



HAL
open science

**Comprendre l'implication des effecteurs fongiques dans
l'infection d'une plante hôte : caractérisation
fonctionnelle d'effecteurs de *Leptosphaeria maculans*, un
champignon pathogène du colza**

Yohann Petit

► **To cite this version:**

Yohann Petit. Comprendre l'implication des effecteurs fongiques dans l'infection d'une plante hôte : caractérisation fonctionnelle d'effecteurs de *Leptosphaeria maculans*, un champignon pathogène du colza. Phytopathologie et phytopharmacie. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS549 . tel-01709853

HAL Id: tel-01709853

<https://theses.hal.science/tel-01709853v1>

Submitted on 15 Feb 2018

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 : 2017SACLS549

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
Préparée à
l'Université Paris-Sud

ÉCOLE DOCTORALE 567 :
Sciences du Végétal : du gène à l'écosystème
Laboratoire : INRA/AgroParisTech UMR1290 BIOGER

Spécialité : Biologie

par

Mr Yohann PETIT

Comprendre l'implication des effecteurs fongiques dans
l'infection d'une plante hôte : caractérisation fonctionnelle
d'effecteurs de *Leptosphaeria maculans*, champignon
pathogène du colza.

Thèse présentée et soutenue à Thiverval-Grignon le 18/12/2017

Composition du jury :

Mme Dufresne, Marie
Mme Fudal, Isabelle
Mr Kroj, Thomas
Mr Duplessis, Sebastien
Mme Attard, Agnès

Professeure Université Paris-Sud
CR INRA Grignon
DR INRA Montpellier
DR INRA Nancy
CR INRA Sophia-Antipolis

Présidente
Directrice de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice

Remerciements

J'ai réalisé ma thèse au sein de l'équipe "Effecteurs et pathogénèse chez *Leptosphaeria maculans*" (ou "Lepto"), de l'unité de recherche BIOGER de l'INRA de Versailles-Grignon.

Une thèse est généralement l'occasion de faire de belles rencontres, tant d'un point de vue scientifique qu'humain. Ma thèse n'a pas fait exception à la règle.

Mes premiers remerciements sont pour ma directrice de thèse, **Isabelle Fudal**. J'ai l'impression qu'une vie s'est écoulé depuis que j'ai poussé les portes de BIOGER pour passer un entretien pour un stage « juste pour voir ». Finalement j'ai bien vu, le séjour a été plus long et plus enrichissant que prévu. Merci de m'avoir fait confiance, pour ce stage puis pour cette thèse, et merci de m'avoir si bien accompagné tout le long de cette superbe aventure.

Je tiens à remercier l'INRA pour avoir financé ce projet de thèse, ainsi que l'ANR pour le financement du contrat StructuraLEP, dont l'appui financier a été d'une grande aide.

Je remercie **Sébastien Duplessis** et **Thomas Kroj** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi que **Marie Dufresne** et **Agnès Attard** pour leur participation à mon jury de thèse.

Un grand merci à **Richard O'Connell**, **Mathieu Gourgues** et **Claire Veneault-Fourrey** pour leur participation à mon comité de thèse, vos conseils et remarques m'ont été d'une grande aide.

Je remercie également l'équipe Lepto dans son intégralité, les anciens, les actuels et les nouveaux. Sans le coaching incroyable de cette équipe il aurait été bien plus difficile (impossible ?) de passer le concours de l'école doctorale. On le disait souvent pour rire, mais vous devriez vraiment ouvrir cette start-up de préparation de concours ! Merci aux chefs d'équipe successifs, **Thierry Rouxel** (désormais Guide Suprême) puis **Mylène Balesdent** de m'avoir si bien accueilli dans l'équipe et si bien guidé lors de la découverte de ce champignon si passionnant. Merci à **Juliette** pour m'avoir appris toutes les ficelles du métier à mon arrivée dans l'équipe. Merci à **Julie** pour avoir enduré cette thèse à mes côtés depuis le début, c'était sympa d'avoir quelqu'un avec qui se plaindre en cas de coups durs. Merci à **Clémence**, sans qui les premières années n'auraient pas été aussi drôles, et que j'ai copié sans vergogne depuis le début (même contrat, même quartier...) : les pauses diplomatiques me manquent, c'était

vraiment le bon temps ! Merci à **Colin** d'avoir apporté une touche de délire à l'ensemble, bon courage pour le reste de ta thèse. Merci à **Claireline** pour ton aide sur la fin du projet, et pour avoir bien voulu finir toutes les manip « laissées en plan ». Merci à **Anaïs**, et bienvenu dans l'équipe. Merci au reste de l'équipe, **Laurent, Michel, Jessica, Bénédicte, Elise, Françoise...**

Un grand merci à **Guillaume Robin**, dont je n'oublierai jamais l'aide précieuse dès le stage de M2. Les choses n'auraient jamais été aussi faciles sans ton expertise, ton aide et ton amitié.

Un merci tout particulier à **Anaïs** (eh oui, encore toi), **Clémentine, Johann, Oriane** et **Maud**, qui ont particulièrement égayé la dernière année. Nos repas et autres festivités vont cruellement me manquer. J'espère que Clémentine et Johann continueront l'entraînement avec autant d'assiduité et de sérieux, mais au vu du relâchement dont vous faites preuve dès que j'ai le dos tourné je n'y crois pas trop.

Merci à tous les membres de la cellule **G.R.O.S**, ça a été un plaisir d'être votre président et de diriger vos travaux de recherche ô combien éminents. Je laisse cette responsabilité entre vos mains, en espérant que la tradition ne disparaîtra pas avec moi.

De manière générale, et sans pouvoir citer tout le monde un par un, merci à tout BIOGER pour votre accueil et votre gentillesse. J'ai passé quatre années de rêve en votre présence, et j'ai fait des rencontres parmi les plus belles de ma vie. Bon courage à tous les thésard(e)s qui n'ont pas encore finis, je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Un merci tout particulier à **Philippe Silar** pour m'avoir fait découvrir le monde fascinant des champignons, et sans qui j'aurais fini bactériologiste à l'Institut Pasteur. Merci également à **Fabienne Malagnac, Sylvain Brun** et **Hervé Lalucque** pour leur aide précieuse lors de mes premiers pas dans ce monde.

Un grand merci à la famille, mes parents **Gilles** et **Marie** et mon frère **Aurélien**, qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans les pires moments. Rien de tout cela n'aurait été possible sans vous. Merci à **Christine** et **Tony** pour leur soutien logistique et moral tout au long de cette

thèse. Merci aux copains, **Thomas, Marianne, Pierrick, Nico, Ceco, Julien, Benoit, Kevin** et **Guillaume** pour avoir pris un air vaguement intéressé lorsque je parlais de champignons, et pour l'énorme soutien moral lors des coups durs (je ne me plaignais pas souvent, mais la préservation de ma santé mentale n'a parfois tenu qu'à votre présence).

Merci à la plus belle rencontre que j'ai fait au cours de cette thèse, qui à elle seule vaut le coup d'avoir sué sang et eau pendant quatre ans.

Merci à **Jean-Claude Flamant**, parti trop tôt, sans qui je n'aurais jamais posé un orteil sur la grande route de la Science.

Liste des figures

Introduction

Figure 1: arbre de vie simplifié des eucaryotes

Figure 2: colonne stratigraphique indiquant les dates d'émergence des symbioses mutualistes entre champignons et organismes photosynthétiques en milieu terrestre

Figure 3: Quelques exemples de maladies de plantes causées par des champignons

Figure 4: le modèle en Zig-Zag des interactions moléculaires plantes-parasites

Figure 5 : exemples de couples PAMP/PRR

Figure 6 : les réactions de défense déclenchées par l'activation de la PTI

Figure 7 : Méthodes de validation de la translocation d'effecteurs fongiques dans les cellules végétales

Figure 8 : exemples de modes d'action connus pour des effecteurs fongiques

Figure 9 : Les principales classes de protéines de résistance aux champignons

Figure 10 : Les différents modèles de reconnaissance des effecteurs par les protéines de résistance

Figure 11 : modèle d'activation de la protéine de résistance MLA10

Figure 12 : réactions de défense déclenchées suite à la reconnaissance d'AvrPto par Prf

Figure 13 : les protéines NRC

Figure 14: Modèles conceptuels des réactions immunitaires végétales

Figure 15 : Les effecteurs de *P. syringae* qui masquent la reconnaissance d'autres effecteurs

Figure 16: triangle de U

Figure 17: Relation phylogénétique et temps de divergence entre les champignons de la classe des Dothidéomycètes

Figure 18: cycle de vie de *Leptosphaeria maculans* en Europe

Figure 19: structure en isochores du génome de *L. maculans*

Chapitre I: AvrLm10-1/AvrLm10-2

Article 2: A two genes – for – one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*

Figure 1. Evidence for wrong genomic assembly in the *AvrLm10* region and identification of the region encompassing the *AvrLm10* locus.

Fig. 2. AvrLm10-1, AvrLm10-2 and the intergenic region between the two genes are necessary to induce Rlm10-mediated recognition.

Figure 3. Interaction phenotypes of *Leptosphaeria maculans* isolates silenced for two *AvrLm10* candidate genes, in relation to the relative expression of the genes.

Figure 4: AvrLm10-1 and AvrLm10-2 physically interact in the yeast two-hybrid system and *in planta*.

Fig. S1: Expression of AvrLm10_1 and AvrLm10_2 during oilseed rape infection.

Fig. S2: Complementation assays in order to identify AvrLm10.

Fig. S3: Immunoblotting shows expression of GFP-AvrLm10-1 and AvrLm10-2-RFP in tobacco leaves.

Fig. S4: As a BiFC negative control, the *L. maculans* effector AvrLm4-7 does not physically interact with AvrLm10-2

Fig. S5: Relationship between the residual expression of two effector genes and the mean leaf lesion size developed on susceptible varieties.

Résultats complémentaires:

Figure 1 : Validation des cibles végétales potentielles d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 identifiées par crible double-hybride.

Figure 3: localisation subcellulaire d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 dans *N. benthamiana* et *A. thaliana*.

Figure 4: AvrLm10-1 et AvrLm10-2 suppriment la mort cellulaire

Figure 5: L'ajout d'un fluorochrome n'impacte pas la capacité d'AvrLm10-1 à supprimer la mort cellulaire.

Figure 6 : Alignements des séquences d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 avec celles de leurs orthologues chez différents champignons phytopathogènes.

Chapitre II: AvrLm4-7

Figure 1 : caractéristiques structurales d'AvrLm4-7

Figure 2 : Hypothèses pouvant expliquer la suppression de la reconnaissance d'AvrLm3 par Rlm3 en présence d'AvrLm4-7.

Figure 3: Localisation subcellulaire de la cible d'AvrLm4-7 dans *N. benthamiana*.

Figure 4: Localisation subcellulaire d'AvrLm4-7 dans *N. benthamiana*.

Figure 5: AvrLm4-7 supprime la mort cellulaire provoquée par plusieurs inducteurs.

Figure 6: AvrLm4-7 supprime la mort cellulaire provoquée par JIP60

Figure 7: les lignées transgéniques d'*A. thaliana* expriment *AvrLm4-7*.

Figure 8: l'expression stable d'*AvrLm4-7* dans *A. thaliana* n'affecte pas la morphologie des plantes.

Figure 9: l'expression stable d'*AvrLm4-7* dans *A. thaliana* n'affecte pas la sensibilité des plantes à *Botrytis cinerea*.

Figure 10: l'expression stable d'*AvrLm4-7* dans *A. thaliana* n'affecte pas le dépôt de callose suite à l'inoculation par *Leptosphaeria maculans*.

Chapitre III: AvrLm3

Figure 1: localisation subcellulaire d'AvrLm3 dans *N. benthamiana* et *A. thaliana*

Figure 2: localisation subcellulaire dans *N. benthamiana* et *A. thaliana* des cibles potentielles d'AvrLm3 identifiées lors du crible double-hybride

Figure 3: AvrLm3 supprime la mort cellulaire provoquée par plusieurs inducteurs

Figure 4: les lignées transgéniques d'*A. thaliana* expriment *AvrLm3*

Figure 5: l'expression stable d'*AvrLm3* dans *A. thaliana* n'affecte pas la morphologie des plantes

Figure 6: l'expression stable d'*AvrLm3* dans *A. thaliana* n'affecte pas la sensibilité des plantes à *Erysiphe cruciferarum*

Liste des tableaux

Introduction

Article 1: Complex Interactions between Fungal Avirulence Genes and Their Corresponding Plant Resistance Genes and Consequences for Disease Resistance Management

Table 1: Characteristics of fungal avirulence genes and plant resistance genes involved in complex interactions.

Chapitre I: AvrLm10-1/AvrLm10-2

Article 2: A two genes – for – one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*

Table 1: Segregation analysis of interaction phenotypes toward *Rlm1* and *Rlm10* in *Leptosphaeria maculans*

Table 2: Conservation of the synteny observed at the *AvrLm10* locus.

Table 3: FRET-FLIM analysis shows that AvrLm10-1 physically interacts with AvrLm10-2 in the cytoplasm of *N. benthamiana* cells

Table S1: Primers used for vector constructions and qRT-PCR

Table S2: vectors used in this study. Vectors for complementation and silencing experiments are homemade. Vectors for transient expression assays are from Martin et al. (2009).

Table S3: Analysis of the “variable leaf lesion size” as a function of the variety and the isolate used

Résultats complémentaires:

Tableau 1 : Cibles végétales potentielles d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 identifiées par crible double hybride

Tableau 2 : Polymorphisme d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* dans les souches naturelles de *L. maculans* virulentes vis-à-vis de *Rlm10*

Tableau 3 : Identification de paralogues d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 chez *Leptosphaeria maculans* 'brassicae'

Chapitre II: AvrLm4-7

Tableau 1: Cibles végétales potentielles d'AvrLm4-7 identifiées par crible double hybride contre une banque d'ADNc de colza infecté par *L. maculans*

Tableau 2: Cibles végétales potentielles d'AvrLm4-7 identifiées par crible double hybride contre une banque d'ORF d'*A. thaliana*

Chapitre III: AvrLm3

Tableau 1 : Cibles végétales potentielles d'AvrLm3 identifiées par crible double hybride contre une banque d'ADNc de colza infecté par *L. maculans*

Annexes

Tableau S1 : amorces utilisées au cours de cette thèse.

Table des matières

Introduction	14
I. Introduction de phytopathologie générale	15
II. Les modes de vie des champignons	17
1. De l'importance des champignons dans les écosystèmes et l'activité humaine	17
2. Mode de vie des champignons associés aux plantes	18
3. Une classification trop simpliste ?	26
III. Le zig-zag des interactions moléculaires plante-pathogène	27
1. La « PAMP-Triggered Immunity » (PTI)	29
a. PAMPs et DAMPs, éliciteurs de la PTI	31
b. La reconnaissance des PAMPs par les PRR.....	31
c. Les voies de signalisations activées lors de la PTI.....	33
d. Les réactions de défense activées lors de la PTI	35
2. L'ETS, ou répression des réponses de défense par les effecteurs	37
a. La notion d'effecteur	37
b. Prédiction des répertoires d'effecteurs fongiques	38
c. Principaux questionnements concernant les effecteurs et analyses mises en place pour y répondre	41
d. La notion d'effecteur, une délimitation fluctuante	45
e. Mode d'action de quelques effecteurs d'agents pathogènes filamenteux	47
i. Interaction avec la chitine	49
ii. Inhibition de protéases végétales	50
iii. Interférence avec les voies de signalisation ou les réponses de défense induites lors de la PTI	50
iv. Interférence avec le métabolisme hormonal	52
v. Interférence avec les ubiquitine-ligases E3	53
3. L'Effector-Triggered Immunity (ETI)	55
a. Les protéines de résistance	55
b. Modèles de reconnaissance des effecteurs	57
c. Voies de signalisation et réactions de défense activées lors de l'ETI	61
i. Activation des protéines de résistance	61
ii. Voies de signalisation menant à l'ETI	64
iii. La notion de helper-NLR	67
iv. Eléments de différenciation entre PTI et ETI	70
4. La suppression de l'ETI	73

a.	Perte ou modification du gène d'avirulence	73
b.	Suppression de la reconnaissance du gène d'avirulence par un effecteur	74
c.	Suppression des réponses induites lors de l'ETI	77
5.	Les limites du modèle en zig-zag	78
IV.	Le pathosystème <i>Leptosphaeria maculans</i> / <i>Brassica napus</i>	81
1.	<i>Brassica napus</i>	81
2.	<i>Leptosphaeria maculans</i>	83
a.	Phylogénie	83
b.	Cycle de vie	85
c.	Génome	86
d.	Lutte contre le phoma du colza	87
e.	Gènes d'avirulence	89
V.	Objectifs de la thèse	91
	<u>Article 1</u> : Complex Interactions between Fungal Avirulence Genes and Their Corresponding Plant Resistance Genes and Consequences for Disease Resistance Management	95
	Chapitre I/ AvrLm10-1/AvrLm10-2	103
	<u>Article 2</u> : A two genes – for – one gene interaction between <i>Leptosphaeria maculans</i> and <i>Brassica napus</i>	107
	Résultats complémentaires	161
1.	Identification de cibles végétales d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 par crible double-hybride	161
2.	Localisation subcellulaire d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2	167
3.	Suppression de la mort cellulaire par AvrLm10-1 et AvrLm10-2	169
4.	Polymorphisme d' <i>AvrLm10-1</i> et <i>AvrLm10-2</i> dans les souches naturelles	173
5.	Paralogues d' <i>AvrLm10-1</i> et <i>AvrLm10-2</i> dans le génome de <i>L. maculans</i>	175
	Discussion	179
	Chapitre II/ AvrLm4-7	185
	Introduction	187
	Résultats	193
1.	Identification de cibles végétales d'AvrLm4-7 par crible double-hybride	193
2.	Localisation subcellulaire d'AvrLm4-7	195
3.	Suppression de la mort cellulaire par AvrLm4-7	195
4.	Génération et caractérisation de lignées transgéniques d' <i>A. thaliana</i> exprimant constitutivement AvrLm4-7	199
5.	Caractérisation des lignées transgéniques d' <i>A. thaliana</i> exprimant constitutivement AvrLm4-7 pour leur sensibilité à différents champignons pathogènes biotrophes, hémibiotrophes et nécrotrophes.....	201

Discussion	206
Chapitre III/ AvrLm3	210
Introduction	212
Résultats	213
1. Localisation subcellulaire d'AvrLm3	211
2. Identification de cibles végétales d'AvrLm3 par crible double-hybride	215
3. Suppression de la mort cellulaire par AvrLm3	217
4. Génération et caractérisation de lignées transgéniques d' <i>A. thaliana</i> exprimant constitutivement AvrLm3	217
5. L'expression stable d'AvrLm3 n'affecte pas la sensibilité d' <i>A. thaliana</i> à différents agents pathogènes nécrotrophes et hémibiotrophes.....	219
Discussion	223
Matériel et Méthodes.....	229
Discussion générale.....	244
1. Comment utiliser la connaissance des cibles végétales et processus cellulaires ciblés par les effecteurs de <i>L. maculans</i> en sélection variétale afin de diminuer la sensibilité des plantes aux maladies ?	245
2. La suppression de la mort cellulaire par les effecteurs de <i>L. maculans</i>	250
3. Les effecteurs de <i>L. maculans</i> sont-ils conservés structuralement et / ou fonctionnellement chez d'autres champignons phytopathogènes ?.....	253
4. Une meilleure connaissance des effecteurs fongiques permet-elle d'améliorer le spectre d'action des résistances qualitatives et leur gestion ?.....	256
Annexes	259
1. Amorces	260
2. Bilan d'activité	263
 Références bibliographiques.....	 270

INTRODUCTION

I. Introduction de phytopathologie générale

La majorité des pertes de rendement en agriculture – cultures maraichères comme grandes cultures – sont causées par huit groupes d'organismes vivants : les plantes parasites, les bactéries, les virus, les particules viroïdes, les nématodes, les insectes, les oomycètes et les champignons, ces derniers étant les deuxièmes principaux responsables de ces pertes juste après les adventices (Agrios, 2005, Fisher *et al.*, 2012). Ces réductions considérables des rendements des cultures, notamment de celles destinées à l'alimentation humaine, ont été responsables de nombreuses famines. Depuis l'antiquité, divers ouvrages ont rapporté des épidémies sur les cultures en Chine, en Inde, en Grèce ou même à Rome, où la rouille du blé a été évoquée dans les écrits dès l'époque d'Aristote, entraînant la création de la fête religieuse de Robigalia destinée à épargner les cultures (Ovide) et est soupçonnée d'être responsable des terribles famines de la fin du Vème siècle qui ont précipité la chute de l'empire romain. Contrairement aux idées reçues, la première étude reliant le développement d'une maladie à un microorganisme n'a pas été réalisée par Robert Koch sur le bacille de la tuberculose en 1890. Dès 1807, le français Isaac-Bénédict Prevost, en cherchant à déterminer les causes de la carie du blé, démontre de manière équivoque que « les grains ou globules qui composent la poussière de la carie sont les semences (gemmes, gemmules ou gongyles) d'une plante microscopique, et [que] cette même plante est la cause de la maladie du grain » (Prevost, 1807). Cette « plante microscopique » était en fait un champignon phytopathogène du genre *Tilletia*. Ces travaux tomberont cependant dans l'oubli en raison du mépris de l'Académie des Sciences pour les travaux de Prevost et sa préférence pour la théorie de la génération spontanée. En 1861, l'allemand Anton de Bary, considéré comme le père de la phytopathologie, fait de même en prouvant que la terrible épidémie de mildiou de la pomme de terre responsable de la grande famine d'Irlande du XIXème siècle a été causée par l'agent pathogène filamenteux *Phytophthora infestans* (Matta, 2010). Cette épidémie demeure l'exemple le plus frappant de famine causée

par un agent pathogène de plante puisqu'elle a entraîné la mort de plus d'un million d'irlandais (Kinealy, 1994).

En 1940, les progrès de la génétique – les travaux de Mendel, Morgan et Darwin sont désormais à la base de la recherche en génétique – permettent à Harold Henry Flor de théoriser la relation gène-pour-gène, selon laquelle à un gène d'avirulence (*AVR*) de l'agent pathogène correspond un gène de résistance (*R*) de la plante (Flor, 1971). Toute interaction génétique entre le gène *AVR* et le gène *R* se conclut par la résistance de la plante à l'agent pathogène (interaction incompatible). Toute autre combinaison allélique entraîne la sensibilité de la plante et le développement de la maladie (réaction compatible). La fin du XXème siècle verra pour sa part le développement exponentiel des techniques de biologie moléculaire, permettant notamment le séquençage massif de génomes d'agents phytopathogènes, ainsi que l'édition de ces génomes indispensable aux études fonctionnelles de génétique moléculaire. Le premier génome d'un champignon phytopathogène à avoir été séquencé est celui de *Magnaporthe oryzae* (Dean *et al.*, 2005). Depuis, le développement toujours plus rapide des techniques de séquençage a abouti au séquençage massif de génomes d'agents phytopathogènes et à l'avènement de l'ère de la post-génomique, avec des projets toujours plus ambitieux comme celui de séquencer 1000 génomes de champignons (1000 Fungal Genome Project : <http://1000.fungalgenomes.org/home/>).

