	1.008482	140.5873	55.12465	27.05487	2.053731	6.01E-05	up	F-box protein
BnaA02g01520D	6.726534	3.941959	4.033927	20.53522	79.17904	67.63719	2.018808	5.47E-05	up	TIFY 9
BnaC07g25290D	4.804667	6.898429	5.042409	42.65007	33.07479	50.24477	2.013755	1.00E-05	up	Monooxygenase
BnaA10g25810D	22.10147	22.66627	18.15267	65.55474	303.6867	141.0718	2.010269	2.23E-05	up	Salicylate/benzoate carboxyl methyltransferase
BnaC09g36390D	161.4368	348.8634	256.1544	1856.068	1479.345	866.7222	1.97529	3.34E-07	up	Unknown
BnaA03g43080D	3.843734	1.97098	2.016964	97.9372	44.09972	13.52744	1.974313	0.0001546	up	Transcription factor
BnaA08g01710D	54.77321	43.36155	39.33079	131.1095	527.1921	271.515	1.972987	1.31E-05	up	Jacalin_like lectin
BnaA06g06160D	251.7646	270.0242	427.5963	2714.598	1934.374	857.0598	1.947691	3.72E-06	up	Glutathione S-transferase
BnaC02g16650D	10.57027	11.82588	9.076337	82.93069	135.3059	32.85235	1.936976	7.19E-05	up	Endopeptidase
BnaA04g19530D	5.765601	8.869408	15.12723	196.6642	66.14958	40.58231	1.936166	0.0001546	up	Transcription factor
BnaA09g00870D	189.3039	81.79565	145.2214	1783.405	760.7201	386.4982	1.904519	7.50E-05	up	Glutathione S-transferase
BnaA05g17890D	8.648401	4.927449	3.025446	48.17878	58.13145	26.08863	1.89659	0.00012647	up	Unknown

BnaA03g35730D	3.843734	3.941959	10.08482	34.75191	58.13145	38.64982	1.894439	9.21E-05	up	Unknown
BnaA03g49430D	0	0	0	9.477793	29.06572	17.39242	1.892881	0.00033613	up	Glutamyltransferase
BnaC08g46910D	4.804667	5.912939	2.016964	22.90467	39.08839	44.44729	1.878713	0.00019039	up	Unknown
BnaA10g13830D	44.20294	57.15841	40.33927	323.0348	259.587	130.4431	1.854723	4.14E-06	up	Unknown
BnaC02g16670D	11.5312	3.941959	4.033927	64.76492	68.15411	25.12238	1.824482	0.0004129	up	Endopeptidase
BnaA07g06150D	147.9838	298.6034	135.1366	1367.172	1074.429	547.8612	1.805603	3.01E-05	up	F-box protein
BnaA05g35790D	31.71081	40.40508	24.20356	217.1994	84.19037	195.1816	1.802197	3.34E-05	up	Transmembrane Transporter
BnaC06g33400D	4.804667	1.97098	2.016964	11.84724	66.14958	41.54856	1.796343	0.00098444	up	Endopeptidase inhibitor
BnaC06g05350D	31.71081	24.63725	58.49195	50.54823	551.2465	653.182	1.796039	0.00094371	up	Unknown
BnaA02g05750D	2.8828	1.97098	7.059373	67.92418	57.12918	13.52744	1.785066	0.00105869	up	Unknown
BnaC05g07890D	200.8351	108.4039	365.0704	1753.392	1365.087	645.452	1.777623	0.0001688	up	Glutathione S-transferase
BnaA06g29590D	7.687468	8.869408	13.11026	65.55474	85.19264	29.95361	1.765127	0.00035497	up	Unknown
BnaC03g22030D	30.74987	10.84039	33.2799	47.38897	226.5122	374.9033	1.751542	0.00128526	up	Jacalin_like lectin
BnaA02g34140D	26.90614	15.76784	14.11875	130.3197	95.2153	58.94098	1.742458	0.00010435	up	Unknown
BnaA07g30040D	4.804667	0.98549	8.067855	14.21669	76.17224	82.13087	1.733596	0.00181345	up	Endopeptidase inhibitor
BnaA05g21930D	5.765601	3.941959	3.025446	25.27411	45.10198	21.2574	1.709534	0.00136507	up	Unknown
BnaA03g14010D	221.9756	205.9674	281.3664	996.7479	831.881	743.0428	1.705904	1.66E-10	up	Monoxygenase
BnaC05g50040D	58.61694	21.68078	50.42409	232.2059	194.4397	151.7005	1.703649	4.28E-05	up	Unknown
BnaA04g21440D	1.921867	3.941959	0	52.12786	49.11105	8.69621	1.698997	0.00245946	up	Transmembrane Transporter
BnaA09g15160D	15.37494	21.68078	40.33927	90.03903	240.5439	96.62455	1.697041	0.00067601	up	Monoxygenase
BnaA08g10060D	73.03095	88.69408	70.59373	351.4682	380.8612	195.1816	1.694348	2.72E-06	up	HSP20
BnaA06g37500D	29.78894	29.56469	70.59373	54.49731	494.1173	619.3634	1.690377	0.00248475	up	Unknown
BnaA04g01700D	30.74987	40.40508	22.1866	271.6967	255.5779	51.21101	1.685788	0.00139948	up	Pirin
BnaA07g17130D	68.22628	58.1439	46.39017	199.8235	826.8697	132.3756	1.683218	0.00181345	up	Strictosidine synthase
BnaA05g14890D	445.8731	171.4752	459.8677	637.3816	2490.632	3191.509	1.670912	0.0014581	up	Hydrolase
BnaAnng30800D	1.921867	3.941959	1.008482	38.70099	25.05666	11.59495	1.666268	0.00325936	up	Cyclin
BnaA09g04020D	49.00761	34.49214	47.39865	126.3706	220.4986	165.228	1.661451	6.01E-06	up	Salicylate/benzoate carboxyl Methyltransferase
BnaC02g43000D	28.828	15.76784	34.28838	195.0846	160.3626	54.10975	1.635023	0.00136318	up	Unknown
BnaC07g42400D	3.843734	0	6.050891	176.129	64.14504	10.6287	1.634081	0.00375557	up	Hydrolase
BnaA08g31110D	28.828	20.69529	23.19508	318.2959	117.2652	42.5148	1.623659	0.00346169	up	Unknown
BnaA03g04460D	9.609335	6.898429	17.14419	30.01301	92.2085	63.7722	1.609192	0.00250083	up	Oxidoreductase
BnaA09g25420D	83.60121	95.59251	152.2808	641.3307	391.8861	286.0087	1.605701	0.00011452	up	uridylyltransferase
BnaC03g16960D	238.3115	239.474	230.9423	870.3773	679.5365	761.4015	1.604326	6.26E-12	up	Monoxygenase
BnaC04g45770D	2.8828	0	3.025446	29.2232	28.06346	10.6287	1.601256	0.0056673	up	Oxidoreductase
BnaA09g34830D	1.921867	12.81137	14.11875	49.75841	95.2153	39.61607	1.600143	0.00414215	up	ATPase