La pratique de l'agriculture intensive depuis la fin des années 1970 favorise le développement des épidémies. En effet, la monoculture sur des parcelles de très grande taille, de même que le raccourcissement des rotations culturales, ont entraîné une perte de diversité des plantes cultivées, qui ne sont plus à même de résister durablement aux agents pathogènes (Ricci et Bui, 2011). Quatre leviers principaux permettent de juguler les invasions d'agents phytopathogènes. Le premier de ces leviers est la lutte agronomique, c'est-à-dire la mise en place de pratiques culturales destinées à limiter le développement des agents phytopathogènes : rotation culturale,

enfouissement des résidus de culture, compagnonnage, travail du sol... Le deuxième moyen de lutte est la lutte chimique qui consiste à utiliser des produits phytosanitaires (herbicides, insecticides, fongicides...) afin de stopper ou limiter le développement des ravageurs (Hirooka et Ishii, 2013). Cette méthode de lutte présente le double désavantage d'être contournable par des agents pathogènes résistants, et d'avoir un impact environnemental désastreux. Elle est de plus en désaccord avec le plan Ecophyto 2 qui vise à diviser par deux l'usage de pesticides avant 2025. La lutte génétique consiste pour sa part à utiliser des résistances variétales qui peuvent être de deux types. La résistance qualitative, le plus souvent monogénique et totale, permet de stopper totalement le développement d'un agent pathogène (Staskawicz, 2001). Cependant son caractère monogénique la rend plus aisément contournable par ces mêmes agents pathogènes. La résistance quantitative est une résistance partielle et souvent multi-génique (Niks *et al.*, 2015). Elle ne stoppe pas totalement le développement de la maladie, mais serait plus difficilement contournable. Enfin, la lutte biologique consiste à utiliser d'autres organismes (bactéries, champignons, nématodes...) ayant un effet négatif sur le développement de l'agent phytopathogène (Suty, 2010). Le système de protection intégrée des cultures, en vigueur jusque dans les années 1970, permettait d'utiliser ces différents moyens de lutte en conjonction pour maintenir la sévérité des épidémies à un niveau économiquement acceptable (Ricci et Bui, 2011). Un retour à ces pratiques pourrait être observé dans les années à venir grâce à l'émergence de l'agro-écologie (Wezel *et al.*, 2009).

II. Les modes de vie des champignons

1. De l'importance des champignons dans les écosystèmes et l'activité humaine

Les champignons forment un règne à part entière, bien distinct de ceux des plantes et des animaux. Le nombre d'espèces appartenant à ce genre avait été estimé à 1,5 millions en 2001 (Hawksworth, 2001), Ce chiffre a par la suite été relevé à 5 millions, mais certains experts

l'estiment encore plus important, considérant qu'il devrait vraisemblablement exister plus d'une espèce de champignon par espèce végétale, plus quelques une associées à des animaux, à d'autres champignons, à d'autres formes de vie ou vivant de manière indépendante (Silar, 2013).

Les champignons jouent des rôles cruciaux dans plusieurs processus écologiques. Ils sont d'excellents décomposeurs de la matière organique végétale, participant ainsi de manière très importante au cycle de la matière organique. Certaines espèces fongiques vivent en association avec des algues pour former les lichens. Les champignons développent également des associations bénéfiques avec des animaux. On peut citer les champignons présents dans le tractus digestif des termites et qui leur permettent de dégrader efficacement la matière végétale, ou ceux cultivés par les fourmis champignonnistes dans le même but (Silar et Malagnac, 2013).

Les champignons ont été très tôt domestiqués par l'Homme, notamment pour la production de denrées alimentaires (pain, fromage, bière, vin..), ou plus récemment de molécules à haute valeur ajoutée (antibiotiques, anticancéreux ; Silar et Malagnac 2013). D'autres projets novateurs utilisant les champignons sont actuellement en cours de développement, parmi lesquels on peut citer la dégradation enzymatique de la biomasse végétale afin de produire des biocarburants (Liao *et al.*, 2016), la mycoremédiation (dépollution des sols contaminés au moyen de champignons, Silar *et al.*, 2011), ou encore la constitution d'une muraille végétale en Afrique australe en associant des plants de jujubier à des champignons symbiotes des racines, dans le but de faire reculer le désert tout en favorisant la culture d'une plante aux multiples intérêts agronomiques.

2. Modes de vie des champignons associés aux plantes

Les champignons phytopathogènes sont la principale cause de pathologies végétales (Deacon, 2005), et les pertes de rendement associées à ces maladies permettraient de nourrir plusieurs

centaines de millions d'individus chaque année (Fisher *et al.*, 2012). Traditionnellement, la phytopathologie fongique a toujours inclus l'étude des oomycètes, des formes de vie filamenteuses anciennement classées parmi les champignons mais dont la phylogénie moléculaire a montré qu'ils n'étaient en rien apparentés aux mycètes (Fig. 1). Bien que phylogénétiquement éloignés, les oomycètes partagent certains traits phénotypiques avec les champignons (formation d'hyphes, reproduction par spores, structures d'invasion analogues...), et sont donc étudiés par les mêmes spécialistes.

Les champignons associés aux plantes peuvent avoir différents modes de vie. Les champignons saprophytes sont retrouvés sur la matière organique végétale morte, qu'ils peuvent décomposer et recycler, ce qui revêt une importance cruciale dans les écosystèmes, notamment dans le turnover de la matière organique végétale (Mäkelä *et al.*, 2014). Les champignons peuvent également vivre avec les plantes en symbiose – au sens large, tel que défini par De Bary en 1879. Si la symbiose est bénéfique au champignon sans impacter la plante, on parle de relation de commensalisme. Lorsque l'association symbiotique est bénéfique au champignon et à la plante, on parle de mutualisme. Les champignons mutualistes les plus connus sont les champignons mycorhiziens, qui s'associent aux racines de 90% des espèces végétales au monde. Dans les écosystèmes forestiers où les réserves d'azote et de phosphate sont très limitées, les symbioses mycorhiziennes revêtent une importance cruciale.

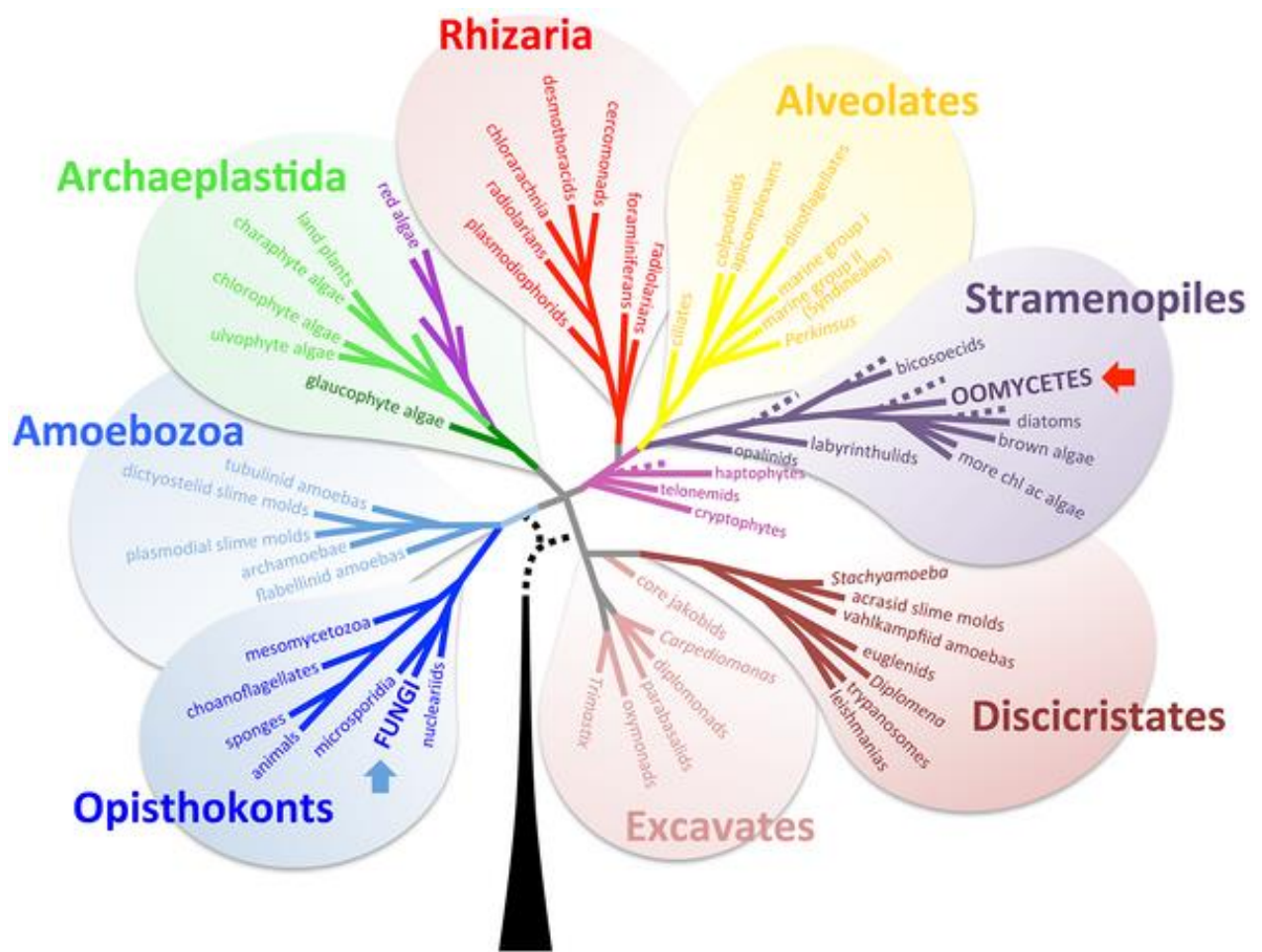


Figure 1: arbre de vie simplifié des eucaryotes.

Les champignons, appartenant au super-règne des Opisthokonts, sont phylogénétiquement très éloignés des oomycètes, qui font partie de la division des Straménophiles. D’après Lee et al. (2012).

En effet, dans cette association, le champignon est responsable du piégeage du carbone, de la mobilisation des composés minéraux et de la dégradation des nutriments organiques qui seront mis à disposition de la plante, augmentant ainsi sa croissance (Veneault-Fourrey et Martin, 2011). De son côté, la plante étant un organisme photosynthétique, elle met à disposition du symbionte ses réserves de glucides issues de la photosynthèse. Cette relation mutualiste est d'une telle importance pour la physiologie du partenaire végétal que les poils absorbants originellement présents sur les racines et connus pour être responsables de la nutrition sont en fait très peu répandus dans le règne végétal. De plus, la colonisation des terres émergées par les Archégoniates - les végétaux verts terrestres et pluricellulaires - s'est faite en conjonction avec celle des champignons inférieurs de l'ordre des Glomales (plus de 85% des Archégoniates actuelles vivent en association mutualiste avec des Glomales) ce qui indique un caractère ancestral de cette association et constitue une preuve de l'importance de ces formes de vie dans le développement de la vie sur Terre (Fig. 2). Les champignons ont par la suite aidé à la colonisation de milieux soumis à des climats plus rudes ou plus variables par les végétaux, et ont eux-mêmes colonisé toutes les niches écologiques terrestres (Selosse, 2000).

On trouve également des champignons qui accomplissent tout leur cycle de vie à l'intérieur même des plantes, et que l'on qualifie d'endophytes. Les endophytes étant très peu étudiés, il est aujourd'hui encore difficile de savoir quel bénéfice ils retirent de ce type de relation, et si cette relation tient plutôt du commensalisme ou du mutualisme. Dans certains cas, un rôle bénéfique a clairement été mis en évidence, comme pour les champignons du genre *Neotyphodium* qui sécrètent des alcaloïdes permettant d'éloigner les insectes ravageurs de leur plante hôte (Arnold, 2007; Jia *et al.*, 2016).

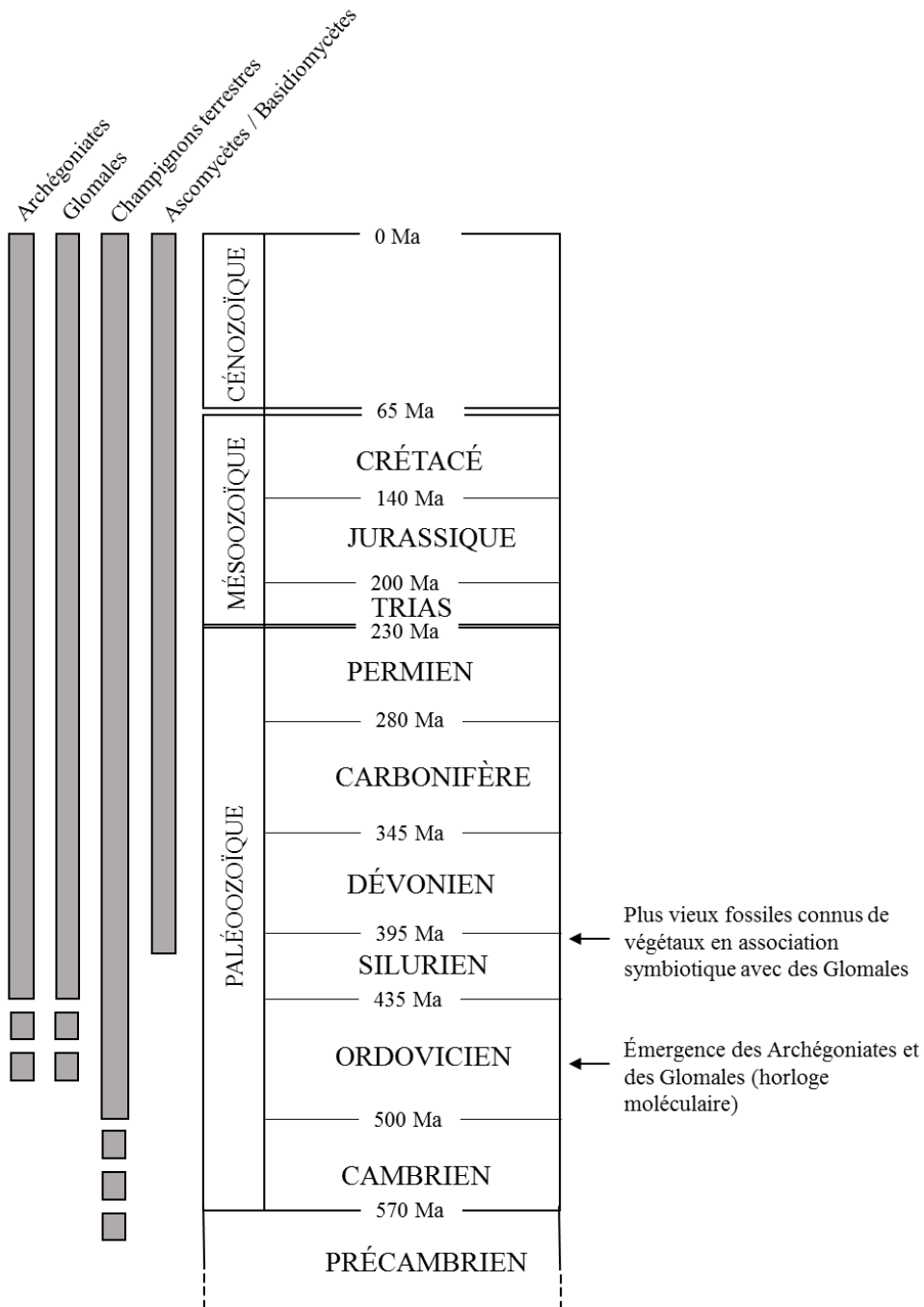


Figure 2: colonne stratigraphique indiquant les dates d'émergence des symbioses mutualistes entre champignons et organismes photosynthétiques en milieu terrestre.

L'horloge moléculaire permet de dater l'émergence conjointe de ces deux groupes entre 350 et 450 millions d'années. Adapté de Selosse (2000).

Enfin, les champignons peuvent être phytopathogènes et entraîner une perte de croissance ou la mort de l'hôte végétal. Les champignons phytopathogènes revêtent une importance particulière tant au niveau des dégâts qu'ils occasionnent sur les cultures (les plus grandes menaces contre les cultures les plus nourricières – riz, blé et maïs – sont dues à des champignons) qu'en tant que modèles d'étude de choix pour les interactions plantes-pathogènes (Fig. 3, Dean *et al.*, 2012).

Ces champignons phytopathogènes peuvent adopter un mode de vie biotrophe, nécrotrophe ou hémibiotrophe. Les champignons biotrophes requièrent un organisme vivant pour compléter leur cycle de vie. Il n'est pas dans l'intérêt biologique de ces champignons de provoquer la mort de leur plante hôte, ni de déclencher des réactions de défense. A ce titre, leurs génomes contiennent une plus grande proportion de gènes codant des petites protéines sécrétées considérées comme des effecteurs putatifs (cf : III.2.a) par rapport à la proportion de gènes codant des enzymes de dégradation de la paroi végétale ou impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Kämper *et al.*, 2006; Nemri *et al.*, 2014; Lo Presti *et al.*, 2015). Cette catégorie d'agents pathogènes regroupe des champignons appartenant par exemples aux ordres des Pucciniales (rouilles), des Ustilagiales (charbons) ou des Erysiphales (oïdium).



Figure 3: Quelques exemples de maladies de plantes causées par des champignons.

A : rouille du lin causée par *Melampsora lini*. **B** : charbon du maïs causé par *Ustilago maydis*. **C** : tâches de rouille noire du blé provoquée par *Puccinia graminis*. **D** : pourriture grise sur framboises causée par *Botrytis cinerea*. **E** : pourriture blanche du tournesol causée par *Sclerotinia sclerotiorum*. **F** : pyriculariose du riz causée par *Magnaporthe oryzae*. **G** : Fusariose de la tomate causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **H** : septoriose du blé causée par *Zymoseptoria tritici*. **I** : anthracnose de la mangue causée par une espèce de *Colletotrichum*. Adapté de <https://www7.inra.fr/hyp3/index.html> et Dean *et al.*, (2012).

Les champignons nécrotrophes provoquent activement la nécrose des cellules de l'hôte et se développent sur les tissus nécrosés. A ce titre, leur stratégie d'infection est majoritairement basée sur l'utilisation de toxines et d'enzymes lytiques responsables de la déliquescence des tissus végétaux. Cependant, il est apparu récemment que les organismes nécrotrophes sont également pourvus de facteurs de virulence permettant de manipuler finement les défenses de l'hôte, comme par exemple des petits ARN interférents (Weiberg *et al.*, 2013), ou des molécules présentant les mêmes caractéristiques que les effecteurs putatifs des organismes biotrophes (Guyon *et al.*, 2014). *Botrytis cinerea*, responsable de la pourriture grise de plus de 1400 espèces végétales, est le champignon nécrotrophe le plus étudié et ayant l'impact le plus important sur les cultures. Mais cette catégorie d'agents pathogènes comprend également *Sclerotinia sclerotiorum*, agent de la pourriture blanche de plus de 400 espèces, et *Cochliobolus heterostrophus*, qui infecte le maïs.

Enfin, les organismes hémibiotrophes requièrent un hôte vivant pour leur croissance végétative, puis finissent par provoquer la mort de cet hôte afin de se reproduire sur ses tissus morts. Cette stratégie étant intermédiaire entre la biotrophie et la nécrotrophie, ces organismes possèdent un répertoire intermédiaire de toxines et enzymes lytiques, ces molécules étant souvent exprimées à des stades très précis du cycle de vie. Le champignon hémibiotrophe le plus étudié est *M. oryzae*, agent responsable de la pyriculariose du riz – la maladie la plus dommageable de cette céréale -, dont certaines lignées ont récemment été démontrées comme étant également capables d'infecter le blé. Mais cette catégorie regroupe également *Fusarium graminearum*, champignon pathogène du blé et principale cause de contamination par des mycotoxines, *Fusarium oxysporum*, qui infecte une centaine d'espèces de cultures maraîchères, *Zymoseptoria tritici*, agent de la septoriose du blé, ou encore *Colletotrichum spp*, dont le spectre d'hôte regroupe la quasi-totalité des plantes cultivées.

3. Une classification trop simpliste ?

Comme beaucoup de modèles et généralisations en biologie, la classification des champignons en fonction de leur mode de vie est sujette à débat et, plus qu'une classification rigide et immuable, doit être vue comme un cadre simplifié de réflexion. En effet, la notion même de symbiose est difficile à définir de manière consensuelle. De Bary définissait la symbiose comme « une association durable de deux êtres vivants ». Mais dans le langage commun le terme de symbiose a peu à peu commencé à désigner uniquement une association bénéfique pour les deux partenaires (soit uniquement du mutualisme). Dans un cas comme dans l'autre, il est parfois difficile de juger si une association est bénéfique ou neutre pour un partenaire, rendant floue la limite entre le commensalisme et le mutualisme. De plus, les molécules utilisées par les champignons pathogènes pour contourner les réactions de défense de la plante sont parfois les mêmes que celles utilisés par les champignons mutualistes pour mettre en place la symbiose (phytoalexines, glucanase, effecteurs..., Rey et Schornack 2013). Dans la mesure où le partenaire fongique comme la plante accaparent un certain type de ressource de l'autre partenaire, certains auteurs parlent même de « parasitisme réciproque » pour qualifier les associations mycorrhiziennes (Antonovics *et al.*, 2015). De même, la classification des modes de vie des organismes phytopathogènes est sujette à de nombreux débats. La catégorie des hémibiotrophes notamment pose le plus de problèmes, car des agents pathogènes traditionnellement rangés dans cette catégorie sont parfois considérés par d'autres auteurs comme des biotrophes ou des nécrotrophes selon le cas (Sánchez-Vallet *et al.*, 2015). Il a déjà été observé que des organismes endophytes, n'ayant aucun impact négatif apparent sur leur plante hôte, pouvaient devenir pathogènes lorsque la plante est soumise à des conditions de stress et ne parvient plus à limiter leur développement (Schulz et Boyle, 2005). Cette observation a mené au concept de continuum endophyte-pathogène-saprophyte (Arnold, 2007; Saikkonen *et al.*, 1998). Ces différents modes de vie ne sont donc que des types extrêmes, et

le type d'interaction réelle entre la plante et son partenaire fongique peut se situer à un niveau intermédiaire, voire varier au cours du temps ou en fonction des facteurs environnementaux. Il est également possible d'observer un passage du parasitisme au mutualisme. En effet, des souches d'*Epichloë typhina*, champignon pathogène de diverses Poaceae, ont été trouvées en association mutualiste avec des graminées (Scott et Schardl, 1993). Il a également été évoqué que les champignons mycorhiziens pourraient être d'anciens saprophytes qui auraient évolué vers le mutualisme (Martin *et al.*, 2016). Ces espèces fongiques peuvent d'ailleurs adopter un mode de vie saprophyte lorsqu'elles sont privées de leur plante hôte, avec plus ou moins de succès en fonction de leur arsenal de gènes permettant l'adoption d'un mode de vie saprophyte.

III. Le zig-zag des interactions moléculaires plante-pathogène

Les plantes sont par nature incapables de bouger pour échapper à une invasion par un ravageur. De plus, contrairement aux animaux, elles ne disposent pas d'une immunité cellulaire qui assurerait des réactions de défense à l'échelle de l'organisme entier. Leur immunité se fait essentiellement à l'échelle de la cellule, chacune d'elles étant responsable de la détection de l'agent pathogène (Ausubel, 2005). Aussi, un certain nombre de défenses préformées permettent de stopper la plupart des infections de manière physique (écorce, cuticule, paroi végétale...) ou chimique (phytoanticipines...) (González-Lamothe *et al.*, 2009).