BnaA02g11150D	4.804667	3.941959	3.025446	170.6003	64.14504	4.831228	1.593986	0.00533164	up	pyridoxal phosphate
BnaA08g31100D	27.86707	23.65176	29.24597	259.8495	72.16317	78.26589	1.586097	0.00252649	up	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
BnaA06g08960D	10.57027	8.869408	83.704	143.7465	483.0924	318.861	1.584851	0.00650184	up	Oxidoreductase
BnaC07g33890D	1.921867	18.72431	11.0933	35.54172	180.4079	64.73845	1.583733	0.00649223	up	Unknown
BnaC03g33490D	0	0.98549	0	28.43338	12.0272	7.729964	1.583356	0.00538642	up	Peroxydase
BnaA01g13350D	0.960933	1.97098	3.025446	22.90467	37.08385	8.69621	1.583001	0.00660289	up	Defensin
BnaAnng23240D	5.765601	2.956469	4.033927	41.86025	49.11105	10.6287	1.5771	0.0064888	up	Endopeptidase
BnaC05g07900D	455.4825	299.5889	741.2342	3893.004	2262.115	935.3257	1.573759	0.00219547	up	Glutathione S-transferase
BnaA06g00690D	8.648401	14.78235	14.11875	54.49731	80.1813	35.75108	1.573044	0.00148094	up	Pectinesterase
BnaC08g36490D	110.5074	128.1137	75.63614	785.0772	308.698	259.92	1.570081	0.00104461	up	RNA-polymerase
BnaCnng03800D	4.804667	4.927449	3.025446	15.79632	31.07026	31.8861	1.56523	0.00523751	up	Unknown
BnaC01g03230D	9.609335	17.73882	14.11875	46.59915	130.2946	41.54856	1.564766	0.00379799	up	Unknown
BnaA04g21450D	3.843734	0	1.008482	50.54823	30.06799	7.729964	1.559397	0.00730366	up	Phenazine
BnaC08g07920D	4.804667	4.927449	4.033927	91.61867	28.06346	11.59495	1.558026	0.00798768	up	Unknown
BnaA03g15910D	1.921867	1.97098	5.042409	9.477793	35.07932	38.64982	1.556023	0.00802513	up	Unknown
BnaC01g20720D	5.765601	8.869408	7.059373	52.12786	47.10652	18.35866	1.552733	0.00469235	up	Transcription factor
BnaA07g27170D	6.726534	7.883918	7.059373	60.81584	19.04306	37.68358	1.544173	0.00523751	up	Unknown
BnaA09g32180D	4.804667	1.97098	5.042409	11.84724	55.12465	28.98737	1.539561	0.00898422	up	Tautomerase
BnaA08g00250D	52.85134	81.79565	68.57677	361.7358	218.4941	166.1942	1.534862	0.00019184	up	Unknown
BnaAnng40100D	4.804667	17.73882	13.11026	113.7335	101.2289	21.2574	1.534354	0.00837297	up	Antiporter
BnaC04g23140D	3.843734	4.927449	1.008482	21.32503	50.11331	13.52744	1.53237	0.00974253	up	Pirin
BnaA09g29530D	0.960933	1.97098	2.016964	10.26761	21.04759	17.39242	1.524488	0.01051764	up	Glycosyltransferase
BnaC07g33880D	3.843734	6.898429	4.033927	13.42687	79.17904	27.05487	1.51581	0.01099328	up	Unknown
BnaA03g55220D	26.90614	35.47763	35.29687	132.6891	120.272	83.09712	1.504996	8.21E-05	up	Unknown
BnaC07g12800D	24.02334	49.27449	66.5598	111.3641	380.8612	156.5318	1.503727	0.00524286	up	Glutathione S-transferase

Matériel et méthode

Séquençage RNA-seq

Des cotylédons de colza de lignée de colza 14.22.3.1 (*Rlm3*) ont été inoculés avec la souche G06-E107, la souche G06-E107 complémentée avec *AvrLm4-7* ou avec de l'eau stérile. Les tissus végétaux autour du point d'inoculations ont été extraits à 7 jpi et les ARN totaux de ces échantillons ont été extraits (3 répétitions biologiques par condition). La construction des banques de cDNA et le séquençage de de reads paired-end de 100 pb, selon la technologie Illumina HiSeq2500 a été sous-traité à la société Integragen (Evry, France), permettant ainsi de générer environ 30 millions de paires de reads pour chaque échantillon.

Analyses RNA-seq

Le contrôle qualité et l'alignement des reads de séquençage a été effectué à l'aide du logiciel CLC Genomic Workbench v8.0.2 (Qiagen, Venlo, Pays-Bas). Les reads d'une qualité supérieure à 30 (Phred Score) ont été conservés et alignés sur le génome de référence de *B. napus* (Chalhoub *et al.*, 2014). Les gènes différentiellement exprimés selon les conditions ont été caractérisés avec le package DESeq2 v1.8.1 (Love *et al.*, 2014) du logiciel R v3.2.1 (R Core Team), à une p-value ajustée <0.01. Les catégories enrichies de GO (Gene Ontology) ont été estimées à l'aide du package Goseq v1.20.0 (p-value <0.05) (Young *et al.*, 2010).

Références

- Agrios GN. 2005.** *Plant Pathology*. Academic Press.
- Allender CJ, King GJ. 2010.** Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biology* **10**: 54.
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P. 2004.** Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 535–544.
- Ansan-Melayah D, Balesdent M-H, Buée M, Rouxel T. 1995.** Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **85**: 1525.
- Axtell MJ, Staskawicz BJ. 2003.** Initiation of *RPS2*-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the *AvrRpt2*-directed elimination of *RIN4*. *Cell* **112**: 369–377.
- Balesdent MH, Attard A, Kühn ML, Rouxel T. 2002.** New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **92**: 1122–1133.
- Balesdent M-H, Fudal I, Ollivier B, Bally P, Grandaubert J, Eber F, Chèvre A-M, Leflon M, Rouxel T. 2013.** The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytologist* **198**: 887–898.
- Balesdent M-H, Louvard K, Pinochet X, Rouxel T. 2006.** A large-scale survey of races of *Leptosphaeria maculans* occurring on oilseed rape in France. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 53–65.
- Bernardi G. 2000.** Isochores and the evolutionary genomics of vertebrates. *Gene* **241**: 3–17.
- Van Der Biezen EA, Jones JDG. 1998.** Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 454–456.
- Block A, Toruño TY, Elowsky CG, Zhang C, Steinbrenner J, Beynon J, Alfano JR. 2014.** The *Pseudomonas syringae* type III effector HopD1 suppresses effector-triggered immunity, localizes to the endoplasmic reticulum, and targets the *Arabidopsis* transcription factor NTL9. *New Phytologist* **201**: 1358–1370.
- Blondeau K, Blaise F, Graille M, Kale SD, Linglin J, Ollivier B, Labarde A, Lazar N, Daverdin G, Balesdent M-H, et al. 2015.** Crystal structure of the effector *AvrLm4-7* of *Leptosphaeria maculans* reveals insights into its translocation into plant cell and recognition by resistance proteins. *The Plant Journal*.

Brown JKM, Tellier A. 2011. Plant-parasite coevolution: bridging the gap between genetics and ecology. *Annual Review of Phytopathology* **49**: 345–367.

Brun H, Chèvre A-M, Fitt BD, Powers S, Besnard A-L, Ermel M, Huteau V, Marquer B, Eber F, Renard M, et al. 2010. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* **185**: 285–299.

van den Burg HA, Harrison SJ, Joosten MHAJ, Vervoort J, de Wit PJGM. 2006. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **19**: 1420–1430.

van den Burg HA, Westerink N, Francoijs K-J, Roth R, Woestenenk E, Boeren S, Wit PJGM de, Joosten MHAJ, Vervoort J. 2003. Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4-mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 27340–27346.

Caillaud M-C, Asai S, Rallapalli G, Piquerez S, Fabro G, Jones JDG. 2013. A downy mildew effector attenuates salicylic acid-triggered immunity in *Arabidopsis* by interacting with the host mediator complex. *PLoS Biol* **11**: e1001732.

Canonne J, Rivas S. 2012. Bacterial effectors target the plant cell nucleus to subvert host transcription. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 217–221.

Carpezat J, Bothorel S, Daverdin G, Balesdent M h., Leflon M. 2014. Use of high resolution melting analysis to genotype the avirulence *AvrLm4-7* gene of *Leptosphaeria maculans*, a fungal pathogen of *Brassica napus*. *Annals of Applied Biology* **164**: 430–440.

Catanzariti A-M, Dodds PN, Lawrence GJ, Ayliffe MA, Ellis JG. 2006. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *The Plant Cell* **18**: 243–256.

Catanzariti A-M, Lim GTT, Jones DA. 2015. The tomato *I-3* gene: a novel gene for resistance to *Fusarium* wilt disease. *New Phytologist* **207**: 106–118.

Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, Parkin IAP, Tang H, Wang X, Chiquet J, Belcram H, Tong C, Samans B, et al. 2014. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* **345**: 950–953.

- Chang C, Yu D, Jiao J, Jing S, Schulze-Lefert P, Shen Q-H. 2013.** Barley MLA immune receptors directly interfere with antagonistically acting transcription factors to initiate disease resistance signaling. *The Plant Cell* **25**: 1158–1173.
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JDG, Felix G, Boller T. 2007.** A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500.
- Chuma I, Hotta Y, Tosa Y. 2011a.** Instability of subtelomeric regions during meiosis in *Magnaporthe oryzae*. *Journal of General Plant Pathology* **77**: 317–325.
- Chuma I, Isobe C, Hotta Y, Ibaragi K, Futamata N, Kusaba M, Yoshida K, Terauchi R, Fujita Y, Nakayashiki H, et al. 2011b.** Multiple translocation of the *AVR-Pita* effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species. *Plos Pathogens* **7**.
- Clarke CR, Chinchilla D, Hind SR, Taguchi F, Miki R, Ichinose Y, Martin GB, Leman S, Felix G, Vinatzer BA. 2013.** Allelic variation in two distinct *Pseudomonas syringae* flagellin epitopes modulates the strength of plant immune responses but not bacterial motility. *New Phytologist* **200**: 847–860.
- Clay NK. 2011.** Chemical diversity on display in the plant innate immune systems of closely-related species. *New Phytologist* **192**: 566–569.
- Cohn M, Bart RS, Shybut M, Dahlbeck D, Gomez M, Morbitzer R, Hou B-H, Frommer WB, Lahaye T, Staskawicz BJ. 2014.** *Xanthomonas axonopodis* virulence is promoted by a transcription activator-like effector-mediated induction of a SWEET sugar transporter in cassava. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 1186–1198.
- Cornelis GR, Van Gijsegem F. 2000.** Assembly and function of type III secretory systems. *Annual Review of Microbiology* **54**: 735–774.
- Costantini M, Cammarano R, Bernardi G. 2009.** The evolution of isochore patterns in vertebrate genomes. *BMC Genomics* **10**: 146.
- Cui H, Tsuda K, Parker JE. 2015.** Effector-Triggered Immunity: From pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology* **66**: 487–511.
- Dangl JL, Jones JD. 2001.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826–833.

- Daverdin G, Rouxel T, Gout L, Aubertot J-N, Fudal I, Meyer M, Parlange F, Carpezat J, Balesdent M-H. 2012.** Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *Plos Pathogens* **8**: e1003020.
- Deising HB, Werner S, Wernitz M. 2000.** The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection* **2**: 1631–1641.
- Delourme R, Chèvre A-M, Brun H, Rouxel T, Balesdent M-H, Dias J, Salisbury P, Renard M, Rimmer SR. 2006.** Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 41–52.
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marco Y. 2003.** Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 8024–8029.
- Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y. 2002.** Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 2404–2409.
- Deslandes L, Rivas S. 2012.** Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science* **17**: 644–655.
- Dilmaghani A, Balesdent MH, Didier JP, Wu C, Davey J, Barbetti MJ, Li H, Moreno-Rico O, Phillips D, Despeghel JP, et al. 2009.** The *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathology* **58**: 1044–1058.
- Dixon MS, Golstein C, Thomas CM, van der Biezen EA, Jones JDG. 2000.** Genetic complexity of pathogen perception by plants: The example of *Rcr3*, a tomato gene required specifically by *Cf-2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 8807–8814.
- Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti A-M, Ayliffe MA, Ellis JG. 2004.** The *Melampsora lini AvrL567* avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *The Plant Cell* **16**: 755–768.
- Dodds PN, Rafiqi M, Gan PHP, Hardham AR, Jones DA, Ellis JG. 2009.** Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *New Phytologist* **183**: 993–1000.