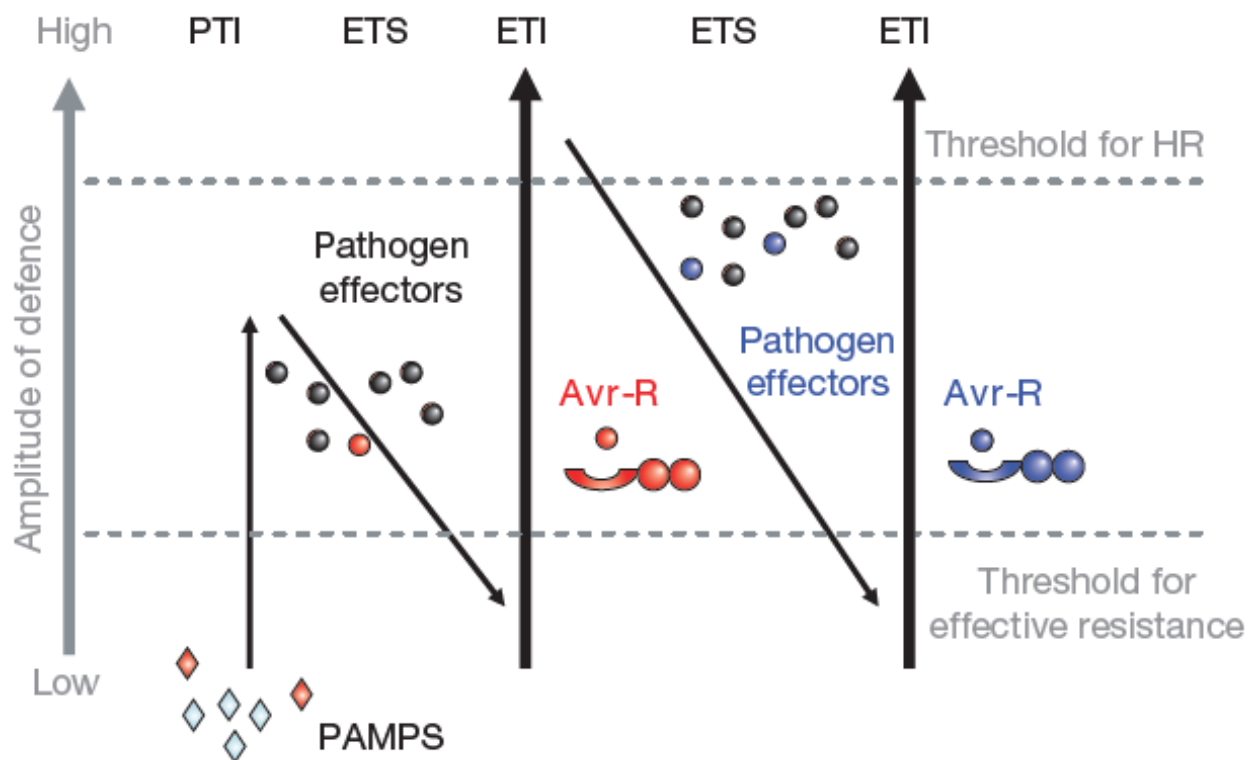


Figure 4: le modèle en Zig-Zag des interactions moléculaires plantes-parasites

Ce modèle de l'immunité végétale est constitué de quatre phases. La première phase consiste en la reconnaissance par la plante de molécules très conservées des agents pathogènes appelées Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs). Cette phase est qualifiée de PTI (PAMP-Triggered Immunity). Certains agents pathogènes adaptés sont capables de contourner la PTI en employant une classe de molécules qualifiées d'effecteurs, déclenchant la deuxième phase de ce modèle : l'ETS (Effector-Triggered Susceptibility). Les plantes résistantes possèdent des protéines de résistance (R) qui reconnaissent un effecteur donné et déclenchent l'ETI (Effector-Triggered Immunity). L'agent pathogène peut supprimer l'ETI via différents moyens (cf III. 4) et rétablir l'ETS. La coévolution entre la plante et son agent pathogène entraîne une « course aux armements » qui peut induire plusieurs cycles d'ETI/ETS à l'échelle évolutive. L'amplitude des réactions de défense associées aux phases de PTI et ETI diffèrent, comme indiqué sur le graphique avec deux seuils pour la mise en place d'une résistance effective contre un agent pathogène.

Adapté de Jones et Dangl (2006).

Cependant certains agents pathogènes adaptés sont capables, dans le cadre de l'infection d'une plante hôte, de contourner ces défenses préformées et d'établir un dialogue moléculaire avec la plante. Si l'on considère la quantité phénoménale d'agents pathogènes ayant l'occasion d'entrer en contact avec chaque plante, la pathologie apparaît comme étant plutôt une exception puisqu'un nombre très limité d'agents pathogènes vont être capables d'accomplir leur cycle infectieux. Par ailleurs, les plantes ont mis au point, au cours de leur coévolution avec les microorganismes, un ensemble de réactions de défense basées sur deux niveaux d'immunité selon le modèle du zig-zag théorisé par Jones et Dangl en 2006 (Fig. 4) : la PTI (PAMP-Triggered Immunity) et l'ETI (Effector-Triggered Immunity), dont les modalités seront détaillées dans la suite de ce manuscrit.

1. La "PAMP-Triggered Immunity" (PTI)

L'établissement d'une réponse immunitaire de type PTI nécessite la reconnaissance de molécules (PAMP - Pathogen-Associated Molecular Patterns - ou DAMPs - Damage-Associated Molecular Patterns) indiquant la présence d'un parasite par des récepteurs appelés PRR (Pattern-Recognition Receptor), la signalisation de cette reconnaissance et l'induction de réactions de défense permettant de stopper l'infection.

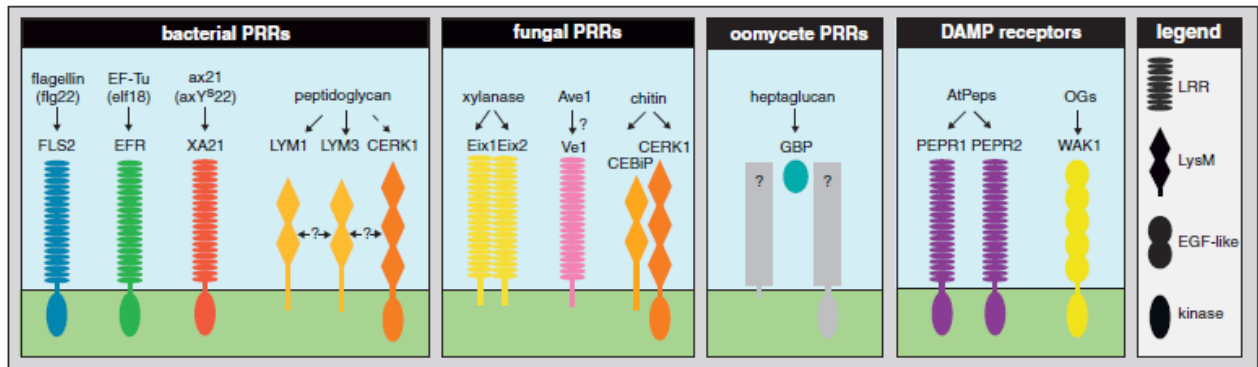


Figure 5 : exemples de couples PAMP/PRR.

Les PRR (Pattern-Recognition Receptor) sont des récepteurs membranaires de type Receptor-Like Proteins (RLP) ou Receptor-Like Kinases (RLK). Ils comportent un domaine transmembranaire (ou une ancre GPI - glycosyl-phosphatidylinositol) et un domaine N-terminal extracellulaire responsable de la reconnaissance des PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Ce domaine N-terminal peut être un domaine riche en leucine LRR (Leucine Rich Repeat), ou encore un domaine LysM. Les RLK possèdent également un domaine intracellulaire à activité kinase impliqué dans la transduction du signal.

Adapté de Monaghan and Zipfel (2012).

a. PAMPs et DAMPs, éliciteurs de la PTI

Même s'il parvient à pénétrer les barrières préformées de la plante, un agent pathogène non-adapté va être confronté au premier niveau de l'immunité végétale, la PTI. Des PAMPs, parfois appelés MAMP (Microbe-Associated Molecular Patterns), vont pouvoir être reconnus par l'hôte (Zipfel et Robatzek, 2010). Ces PAMPs correspondent à des molécules très conservées car essentielles pour l'agent pathogène (Naito *et al.*, 2008). On peut citer la flagelline, les lipopolysaccharides ou le facteur d'élongation EF-Tu des bactéries, la chitine des champignons ou les glucanes des oomycètes. De plus, des composés endogènes de la plante sont libérés lors de l'attaque des cellules végétales par l'agent pathogène : de l'acide galacturonique et des oligogalacturonides sont relargués suite à la dégradation de la paroi cellulaire, des fragments de cutines sont produits suite à l'action de cutinases... Ces molécules ont été regroupées sous le terme de DAMPs ou alarmines (Seong et Matzinger, 2004).

b. La reconnaissance des PAMPs par les PRR

Les PAMPs sont reconnus via une interaction directe avec des récepteurs PRR appartenant à la classe des Receptor-Like Proteins (RLP) ou des Receptor-Like Kinases (RLK) (Monaghan et Zipfel, 2012). Tous les PRR caractérisés à ce jour sont des protéines membranaires comportant un domaine N-terminal interagissant avec le PAMP correspondant, un domaine transmembranaire et parfois un domaine C-terminal intracytoplasmique responsable de la transduction du signal. La partie N-terminale des PRR comporte généralement un motif conservé, parmi lesquels on peut citer le domaine LysM contenant des motifs lysine, ou le domaine LRR (Leucine-Rich Repeat) (Tör *et al.*, 2009 ; Monaghan et Zipfel, 2012 ; Fig. 5).

L'étude fonctionnelle des couples PAMPs/PRR a permis de décrypter au niveau moléculaire les réactions de défense de la PTI. Le couple le plus étudié est celui constitué par le peptide flg22, constituant de la flagelline bactérienne, et le récepteur correspondant FLS2 chez *A. thaliana* (Boller et Felix, 2009). FLS2 est un PRR comprenant un domaine N-terminal de type LRR et un domaine C-terminal ayant une activité sérine/thréonine kinase. L'interaction flg22/FLS2 entraîne une hétérodimérisation de FLS2 avec un autre récepteur membranaire LRR-RLK appelé BAK1 (Segonzac et Zipfel, 2011). Cette dimérisation est le déclencheur de toutes les réactions de défense subséquentes, qui seront détaillées dans les parties III.1.c et III.1.d. BAK1 est un régulateur central de l'immunité végétale puisqu'il forme des hétérodimères avec la plupart des PRR caractérisés à ce jour, notamment avec les PRR responsables de la reconnaissance de EF-Tu, des lipopolysaccharides, du peptidoglycane, de l'élicite INF1 de *P. infestans*, des protéines de chocs thermiques (Cold-Shock Proteins – CSPs), des protéines de la famille NLP (Necrosis and ethylene-inducing peptide 1 Like Proteins – des PAMPs conservés chez les procaryotes comme les eucaryotes) et d'un PAMP fongique identifié récemment, RcCDI1 (Derevnina *et al.*, 2016; Franco-Orozco *et al.*, 2017; Heese *et al.*, 2007).

L'induction de la PTI suite à la reconnaissance d'un PAMP par un PRR peut également se faire suite à une homodimérisation de ce PRR. Ainsi, le récepteur d'*A. thaliana* AtCERK1 interagit physiquement avec des oligomères de chitine fongique longs de 7 à 8 résidus N-acétylglucosamine (GlcNac). Cette reconnaissance entraîne la dimérisation d'AtCERK1, ce qui permet des trans-phosphorylations intermoléculaires indispensables à la transduction du signal immunitaire (Miya *et al.*, 2007). Il existe même des cas de double homodimérisation puisque chez le riz (*Oryza sativa*), la chitine est détectée par la protéine OsCEBiP (une protéine membranaire avec ancre GPI et domaine LysM extracellulaire), qui s'homodimérise. Ce

complexe homodimérique va lui-même s'associer à un homodimère d'OsCERK1, un orthologue d'AtCERK1 (Shimizu *et al.*, 2010).

Il est à noter que tous les PAMPs ne sont pas reconnus par toutes les plantes. Par exemple les NLPs ne sont reconnus que par les dicotylédones, et ne déclenchent aucune mort cellulaire chez les monocotylédones (Qutob *et al.*, 2006). De même, le facteur d'élongation EF-Tu n'est reconnu que par les plantes de la famille des Brassicaceae (Kunze *et al.*, 2004). Il semble que la spécificité de reconnaissance PAMP/PRR soit un acquis de la coévolution de la plante et de son agent pathogène.

c. Les voies de signalisation activées lors de la PTI

Dans les minutes qui suivent la reconnaissance d'un PAMP par un PRR, trois réponses de défense sont déclenchées (Chinchilla et Boller, 2012 ; Fig. 6). Tout d'abord, un double flux d'ions a lieu : des ions Ca^{2+} entrent dans la cellule, alors qu'un important flux de potassium en sort (Kudla *et al.*, 2010). La sortie des ions K^{+} a pour conséquence immédiate l'alcalinisation de l'apoplasme, le rendant plus inhospitalier pour l'agent pathogène. De son côté le calcium va servir de messager secondaire pour activer diverses voies de signalisation associées aux réponses immunitaires. La deuxième réaction immédiate est la production de ROS (Reactive Oxygen Species) via les NADPH oxydases de la membrane plasmique, qui vont avoir trois rôles : l'activation d'un certain nombre de facteurs de transcription associés aux défenses de la plante, la stimulation de la fermeture des stomates, et un effet toxique sur l'agent pathogène (Suzuki *et al.*, 2011). Enfin, plusieurs cascades de MAPK (Mitogen-Associated Protein Kinase) impliquées dans les réponses immunitaires sont activées. La cascade de signalisation qui s'en suit est responsable de l'activation de plusieurs facteurs de transcription activateurs de gènes de défense (Zhang et Klessig, 2001). On peut citer les familles de facteurs de transcription WRKY, TGA ou FRK1.

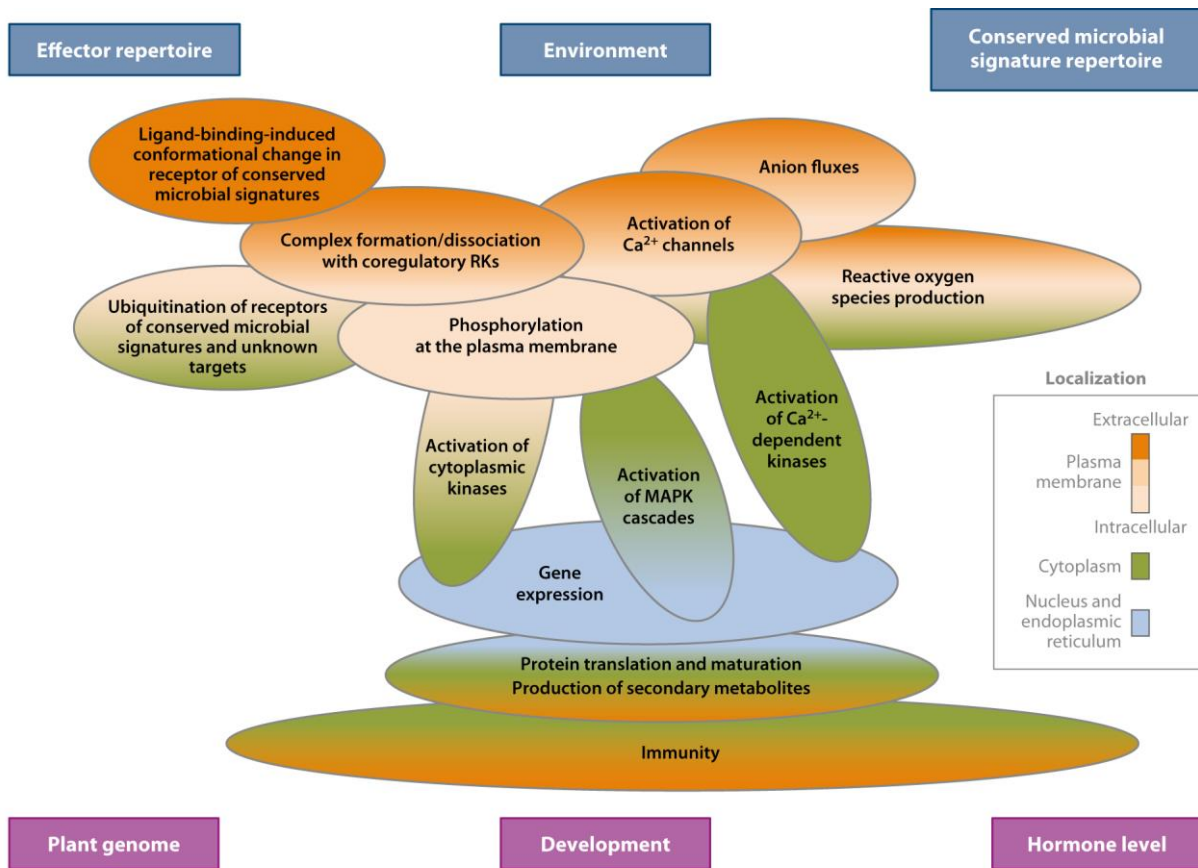


Figure 6 : les réactions de défense déclenchées par l'activation de la PTI.

Suite à la perception de PAMP par des PRR (Pattern-Recognition Receptor) lors de la PTI (PAMP-Triggered Immunity), les trois premières réactions sont un afflux important de calcium, une production de ROS (Reactive Oxygen Species) et l'activation des cascades de signalisation des MAPK (Mitogen-Associated Protein Kinase). S'ensuit une modification de la balance hormonale, l'endocytose des PRR et l'activation de plusieurs gènes de défense. Adapté de Schwessinger and Ronald (2012).

Suite à ces réactions quasi-immédiates, un ensemble d'autres réactions de défense sont mises en place dans le cadre de la PTI. Tout d'abord, la synthèse de diverses hormones végétales est activée de manière significative. L'éthylène (ET) est connu comme étant la principale hormone impliquée dans la PTI. Il est responsable de l'activation de plusieurs gènes de défense et facteurs de transcription, notamment celui activant la synthèse de FLS2 (Boutrot *et al.*, 2010). Cependant des études plus récentes ont démontré que l'acide salicylique et l'acide jasmonique étaient également impliqués de manière importante dans la PTI. L'inactivation de gènes de biosynthèse de ces hormones réduit grandement l'efficacité de la PTI déclenchée par flg22 et EF-Tu suite à l'infection d'*A. thaliana* par la bactérie *Pseudomonas syringae* (Pieterse *et al.*, 2012).

Par ailleurs, l'endocytose des PRR débute. Le rôle de cette endocytose est encore mal connu, mais il est vraisemblable qu'il s'agisse d'un mécanisme de rétrocontrôle de la PTI (Beck *et al.*, 2012; Robatzek, 2007). En effet, toutes les réactions de défense de la PTI ont un fort impact négatif sur la croissance végétale, il n'est pas dans l'intérêt de la plante de les prolonger (Alcázar *et al.*, 2011). On observe notamment que des plantes traitées avec des peptides flg22 purifiés grandissent moins vite que des plantes non traitées (Gómez-Gómez et Boller, 2002).

d. Les réactions de défense activées lors de la PTI

La phase finale de la PTI consiste en la sécrétion focalisée de plusieurs types de molécules destinées à limiter ou stopper le développement de l'agent pathogène. La finalité des réactions précoces de la PTI consiste en l'activation conjointe de plusieurs gènes de défense (Wise *et al.*, 2007). Ces gènes de défense sont activés par des facteurs de transcription spécifiques des voies de défenses. Un même gène de défense peut être activé par la reconnaissance de plusieurs PAMPs. Les gènes activés comprennent des gènes codant des PRR (pour la boucle d'auto-activation de la PTI), des gènes de synthèse de protéines et peptides antimicrobiens, des clusters

de biosynthèse de métabolites secondaires ou des gènes impliqués dans la sécrétion focalisée de la callose (Wise *et al.*, 2007).

La classe de molécules la plus produite en condition d'infection est celle des protéines Pathogenesis-Related (PR) (van Loon *et al.*, 2006). Cette classe compte 17 familles basées sur leurs homologies de séquences et sur leurs propriétés antimicrobiennes. On trouve parmi les protéines PR des chitinases dégradant la paroi fongique, des inhibiteurs de protéases inhibant l'activité des enzymes de dégradation de la paroi végétale, des peroxydases ou des protéases. Certaines familles ciblent spécifiquement un type d'agent pathogène, tandis que d'autres ont un spectre d'action plus large. La protéine PR la plus étudiée est PR1, découverte en 1970 dans les fluides extracellulaires de tabac infecté (Van Loon et Van Kammen, 1970). Elle a une forte activité antimicrobienne, et le gène qui la code est couramment utilisé comme gène marqueur des réactions de la PTI tant il est surexprimé en conditions d'infection. Malgré sa découverte précoce et son implication importante dans les réactions de défense, PR-1 était jusque récemment la seule protéine PR pour laquelle aucun mode d'action n'était connu. Cependant, une étude récente a pu mettre en évidence que les propriétés antimicrobiennes de PR-1 sont liées à sa capacité à interagir physiquement avec des ergostérols de la membrane plasmique de l'agent pathogène et à y causer des dommages (Gamir *et al.*, 2017).

Des métabolites secondaires sont également impliqués dans les réactions de défense. Les métabolites secondaires antimicrobiens les plus abondants dans le règne végétal et les plus produits sont les phytoalexines, qui peuvent être des terpènes (Avenacine A-1 de l'avoine), des alcaloïdes (tomatine de la tomate, camalexine d'*A. thaliana*) ou des phénols (pisatine du pois) (Bednarek, 2012). Les plantes de la famille des Brassicaceae utilisent notamment le système myrosinase-glucosinolates pour repousser les insectes et stopper le développement de certains champignons. Les glucosinolates sont des métabolites secondaires composés d'un groupement aglycone, d'une molécule de glucose et d'un sulfate. Les myrosinase sont des enzymes de la

classe des glucosyl-hydrolases qui vont cliver les formes de stockage des glucosinolates pour obtenir divers composés répulsifs et antimicrobiens : thiocyanates, isothiocyanates, nitrilles et cyanoepithioalkanes (Halkier et Gershenzon, 2006).

Le dernier moyen de lutter contre l'invasion d'un agent pathogène est la sécrétion focalisée de callose. La callose est un polymère de glucane qui est sécrété par la plante au niveau des sites d'infection afin de constituer une barrière physique (Luna *et al.*, 2010). La formation de dépôts de callose est fréquemment utilisée comme marqueur de l'induction de la PTI ou de sa suppression par des agents pathogènes adaptés.

2. L'ETS, ou répression des réponses de défense par les effecteurs

Dans la deuxième phase du modèle en zigzag, des effecteurs apoplastiques ou cytoplasmiques répriment les réponses de défense induites par la PTI, et manipulent la structure ou les fonctions de la cellule hôte.

a) La notion d'effecteur

Les agents pathogènes adaptés sont capables de contourner les réactions de défense de la PTI et d'infecter leur plante hôte malgré cette première ligne de défense. Le contournement de la PTI se fait par le biais d'une classe de molécules couramment appelées effecteurs (Oliva *et al.*, 2010). Dans le cadre d'une interaction plante-pathogène, on appelle effecteur une molécule sécrétée par l'agent pathogène et impliquée dans la manipulation de la structure et/ou de la fonction de la cellule végétale, facilitant ainsi l'infection (Kamoun, 2006). Il est à noter que les effecteurs ne sont pas utilisés que par les agents pathogènes, mais également par les champignons mutualistes mycorhiziens (Kloppholz *et al.*, 2011; Plett *et al.*, 2011). Les effecteurs correspondent la plupart du temps à des petites protéines sécrétées, souvent riches en cystéines (Oliva *et al.*, 2010).

Les effecteurs peuvent avoir un mode d'action extracellulaire (dans l'apoplasme des cellules végétales) ou intracellulaire (après entrée dans les cellules végétales). Cette entrée dans la cellule végétale peut se faire de différentes manières selon le type d'agent pathogène. Ainsi, les bactéries phytopathogènes utilisent le système de sécrétion de type 3 (Type 3 Secretion System : T3SS), une seringue moléculaire qui « injecte » directement les effecteurs à l'intérieur de la cellule végétale (Galán et Collmer, 1999). Pour leur part, les nématodes disposent d'un stylet, un organe en relation directe avec les glandes salivaires qui permet également l'entrée directe des effecteurs dans les cellules végétales (Lambert et Bekal, 2002). Les agents pathogènes filamenteux peuvent parfois différencier des structures hyphales particulières appelées haustoria, qui leur permettent de sécréter leurs effecteurs dans l'apoplasme au niveau d'une interface très étroite avec la cellule végétale (Ökmen et Doehlemann, 2014). Il n'a cependant pas encore été démontré très clairement de quelle façon les effecteurs d'agents pathogènes filamenteux sont par la suite internalisés dans les cellules végétales, et cette question est encore sujette à débats (Lo Presti et Kahmann, 2017; Petre et Kamoun, 2014).

b) Prédiction de répertoires d'effecteurs fongiques

Le nombre de séquençages de génomes de champignons phytopathogènes, mais aussi mutualistes ou saprophytes, a explosé au cours des années 2000, ce qui a permis des études de génomique comparative de plus en plus poussées, ainsi que la constitution de répertoires de gènes codant des effecteurs putatifs.