Dodds PN, Rathjen JP. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**: 539–548.

Doehlemann G, Reissmann S, Assmann D, Fleckenstein M, Kahmann R. 2011. Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Molecular Microbiology* **81**: 751–766.

Doré C, Varoquaux F. 2006. *Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées*. Editions Quae.

van Esse HP, Bolton MD, Stergiopoulos I, de Wit PJGM, Thomma BPHJ. 2007. The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **20**: 1092–1101.

van Esse HP, Klooster JW van't, Bolton MD, Yadeta KA, van Baarlen P, Boeren S, Vervoort J, Wit PJGM de, Thomma BPHJ. 2008. The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *The Plant Cell* **20**: 1948–1963.

Eyre-Walker A, Hurst LD. 2001. The evolution of isochores. *Nature Reviews Genetics* **2**: 549–555.

Faris JD, Zhang Z, Lu H, Lu S, Reddy L, Cloutier S, Fellers JP, Meinhardt SW, Rasmussen JB, Xu SS, et al. 2010. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 13544–13549.

Feng J, Zhang H, Strelkov SE, Hwang S-F. 2014. The LmSNF1 gene is required for pathogenicity in the canola blackleg pathogen *Leptosphaeria maculans*. *PLoS ONE* **9**: e92503.

Fitt BDL, Brun H, Barbetti MJ, Rimmer SR. 2006. World-Wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 3–15.

Flor HH. 1946. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* **32**: 653–669.

Flor HH. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275–296.

- Fradin EF, Abd-El-Haliem A, Masini L, van den Berg GCM, Joosten MHJ, Thomma BPHJ. 2011.** Interfamily transfer of tomato *Ve1* mediates *Verticillium* resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **156**: 2255–2265.
- Friesen TL, Faris JD, Solomon PS, Oliver RP. 2008.** Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cellular Microbiology* **10**: 1421–1428.
- Fudal I, Ross S, Brun H, Besnard A-L, Ermel M, Kuhn M-L, Balesdent M-H, Rouxel T. 2009.** Repeat-Induced Point mutation (RIP) as an alternative mechanism of evolution toward virulence in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 932–941.
- Fudal I, Ross S, Gout L, Blaise F, Kuhn ML, Eckert MR, Cattolico L, Bernard-Samain S, Balesdent MH, Rouxel T. 2007.** Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: Map-based cloning of *AvrLm6*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 459–470.
- Galagan JE, Selker EU. 2004.** RIP: the evolutionary cost of genome defense. *Trends in Genetics* **20**: 417–423.
- Ghanbarnia K, Fudal I, Larkan NJ, Links MG, Balesdent M-H, Profotova B, Fernando WGD, Rouxel T, Borhan MH. 2014.** Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm2*, using an intraspecific comparative genomics approach. *Molecular Plant Pathology*.
- Gimenez-Ibanez S, Boter M, Fernández-Barbero G, Chini A, Rathjen JP, Solano R. 2014.** The bacterial effector HopX1 targets JAZ transcriptional repressors to activate jasmonate signaling and promote infection in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* **12**: e1001792.
- Gómez-Gómez L, Boller T. 2000.** FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **5**: 1003–1011.
- Gonzalez-Cendales Y, Catanzariti A-M, Baker B, McGrath DJ, Jones DA. 2015.** Identification of *I-7* expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. *Molecular Plant Pathology*: n/a–n/a.
- Gout L, Fudal I, Kuhn M-L, Blaise F, Eckert M, Cattolico L, Balesdent M-H, Rouxel T. 2006.** Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Microbiology* **60**: 67–80.
- Gout L, Kuhn ML, Vincenot L, Bernard-Samain S, Cattolico L, Barbetti M, Moreno-Rico O, Balesdent M-H, Rouxel T. 2007.** Genome structure impacts molecular evolution at

the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environmental Microbiology* **9**: 2978–2992.

Govrin EM, Levine A. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* **10**: 751–757.

Grandaubert J, Lowe RG, Soyer JL, Schoch CL, Wouw APV de, Fudal I, Robbertse B, Lapalu N, Links MG, Ollivier B, et al. 2014. Transposable element-assisted evolution and adaptation to host plant within the *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex of fungal pathogens. *BMC Genomics* **15**: 891.

Guo M, Tian F, Wamboldt Y, Alfano JR. 2009. The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 1069–1080.

Gururani MA, Venkatesh J, Upadhyaya CP, Nookaraju A, Pandey SK, Park SW. 2012. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **78**: 51–65.

Hahn MG, Darvill AG, Albersheim P. 1981. The endogenous elicitor, a fragment of cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiology* **68**: 1161–1169.

Halim VA, Vess A, Scheel D, Rosahl S. 2006. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biology* **8**: 307–313.

Hirooka T, Ishii H. 2013. Chemical control of plant diseases. *Journal of General Plant Pathology* **79**: 390–401.

van der Hoorn RAL, Kamoun S. 2008. From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell* **20**: 2009–2017.

Houterman PM, Cornelissen BJC, Rep M. 2008. Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *Plos Pathogens* **4**: e1000061.

Houterman PM, Ma L, Van Ooijen G, De Vroomen MJ, Cornelissen BJC, Takken FLW, Rep M. 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *The Plant Journal* **58**: 970–978.

- Hou S, Yang Y, Wu D, Zhang C. 2011.** Plant immunity: Evolutionary insights from PBS1, Pto ans RIN4. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 794–799.
- Huang Y-J, Balesdent M-H, Li Z-Q, Evans N, Rouxel T, Fitt BDL. 2010.** Fitness cost of virulence differs between the *AvrLm1* and *AvrLm4* loci in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology* **126**: 279–291.
- Huang Y-J, Evans N, Fitt BDL, Li Z-Q, Rouxel T, Balesdent M-H. 2006.** Fitness cost associated with loss of the *AvrLm4* avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). In: Fitt BDL,, In: Evans N,, In: Howlett BJ,, In: Cooke BM, eds. Sustainable strategies for managing Brassica napus (oilseed rape) resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker). Springer Netherlands, 77–89.
- Hyde KD, Jones EBG, Liu J-K, Ariyawansa H, Boehm E, Boonmee S, Braun U, Chomnunti P, Crous PW, Dai D-Q, et al. 2013.** Families of Dothideomycetes. *Fungal Diversity* **63**: 1–313.
- Iida Y, van 't Hof P, Beenen H, Mesarich C, Kubota M, Stergiopoulos I, Mehrabi R, Notsu A, Fujiwara K, Bahkali A, et al. 2015.** Novel mutations detected in avirulence genes overcoming tomato *Cf* resistance genes in isolates of a Japanese population of *Cladosporium fulvum*. *PLoS ONE* **10**: e0123271.
- Inami K, Yoshioka-Akiyama C, Morita Y, Yamasaki M, Teraoka T, Arie T. 2012.** A genetic mechanism for emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Inactivation of avirulence gene *AVR1* by transposon insertion. *PLoS ONE* **7**: e44101.
- Irelan JT, Hagemann AT, Selker EU. 1994.** High frequency repeat-induced point mutation (RIP) is not associated with efficient recombination in *Neurospora*. *Genetics* **138**: 1093–1103.
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B. 2000.** Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO Journal* **19**: 4004–4014.
- Johal GS, Briggs SP. 1992.** Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. *Science (New York, N.Y.)* **258**: 985–987.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006.** The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- de Jonge R, van Esse HP, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, van der Krol S, Shibuya N, Joosten MHAJ, Thomma BPHJ. 2010.** Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* **329**: 953–955.

- de Jonge R, van Esse HP, Maruthachalam K, Bolton MD, Santhanam P, Saber MK, Zhang Z, Usami T, Lievens B, Subbarao KV, et al. 2012.** Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 5110–5115.
- Joosten MH, Vogelsang R, Cozijnsen TJ, Verberne MC, De Wit PJ. 1997.** The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. *The Plant Cell* **9**: 367–379.
- Kale SD, Gu B, Capelluto DGS, Dou D, Feldman E, Rumore A, Arredondo FD, Hanlon R, Fudal I, Rouxel T, et al. 2010.** External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell* **142**: 284–295.
- Kaschani F, Shabab M, Bozkurt T, Shindo T, Schornack S, Gu C, Ilyas M, Win J, Kamoun S, van der Hoorn RAL. 2010.** An effector-targeted protease contributes to defense against *Phytophthora infestans* and is under diversifying selection in natural hosts. *Plant Physiology* **154**: 1794–1804.
- Kasuga T, Gijzen M. 2013.** Epigenetics and the evolution of virulence. *Trends in Microbiology* **21**: 575–582.
- Kawchuk LM, Hachey J, Lynch DR, Kulcsar F, van Rooijen G, Waterer DR, Robertson A, Kokko E, Byers R, Howard RJ, et al. 2001.** Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6511–6515.
- Keen NT. 1982.** Mechanisms conferring specific recognition in gene-for-gene plant-parasite systems. In: Wood RKS, ed. NATO Advanced Study Institutes Series. Active Defense Mechanisms in Plants. Springer US, 67–84.
- Kolmer JA. 1996.** Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual Review of Phytopathology* **34**: 435–455.
- Kombrink A, Thomma BPHJ. 2013.** LysM effectors: Secreted proteins supporting fungal life. *PLoS pathogens* **9**: e1003769.
- Larkan NJ, Lydiate DJ, Parkin I a. P, Nelson MN, Epp DJ, Cowling WA, Rimmer SR, Borhan MH. 2013.** The *Brassica napus* blackleg resistance gene *LepR3* encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm1. *New Phytologist* **197**: 595–605.

- Larkan NJ, Ma L, Borhan MH. 2015.** The *Brassica napus* receptor-like protein RLM2 is encoded by a second allele of the *LepR3/Rlm2* blackleg resistance locus. *Plant Biotechnology Journal*: 1–10.
- Leach JE, Vera Cruz CM, Bai J, Leung H. 2001.** Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 187–224.
- Lim MTS, Kunkel BN. 2004.** Mutations in the *Pseudomonas syringae avrRpt2* gene that dissociate its virulence and avirulence activities lead to decreased efficiency in *AvrRpt2*-induced disappearance of RIN4. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 313–321.
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ. 2006.** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135–162.
- Luderer R, Takken FLW, Wit PJGM de, Joosten MHAJ. 2002.** *Cladosporium fulvum* overcomes *Cf-2*-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins. *Molecular Microbiology* **45**: 875–884.
- Lu W, Desveaux D. 2013.** The coevolutionary arms race between pathogen and plant host. *University of Toronto Journal of Undergraduate Life Sciences* **7**.
- Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL. 2002.** RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for *RPM1*-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**: 743–754.
- Ma L-J, van der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi M-J, Di Pietro A, Dufresne M, Freitag M, Grabherr M, Henrissat B, et al. 2010.** Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **464**: 367–373.
- Ma L, Houterman PM, Gawehns F, Cao L, Sillo F, Richter H, Clavijo-Ortiz MJ, Schmidt SM, Boeren S, Vervoort J, et al. 2015.** The *AVR2–SIX5* gene pair is required to activate *I-2*-mediated immunity in tomato. *New Phytologist*: n/a–n/a.
- Malinovsky FG, Fangel JU, Willats WGT. 2014.** The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD. 1993.** Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**: 1432–1436.

- McDonald BA, Linde C. 2002a.** The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* **124**: 163–180.
- McDonald BA, Linde C. 2002b.** Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349–379.
- Mesarich CH, Griffiths SA, van der Burgt A, Ökmen B, Beenen HG, Etalo DW, Joosten MHAJ, de Wit PJGM. 2014.** Transcriptome sequencing uncovers the *Avr5* avirulence gene of the tomato leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 846–857.
- Mirzadi Gohari A, Ware SB, Wittenberg AHJ, Mehrabi R, Ben M'Barek S, Verstappen ECP, van der Lee TAJ, Robert O, Schouten HJ, de Wit PPJGM, et al. 2015.** Effector discovery in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular Plant Pathology*: n/a–n/a.
- Mitchum MG, Hussey RS, Baum TJ, Wang X, Elling AA, Wubben M, Davis EL. 2013.** Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. *New Phytologist* **199**: 879–894.
- Monaghan J, Zipfel C. 2012.** Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 349–357.
- Mott GA, Middleton MA, Desveaux D, Guttman DS. 2014.** Peptides and small molecules of the plant-pathogen apoplastic arena. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Mueller AN, Ziemann S, Treitschke S, Aßmann D, Doehlemann G. 2013.** Compatibility in the *Ustilago maydis*–Maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS Pathog* **9**: e1003177.
- Mundt CC. 2014.** Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, Genetics and Evolution* **27**: 446–455.
- Nishimura MT, Stein M, Hou B-H, Vogel JP, Edwards H, Somerville SC. 2003.** Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science (New York, N.Y.)* **301**: 969–972.
- Ong LE, Innes RW. 2006.** *AvrB* mutants lose both virulence and avirulence activities on soybean and *Arabidopsis*. *Molecular Microbiology* **60**: 951–962.