Chez les oomycètes les effecteurs peuvent contenir divers domaines conservés, comme les domaines CRN (Crinkler) retrouvé chez la plupart des oomycètes et présentant des signatures d'expansion dans l'ordre des Peronosporales (Stam *et al.*, 2013), RxLR (arginine - n'importe quel acide aminé – leucine - arginine) retrouvé dans la séquence des effecteurs d'oomycètes du genre *Phytophthora* et *Hyaloperonospora* (Jiang *et al.*, 2008), ou encore WY (Win *et al.*, 2012). La présence de ces domaines a grandement facilité la recherche de gènes candidats (Raffaele *et*

al., 2010). Cependant ces domaines sont absent chez les effecteurs fongiques (ou fortement dégénérés). La recherche de gènes codant des effecteurs putatifs a donc été plus compliquée dans les génomes fongiques.

Plusieurs critères ont donc été choisis pour rechercher ces gènes. Typiquement les gènes codant des effecteurs putatifs coderaient des petites protéines sécrétées (PPS), ayant une taille généralement comprise entre 80 et 300 acides aminés, et souvent (mais pas toujours) riches en cystéine. Ces gènes sont le plus souvent sous sélection positive, et ne possèdent pas d'homologues chez d'autres espèces ou de domaine conservé (Kamoun, 2006). Enfin, les gènes codant ces effecteurs sont surexprimés ou spécifiquement exprimés pendant l'infection, et très peu exprimés en condition de culture axénique (Sperschneider *et al.*, 2015, 2017).

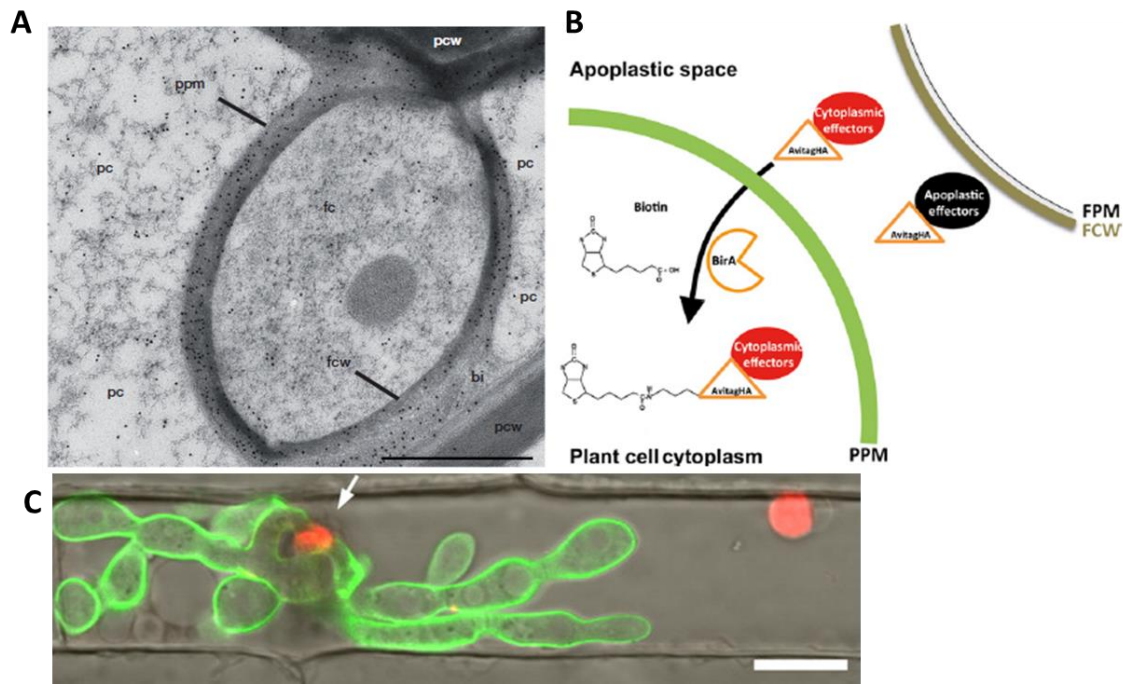


Figure 7 : Méthodes de validation de la translocation d'effecteurs fongiques dans les cellules végétales.

A : Immunocytolocalisation, dans des cellules de maïs infectées par *U. maydis*, de l'effecteur Cmu1 taggé à l'hémagglutinine (HA). ppm : membrane plasmique de la plante. pcw : paroi végétale. pc : cytoplasme de la plante. fcw : paroi fongique. fc : cytoplasme fongique. bi : interface biotrophe. L'échelle représente 1 μm . **B :** représentation schématique du test de biotinylation *in vivo* proposé par Lo Presti *et al* (2017). Le champignon sécrète un effecteur fusionné avec un tag AviTag. Si l'effecteur est transloqué dans la cellule végétale, la biotine ligase cytoplasmique BirA va biotinyler l'effecteur. ppm : membrane plasmique de la plante. fpm : membrane plasmique fongique. fcw : paroi fongique. **C :** localisation d'un effecteur (fusionné au fluorochrome mCherry) de *M. oryzae* (exprimant la GFP) dans des cellules de riz en condition d'infection. L'effecteur se retrouve au niveau du BIC (Biotrophic Interfacial Complex ; rouge, flèche blanche) et du noyau de la cellule végétale (rouge). L'échelle représente 2,5 μm .

Adapté de Djamei *et al* (2011), Lo Presti *et al* (2017) et Khang *et al* (2010).

c) Principaux questionnements concernant les effecteurs et analyses mises en place pour y répondre.

Que les effecteurs soient bactériens, fongiques, d'oomycètes ou de nématodes, les mêmes questions principales se posent.

- Les effecteurs agissent-ils dans l'apoplasme ou dans la cellule végétale, et dans ce cas comment sont-ils transportés dans la cellule ?

Le motif conservé RxLR a longtemps été considéré comme indispensable à l'importation des effecteurs d'oomycètes dans les cellules végétales (Dou *et al.*, 2008; Kale *et al.*, 2010). Cependant une étude récente remet en cause ce rôle et suggère plutôt une implication de ce motif dans la sécrétion des effecteurs (Wawra *et al.*, 2017). Chez les effecteurs de champignons, des motifs « RxLR-like » ayant une séquence beaucoup plus dégénérée ont été trouvés, sans que leur implication dans l'importation des effecteurs vers la cellule végétale ait été clairement démontrée (Kale *et al.*, 2010 ; Petre et Kamoun, 2014; Rafiqi *et al.*, 2010). Un motif Y/F/WxC a été trouvé dans 35 effecteurs de *B. graminis* ainsi que chez *P. graminis*, sans qu'un rôle dans la translocation ait été encore décrit (Godfrey *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que la mutation de 3 motifs situés dans une région hydrophobe d'AvrM (*M. lini*) empêche le déclenchement de la reconnaissance de cet effecteur par des lignées de tabac transgénique exprimant le gène de résistance *M* (Rafiqi *et al.*, 2010; Ve *et al.*, 2013). Il est toujours débattu de savoir si l'entrée des effecteurs fongiques dans les cellules végétales se fait via ce type de motif ou grâce à des propriétés physico-chimiques intrinsèques aux effecteurs. Cependant, étant donné que pour beaucoup d'effecteurs un mode d'action intracellulaire a été démontré, ou que leur internalisation a été démontrée par plusieurs expérimentations indépendantes, il est aujourd'hui admis qu'une partie des effecteurs d'agents pathogènes filamenteux sont bien internalisés dans les cellules végétales (Lo Presti et Kahmann, 2017).

Plusieurs études ont permis la localisation d'effecteurs fongiques dans les cellules végétales pendant l'infection. Ces analyses ont été réalisées via la sécrétion par l'agent pathogène d'une fusion effecteur-fluorochrome ou effecteur-tag. La translocation d'un effecteur de champignon phytopathogène a pour la première fois été mise en évidence avec l'effecteur RTP1 de *Uromyces fabae*, qui a été localisé dans le noyau des cellules végétales par immunocytolocalisation en condition d'infection (Kemen *et al.*, 2005). Il a également été démontré que l'effecteur Cmu1 d'*U. maydis*, fusionné à un tag hémagglutinine (HA), est internalisé dans les cellules de maïs en condition d'infection (Djamei *et al.*, 2011 ; Fig. 7A). Des expériences similaires ont été menées pour l'effecteur AvrM de *M. lini* afin de prouver son internalisation dans les cellules végétales (Rafiqi *et al.*, 2010). L'effecteur MiSSP7 du champignon mutualiste *Laccaria bicolor* a été localisé dans les cellules végétales en condition d'infection grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques (Plett *et al.*, 2011). L'internalisation d'AvrLm4-7 de *L. maculans* a été démontrée par plusieurs expériences indépendantes (expression transitoire dans le tabac, test de translocation dans des racines de colza, expression transitoire par biolistique sur feuilles de colza et translocation dans des cellules de mammifères suivie de cytométrie en flux) qui, bien que sujettes à caution prises individuellement, confirment collectivement que cet effecteur présente bien un mode d'action intracellulaire (Blondeau *et al.*, 2015). Récemment un test de translocation a été mis au point pour *U. maydis* afin de déterminer si un effecteur est ou non internalisé dans les cellules végétales. Il consiste à exprimer, en condition d'infection, des effecteurs couplés à un tag AviTag. Ce tag est biotinylé à l'intérieur de la cellule végétale par une biotine ligase cytoplasmique. Si l'effecteur est biotinylé, cela indique qu'il a été internalisé dans la cellule végétale (Lo Presti *et al.*, 2017 ; Fig. 7B). Enfin, le modèle d'étude ayant permis d'observer le plus facilement l'internalisation des effecteurs est *M. oryzae*, qui sécrète ses effecteurs de deux façons. Les effecteurs apoplastiques sont accumulés au niveau de l'extrémité des hyphes primaires et sont sécrétés via le système de

sécrétion conventionnel, tandis que les effecteurs cytoplasmiques sont sécrétés au niveau d'une structure particulière appelée BIC (biotrophic interfacial complex) via un système de sécrétion inédit (Giraldo *et al.*, 2013). L'observation d'effecteurs sécrétés par le BIC et couplés à un fluorochrome a permis de mettre en évidence leur translocation dans les cellules végétales (Khang *et al.*, 2010 ; Fig. 7C). Il a récemment été spéculé que des effecteurs de *M. oryzae* permettent de contourner la machinerie cellulaire végétale associée à l'endocytose, la détournant ainsi au bénéfice de l'internalisation des effecteurs (Oliveira Garcia et Valent, 2017, communication orale).

Chez les oomycètes, Wang *et al.*, (2017) ont récemment montré la sécrétion des effecteurs de *P. infestans* semblait, tout comme celle des effecteurs de *M. oryzae*, dépendante de deux systèmes de sécrétion distincts. L'effecteur EPIC1 est localisé dans l'apoplasme en condition d'infection, et sa sécrétion est inhibée par la brefeldine A (BFA), un inhibiteur de la sécrétion par l'appareil de Golgi. L'effecteur Pi04314 est localisé dans le nucléole en condition d'infection, et sa sécrétion n'est pas inhibée par la BFA, indiquant que cette sécrétion se fait via un mécanisme différent de celle d'EPIC1.

- Dans quel compartiment cellulaire agissent les effecteurs ?

Déterminer la localisation précise des effecteurs dans la cellule végétale peut apporter des informations sur leur mode d'action. La localisation sub-cellulaire des effecteurs dans des cellules végétales est généralement réalisée par expression transitoire dans une plante modèle (le plus souvent *Nicotiana benthamiana*) de l'effecteur couplé à un fluorochrome. De cette façon les effecteurs fongiques ont pu être trouvés dans divers compartiments cellulaires – noyau, chloroplastes, mitochondries, membrane plasmique, vacuole, peroxysomes... -, donnant ainsi une idée de leur rôle dans la cellule. Un effecteur localisé dans les chloroplastes pourrait interférer avec la photosynthèse, ou avec la synthèse d'acide salicylique, alors qu'un effecteur

nucléaire pourrait modifier la transcription de gènes de défense. Une étude à moyen débit du répertoire d'effecteurs de *M. larici-populina* a montré que sur 20 effecteurs testés en expression transitoire dans le tabac, 14 présentaient une localisation nucléo-cytoplasmique (non-informative, car la GFP libre présente la même localisation), alors que 6 effecteurs présentaient une localisation informative, dont 2 étaient retrouvés dans les chloroplastes et 2 dans le noyau (Petre *et al.*, 2015). Une étude similaire sur 16 effecteurs de *M. larici-populina* a été réalisée très récemment par Germain *et al* (2018), mettant en évidence une localisation dans les chloroplastes, les plasmodesmes et dans des corps cytosoliques pour trois de ces effecteurs. Le même type d'étude réalisée sur des effecteurs de *P. striiformis* a révélé que sur les 16 effecteurs étudiés, 7 présentaient une localisation informative, dont 3 dans le noyau, 2 dans les chloroplastes et un au niveau des endomembranes (Petre *et al.*, 2016). En fin, sur les 82 effecteurs de *Phakopsora pachyrhizi* testés par Qi *et al* (2017), 33 sont nucléo-cytoplasmiques, 16 sont également nucléo-cytoplasmiques mais avec une distribution cytoplasmique sous forme de ponctuations, 12 sont strictement cytoplasmiques, 17 strictement nucléaires, et un effecteur est localisé dans le nucléole.

- Quelles sont les protéines végétales ciblées par les effecteurs ?

Les principales techniques utilisées pour identifier les cibles d'effecteurs sont le double-hybride dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le pull-down. Ainsi, Mukhtar *et al.*, (2011) ont constitué un réseau d'interactions entre 8000 ORF d'*A. thaliana* et des effecteurs de *P. syringae* (30) et *Hyaloperonospora arabidopsidis* (53) par double-hybride. Ils ont montré que des effecteurs de deux agents pathogènes très éloignés phylogénétiquement (une bactérie et un oomycète) interagissaient avec un nombre réduit de cibles végétales, dont des cibles communes, chez *A. thaliana*. De cette étude a émergé le concept de « hub », selon lequel, suite à une convergence évolutive, les effecteurs de tous les organismes phytopathogènes cibleraient un nombre limité de protéines végétales. Plus récemment une étude a démontré que plusieurs

effecteurs de *P. syringae*, étaient capable d'inhiber spécifiquement l'activité du protéasome, et des expériences de pull-down ont permis de trouver parmi les cibles potentielles d'un de ces effecteurs (HopM1) 15 protéines associées au protéasome et 8 protéines associées à l'ubiquitine (Üstün *et al.*, 2016). Cela signifie que, au-delà du concept de « hub » au niveau moléculaire, un système cellulaire entier (dans ce cas le protéasome) peut être considéré comme un hub et être ciblé à de nombreuses reprises par un ou plusieurs effecteurs.

Le pull-down, qui consiste à immunoprécipiter une protéine d'intérêt portant un tag dans le but d'identifier ses partenaires protéiques, a également été utilisé pour trouver des interactants à des effecteurs d'agents phytopathogènes (Pennington *et al.*, 2016; Petre *et al.*, 2015, 2016; Üstün *et al.*, 2016). Tout comme le double-hybride, cette technique induit beaucoup de bruit de fond sous la forme de faux positifs, et certains de ces faux positifs sont fréquemment retrouvés dans les différents cribles étant donné leur très forte expression ou leur tendance à interagir de manière non-spécifique avec plusieurs protéines (Petre *et al.*, 2015). A ce titre, lorsqu'une même cible potentielle est retrouvée dans plusieurs cribles double-hybride ou pull-down, il devient difficile de faire la différence entre un faux positif et un possible hub.

- Quelle est l'implication des effecteurs dans le pouvoir pathogène ?

De simples tests de pathogénie sur plante avec une souche de l'agent pathogène délétée pour un effecteur devrait en théorie suffire à répondre à cette question. Ainsi, les effecteurs AvrLm1 et AvrLm4-7 ont un effet quantitatif sur le pouvoir pathogène de *L. maculans* (Huang *et al.*, 2006, 2010), de même qu'Avr2, Avr3 et Six5 sur celui de *F. oxysporum* (Houterman *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2015; Rep *et al.*, 2005). Cependant, du fait des grands répertoires d'effecteurs des agents pathogènes filamenteux, des phénomènes de redondance fonctionnelle empêchent parfois d'observer un effet quantifiable de l'absence (ou de la surexpression) des effecteurs, comme cela a été observé pour l'effecteur AvrL567 de *M. lini* (Lawrence *et al.*, 2010). Une

alternative consiste à exprimer ces effecteurs dans une plante modèle (*A. thaliana*, *N. benthamiana*...) et à chercher des phénotypes associés à l'expression de ces effecteur (différence de sensibilité à différents agents pathogènes, suppression de la PTI... ; Pel *et al*, 2014 ; Germain *et al*, 2018 ; Qi *et al*, 2017).

d) La notion d'effecteur, une délimitation fluctuante

Comme tous les concepts généraux, la définition d'effecteur est sujette à discussion.

Un effecteur a d'abord été défini comme une protéine sécrétée par un microorganisme pathogène dans la cellule végétale pour contourner les défenses de la plante (Jones et Dangl, 2006). Or cette définition est discutable sur tous les points. Il existe des effecteurs de nature non-protéique comme des métabolites secondaires (Collemare et Lebrun, 2011) ou des petits ARN (Weiberg *et al.*, 2013). De plus, les effecteurs ne sont pas utilisés que par les microorganismes (mais aussi par les nématodes ; Eves-van den Akker et Birch, 2016 – ou par certains insectes : Rodriguez et Bos, 2012) ni que par les agents pathogènes (mais aussi par les mutualistes ; Plett et Martin, 2015). Un effecteur n'est pas toujours internalisé dans la cellule végétale, mais peut avoir un rôle extracellulaire (effecteurs apoplastiques ; Sperschneider *et al.*, 2015). Enfin un effecteur ne contourne pas toujours les réactions de défense mais peut aussi perturber, de façon plus générale, la structure ou la fonction de la cellule végétale. Ainsi des effecteurs TAL sont impliqués dans la nutrition des bactéries pathogènes qui les sécrètent (Bogdanove *et al.*, 2010). On en arrive ainsi à une définition de plus en plus large de la notion d'effecteur : on appelle effecteur toute molécule sécrétée par un agent pathogène ou mutualiste au moment de l'infection dans le but de faciliter la colonisation de sa plante hôte.

Les critères utilisés pour rechercher des gènes codant des effecteurs putatifs dans les génomes sont aussi sujets à discussion. Même si la majorité des effecteurs sont des petites protéines de moins de 300 acides aminés, certains peuvent avoir une taille plus importante. Le contenu en cystéine n'est pas non plus un argument toujours valable car plusieurs effecteurs pauvres en

cystéine ont été identifiés. La surexpression *in planta* peut également être trompeuse selon la cinétique considérée. Par exemple chez l'ascomycète *L. maculans*, une première vague d'effecteurs est bien exprimée durant les phases précoces de l'infection, mais ne tenir compte que de cette phase n'aurait pas permis de découvrir une deuxième vague d'effecteurs exprimés durant la colonisation systémique de la tige (Gervais *et al.*, 2016). L'existence de vagues d'expression d'effecteurs a également été mis en évidence chez *M. larici-populina* (Duplessis *et al.*, 2011) ou *Colletotrichum higginsianum* (O'Connell *et al.*, 2012). Enfin, le critère prônant qu'un effecteur ne doit pas avoir d'homologues ni de fonction prédite est voué à disparaître : à mesure que nos connaissances sur les effecteurs progressent, les bases de données se remplissent avec de plus en plus de séquences de gènes codant des effecteurs, accroissant les chances de trouver des homologues dans d'autres espèces. On retrouve ainsi des gènes codant des effecteurs chez *Venturia inaequalis* et *Venturia pirina* présentant des homologies de séquence avec le gène *AvrLm6* de *L. maculans* (Shiller *et al.*, 2015), codant lui-même pour un effecteur (Fudal *et al.*, 2007). De même, l'effecteur *Avr4* de *C. fulvum* possède des orthologues chez plusieurs champignons phytopathogènes (Jonge et Thomma, 2009).

Encore une fois, tout comme pour les difficultés de classification des champignons évoquées dans la partie II.3, il convient de garder à l'esprit que la définition d'effecteur n'est pas une définition claire et inébranlable, mais plutôt un cadre de réflexion qui permet d'étudier une classe de molécules ayant de toute évidence des similarités de fonction dans un contexte comparable.

e) Mode d'action de quelques effecteurs d'agents pathogènes filamenteux.

Les génomes bactériens sont plus petits que ceux des champignons, et les répertoires d'effecteurs bactériens plus réduits : quelques dizaines de gènes codant des effecteurs putatifs contre plusieurs centaines pour les champignons (300 pour *U. maydis*, 440 pour *Z. tritici*, 650 pour *L. maculans*, 1200 pour *M. larici-populina* ; Duplessis *et al.*, 2011; Goodwin *et al.*, 2011;

Kämper *et al.*, 2006; Rouxel *et al.*, 2011). Les processus cellulaires et les protéines végétales ciblés par les effecteurs bactériens sont donc beaucoup mieux connus que ceux ciblés par les effecteurs fongiques. Ainsi chez *P. syringae*, on trouve des effecteurs impliqués dans la suppression des défenses immunitaires via la perturbation des voies de signalisation ou de l'expression des gènes de défense, du trafic vésiculaire, de la synthèse d'acide salicylique... (Block et Alfano, 2011). Au cours des dernières années, plusieurs modes d'action ont été déterminés pour des effecteurs d'agents pathogènes filamenteux (Fig. 8).

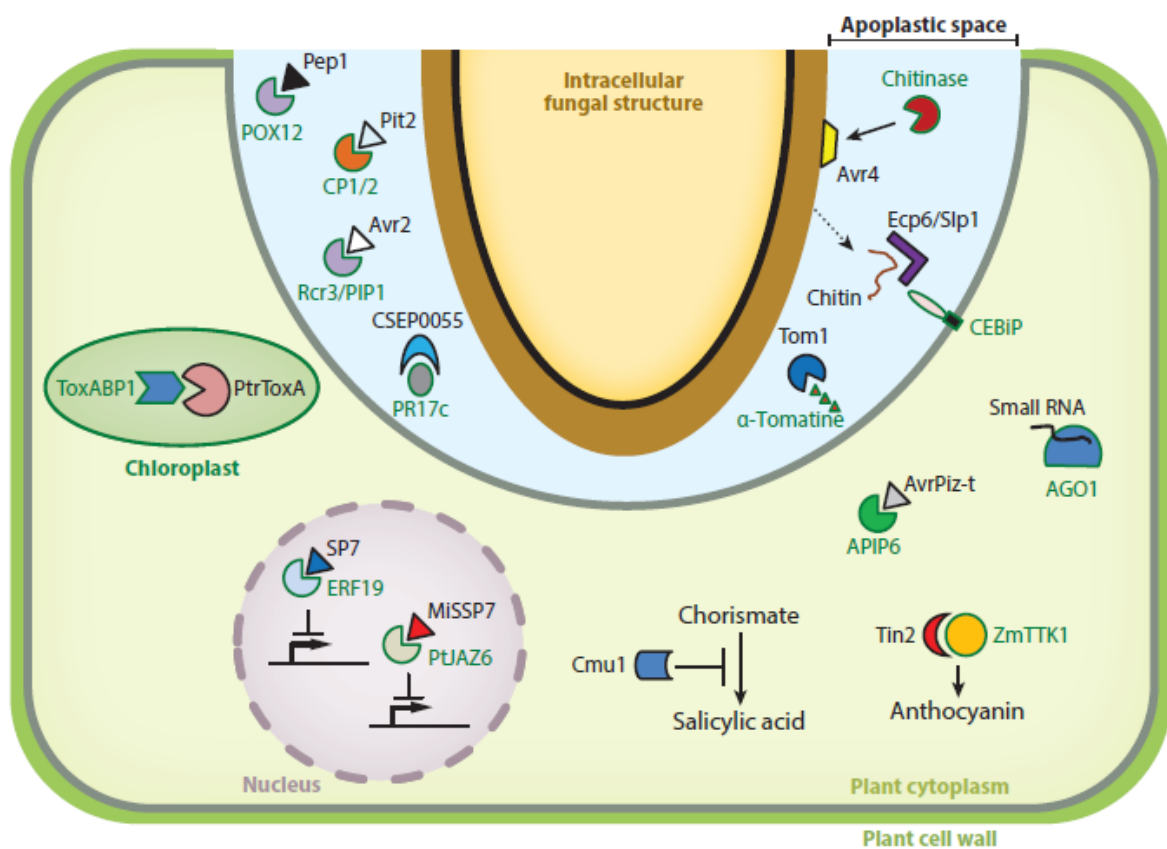


Figure 8 : exemples de modes d'action connus pour des effecteurs fongiques.