- Orbach MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG, Valent B. 2000.** A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *The Plant Cell* **12**: 2019–2032.
- Padmanabhan SY. 1973.** The great Bengal famine. *Annual Review of Phytopathology* **11**: 11–24.
- Parlange F, Daverdin G, Fudal I, Kuhn M-L, Balesdent M-H, Blaise F, Grezes-Besset B, Rouxel T. 2009.** *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents *Rlm4*-mediated recognition through a single amino acid change. *Molecular Microbiology* **71**: 851–863.
- Petre B, Kamoun S. 2014.** How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? *PLoS Biol* **12**: e1001801.
- Pinochet X, Renard M. 2012.** Progrès génétique en colza et perspectives. *Oilseeds & fats Crops and Lipids* **19**: 147–154.
- Plett JM, Daguerre Y, Wittulsky S, Vayssières A, Deveau A, Melton SJ, Kohler A, Morrell-Falvey JL, Brun A, Veneault-Fourrey C, et al. 2014.** Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 8299–8304.
- Presti L Lo, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, Kahmann R. 2015.** Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology* **66**: 513–545.
- Pritchard L, Birch PRJ. 2014.** The zigzag model of plant–microbe interactions: is it time to move on? *Molecular Plant Pathology* **15**: 865–870.
- Quenouille J, Montarry J, Palloix A, Moury B. 2013.** Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown. *Molecular Plant Pathology* **14**: 109–118.
- Qutob D, Patrick Chapman B, Gijzen M. 2013.** Transgenerational gene silencing causes gain of virulence in a plant pathogen. *Nature Communications* **4**: 1349.
- Raffaele S, Kamoun S. 2012.** Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 417–430.

- Rajput NA, Zhang M, Ru Y, Liu T, Xu J, Liu L, Mafurah JJ, Dou D. 2014.** *Phytophthora sojae* effector PsCRN70 suppresses plant defenses in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE* **9**: e98114.
- Ravensdale M, Bernoux M, Ve T, Kobe B, Thrall PH, Ellis JG, Dodds PN. 2012.** Intramolecular interaction influences binding of the flax L5 and L6 resistance proteins to their AvrL567 ligands. *PLoS pathogens* **8**: e1003004.
- Rep M, Meijer M, Houterman PM, van der Does HC, Cornelissen BJC. 2005.** *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 15–23.
- Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauss T, Bonas U, Lahaye T. 2007.** Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper *Bs3* resistance gene. *Science (New York, N.Y.)* **318**: 645–648.
- Rouxel T, Balesdent MH. 2005.** The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Molecular Plant Pathology* **6**: 225–241.
- Rouxel T, Grandaubert J, Hane JK, Hoede C, van de Wouw AP, Couloux A, Dominguez V, Anthouard V, Bally P, Bourras S, et al. 2011.** Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nature Communications* **2**.
- Rouxel T, Penaud A, Pinochet X, Brun H, Gout L, Delourme R, Schmit J, Balesdent M-H. 2003.** A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 871–881.
- Saitoh H, Fujisawa S, Mitsuoka C, Ito A, Hirabuchi A, Ikeda K, Irieda H, Yoshino K, Yoshida K, Matsumura H, et al. 2012.** Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. *PLoS Pathog* **8**: e1002711.
- Sánchez-Vallet A, McDonald MC, Solomon PS, McDonald BA. 2015a.** Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genetics and Biology* **79**: 29–32.
- Sánchez-Vallet A, Mesters JR, Thomma BPHJ. 2015b.** The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews* **39**: 171–183.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 5463–5467.
- Schoch CL, Crous PW, Groenewald JZ, Boehm EWA, Burgess TI, de Gruyter J, de Hoog GS, Dixon LJ, Grube M, Gueidan C, et al. 2009.** A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Studies in Mycology* **64**: 1–15–S10.
- Scholze H, Boch J. 2011.** TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current Opinion in Microbiology* **14**: 47–53.
- Schulze-Lefert P, Panstruga R. 2011.** A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends in Plant Science* **16**: 117–125.
- Schürch S, Linde CC, Knogge W, Jackson LF, McDonald BA. 2004.** Molecular population genetic analysis differentiates two virulence mechanisms of the fungal avirulence gene *NIP1*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 1114–1125.
- Schwessinger B, Ronald PC. 2012.** Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 451–482.
- Schwessinger B, Zipfel C. 2008.** News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **11**: 389–395.
- Soyer JL, Ghalid M El, Glaser N, Ollivier B, Linglin J, Grandaubert J, Balesdent M-H, Connolly LR, Freitag M, Rouxel T, et al. 2014.** Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genet* **10**: e1004227.
- Sprague SJ, Balesdent M-H, Brun H, Hayden HL, Marcroft SJ, Pinochet X, Rouxel T, Howlett BJ. 2006.** Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 33–40.
- Stachowiak A, Olechnowicz J, Jedryczka M, Rouxel T, Balesdent M-H, Happstadius I, Gladders P, Latunde-Dada A, Evans N. 2006.** Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 67–75.

- Stam R, Howden AJM, Delgado-Cerezo M, M. M. Amaro TM, Motion GB, Pham J, Huitema E. 2013.** Characterization of cell death inducing *Phytophthora capsici* CRN effectors suggests diverse activities in the host nucleus. *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Stergiopoulos I, Kourmpetis YAI, Slot JC, Bakker FT, de Wit PJGM, Rokas A. 2012.** In silico characterization and molecular evolutionary analysis of a novel superfamily of fungal effector proteins. *Molecular Biology and Evolution* **29**: 3371–3384.
- Stotz HU, Mitroussia GK, de Wit PJGM, Fitt BDL. 2014.** Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends in Plant Science* **19**: 491–500.
- Stotz HU, Waller F, Wang K. 2013.** Innate immunity in plants: The role of antimicrobial peptides. In: Hiemstra PS, In: Zaat SAJ, eds. *Progress in Inflammation Research. Antimicrobial Peptides and Innate Immunity*. Springer Basel, 29–51.
- Strange RN, Scott PR. 2005.** Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 83–116.
- Stukenbrock EH, McDonald BA. 2009.** Population genetics of fungal and oomycete effectors involved in gene-for-gene interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**: 371–380.
- Szczesny R, Büttner D, Escolar L, Schulze S, Seiferth A, Bonas U. 2010.** Suppression of the *AvrBs1*-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from *Xanthomonas* depends on a SNF1-related kinase. *New Phytologist* **187**: 1058–1074.
- Tellier A, Moreno-Gómez S, Stephan W. 2014.** Speed of adaptation and genomic footprints of host–parasite coevolution under arms race and trench warfare dynamics. *Evolution* **68**: 2211–2224.
- Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHAJ. 2011.** Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell Online* **23**: 4–15.
- Tör M, Lotze MT, Holton N. 2009.** Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3645–3654.
- Travadon R, Bousset L, Saint-Jean S, Brun H, Sache I. 2007.** Splash dispersal of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores and the spread of blackleg on oilseed rape. *Plant Pathology* **56**: 595–603.