Les effecteurs fongiques peuvent agir dans l'apoplasme pour protéger la chitine contre les chitinases végétales (Avr4) ou contre la reconnaissance des PAMP (Ecp6), inhiber l'activité de protéases végétales (Avr2, Tom1), ou dans la cellule végétale où ils vont notamment perturber la balance hormonale de la cellule végétale (Cmu1, MiSSP7), perturber la photosynthèse dans les chloroplastes (ToxA) ou modifier la transcription de gènes impliqués dans les voies de défense (MiSSP7)... Adapté de Lo Presti *et al* (2017).

i. Interaction avec la chitine

La chitine est le PAMP fongique le plus connu. Il s'agit d'un polymère de N-acétylglucosamine constituant la plus grosse partie des parois fongiques. Les plantes sécrètent un grand nombre d'enzymes de dégradation lorsque les réponses immunitaires sont déclenchées, notamment des chitinases. Plusieurs effecteurs fongiques possèdent un domaine LysM, qui est impliqué dans la liaison à la chitine. Ce domaine a été d'abord décrit chez l'effecteur Avr4 de *C. fulvum* (van Esse *et al.*, 2007). Depuis la découverte de ce domaine, des recherches par homologie de séquences ont mis en évidence la présence d'effecteurs LysM dans le sécrétome des champignons phytopathogènes : 2 chez les Ustilagomycètes, 11 chez les Leotiomycètes, 32 chez les Dothideomycètes, 113 chez les Sordariomycètes... (Jonge et Thomma, 2009). On peut citer notamment l'effecteur Ecp6 de *C. fulvum* ainsi que Slp1 de *M. oryzae* (Mentlak *et al.*, 2012).

Deux rôles distincts ont été mis en évidence pour ces effecteurs à domaine LysM : un rôle de protection de la chitine fongique contre les chitinases de la plante, et un rôle de masquage des fragments de chitine relargués suite à l'action des chitinases végétales. L'effecteur le plus connu ayant un rôle dans la protection de la chitine contre ces chitinases est Avr4, exprimé par le champignon pathogène de la tomate *Cladosporium fulvum* (van den Burg *et al.*, 2006). Il interagit de manière très spécifique avec les polymères de chitine d'au moins trois résidus de long et inhibe l'activité des chitinases végétales. Par la suite d'autres effecteurs ayant un rôle semblable ont été identifiés, comme les effecteurs Mg1LysM et Mg3LysM de *Z. tritici* (Marshall *et al.*, 2011), ou plus récemment SnTox1 de *P. nodorum* (Liu *et al.*, 2016). De même, l'effecteur le plus connu impliqué dans le masquage des fragments de chitine afin qu'ils ne soient pas reconnus par les PRR correspondants et ne déclenchent pas de PTI est un effecteur de *C. fulvum*, Ecp6 (de Jonge *et al.*, 2010). Mais plus récemment il a été démontré que l'effecteur Slp1 de *M. oryzae* présente la même fonction (Mentlak *et al.*, 2012). Ces deux

effecteurs inhibent compétitivement le récepteur CERK1 et une chitin-elicitor binding protein (CEBiP) par interaction directe.

ii. Inhibition de protéases végétales

L'apoplasme est un milieu riche en enzymes de dégradation et protéases, rendant difficile sa colonisation par des agents pathogènes apoplastiques. Ces derniers ont de leur côté à leur disposition tout un arsenal d'effecteurs capables d'inhiber ces protéases extracellulaires. Ainsi, l'effecteur Avr2 de *C. fulvum* interagit avec de nombreuses protéases de tomate telles que Rcr3, Pip1 ou encore C14 (van Esse *et al.*, 2008). Cet effecteur joue un rôle important dans la pathogénie de *C. fulvum* : l'inactivation d'AVR2 entraîne une diminution quantitative du pouvoir pathogène de *C. fulvum*. De plus, l'expression stable d'AVR2 dans des lignées transgéniques d'*A. thaliana* rend ces plantes plus sensibles à *B. cinerea* et *Verticilium dahliae*.

Les effecteurs inhibiteurs de protéases végétales ont été très bien caractérisés chez l'oomycète *P. infestans*. On peut citer Avrblb2, qui est localisé au niveau des haustoria et empêche la sécrétion de la protéase C14, compromettant ainsi les réactions de défense associées à cette protéase. Les effecteurs EPIC1 et EPIC2B ciblent également la protéase C14, ce qui fait d'elle une cible conservée (et vraisemblablement importante) des effecteurs de *P. infestans* (Song *et al.*, 2009). D'autre part, deux effecteurs de *P. infestans* ciblent la Pathogenesis-Related Protein 7 (PR7) PR69B (une endoprotéinase) : EPI1 et EPI10, deux inhibiteurs de protéases de la famille Kazal, qui interagissent physiquement avec P69B et inhibent spécifiquement son activité protéase (Tian *et al.*, 2004, 2005).

iii. Interférence avec les voies de signalisation ou les réponses de défense induites lors de la PTI

Plusieurs effecteurs sont connus pour empêcher le déclenchement de la PTI, mais la façon dont ils inhibent la PTI n'est pas forcément connue. Ils peuvent supprimer la PTI en interférant avec les voies de signalisation y menant, ou en supprimant directement les réponses de la PTI. Ce

type de mode d'action d'effecteur a été beaucoup décrit dans les systèmes bactériens, mais encore très peu de systèmes similaires ont été mis en évidence chez les agents pathogènes filamenteux.

Plusieurs effecteurs d'espèces du genre *Phytophthora* perturbent directement les voies de signalisation impliquant des MAPK. PexRD2 de *P. infestans* interagit directement avec le domaine kinase de la kinase MAPKKKε (King *et al.*, 2014). Cette kinase est impliquée dans le déclenchement de la mort cellulaire associée aux réactions de défense. Les effecteurs Avh238^{P7076} et Avh331 de *P. sojae* interfèrent également avec les cascades de signalisation des MAPK, et Avh331 est même capable de diminuer l'expression de certains gènes de défense et de fortement impacter le dépôt de callose en condition d'infection (Cheng *et al.*, 2012).

La production de ROS est également un processus qui peut être ciblé par les effecteurs. Trois effecteurs de *P. sojae*, PsCRN63, PsCRN115 et PsCRN70, diminuent significativement la production de ROS en condition d'infection. PsCRN63 y parvient en ciblant directement les catalases végétales et en perturbant leur production (Rajput *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015).

Récemment, des interactions physiques ont été mises en évidence entre plusieurs toxines hôte-spécifique de *Parastagonospora nodorum* (agent pathogène du blé) et des protéines PR1. La toxine hôte-spécifique ToxA interagit spécifiquement avec la protéine PR1-5 dimérique du blé (Lu *et al.*, 2014). L'interaction entre ToxA et PR1-5 est très spécifique puisqu'elle repose sur deux acides aminés cruciaux et n'a pas lieu avec d'autres protéines PR1, et est nécessaire pour l'activité nécrotique de ToxA. L'effecteur SnTox3 cible quant à lui 6 protéines PR1 différentes (il en existe 23 chez le blé) avec des affinités différentes (Breen *et al.*, 2016).

iv. Interférence avec le métabolisme hormonal

Les hormones végétales jouent un rôle prépondérant dans les réactions de défense et leur signalisation. Plusieurs effecteurs ont été décrits comme ciblant le métabolisme hormonal, notamment les voies de l'acide salicylique, du méthyl jasmonate ou de l'auxine.

Ainsi, 2 effecteurs fongiques interférant avec la voie de l'acide salicylique ont été identifiés. Vdlscl est un effecteur ayant un effet quantitatif sur le pouvoir pathogène de *Verticillium dahliae*. Son expression transitoire dans *N. benthamiana* rend la plante plus sensible à *Phytophthora capsici* et diminue significativement les niveaux d'acide salicylique (SA) dans la feuille. Vdlscl est responsable de l'hydrolyse et la dégradation de l'isochorismate, un précurseur de la voie de biosynthèse de l'acide salicylique, entraînant une diminution des réserves de précurseur disponible pour la synthèse d'acide salicylique (Liu *et al.*, 2014). Un système similaire a été identifié chez *U. maydis* où l'effecteur Cmu1 présente une activité chorismate mutase et est impliqué dans la dégradation du chorismate (un autre précurseur de l'acide salicylique) en prephenates (Djamei *et al.*, 2011).

Le seul exemple connu d'effecteur fongique ciblant la voie de biosynthèse de l'acide jasmonique n'est pas un effecteur de champignon phytopathogène, mais mycorhizien : MiSSP7, un effecteur de *L. bicolor*, interagit physiquement avec la protine PtJAZ6 de la famille des protéines JAZ, des inhibiteurs de la synthèse d'acide jasmonique. Cette interaction physique permet à MiSSP7 de stabiliser PtJAZ6 et ainsi de diminuer les niveaux d'acide jasmonique et de faciliter la colonisation des racines par *L. bicolor* (Plett *et al.*, 2014).

Enfin, l'effecteur PSE1 de *P. parasitica* perturbe l'accumulation de l'auxine au niveau de l'apex des racines d'*A. thaliana*. Cela a pour conséquence, outre une altération de la morphologie des racines prenant la forme notamment d'un défaut de formation des poils racinaires, une augmentation de la sensibilité à *P. parasitica* des plantes transgéniques exprimant cet effecteur (Evangelisti *et al.*, 2013).

v. Interférence avec les ubiquitines ligases E3

L'ubiquitine est un peptide très conservé chez les eucaryotes qui se retrouve conjugué aux protéines qui doivent être dégradées par la machinerie cellulaire. Ce peptide est conjugué à sa cible par une ubiquitine ligase E3, et sert de balise de reconnaissance pour le protéasome 26S qui dégrade cette cible (Vierstra, 2009). Une étude récente a démontré que le système du protéasome pourrait être une cible courante des effecteurs bactériens (Üstün *et al.*, 2016). Il apparaît que les effecteurs d'agents pathogènes filamenteux ciblent également ce processus crucial pour le turn-over des protéines de la cellule.

L'effecteur Avr3a de *P. infestans* inhibe la mort cellulaire provoquée par l'élicite de *P. infestans* INF1 en interagissant physiquement avec l'ubiquitine ligase E3 CMPG1. Cette interaction empêche la dégradation de CMPG1 et perturbe la voie de signalisation subséquente menant aux réactions de la PTI et à la mort cellulaire (Bos *et al.*, 2010).

Plus récemment une interaction avec une ubiquitine ligase a également été démontrée pour l'effecteur AvrPiz-t de *M. oryzae*. AvrPiz-t cible APIP6 (AvrPiz-t Interacting Protein 6), une ubiquitine ligase E3, et supprime son activité. De plus, AvrPiz-t subi lui-même une ubiquitination par APIP6 entraînant sa dégradation par le protéasome. Ces suppressions permettent à *M. oryzae* de contourner les défenses basales du riz, notamment la PTI déclenchée par la reconnaissance de la chitine (Park *et al.*, 2012).

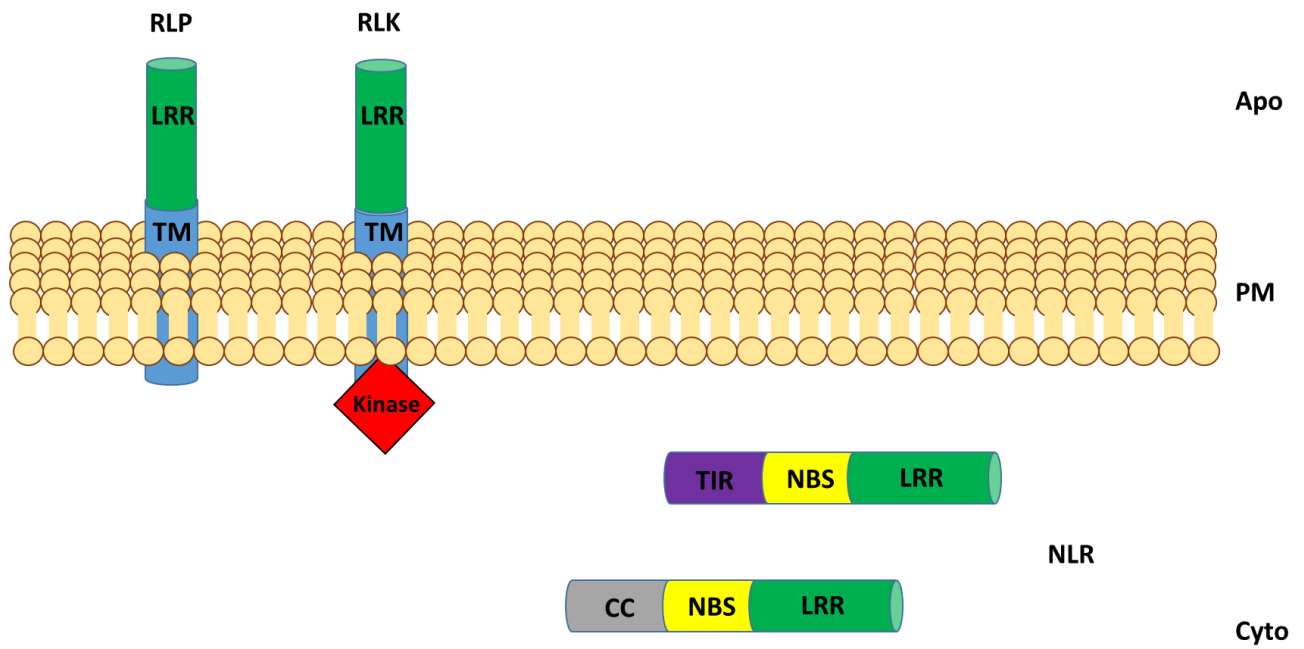


Figure 9 : Les principales classes de protéines de résistance aux champignons.

Les protéines de résistance peuvent être membranaires comme les Receptor-Like Proteins (RLP) ou les Receptor-Like Kinases (RLK), ou cytoplasmiques comme les Nucleotide-binding Leucine-rich Repeat proteins (NLR). Les domaines N-terminaux des NLR sont généralement de deux types : Toll-Interleukin Receptor (TIR) ou Coiled-Coil (CC). LRR : Leucine-riche Repeat. NBS : Nucleotide-Binding Site. Apo : apoplasme. PM : membrane plasmique. Cyto : cytoplasme.

3. L'Effector-Triggered Immunity (ETI)

Les travaux de Flor sur la rouille du lin ont mis en évidence que les plantes résistantes étaient capables de résister à l'infection par un agent pathogène adapté par l'intermédiaire d'une interaction gène-pour-gène très spécifique (Flor, 1971). Selon ce modèle, des effecteurs de l'agent pathogène sont reconnus par des protéines de résistance (R) de la plante résistante. La reconnaissance de cet effecteur entraîne un deuxième niveau d'immunité appelé ETI (Effector-Triggered Immunity). L'effecteur reconnu est alors qualifié de protéine d'avirulence, et sa reconnaissance entraîne tout un ensemble de réactions de défense dont le plus souvent une mort cellulaire localisée appelée réaction hypersensible (HR : hypersensitive response) et l'arrêt de la colonisation de la plante par l'agent pathogène. Contrairement à la PTI qui est commune à plusieurs plantes d'un même groupe phylogénétique, l'ETI est génotype-spécifique.

a) Les protéines de résistance

La reconnaissance des effecteurs se fait le plus souvent par le biais de deux types de protéines de résistance : des récepteurs membranaires de type RLP ou RLK, et des protéines cytoplasmiques Nucléotide-binding/Leucine Rich repeat (NLR). Ces dernières contiennent un domaine C-terminal de type Leucine-Rich Repeat (LRR), un domaine Nucleotide-Binding (NB) central, et un domaine N-terminal qui peut majoritairement être de deux types: Toll-Interleukin Receptor (TIR, très semblables aux protéines Toll-like impliquées dans l'immunité innée des mammifères) ou Coiled-Coil (CC), les protéines TIR étant restreintes aux dicotylédones alors que les CC se retrouvent également chez les monocotylédones (Takken et Goverse, 2012 ; Fig. 9). Les gènes codant des NLR sont polymorphes et en expansion dans les génomes de plantes (plusieurs centaines de NLR par génome) (Jacob *et al.*, 2013).

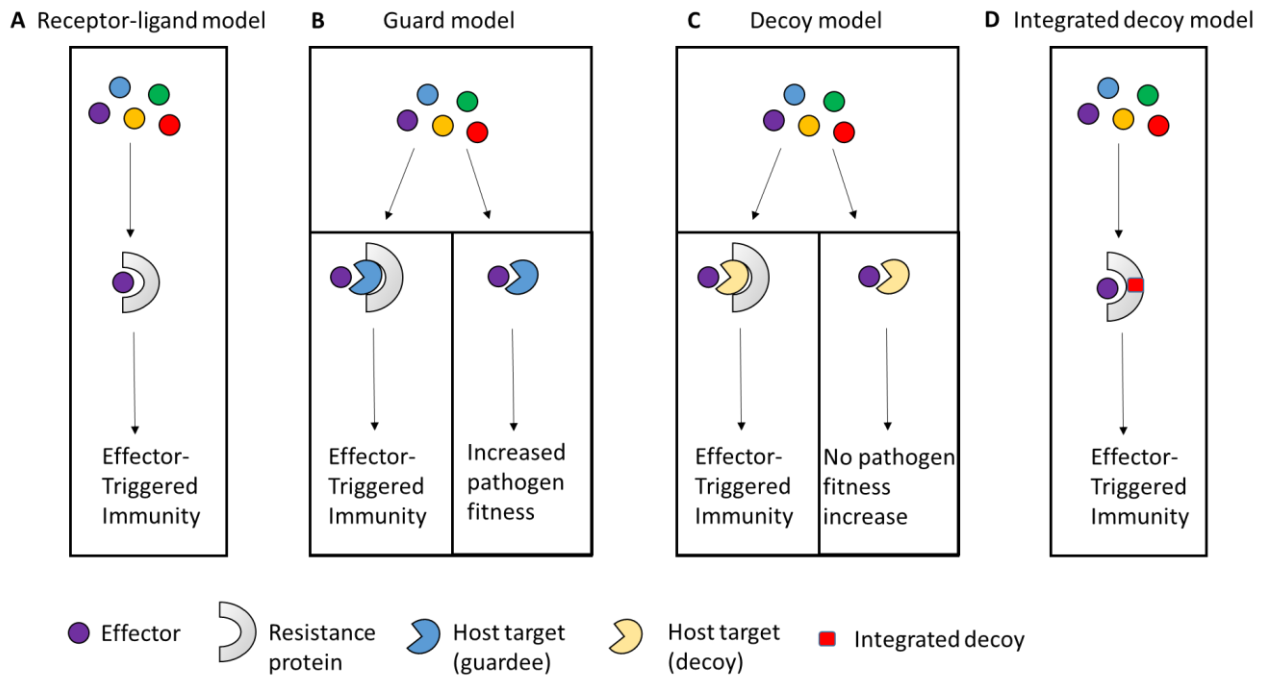


Figure 10 : Les différents modèles de reconnaissance des effecteurs par les protéines de résistance.

A : modèle ligand-récepteur. La protéine de résistance reconnaît l'effecteur en interagissant physiquement avec lui. **B** : modèle de garde. La protéine de résistance détecte une modification dans la cible d'un effecteur, ce qui déclenche les réactions de défense. **C** : modèle du « leurre » (decoy). La protéine de résistance détecte des modifications dans une protéine leurre qui imite la cible de l'effecteur. Contrairement au modèle de garde, en l'absence de la protéine de résistance la protéine leurre n'entraîne pas un gain de fitness pour l'agent pathogène puisqu'elle n'est pas impliquée dans les réactions de défense. **D** : modèle de « l'integrated decoy ». Le leurre est directement intégré dans la protéine de résistance, qui interagit directement avec l'effecteur. Adapté de Lu and Desveaux (2013) et Cesari *et al* (2014).

La reconnaissance des effecteurs par les protéines de résistance peut se faire via différents domaines selon le couple considéré. Beaucoup de protéines de résistance reconnaissent leur effecteur correspondant via le domaine LRR, qui constitue la partie hypervariable de la protéine. C'est par exemple le cas de Pi2 et Piz-t (riz ; Zhou *et al.*, 2006), la plupart des TIR-NLR du lin reconnaissant *M. lini* (Ellis *et al.*, 2007) et MLA10 (orge ; Shen *et al.*, 2007). Mais parfois c'est le domaine CC (Rx ; Rairdan *et al.*, 2008) ou TIR, ou même un autre domaine particulier (domaine HMA de Pik-1 et RGA5 : Cesari *et al.*, 2013; Kanzaki *et al.*, 2012) qui reconnaît l'effecteur ou son activité. De même la transduction du signal entraînant les réactions de défense peut être assuré par le domaine NB (Rx : Rairdan *et al.*, 2008), TIR (L6, RPS4 ;Bernoux *et al.*, 2011; Swiderski *et al.*, 2009) ou CC (MLA10 : Maekawa *et al.*, 2011;).

b) Modèles de reconnaissance des effecteurs

Quatre modèles ont émergé expliquant la façon dont les protéines de résistance reconnaissent les effecteurs (Fig. 10).

Le premier modèle à avoir été proposé est le modèle ligand-récepteur ou elicitateur-recepteur, dans lequel l'effecteur interagit directement avec la protéine de résistance (Catanzariti *et al.*, 2010; Dodds *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2000; Keen, 1990; Steinbrenner *et al.*, 2015). C'est le modèle qui s'accorde le mieux avec le concept d'interaction gène-pour-gène tel que proposé par Flor, et cela est effectivement observé entre les effecteurs de *M. lini* AvrP1, AvrP2, AvrP3, AvrP4, AvrM et AvrL567 et les protéines de résistance du lin P1, P2, P3, P, M, L5, L6 et L7 (Catanzariti *et al.*, 2010; Dodds *et al.*, 2006). On peut également citer l'exemple d'AvrPita de *M. oryzae* qui a été le premier effecteur dont l'interaction directe avec sa protéine de résistance (Pita) a été démontrée (Jia *et al.*, 2000).

Le modèle ligand-récepteur ne permet cependant pas d'expliquer comment, avec un répertoire de protéines de résistance limité, les plantes peuvent détecter des effecteurs d'un si grand nombre d'agents pathogènes. Dans le modèle de garde, l'effecteur interagit avec une cible végétale et la modifie. L'interaction avec cette cible ou son altération est détectée par une protéine de résistance (Dangl et Jones, 2001). C'est par exemple le cas de l'effecteur Avr2 de *C. fulvum*, qui cible la cystéine-protéase de la famille des papain-like Rcr3 dans l'espace extracellulaire afin d'inhiber son activité. La modification de Rcr3 est détectée par la protéine de résistance Cf2, qui déclenche alors l'ETI (Lozano-Torres *et al.*, 2014). L'exemple le plus connu et le plus étudié illustrant le modèle de garde est celui constitué par RIN4 (RPM1 Interacting protein 4), ciblée par 3 effecteurs de *P. syringae* : AvrRpm1, AvrRpt2 et AvrB. RIN4 est constitutivement associé aux protéines de résistance d'*A. thaliana* RPM1 et RPS2. Le clivage de RIN4 par AvrRpt2 active RPS2 (qui était précédemment maintenu dans un état inactif par RIN4) (Kim *et al.*, 2002), et la phosphorylation de RIN4 par AvrRpm1 ou AvrB entraîne l'activation de RPM1 (Mackey *et al.*, 2003). Le modèle de garde explique ainsi comment une plante peut reconnaître plusieurs effecteurs avec un nombre limité de protéines de résistance.

Lorsque le modèle de garde a été proposé, l'hypothèse de base était que la cible gardée était indispensable à l'activité effectrice. Il a depuis été prouvé qu'un effecteur pouvait avoir de nombreuses cibles (van der Hoorn et Kamoun, 2008). Dans le modèle du leurre (ou « decoy »), la cible de l'effecteur n'est pas un vrai interactant dont le ciblage par un effecteur faciliterait l'infection, mais un leurre inactif. Tout comme dans le modèle de garde, l'interaction de l'effecteur avec sa « cible » est détectée par une protéine de résistance, qui active l'ETI (van der Hoorn et Kamoun, 2008). On peut citer l'exemple de Pto, une kinase de tomate interagissant avec les effecteurs de *P. syringae* AvrPto et AvrPtoB. L'absence d'interaction entre AvrPto/AvrPtoB et Pto n'entraîne aucun défaut de virulence de la bactérie, ce qui suggère que

Pto n'est pas la « vraie » cible de ces effecteurs mais un leurre dont la reconnaissance entraîne des réactions de défense. De même, van der Hoorn et Kamoun (2008) suggèrent que la cystéine-protéase Rcr3 n'est pas la vraie cible d'Avr2, qui interagit également avec plusieurs protéases extracellulaires et inhibe leur activité, notamment Pip1, qui est très proche de Rcr3. Rcr3 n'est pas accumulée à des niveaux comparables à Pip1 durant l'infection, et aucune différence de sensibilité à *C. fulvum* n'est observée entre des tomates sauvages et des lignées transgéniques n'exprimant pas Rcr3 (Dixon *et al.*, 2000; Shabab *et al.*, 2008). Il a été suggéré que Rcr3 ne serait en fait qu'un decoy, et que la véritable cible d'Avr2 serait Pip1 (van der Hoorn et Kamoun, 2008).

Enfin, le concept de leurre intégré (« integrated decoy ») a récemment émergé. Dans ce cas de figure, la protéine de résistance possède un decoy intégré qui mime la cible de l'effecteur et « l'attire » (Cesari *et al.*, 2014). Ces domaines de reconnaissance non-conventionnels ont évolué par duplication de la cible de l'effecteur et fusion de ce domaine dans la protéine de résistance. Ce type de NLR est retrouvé chez des plantes des familles des Brassicaceae, Fabaceae, Rosaceae et Poaceae (Kroj *et al.*, 2016; Sarris *et al.*, 2016). C'est par ce mode de reconnaissance que sont reconnus les effecteurs Avr-Pia et Avr1-CO39, reconnus par la protéine de résistance RGA5, et Avr-Pik, reconnu par Pik-1 (Cesari *et al.*, 2013; Kanzaki *et al.*, 2012; Okuyama *et al.*, 2011). Ces 3 effecteurs interagissent avec des cibles possédant un domaine HMA (Heavy-Metal Associated) (Kanzaki *et al.*, 2016). RGA5 et Pik-1 possèdent également un domaine HMA contenant un decoy intégré.

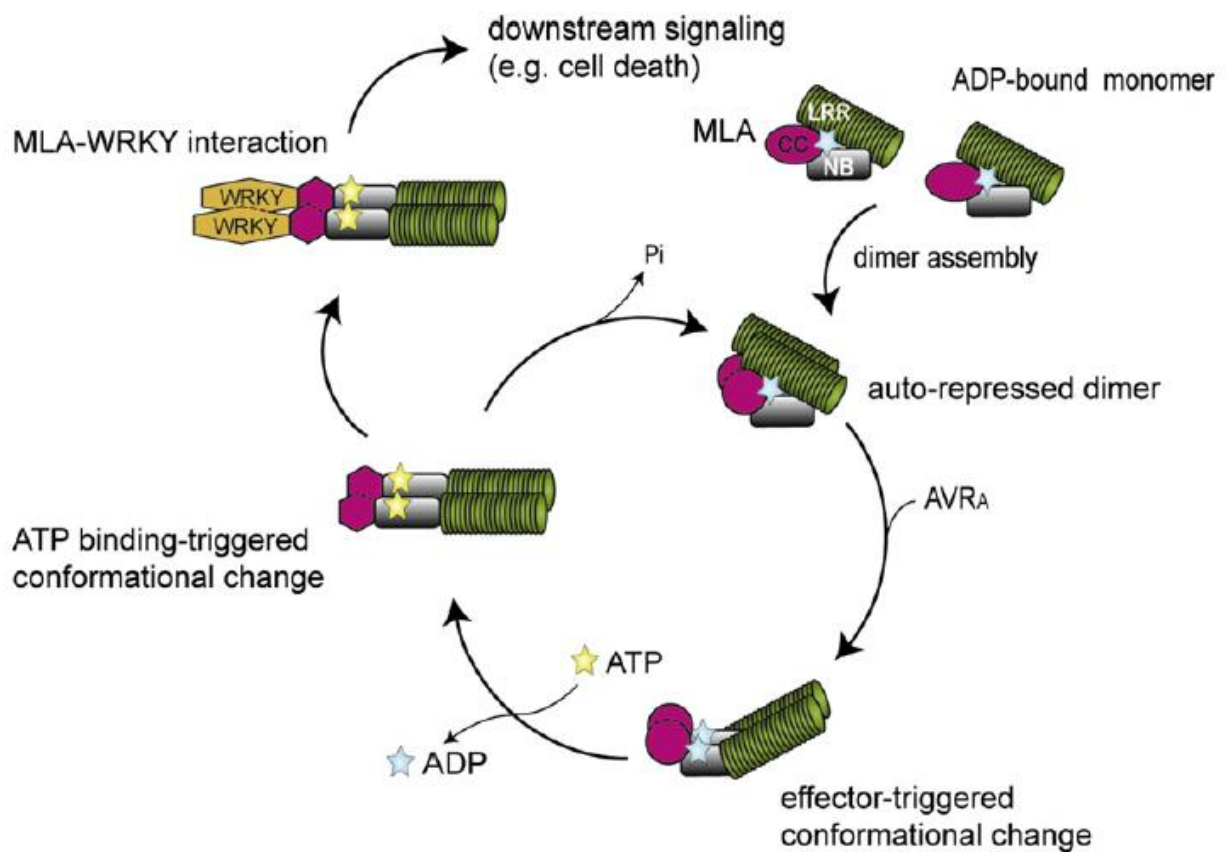


Figure 11 : modèle d'activation de la protéine de résistance MLA10.

Les monomères de MLA10 sont associés à de l'ADP. Ils s'associent en dimère via leur domaine CC. La perception de l'effecteur AVR_A de *Blumeria graminis* par le domaine LRR entraîne l'activation ATP-dépendante du dimère et un changement de conformation qui rend les domaines CC accessibles pour interagir avec des composants de l'immunité végétale. NB : nucleotide binding. LRR : leucine-rich repeat. CC : coiled-coil. ADP : adénosine di-phosphate. ATP : adénosine tri-phosphate. Adapté de Maekawa *et al* (2011).

c) Voies de signalisation et réactions de défense activées lors de l'ETI

i. Activation des protéines de résistance

La façon dont les protéines de résistance sont activées suite à la perception d'un effecteur est encore sujette à débat (DeYoung et Innes, 2006). Dans le cas des NLR, le modèle actuellement proposé stipule qu'elles sont stockées dans la cellule dans un état monomérique inactif, évitant ainsi l'activation constitutive de voies de défense coûteuses en énergie pour la plante. L'activation des NLR est ATP-dépendante, et entraîne leur homodimérisation via leur domaine TIR ou CC. Ce modèle est soutenu par des études structure-fonction de la protéine TIR-NLR L6 (lin), qui montrent la présence de 2 interfaces dans le domaine TIR : une première interface impliquée dans la dimérisation, conservée dans les NLR N (tabac) et RPS4 (*A. thaliana*) (Dinesh-Kumar *et al.*, 2000; Swiderski *et al.*, 2009), et une deuxième interface impliquée dans la transduction du signal (Bernoux *et al.*, 2011). Le domaine TIR peut également être impliqué dans l'hétérodimérisation de protéines NLR, comme dans le cas des protéines RRS1 et RPS4 (Williams *et al.*, 2014). La dimérisation de protéines CC-NLR a également été démontrée par plusieurs études structure-fonction comme dans le cas de MLA10 (orge) ou Pikp (riz) (Maekawa *et al.*, 2011; Maqbool *et al.*, 2015 ; Fig. 11).

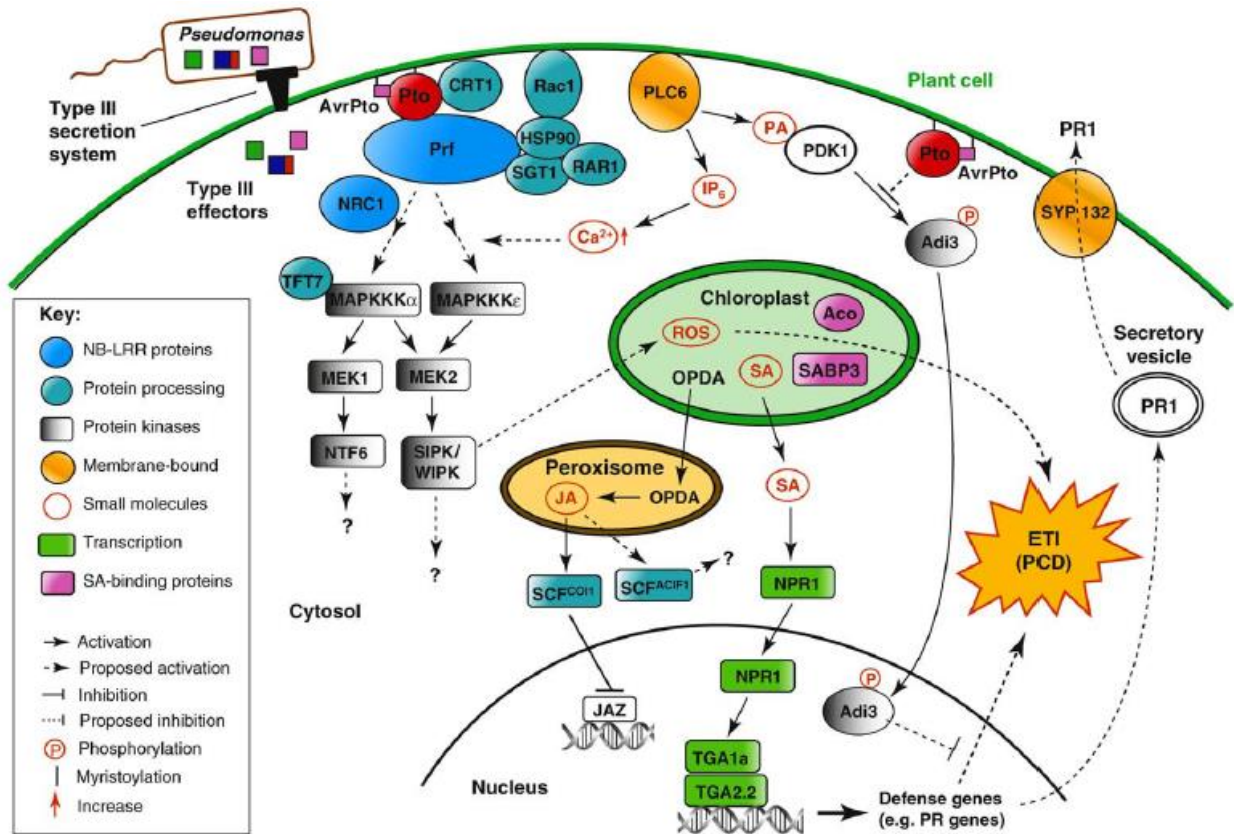


Figure 12 : réactions de défense déclenchées suite à la reconnaissance d'AvrPto par Prf.

La myristoylation de Pto par AvrPto entraîne l'activation de Prf, la protéine de résistance responsable de la reconnaissance de cet effecteur. Les voies de signalisation menant à l'ETI suite à la reconnaissance d'AvrPto par Prf ont été très étudiées et permettent de dresser un schéma global du déclenchement des réponses immunitaires suite à cette reconnaissance. Les composés en blanc sont très probablement impliqués dans l'ETI déclenchée par AvrPto, mais aucune étude ne l'a encore mis en évidence. Les points d'interrogation indiquent une cible inconnue. Adapté de Oh et Martin (2011).

Mise à part leur homo- ou hétérodimérisation, deux autres processus cellulaires sont responsables de la régulation de l'activité des protéines NLR : leur maturation chaperonne-dépendante, et leur dégradation par le protéasome. L'activation des protéines NLR et les voies de signalisation subséquentes ont été particulièrement étudiées via la kinase de tomate Pto (Oh et Martin, 2011 ; Fig. 12). Cette sérine/thréonine-kinase interagit physiquement avec les effecteurs AvrPto et AvrPtoB de *P. syringae pv. tomato* (Kim *et al.*, 2002). La myristoylation de Pto par AvrPto entraîne l'activation de Prf, une protéine NLR interagissant physiquement avec Pto (Loh *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1999; de Vries *et al.*, 2006; Yeam *et al.*, 2010). Deux modèles expliquant le rôle de Pto ont été proposés : Pto pourrait être une protéine impliquée dans les réactions de défense ciblée par AvrPto et gardée par Prf. Cependant aucun rôle dans les défenses immunitaires n'a été directement montré pour Pto. Le modèle le plus probable est que cette kinase serait un decoy qui « attire » AvrPto loin de sa cible initiale. Quoi qu'il en soit, Pto maintient Prf dans un état inactif en la phosphorylant, et la myristoylation de Pto inhibe son activité kinase, entraînant l'activation de Prf et le déclenchement de l'ETI.

Prf interagit directement avec les chaperonnes Hsp90 (Heat-shock protein 90), SGT1 (Suppressor of G2 allele of *skp1*) et RAR1 (Required for Mla12 Resistance 1), qui ont toutes été décrites comme fortement impliquées dans les réactions de défense. Hsp90 forme des dimères constitutivement actifs s'associant avec beaucoup de NLR. L'inhibition de Hsp90 entraîne la diminution de la quantité de protéines pour plusieurs NLR tel que Rx, RPM1, RPS5 et I-2 (Hubert *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003; Shirasu, 2009; Van Ooijen *et al.*, 2010). De son côté SGT1 est un adaptateur Hsp90-spécifique pour les NLR ayant un double rôle central dans les réactions de défense. Il régule positivement l'accumulation de certaines protéines NLR en s'associant à Hsp90 ou RAR1 pour un repliement optimal, mais est également impliqué dans l'adressage des NLR mal repliées au protéasome via l'ubiquitine-ligase SCF (Skp1-Cullin F-box) (Park et Seo, 2015; Shirasu, 2009). RAR1 seul semble n'avoir qu'un rôle mineur dans

l'ETI déclenchée par Prf, mais il est possible que le complexe Hsp90/SGT1/RAR1 stabilise Prf (Oh et Martin, 2011), et des mutants $\Delta rar1$ présentent une diminution de l'accumulation de beaucoup de NLR (Holt *et al.*, 2005).

Parmi les chaperonnes identifiées lors de l'étude de l'ETI déclenchée par le trio AvrPto/Pto/Prf, on peut également citer CRT1 (Compromised recognition of TCV coat protein 1), une protéine proche des Hsp90, qui interagit avec des Hsp90 et avec des NLR inactifs. Lorsque ces NLR reconnaissent leur effecteur correspondant, l'interaction avec CRT1 est abolie, suggérant que cette chaperonne est impliquée dans le maintien des NLR dans un état inactif en absence d'agent pathogène.

D'une manière générale, l'activité des protéines NLR est très finement régulée via leur activation, leur repliement et leur adressage sélectif au protéasome afin de déclencher au mieux les réactions de défense sans pour autant provoquer une suractivation délétère pour la plante.

ii. Voies de signalisation menant à l'ETI

Les processus cellulaires fréquemment associés à l'ETI sont, tout comme pour la PTI, un influx de calcium, un burst oxydatif, l'activation de voies MAP kinase, la biosynthèse d'hormones et des reprogrammations transcriptionnelles. Cependant, la réaction la plus caractéristique de l'ETI est le déclenchement de la HR, une forme de mort cellulaire programmée locale destinée à stopper le développement de l'agent pathogène (Jones et Dangl, 2006).

Les voies de signalisation menant à l'ETI varient selon que la reconnaissance de l'effecteur s'est faite par l'intermédiaire d'une protéine de résistance de type TIR-NLR ou CC-NLR. L'ETI déclenchée par certaines CC-NLR requiert NDR1 (Non-race specific Disease Resistance 1) (Century *et al.*, 1997). Cette protéine est associée à la membrane plasmique, et possède des homologies avec des intégrines de mammifères. Des mutants $\Delta ndr1$ présentent un décollement de la membrane plasmique de la paroi cellulaire. NDR1 régulerait donc la signalisation entre la membrane et la paroi pendant l'infection (Knepper *et al.*, 2011). L'immunité déclenchée par les

TIR-NLR requiert EDS1 (Enhanced Disease Susceptibility 1) (Parker *et al.*, 1996). Cette protéine interagit majoritairement avec deux partenaires : PAD4 et SAG101. Ces trois partenaires possèdent un domaine lipase et sont requis pour le déclenchement de l'ETI. Le dimère EDS1/PAD4 active la production d'acide salicylique (Zhou *et al.*, 1998) et est important pour les réactions de défense basales à la fois localement et dans les cellules adjacentes à l'infection. Les dimères EDS1/SAG101 et EDS1/EDS1 sont uniquement impliqués dans le déclenchement de la HR (Rietz *et al.*, 2011).

L'activation de la HR fait intervenir des phospholipides dans le cadre de l'ETI déclenchée par AvrPto. Le silencing de PLC6 (Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C 6) diminue la résistance de la tomate à *P. syringae pv. tomato*. Cette lipase est impliquée dans l'hydrolyse du phosphatidylinositol-biphosphate (PIP2) en diacylglycérol et inositol triphosphate. Le diacylglycérol est phosphorylé pour former l'acide phosphatidique (PA), qui interagit avec PDK1 (Phosphoinositide-independant protein Kinase 1) pour activer d'autres kinases. Parmi ces kinases se trouve Adid3, qui interagit avec Pto lorsqu'AvrPto est reconnu. Adid3 est un suppresseur de la mort cellulaire qui inhibe l'expression de gènes impliqués dans la HR. Pto inhibe Adid3 de manière AvrPto-dépendante, permettant le déclenchement de la HR (Oh et Martin, 2011).

Comme lors de la PTI, les cascades de signalisation des MAPK sont activées. A ce jour, un rôle dans l'ETI a été démontré pour 3 MAPKKK : NPKI dans *Nicotiana tabacum*, MAPKKK α et MAPKKK ϵ chez *N. benthamiana* et la tomate (Jin *et al.*, 2002; Melech-Bonfil et Sessa, 2010; Pozo *et al.*, 2004). MAPKKK α et MAPKKK ϵ sont impliquées dans l'ETI déclenchée par la reconnaissance d'AvrPto, et la suite de la cascade d'activation a été décryptée grâce à plusieurs expériences de silencing dans le tabac : MAPKKK α active la MAPKK MEK1, qui active la MAPK NTF6. De son côté MAPKKK ϵ active MEK2 qui active les MAPK SIPK et WIPK (Melech-Bonfil et Sessa, 2010; Pozo *et al.*, 2004). Les effets précis de ces 2 cascades de

signalisation et les gènes activés ne sont pas encore connus. Cependant on sait que la surexpression ectopique de MEK2 déclenche des HR chez la tomate et le tabac, et active la production de H₂O₂ et O₂⁻ de manière lumière-dépendante, ce qui suggère qu'au moins une partie du signal de SIPK/WIPK est transféré dans les chloroplastes (Liu *et al.*, 2007). SIPK et WIPK ont également un rôle dans l'ETI déclenchée par les gènes de résistance *Cf9* et *N* (Romeis *et al.*, 1999; Zhang et Klessig, 2001). et les homologues de ces MAPK dans *A. thaliana*, respectivement AtMPK6 et AtMPK3, sont impliqués dans l'ETI déclenchée par RPS2 (Rasmussen *et al.*, 2012).

Des hormones végétales sont également impliquées dans l'ETI. L'acide salicylique, en particulier, produit dans les chloroplastes à partir du chorismate, a un rôle clé dans la résistance systémique acquise (SAR : systemic acquired resistance) et dans la résistance aux agents pathogènes biotrophes (Šašek *et al.*, 2012). Ce processus permet de propager les réactions de défense à l'ensemble de la plante et également de garder en mémoire l'infection en cas de nouvelle attaque, ce qui se rapproche de l'immunité acquise des mammifères (Kachroo et Robin, 2013). Quand la SAR est déclenchée, l'augmentation de la concentration en acide salicylique change le statut redox de la cellule, ce qui a pour effet d'activer la protéine NPR1 (Non-expressor of Pathogenesis-Related protein 1). NPR1 est ainsi adressée au noyau et interagit avec le facteur de transcription TGA2, ce qui lève la répression de certains gènes de défense parmi-lesquels *PRI*. Le silencing de *NPR1* ou de *TGA2* entraîne la diminution de l'ETI associée à AvrPto/Pto (Fan et Dong, 2002).

L'acide jasmonique est également impliquée dans l'ETI. La reconnaissance d'AvrPto par Prf entraîne l'activation de COI1 (Coronatine-Insensitive 1), qui agit en complexe avec des protéines SCF pour dégrader les protéines JAZ, régulateurs négatifs de la signalisation de l'acide jasmonique, augmentant les réactions de défense (Dong, 1998). Une autre protéine SCF, ACIF1 (Avr9/Cf9 INDuced F-box 1), régule positivement l'ETI associée à la reconnaissance

d'AvrPto par Prf, mais aussi d'Avr9 par Cf9, en augmentant les niveaux d'acide jasmonique et abscissique (van den Burg *et al.*, 2008).

Enfin, l'ETI fait appel à la sécrétion focalisée de molécules de défense. Ainsi, la synthaxine SYP132 est importante pour l'ETI déclenchée par la reconnaissance d'AvrPto, car elle s'associe à un complexe SNARE pour sécréter des protéines PR et probablement d'autres composés (Kalde *et al.*, 2007).

iii. La notion de helper-NLR

Il a été démontré que plusieurs NLR fonctionnent par paire, et que la reconnaissance de la protéine d'avirulence correspondante ne peut se faire que si les deux NLR sont exprimés. Dans la plupart des cas les gènes codant ces protéines de résistance sont voisins dans le génome, et sont souvent localisées en orientation inverse ce qui suggère une régulation commune de leur expression (Césari *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2014).

Ce cas de figure a été mis en évidence pour la première fois avec les gènes de résistance *RPP2A* et *RPP2B*, localisés tête-bêche dans le génome d'*A. thaliana*, qui confèrent une résistance à un isolat d'*H. arabidopsidis* via la reconnaissance d'un gène d'avirulence non encore identifié (Sinapidou *et al.*, 2004). *A. thaliana* possède également les gènes de résistance *RRS1* et *RPS4*, en orientation tête-bêche dans le génome, qui confèrent à la plante une résistance contre *C. higginsianum*, *P. syringae* et *Ralstonia solanacearum* (Narusaka *et al.*, 2009).