- Tsuda K, Katagiri F. 2010.** Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 459–465.
- Tsuji J, Jackson EP, Gage DA, Hammerschmidt R, Somerville SC. 1992.** Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiology* **98**: 1304–1309.
- Voigt CA. 2014.** Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science* **5**: 168.
- Wawra S, Agacan M, Boddey JA, Davidson I, Gachon CMM, Zanda M, Grouffaud S, Whisson SC, Birch PRJ, Porter AJ, et al. 2012.** Avirulence protein 3a (AVR3a) from the potato pathogen *Phytophthora infestans* forms homodimers through its predicted translocation region and does not specifically bind phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 38101–38109.
- Weiberg A, Wang M, Lin F-M, Zhao H, Zhang Z, Kaloshian I, Huang H-D, Jin H. 2013.** Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science (New York, N.Y.)* **342**: 118–123.
- West JS, Fitt BDL. 2005.** Population dynamics and dispersal of *Leptosphaeria maculans* (blackleg of canola). *Australasian Plant Pathology* **34**: 457–461.
- West JS, Fitt BDL, Leech PK, Biddulph JE, Huang Y-J, Balesdent M-H. 2002.** Effects of timing of *Leptosphaeria maculans* ascospore release and fungicide regime on phoma leaf spot and phoma stem canker development on winter oilseed rape (*Brassica napus*) in southern England. *Plant Pathology* **51**: 454–463.
- West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ, Fitt BDL. 2001.** Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology* **50**: 10–27.
- Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, van West P, Chapman S, et al. 2007.** A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**: 115–118.
- Wichmann G, Bergelson J. 2004.** Effector genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* promote transmission and enhance other fitness traits in the field. *Genetics* **166**: 693–706.

- Wilton M, Subramaniam R, Elmore J, Felsensteiner C, Coaker G, Desveaux D. 2010.** The type III effector HopF2Pto targets *Arabidopsis* RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 2349–2354.
- Wolfe MS, McDermott JM. 1994.** Population genetics of plant pathogen interactions: The example of the *Erysiphe Graminis-Hordeum vulgare* pathosystem. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 89–113.
- Van de Wouw AP, Lowe RGT, Elliott CE, Dubois DJ, Howlett BJ. 2014.** An avirulence gene, *AvrLmJ1*, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Molecular Plant Pathology* **15**: 523–530.
- Wu J, Kou Y, Bao J, Li Y, Tang M, Zhu X, Ponaya A, Xiao G, Li J, Li C, et al. 2015.** Comparative genomics identifies the *Magnaporthe oryzae* avirulence effector *AvrPi9* that triggers *Pi9*-mediated blast resistance in rice. *New Phytologist* **206**: 1463–1475.
- Wu S, Shan L, He P. 2014.** Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. *Plant Science* **228**: 118–126.
- Yaeno T, Li H, Chaparro-Garcia A, Schornack S, Koshiba S, Watanabe S, Kigawa T, Kamoun S, Shirasu K. 2011.** Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 14682–14687.
- Yeats TH, Rose JKC. 2013.** The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology* **163**: 5–20.
- Yu Y, Streubel J, Balzergue S, Champion A, Boch J, Koebnik R, Feng J, Verdier V, Szurek B. 2011.** Colonization of rice leaf blades by an African strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* depends on a new TAL effector that induces the rice nodulin-3 *Os11N3* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**: 1102–1113.
- Zhang Y, Crous PW, Schoch CL, Hyde KD. 2011.** Pleosporales. *Fungal Diversity* **53**: 1–221.
- Zhang X, Liban S, Fernando WGD, Cross DJ, Peng G, Kutcher HR. 2015.** Genetic resistance to blackleg in the Canadian canola (*B. napus*) germplasm and the breakdown of the dominant *Rlm3* by the *L. maculans* pathogen population. Saskatoon, .

Zhang Y, Schoch CL, Fournier J, Crous PW, de Gruyter J, Woudenberg JHC, Hirayama K, Tanaka K, Pointing SB, Spatafora JW, et al. 2009. Multi-locus phylogeny of Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. *Studies in Mycology* **64**: 85–102–S5.

Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, et al. 2007. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host & Microbe* **1**: 175–185.

Zhang R, Zhang C-T. 2004. Isochore structures in the genome of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Evolution* **59**: 227–238.

Zhou E, Jia Y, Singh P, Correll JC, Lee FN. 2007. Instability of the *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AVR-Pita* alters virulence. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 1024–1034.

Title : A game of hide and seek between the avirulence genes *AvrLm3* and *AvrLm4-7* in *Leptosphaeria maculans*

Keywords : interaction, avirulence, resistance, *Leptosphaeria maculans*, *Brassica napus*

Abstract:

Leptosphaeria maculans is a Dothideomycete responsible for stem canker on oilseed rape (*Brassica napus*). Genetic control, encompassing mostly the use of major resistance genes, is the most effective method to control this pathogen. When the first cultivars harboring *Rlm7* have been deployed in the early 2000's, all of the European isolates were avirulent towards this resistance gene and *AvrLm3* was considered to be absent from the populations. In 2012, Daverdin *et al.* showed that *L. maculans* has the ability to rapidly overcome the *Rlm7* resistance whenever a strong selection pressure is applied. The phenotyping of isolates sampled by Daverdin *et al.* also showed that more than 98 % of the isolates virulent towards *Rlm7* had become avirulent towards *Rlm3*. This result led to the hypothesis that the presence of *AvrLm4-7* can suppress *AvrLm3* recognition by *Rlm3* and this was validated by the complementation of an isolate avirulent towards *Rlm3* with a functional allele of *AvrLm4-7*.

AvrLm3 is genetically linked to *AvrLm4-7*, at a distance of 20 cM. However, no candidate gene was identified before the beginning of my PhD. The objective of my PhD project was to identify *AvrLm3*, in order to better understand the antagonistic relationship between *AvrLm3* and *AvrLm4-7* phenotypes. The combination of genetic and genomic approaches (genetic mapping, RNA-seq, *de novo* sequencing of an isolate avirulent towards *Rlm3* and BAC clone sequencing) allowed me to identify *AvrLm3*, whose sequence was absent from the reference genome assembly. *AvrLm3* has common characteristics with others genes encoding fungal effector: it codes for a small, cysteine-rich protein, is highly expressed at early infection stages and shows no homology with others fungal genes. Although the mechanism allowing the suppression of *AvrLm3* recognition due to the presence of *AvrLm4-7* has not been elucidated, several hypotheses were invalidated: the presence of *AvrLm4-7* has no impact on *AvrLm3* expression and the two avirulence proteins do not interact physically.

The sampling of field isolates in 2012 and 2013 showed the currently ongoing breakdown of *Rlm7*, with ca. 10% of virulent isolates, and the resurgence of the *AvrLm3* phenotype in these populations, only 0.5 % of isolates being virulent towards both *Rlm3* and *Rlm7*. A large collection of isolates from worldwide origin was genotyped for *AvrLm3*. It revealed that all isolates possess *AvrLm3*, with a high level of allelic diversity. The resurgence of the avirulent phenotype towards *Rlm3* following the breakdown the *Rlm7*, along with the important role of *AvrLm3* and *AvrLm4-7* in fungal fitness, suggest that the antagonistic relationship between these two avirulence phenotypes could be an opportunity to propose original strategies to increase the durability of *Rlm3* and *Rlm7*, by alternating both resistance genes at the landscape level or using pyramiding strategies. However, we identified novel isoforms of *AvrLm4-7* allowing the fungus to escape *Rlm7* recognition, while maintaining the suppression of *Rlm3* recognition effective.

This work allowed to better characterize an unusual gene-for-gene relationship. Indeed, only one other example of antagonism between avirulence phenotypes has been identified to date, in the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* (Houterman *et al.*, 2008). The diversity of mechanisms allowing *L. maculans* to overcome the *Rlm3* resistance illustrates perfectly the complexity of the arms race between plants and pathogens.

Titre : Quand un gène d'avirulence en cache un autre : analyse de l'interaction entre *AvrLm3* et *AvrLm4-7* chez *Leptosphaeria maculans*

Mots clés : interaction, avirulence, résistance, *Leptosphaeria maculans*, *Brassica napus*

Résumé:

Leptosphaeria maculans est l'agent de la nécrose du collet des crucifères, principale maladie fongique du colza (*Brassica napus*). La lutte génétique est à l'heure actuelle la méthode la plus efficace pour contrôler cette maladie et repose principalement sur l'utilisation de gènes de résistance majeurs. Lorsque des variétés de colza possédant la résistance *Rlm7* ont été commercialisées au début des années 2000, la totalité des souches européennes étaient avirulentes vis-à-vis de ce gène de résistance. A l'inverse, *AvrLm3* était considéré comme absent de ces populations. Un précédent projet de thèse réalisé dans l'équipe a montré la rapide capacité d'adaptation de *L. maculans* à la pression de sélection exercée par *Rlm7* (Daverdin *et al.* 2012) et le phénotypage des populations isolées lors de cette étude avait montré que 98% des souches virulentes vis-à-vis de *Rlm7* étaient avirulentes vis-à-vis de la résistance *Rlm3*. L'hypothèse d'un masquage du phénotype avirulent dû à la présence d'*AvrLm4-7* a alors été validée par la complémentation d'une souche avirulente vis-à-vis de *Rlm3* par un allèle fonctionnel d'*AvrLm4-7*. Sur ces bases, l'objectif de mon projet de thèse était d'identifier *AvrLm3* afin d'analyser l'antagonisme entre les phénotypes *AvrLm3* et *AvrLm4-7*, ainsi que les mécanismes menant au contournement de *Rlm3* et *Rlm7*.

Le gène *AvrLm3* avait été identifié comme génétiquement lié à *AvrLm4-7*, à une distance de 20 cM. Toutefois il n'avait pas été possible d'identifier un gène candidat. Par la combinaison d'approches de génétique et de génomique (clonage positionnel, RNA-seq, séquençage *de novo* d'une souche avirulente et séquençage de clones BAC), j'ai pu identifier le gène *AvrLm3*, dont la séquence était absente du génome de référence de *L. maculans*. *AvrLm3* est très fortement exprimé lors des phases précoces de l'infection et code pour une petite protéine sécrétée riche en cystéines et ne présentant pas d'homologies avec d'autres protéines fongiques. Ce gène a donc les caractéristiques classiques des gènes codant pour des effecteurs fongiques, mais présente la particularité d'être le premier gène d'avirulence de *L. maculans* localisé en région télomérique. Bien que le mécanisme par lequel la présence du gène *AvrLm4-7* supprime la reconnaissance du gène *AvrLm3* dans l'interaction entre *B. napus* et *L. maculans* n'ait pas été élucidé au terme de ma thèse, plusieurs hypothèses ont pu être invalidées, notamment l'absence de régulation de l'expression d'*AvrLm3* par *AvrLm4-7*. De plus, une approche double hybride a mis en évidence une absence d'interaction directe entre les deux protéines d'avirulence.

L'isolement de souches de *L. maculans* issues de parcelles expérimentales sur le site de Grignon en 2012 et 2013 a mis en évidence le contournement actuel de la résistance *Rlm7*, avec environ 10 % de souches virulentes. Le phénotypage de ces collections a confirmé la présence majoritaire d'un allèle avirulent d'*AvrLm3* chez celles-ci, moins de 0,5 % des souches isolées étant virulentes à la fois vis-à-vis de *Rlm3* et de *Rlm7*. L'analyse de 592 souches d'origine mondiale a montré qu'*AvrLm3* est toujours présent chez *L. maculans*, sous diverses formes alléliques, suggérant un rôle majeur d'*AvrLm3* dans la fitness fongique. La résurgence du phénotype avirulent vis-à-vis de *Rlm3* suite au contournement de *Rlm7* fait envisager l'opportunité d'exploiter l'interaction entre les deux gènes d'avirulence pour une gestion plus durable des gènes de résistance de *B. napus*, par l'alternance de cultivars possédant *Rlm3* et *Rlm7* ou le pyramidage de ces deux gènes dans des variétés de colza. De plus, le rôle démontré d'*AvrLm3* et d'*AvrLm4-7* dans l'agressivité lors de l'infection suppose un fort coût de fitness lié à la virulence. Toutefois, des mécanismes originaux de compensation permettant au champignon d'échapper à la reconnaissance par *Rlm3* et *Rlm7* tout en conservant *a priori* fonctionnelle la fonction effectrice d'*AvrLm3* et *AvrLm4-7* ont été identifiés. Les résultats obtenus lors de ce travail de thèse ont permis la meilleure caractérisation d'une interaction gène-pour-gène inhabituelle, dont un seul autre exemple a été caractérisé à l'heure actuelle, chez le champignon *Fusarium oxysporum*. La diversité des mécanismes moléculaires permettant à *L. maculans* de contourner la résistance *Rlm3* illustre la complexité de la course aux armements entre les plantes et les agents pathogènes.