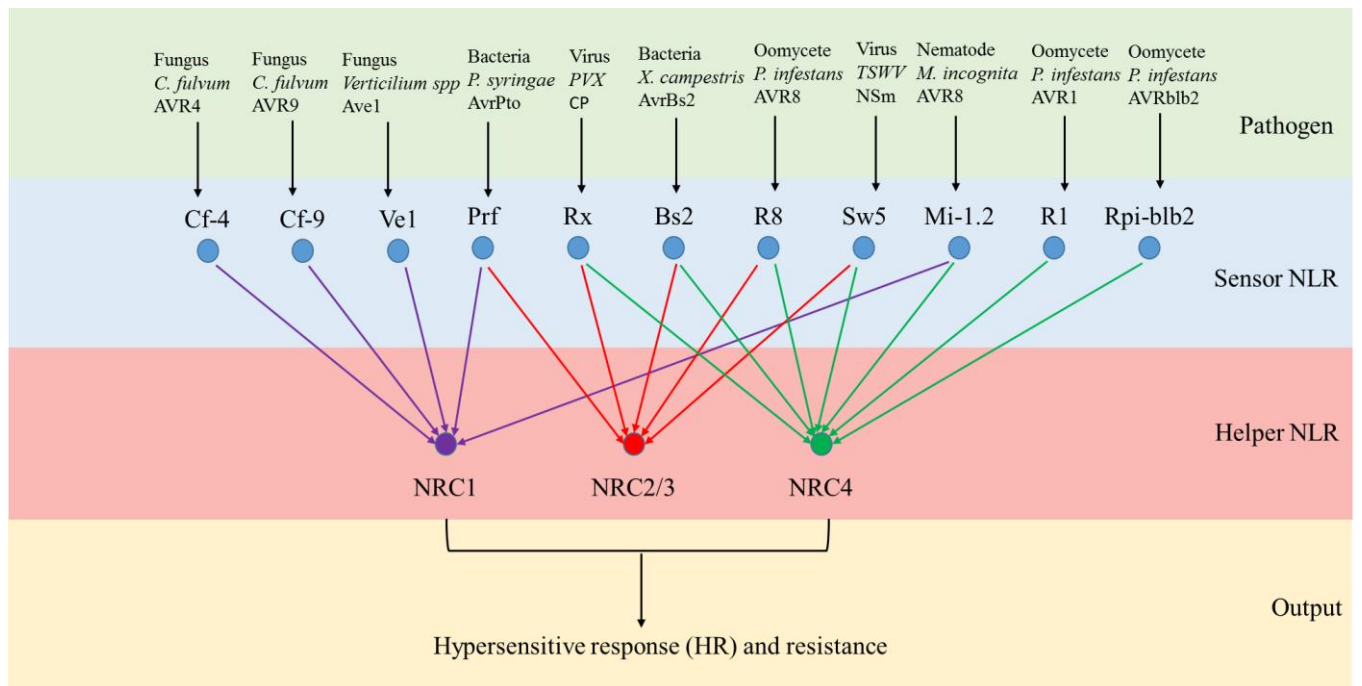


Figure 13 : les protéines NRC.

Les protéines NRC (NLR Required for Cell-death) sont des protéines NLR (Nucleotide-binding Leucine Rich-repeat) helper responsables du déclenchement de la mort cellulaire suite à la reconnaissance d'effecteurs par d'autres NLR sensor. Une même NLR helper peut être associée à plusieurs NLR sensor reconnaissant des effecteurs d'espèces très différentes. Inspiré de Wu *et al.*, (2017).

Plusieurs effecteurs de *M. oryzae* sont également reconnus par des couples de protéines de résistance chez le riz agissant en tandem : le « sensor » interagit physiquement avec l'effecteur, et le « helper » transmet le signal permettant d'activer les voies de signalisation menant à l'ETI. Ainsi, AVR-Pia et AVR1-CO39 sont reconnues par les protéines de résistance RGA4 et RGA5, et Avr-Pik est reconnu par Pik-1 et Pik-2. RGA4 et RGA5, de même que *Pik-1* et *Pik-2*, sont localisés en orientation inverse dans le génome du riz (Cesari *et al.*, 2013; Kanzaki *et al.*, 2012).

Récemment des protéines appelées NRC (NLR Required for Cell-death) ont été identifiées. Ces NLR sont nécessaires pour le déclenchement de la HR suite à la reconnaissance par plusieurs protéines de résistance. La première protéine NRC à avoir été caractérisée est NRC1, qui induit une HR lorsque les protéines de résistance Cf-4, Cf-9, Ve1, LeEix2, Prf, Rx et Mi-1.2 de la tomate reconnaissent leurs effecteurs respectifs (Gabriëls *et al.*, 2006, 2007; Sueldo *et al.*, 2015). Par la suite il a été démontré que NRC2 et NRC3 (présents chez plusieurs Solanacées, mais également chez *N. benthamiana*) sont requis pour la HR associée à Prf (Wu *et al.*, 2016), et que NRC4 (également présent chez plusieurs Solanacées et *N. benthamiana*) est requis pour la mort cellulaire associée à Rpi-blb2, Mi-1.2, et R1. De plus, NRC2, NRC3 et NRC4 sont redondants et contribuent tous les trois à la mort cellulaire associée à Rx, Bs2, R8, et Sw5 (Wu *et al.*, 2017). Il semble que la famille des NRC soit une famille en expansion dans le génome des Solanacées, qui aurait évolué à partir d'une paire de NLR agissant en tandem. Ainsi les NLR sensor (les protéines de résistance) auraient rapidement évolué et se seraient diversifiés de manière significative au cours de l'évolution, alors que quelques NLR helper auraient été conservés pour contribuer au déclenchement de la HR associée à ces différentes protéines de résistance. Ce système permet à la plante de bénéficier d'une résistance à spectre large en s'appuyant sur un nombre limité de NLR helper (Wu *et al.*, 2017 ; Fig. 13).

iv. Elements de différenciation entre PTI et ETI

D'une manière générale, les voies de signalisation menant à la PTI ou à l'ETI et les réactions de défense (burst oxydatif, activation des MAPK, reprogrammation transcriptionnelle, modification de la balance hormonale, sécrétion de composés antimicrobiens...) sont les mêmes. La HR est souvent considérée comme une réaction caractéristique de l'ETI, mais elle est parfois observée dans le cadre de la PTI (la reconnaissance de la flagelline de *P. syringae* pv. *tabaci* induit une HR, de même que la reconnaissance de la glycoprotéine CBEL de *Phytophthora parasitica* ; Naito *et al.*, 2008 ; Khatib *et al.*, 2004).

Ce qui différencie principalement la PTI et l'ETI c'est la cinétique et l'amplitude des réponses, les réponses déclenchées en cas d'ETI étant plus fortes et plus prolongées. Ainsi, la production de ROS suite à la reconnaissance d'une PAMP est rapide et transitoire, alors que la production de ROS provoquée par la reconnaissance d'un effecteur est biphasique : un premier pic de production transitoire et faible est d'abord observé, puis un deuxième pic apparaît, plus durable et d'amplitude plus forte (Torres *et al.*, 2006). De même, les cascades MAPK mais aussi les hormones végétales entraînent une reprogrammation très importante de l'expression des gènes de défense au cours de l'ETI. 25% des gènes d'*A. thaliana* sont significativement dérégulés durant l'infection. Si les gènes dérégulés durant l'ETI et la PTI sont globalement les mêmes, cette dérégulation est bien plus prolongée dans le cadre de l'ETI (Eulgem, 2005).

Tsuda *et al.* (2009) ont comparé les réactions de défense induites en cas de PTI et d'ETI pour des lignées d'*A. thaliana* mutées pour 1 à 4 des gènes suivants : *PAD4* (régulateur central), *DDE2* (biosynthèse de JA), *EIN2* (biosynthèse d'ET) et *SID2* (biosynthèse de SA). L'ETI a été déclenchée par AvrRPT2 ou AvrRPM1 et la PTI par flg22 ou elf18. Les auteurs ont testé toutes les combinaisons de mutations. En effet, si l'on considère un réseau immunitaire hypothétique comprenant 3 gènes A, B et C agissant en interaction, la perte du gène A fait perdre le secteur immunitaire A, mais également les interactions A:B, A:C et A:B:C (Fig. 14A). Les auteurs sont

arrivés à un modèle des réponses de la PTI et de l'ETI dans lequel ces deux types d'immunités diffèrent pour plusieurs critères : les réactions de la PTI sont synergétiques. Chaque secteur immunitaire active les autres, et l'effet de tous les secteurs combinés est supérieur à la somme de leurs effets individuels. On parle d'interaction positive entre secteurs immunitaires. L'ETI induit plutôt des réponses compensatoires. La perte d'un secteur est immédiatement compensée par les autres (Fig. 14B). Ce modèle explique pourquoi l'ETI est beaucoup plus difficile à mettre en échec par les effecteurs des agents pathogènes. La PTI est fréquemment perturbée car il suffit à un effecteur de supprimer un secteur pour que le reste du réseau immunitaire s'en trouve fortement impacté et que l'effet synergétique soit perdu. En revanche dans le cadre de l'ETI la perte d'un secteur est aisément compensée par les autres secteurs (Fig. 14C). Cette étude a été faite en prenant en compte 3 secteurs (SA, JA et ET), mais beaucoup d'autres secteurs sont à considérer dans l'immunité végétale (MAPK, auxine, gibberellines, acide abscissique...).

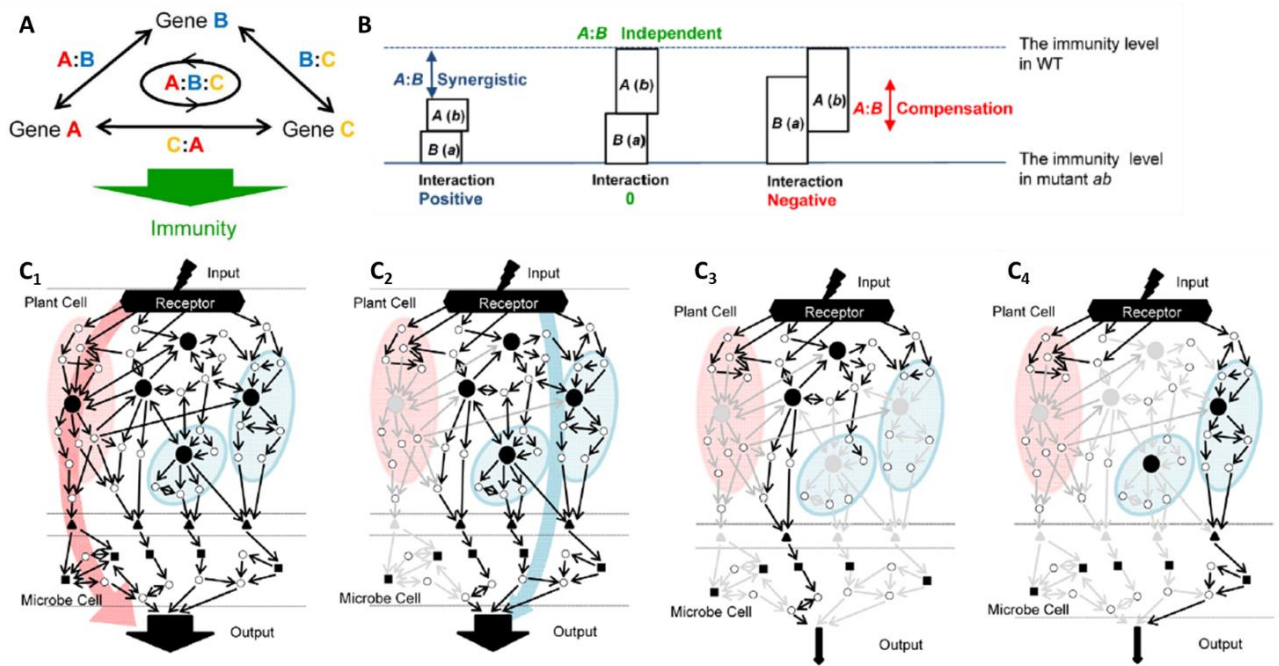


Figure 14: Modèles conceptuels des réactions immunitaires végétales.

A : dans un réseau immunitaire composé de 3 secteurs régulés par 3 gènes, la perte d'un gène ne fait pas seulement perdre le secteur en question, mais également les interactions entre ce secteur et tous les autres secteurs. **B :** interprétation du résultat de l'infection sur un réseau immunitaire composé de deux gènes. A représente le niveau d'immunité dans un mutant *b*, et B dans un mutant *a*. Si l'interaction entre les deux secteurs est positive, la somme des effets A et B est inférieur au niveau d'immunité du WT, les secteurs A et B agissent en synergie. Si les deux secteurs n'interagissent pas, la somme des deux effets sera strictement équivalente au niveau d'immunité du WT, les secteurs sont indépendants. Si la somme des effets A et B est supérieure au niveau d'immunité du WT, les deux secteurs agissent de manière compensatoire, leur interaction est négative. **C :** diagramme conceptuel du fonctionnement de l'ETI. **C₁ :** beaucoup de gènes sont impliqués dans le réseau immunitaire. Un secteur peut être préférentiellement utilisé pour les défenses immunitaires (flèche rouge). **C₂ :** même si le secteur préférentiel est contourné, un deuxième secteur peut prendre le relais et compenser sa perte. **C₃ et C₄ :** il faut contourner un grand nombre de secteurs pour pouvoir abaisser suffisamment le niveau d'immunité pour que la colonisation par l'agent pathogène puisse avoir lieu. Gros points noirs : hubs du réseau immunitaire. Triangles noirs : composés de défense de la plante affectant directement l'agent pathogène. Flèches, points et triangles grisés : respectivement connections, gènes et composés de défense perturbés. Input : perception de PAMP ou d'effecteurs. Output : inhibition de la croissance de l'agent pathogène. Adapté de Tsuda et al (2009).

4. La suppression de l'ETI

Les interactions moléculaires plantes/agents pathogènes sont souvent comparées à une « course aux armements » au cours de laquelle chaque protagoniste tente de s'adapter aux réactions de l'autre (Brown et Tellier, 2011). Lorsqu'un gène de résistance permet à une plante de reconnaître un agent pathogène, plusieurs types d'évènements moléculaires peuvent permettre le contournement de cette résistance par l'agent pathogène.

a) Perte ou modification du gène d'avirulence

Le gène d'avirulence peut subir une délétion partielle ou complète, comme cela a été observé pour le gène *Avr9* de *C. fulvum* (van Kan *et al.*, 1991), le gène *AvrLm1* de *L. maculans* (Gout *et al.*, 2006) ou le gène *AVR-CO39* de *M. oryzae* (Huang *et al.*, 2014). La taille de la région délétée peut être très variable. Elle peut ne représenter que quelques nucléotides et entraîner un décalage du cadre de lecture et la production d'une protéine tronquée comme observé pour *Avr2* (Luderer *et al.*, 2002), ou perturber la structure tridimensionnelle de la protéine dans le cas d'*Av4* (Joosten *et al.*, 1997). Mais la délétion peut également représenter des régions plus étendues, de quelques kb (environ 10 kb pour *Avr-Pita*, Orbach *et al.*, 2000) à plusieurs centaines (260 kb pour *AvrLm1* ; Gout *et al.*, 2007).

Le passage à la virulence peut résulter de l'insertion d'un élément transposable dans le promoteur ou la séquence codante du gène d'avirulence. C'est par exemple le cas du gène d'avirulence *Avr-Pita* de *M. oryzae*, dont la séquence promotrice a subi l'insertion de l'élément transposable Pot3 empêchant la transcription du gène (Zhou *et al.*, 2007). De même, le gène d'avirulence *AVR1* de *F. oxysporum* est inactivé par l'insertion du transposon *Hormin* (Inami *et al.*, 2012).

Le phénomène de RIP (Repeat Induced point Mutation) a également été démontré comme étant un mécanisme de passage à la virulence. Il s'agit d'un mécanisme préméiotique propre aux champignons ascomycètes entraînant des mutations C→T et G→A dans la séquence des

éléments répétés afin de les inactiver (Galagan et Selker, 2004). Chez *L. maculans*, le RIP affecte également les gènes proches des éléments répétés et peut conduire à leur inactivation, comme cela a été démontré pour les gènes d'avirulence *AvrLm6* et *AvrLm4-7* (Daverdin *et al.*, 2012; Fudal *et al.*, 2009).

Des mécanismes épigénétiques peuvent également être à l'origine de la perte de reconnaissance d'un gène d'avirulence (Kasuga et Gijzen, 2013). *Avr3a* de *P. infestans* peut ainsi échapper à la reconnaissance par le gène de résistance *Rps3a* sans altération de sa séquence codante via l'action de petits ARN non codants (Qutob *et al.*, 2013).

On observe également des cas de mutations ponctuelles entraînant la perte de la reconnaissance par le gène de résistance tout en conservant la fonction effectrice de la protéine d'avirulence. C'est notamment le cas d'*AvrLm4-7* de *L. maculans*, qui échappe à la reconnaissance par le gène de résistance *Rlm4* grâce à une mutation entraînant une substitution d'une glycine par une arginine dans la séquence protéique, sans pour autant affecter la fonction effectrice de la protéine (Parlange *et al.*, 2009).

b) Suppression de la reconnaissance du gène d'avirulence par un effecteur

Plusieurs cas où un effecteur empêche la reconnaissance d'un autre effecteur ont été mis en évidence. Ainsi, *AvrRpt2* de *P. syringae*, qui entraîne la dégradation de RIN4, masque la reconnaissance d'*AvrRPM1* par RPM1. En effet, comme *AvrRPM1* est reconnu par RPM1 suite à la phosphorylation de RIN4, la dégradation de RIN4 par *AvrRpt2* empêche la phosphorylation de RIN4 par *AvrRPM1* et le déclenchement de l'ETI (Mackey *et al.*, 2003). Cet exemple illustre parfaitement bien le modèle en zig-zag des interactions plantes-pathogènes puisque la reconnaissance d'un effecteur par une protéine de résistance est masquée par un autre effecteur qui est lui-même reconnu par une protéine de résistance, RPS2 (Fig. 15). De la même façon, l'effecteur *AvrPphB* de *P. syringae* supprime la reconnaissance d'*AvrB* en clivant la kinase RIPK (RPM1 Interacting Protein Kinase : Fig. 15), responsable de l'activation de RPM1

suite à la phosphorylation de RIN4 (Russell *et al.*, 2015). Le clivage de cette kinase ne permet en revanche pas d'empêcher la reconnaissance d'AvrRPM1, ce qui signifie que la reconnaissance d'AvrRPM1 et AvrB déclenche des voies de signalisation différentes pour aboutir à l'ETI. De plus, AvrRPM1 et AvrB sont reconnus par deux protéines de résistance différentes chez le soja, respectivement Rpg1r et Rpg1b. Or AvrPphB est capable de supprimer la reconnaissance d'AvrB par Rpg1b, mais pas celle d'AvrRPM1 par Rpg1R. Enfin, *AvrPphB* de *P. syringae* pv *phaseolicola* peut être reconnu par un gène de résistance présent dans certains cultivars résistants de haricot, mais cette reconnaissance peut être masquée à son tour par l'effecteur AvrPphC via un mécanisme non encore déterminé (Tsiamis *et al.*, 2000).

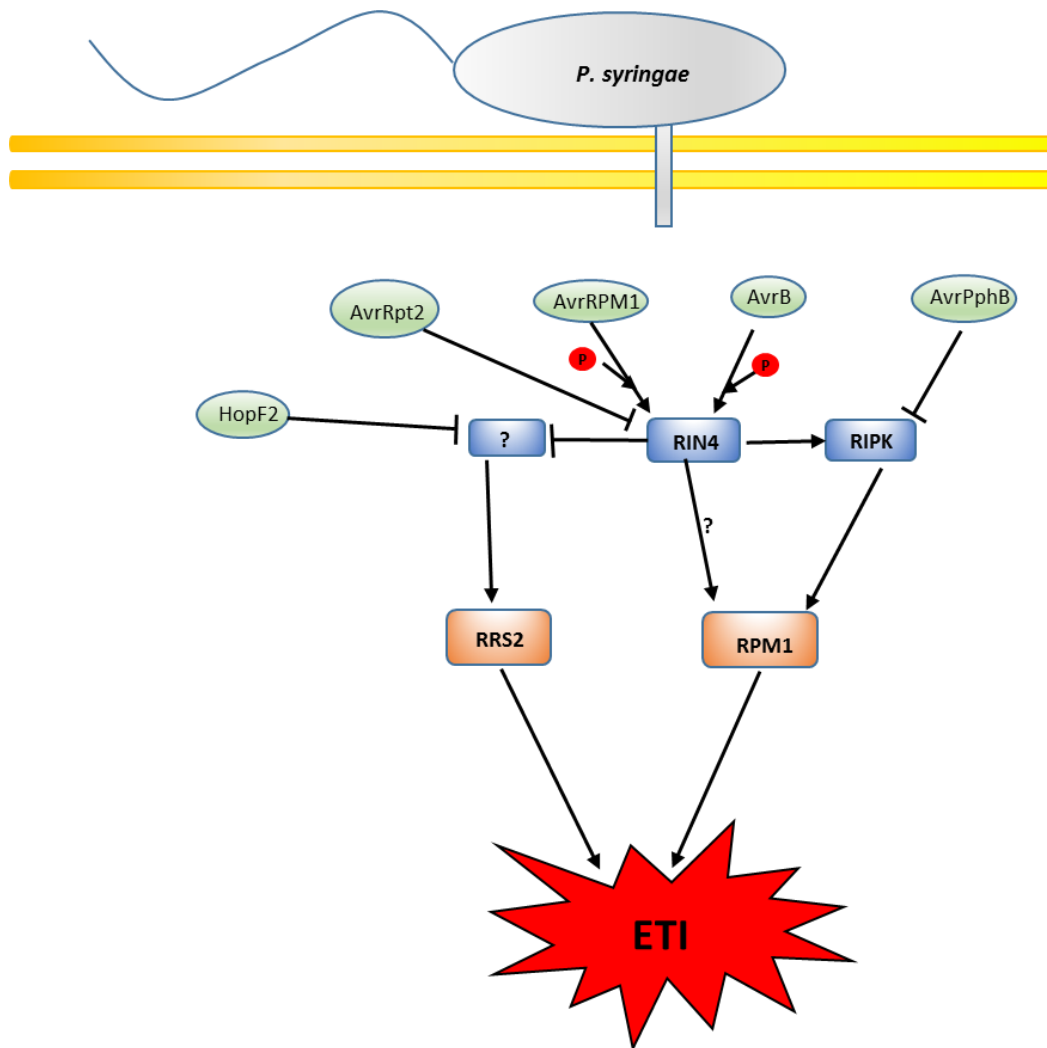


Figure 15 : Les effecteurs de *P. syringae* qui masquent la reconnaissance d'autres effecteurs.

Les effecteurs de *P. syringae* pv. *tomato* AvrRPM1, AvrB, AvrRpt2, AvrPphB et HopF2 sont sécrétés au cours de l'infection d'*A. thaliana*. AvrRPM1 et AvrB phosphorylent le régulateur global RIN4, ce qui active la protéine de résistance RPM1. La voie de signalisation menant à l'activation de RPM1 par AvrRPM1 est encore inconnue, mais on sait que l'activation de RPM1 par AvrB passe par la kinase RIPK (RPM1 Interacting Protein Kinase). AvrPphB clive RIPK, empêchant ainsi l'activation de RPM1 par AvrB (mais pas par AvrRPM1). AvrRpt2 dégrade RIN4, ce qui a pour effet d'empêcher la reconnaissance d'AvrRPM1 par RPM1. Cependant, la dégradation de RIN4 par AvrRpt2 active la protéine de résistance RRS2. HopF2 est capable d'empêcher la reconnaissance d'AvrRpt2 par RRS2 en diminuant la dégradation de RIN4, mais cet effet n'a été observé qu'en condition de surexpression de HopF2.

Des cas de figure similaires ont été décrits chez les champignons. *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* possède deux effecteurs, Avr2 et Avr3, respectivement reconnus par les protéines de résistance I2 et I3. Ces deux effecteurs sont retrouvés dans toutes les souches de Fol séquencées à ce jour, et leur délétion entraîne une diminution quantitative du pouvoir pathogène. Certaines souches possèdent également l'effecteur AVR1, qui permet de masquer la reconnaissance d'AVR2 et AVR3 par I2 et I3 (Houterman *et al.*, 2008). De même, l'effecteur AvrLm4-7 de *L. maculans* permet de masquer la reconnaissance d'un autre effecteur, AvrLm3, par la protéine de résistance correspondante Rlm3 (Plissonneau *et al.*, 2016). Enfin, plusieurs distorsions suite à des croisements génétiques entre souches virulentes et avirulentes de *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* ont amené Bourras *et al.* (2016) à faire l'hypothèse de l'implication de deux effecteurs dans ces événements de reconnaissance : une protéine d'avirulence reconnue par la protéine de résistance, et un deuxième effecteur impliqué dans la suppression de cette reconnaissance via un mécanisme encore inconnu.

c) Suppression des réponses induites lors de l'ETI

Une façon simple de trouver des effecteurs impliqués dans la suppression de l'ETI est de cribler des répertoires d'effecteurs pour leur capacité à supprimer la HR. Ce type de crible est souvent réalisé par expression transitoire d'un répertoire d'effecteurs dans *N. benthamiana* en présence d'inducteurs de la mort cellulaire. Le crible primaire est généralement réalisé avec le facteur pro-apoptotique murin BAX, qui permet de mettre en évidence une suppression très générale de la mort cellulaire. Ce crible est par la suite affiné en utilisant des inducteurs de la PTI (PAMP) ou de l'ETI (effecteurs reconnus par le tabac, ou co-expression d'un couple protéine d'avirulence / protéine de résistance).

Ce type de crible a été ainsi réalisé par Wang *et al* (2011) pour tester 169 effecteurs de *P. sojae*. La grande majorité de ces effecteurs sont capables de supprimer la mort cellulaire induite par BAX, et certains sont également capables de supprimer la mort cellulaire induite par une PAMP

(INF1) et / ou par deux effecteurs (Avh238 et Avh241). Tous les cas de figures existent, ce qui permet de classer les effecteurs de *P. sojae* en supprimeur plus ou moins spécifiques de l'ETI ou de la PTI. De manière intéressante, les effecteurs supprimant spécifiquement l'ETI sont ceux qui sont exprimés les plus précocement au cours de l'infection. Il semble donc que la première vague d'effecteurs de *P. sojae* ait pour fonction de supprimer l'ETI, avant même que les effecteurs supprimeurs de la PTI ne soient exprimés à leur tour.

Il a également été démontré que certains effecteurs suppriment spécifiquement les réponses de l'ETI, mais pas de la PTI. L'effecteur HopD1 de *P. syringae* interagit physiquement avec le facteur de transcription NTL9 de la famille NTM1-like (NAC with Transmembrane Motif 1) au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Mukhtar *et al.*, 2011). Cet effecteur est capable de supprimer la reconnaissance par *A. thaliana* de souches avirulentes de *P. syringae* exprimant des effecteurs reconnus par cette plante (Block *et al.*, 2014). HopD1 ne permet cependant pas de supprimer les défenses de la PTI induites par plusieurs PAMP. Sa cible, NTL9, est impliquée dans les réactions de défense de la plante. Elle induit l'expression de gènes impliqués dans les réactions immunitaires, et cette induction est supprimée en présence de HopD1. NTL9 est également impliqué dans les réactions de la PTI en induisant l'expression de gènes comme FRKY1. De manière intéressante, la présence de HopD1 n'affecte pas l'induction de ces gènes impliqués dans la PTI. Il doit donc y avoir un messager spécifique, à un moment quelconque de la voie de signalisation, qui oriente l'action de NTL9 vers l'induction de gènes spécifiques de la PTI ou de l'ETI. Block *et al.* (2014) suggèrent que cette catégorie d'effecteur qui supprime l'ETI mais pas la PTI aurait été acquise plus tard au cours de l'évolution du pathosystème, après l'acquisition des protéines de résistance par les plantes.

5. Les limites du modèle en zig-zag

Récemment plusieurs études ont remis en cause la pertinence et l'universalité du modèle en zig-zag, notamment en insistant sur la limite parfois difficilement discernable entre PAMP

et effecteurs, entre PRR et protéines de résistance, et entre PTI et ETI (Thomma *et al.*, 2011). Plusieurs autres modèles ont été proposés.

Cook *et al.* (2015) ont proposé le modèle de l'Invasion Pattern (IP), dans lequel toute distinction entre PAMP, DAMP et effecteur est abolie. Toute molécule produite au moment de l'infection, issue de l'agent pathogène ou de l'hôte, peut déclencher la reconnaissance par un IPR (Invasion Pattern Receptor). Dans ce modèle il n'existe donc plus qu'une catégorie d'éliciteur, quelle que soit la force de la réponse immunitaire, la conservation phylogénétique de l'IP ou la spécificité de l'agent pathogène. A travers cette étude les auteurs ont tenté de donner du sens à des interactions non prises en compte par le modèle en zig-zag, comme l'infection par des agents pathogènes nécrotrophes ou non-microbiens, ou encore l'établissement d'une symbiose mutualiste. L'intérêt principal du modèle est de proposer une vision plus intégrée des interactions plante-pathogène.

Pour leur part, Stotz *et al.* (2014) ont proposé le terme d'Effector Triggered Defence (ETD) pour qualifier la reconnaissance des effecteurs des agents pathogènes apoplastiques par des récepteurs de type RLP. En effet, selon ces auteurs, dans ces cas de figure, les défenses mises en jeu sont plus lentes que dans le cadre de l'ETI, ce qui laisse imaginer un autre niveau de défense des plantes indépendant de l'ETI et de la PTI.

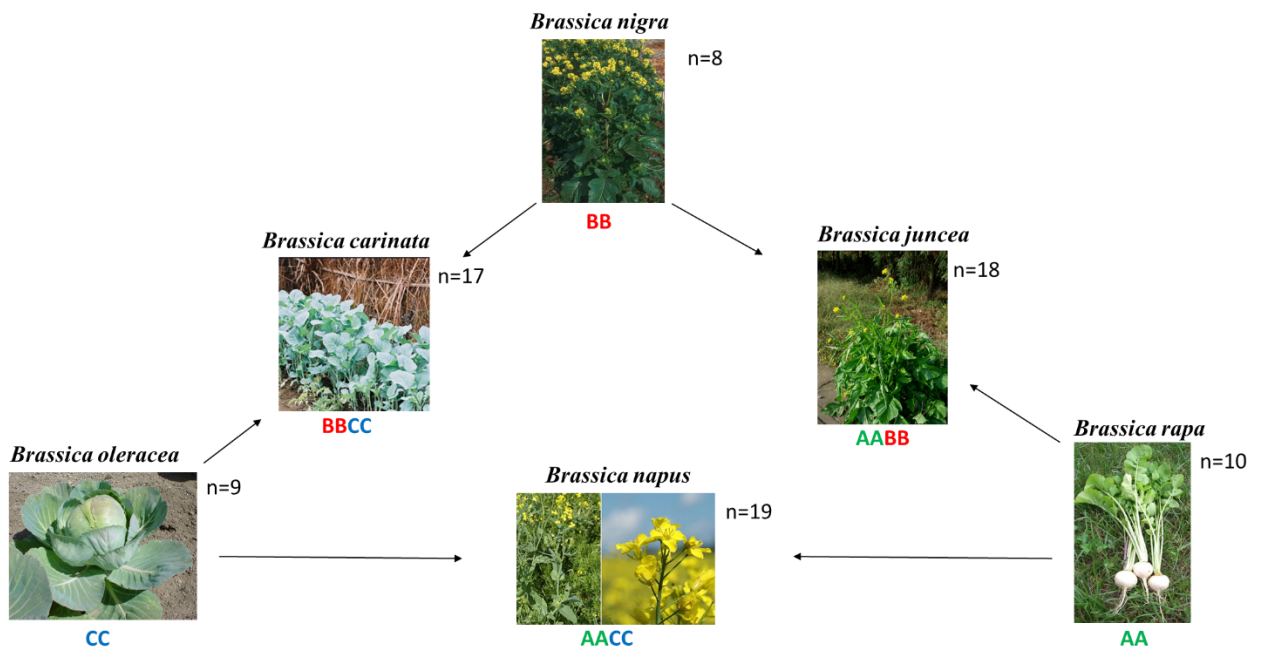


Figure 16: triangle de U.

Trois plantes ancestrales du genre *Brassica* se sont hybridées deux à deux au cours de leur histoire évolutive, donnant naissance à trois autres plantes (U, 1935). Ces plantes hybrides possèdent un génome tétraploïde issu des deux génomes diploïdes de leur plantes parentes. Le colza (*Brassica napus*) est issu d'une hybridation entre le chou (*Brassica oleracea*) et la navette (*Brassica rapa*).

IV. Le pathosystème *Leptosphaeria maculans* / *Brassica napus*

1. *Brassica napus*

Le colza (*Brassica napus*) est une plante allotétraploïde ($2n=38$, génome AACC) de la famille des Brassicaceae (anciennement crucifères). Les plantes de cette famille ont émergé par hybridation interspécifique entre trois espèces diploïdes ancestrales (U, 1935 ; Fig. 16). Le colza est issu de l'hybridation interspécifique entre *Brassica oleracea* ($2n=18$, génome CC) et *Brassica rapa* ($2n=20$, génome AA). Cette hybridation semble s'être produite indépendamment à plusieurs reprises au cours de l'histoire évolutive de ces plantes, et la date de la première hybridation est estimée il y a environ 7500 ans (Allender et King, 2010). Le génome de *B. napus* a été séquencé récemment, révélant une séquence génomique de 1130 Mb répartie sur 9 chromosomes issus du génome C (*B. oleracea*) et 10 chromosomes issus du génome A (*B. rapa*), et comportant plus de 100 000 gènes prédits (Chalhoub *et al.*, 2014).

La production annuelle de colza a atteint presque 74 millions de tonnes au niveau mondial en 2014. La Chine a été le plus gros producteur ces dernières décennies, même si le Canada a récemment pris la tête de la production mondiale (15,5 millions de tonnes en 2014, 21,9% de la production mondiale). Avec ses 5,5 millions de tonnes produites sur 1,5 millions d'hectares en 2014, la France est le 5^{ème} producteur mondial (<http://www.fao.org>). Cette plante est principalement utilisée pour la production d'huile de colza, l'une des principales huiles végétales alimentaires avec l'huile de tournesol et l'huile d'olive. L'extraction de l'huile des graines permet la production d'un sous-produit, les tourteaux, massivement utilisés dans l'alimentation animale – le tourteau de colza étant le deuxième type de tourteau le plus utilisé en Europe, derrière le tourteau de soja. Enfin, le colza est utilisé pour la production de biocarburants de première génération.

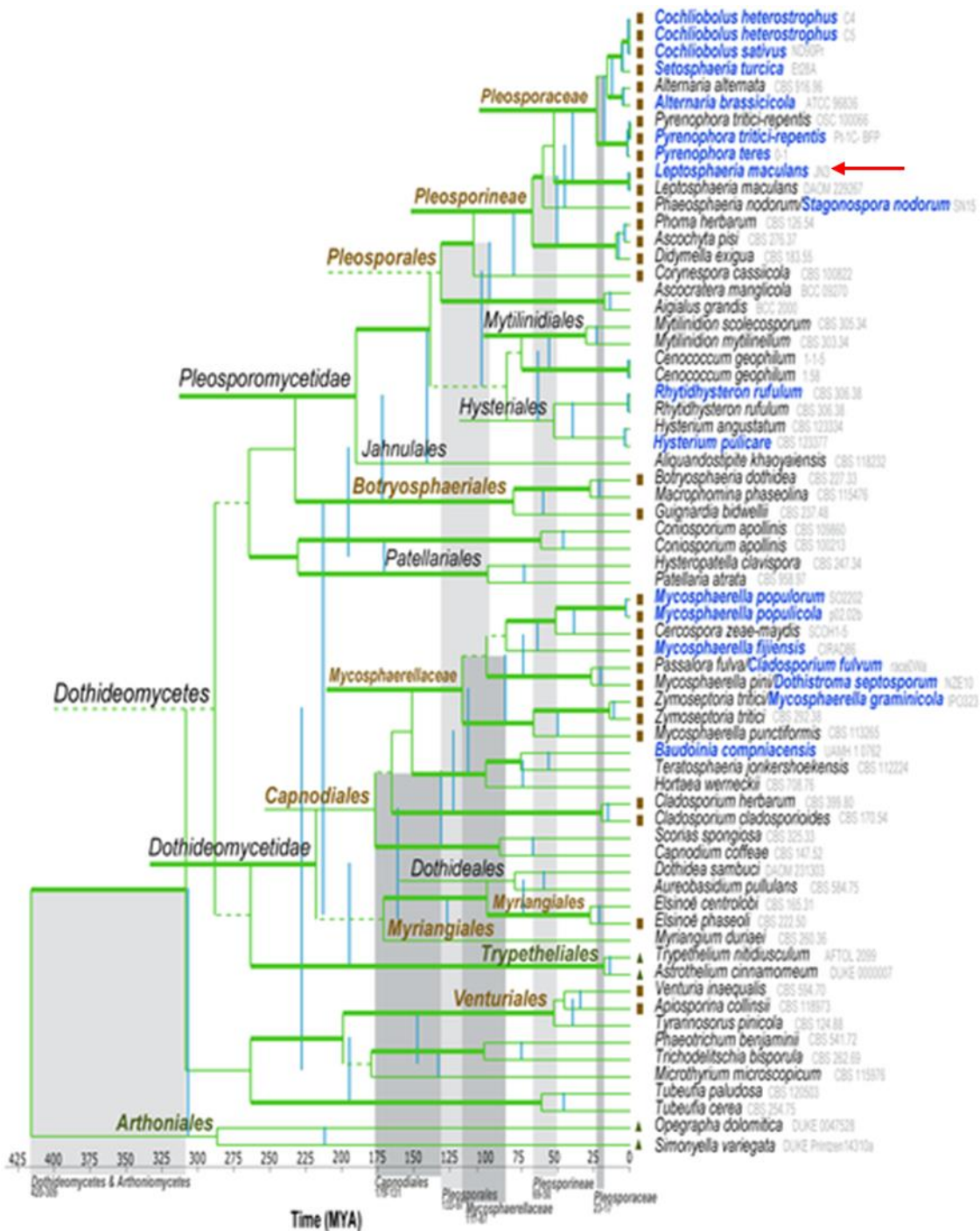


Figure 17: Relation phylogénétique et temps de divergence entre les champignons de la classe des Dothidéomycètes.

D'après Ohm et al. (2012).

Le colza est la cible d'un grand nombre de ravageurs (altises, charançons, pucerons, taupins...), d'adventices (Orobanche) et d'agents pathogènes filamenteux tels qu'*Erysiphe cruciferarum* (oïdium), *Cylindrosporium concentricum* (cylindrosporiose), *Alternaria alternata* (alternariose), *Sclerotinia sclerotiorum* (pourriture blanche). Le phoma du colza (ou nécrose du collet), causé par le champignon *Leptosphaeria maculans*, est l'une des maladies les plus dommageable pour cette culture. Cette pathologie est présente dans toutes les zones de culture du colza (Europe, Amérique du Nord, Australie) à l'exception de la Chine. Les pertes de rendements liées au phoma du colza ont été estimées entre 5 et 20% en Europe (Fitt *et al.*, 2006).

2. *Leptosphaeria maculans*

a) Phylogénie

L. maculans est un ascomycète hémibiotrophe de la classe des Dothideomycètes, responsable de la nécrose du collet des crucifères, également appelée phoma du colza. La classe des Dothideomycètes est connue pour comprendre un grand nombre de champignons phytopathogènes tels que *Parastagonospora nodorum*, *Alternaria alternata*, *Venturia inaequalis*, *Cochliobolus heterostrophus* ou encore *Zymoseptoria tritici* (Schoch *et al.*, 2009 ; Fig. 17). *L. maculans* se développe sur les plantes de la famille des Brassicaceae, et particulièrement sur celles du genre *Brassica*. Des études ont montré que ce champignon était également capable d'infecter certains écotypes de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (Bohman *et al.*, 2004).

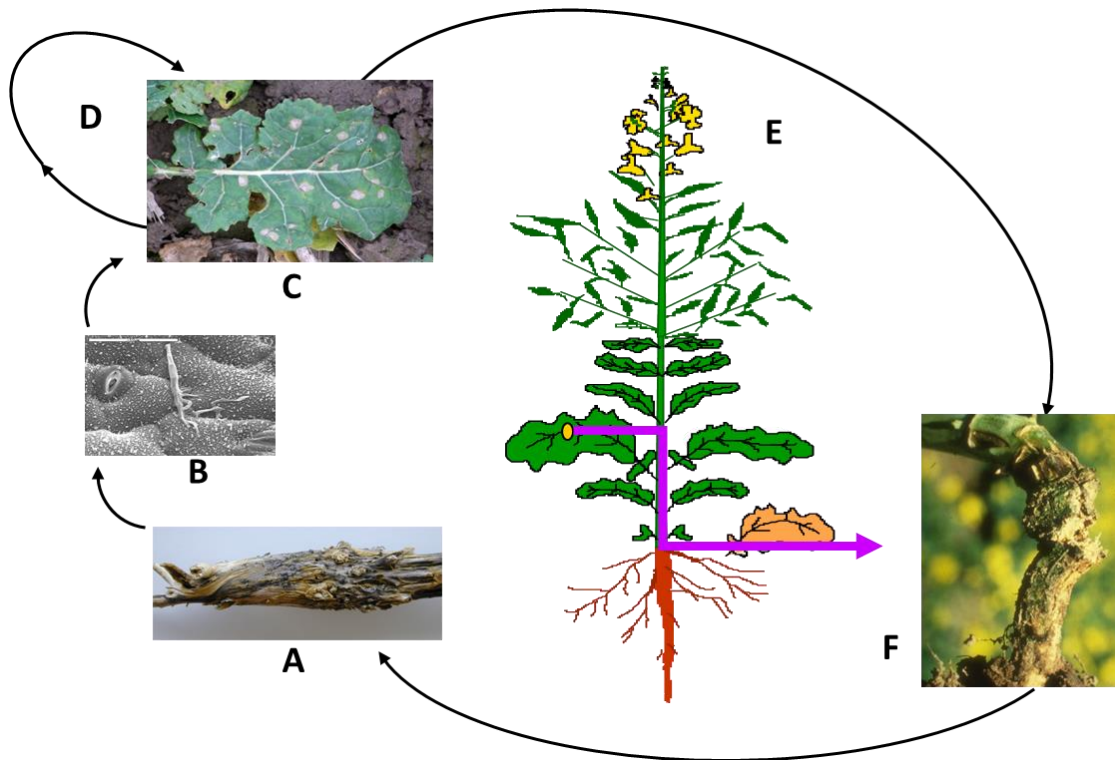


Figure 18: cycle de vie de *Leptosphaeria maculans* en Europe.

A : la reproduction sexuée du champignon a lieu durant l'automne sur les résidus de culture de colza. **B** : des ascospores (spores sexuées) sont produites et dispersées sur de grandes distances par le vent. **C** : les ascospores germent sur les feuilles de colza et y pénètrent en passant par les stomates ou des blessures. Cette première phase biotrophe prend fin lorsque des macules apparaissent sur les feuilles infectées. **D** : sur les macules apparaissent des pycnides, qui produisent des conidies (spores asexuées). Ces conidies constituent l'inoculum secondaire. **E** : *L. maculans* entame ensuite une phase de vie endophyte totalement asymptotique au cours de laquelle il va coloniser la tige de colza. **F** : en fin de saison culturale (début de l'été), une seconde phase nécrotrophe débute. *L. maculans* provoque des nécroses au niveau du collet, pouvant entraîner une verse parasitaire.

Adapté de Rouxel et Balesdent (2005).

L. maculans fait partie d'un complexe d'espèces regroupant deux sous-espèces de *L. maculans* – *L. maculans* 'brassicae', l'espèce pathogène du colza, et *L. maculans* 'lepidii' – ainsi que 6 sous-espèces de *Leptosphaeria biglobosa* – 'brassicae', 'canadensis', 'erysimii', 'australensis', 'occiaustralensis' et 'thlapsii'. *L. maculans* 'brassicae' et *L. biglobosa* 'brassicae' infectent toutes les deux le colza et sont fréquemment retrouvées sur les mêmes plantes au même moment. Ces deux espèces provoquent des macules foliaires, bien que de morphologie très différentes, mais seule *L. maculans* est capable de provoquer la nécrose du collet, alors que *L. biglobosa* développe des nécroses au niveau des tiges et impacte donc peu le rendement. Elles présentent également des répartitions géographiques similaires, à l'exception de la Chine où seule *L. biglobosa* est présente à l'heure actuelle (Cai *et al.*, 2017). Cependant l'augmentation des échanges internationaux et le réchauffement climatique font actuellement craindre une propagation de *L. maculans* dans ces zones.

b) Cycle de vie

L. maculans présente un cycle de vie relativement complexe avec une alternance de plusieurs modes de vie (Rouxel et Balesdent, 2005 ; Fig. 18). Ce cycle débute par un développement saprophyte sur les résidus de culture de colza de la saison culturale précédente. La reproduction sexuée du champignon a lieu à ce stade, aboutissant à la formation de périthèces produisant des ascospores. Les ascospores constituent l'inoculum primaire. Elles sont dispersées sur de longues distances par le vent en automne (en Europe). La germination des ascospores sur les feuilles de colza donne lieu à une première phase biotrophe d'environ une semaine au cours de laquelle le champignon colonise l'apoplasme des tissus du mésophyle en passant par les stomates ou des blessures. Suite à cette courte phase biotrophe, une première phase nécrotrophe débute, entraînant la formation de macules foliaires. Sur ces macules apparaissent des pycnides produisant des conidies, spores asexuées constituant l'inoculum secondaire responsable de la propagation du champignon à plus petite distance. Le champignon va par la suite coloniser

l'ensemble de la tige au cours d'une phase de développement endophyte totalement asymptomatique pouvant durer jusqu'à 6 mois. Enfin, au début de l'été, une dernière phase nécrotrophe a lieu, aboutissant à la nécrose du collet et pouvant entraîner une verse parasitaire responsable de pertes de rendement pouvant aller jusqu'à plus de 50% de la surface cultivée (Fitt et al., 2006).

c) Génome

Une première version du génome de *L. maculans* a été publiée en 2011 suite à un séquençage « Sanger ». Les 45,1 Mb du génome sont réparties sur 18 chromosomes, dont un chromosome dispensable. Le nombre de gènes prédits est de 12469 gènes (Rouxel *et al.*, 2011). La première version du génome a depuis été amélioré au moyen de données d'expression (puces et RNAseq en condition d'infection), mais aussi par le reséquençage récent de la souche de référence JN3 au moyen de la technologie Nanopore. Ces nouvelles données sont actuellement encore en cours d'analyse.

Le séquençage du génome de *L. maculans* a permis de mettre en évidence une structuration du génome en isochores (Fig. 19). En effet, deux types de compartiments génomiques se succèdent. Les isochores GC présentent un taux équilibré de bases G et C (51%), constituent les deux tiers du génome et contiennent 95% des gènes prédits. Les isochores AT contiennent moins de bases G et C (33%), représentent 36% du génome, contiennent peu de gènes mais sont enrichis en gènes codant des effecteurs putatifs. Ces isochores AT sont constitués d'une mosaïque d'éléments répétés dégénérés par le mécanisme de RIP, ce qui explique le plus fort taux de bases A et T dans ces isochores (le RIP induit des mutations C→T et G→A ; Galagan et Selker, 2004). Il a été démontré que la grande plasticité des isochores AT était en grande partie responsable de l'évolution sous pression de sélection des répertoires d'effecteurs de *L. maculans* et de l'adaptation de *L. maculans* aux sources de résistance qualitative mises en place pour lutter contre lui (Daverdin *et al.*, 2012 ; Fudal *et al.*, 2009).

d) Lutte contre le phoma du colza

Plusieurs leviers sont disponibles pour limiter l'impact du phoma.

De bonnes pratiques agronomiques permettent de ralentir le développement de *L. maculans*. L'enfouissement systématique des résidus de culture permet de fortement réduire la phase de reproduction sexuée, et donc de diminuer l'adaptabilité du champignon face aux sources de résistance. Il est également préconisé de limiter la densité du semis, de limiter l'utilisation d'engrais azotés en été et de pratiquer la rotation des cultures (West *et al.*, 2001).

La lutte chimique reste très peu utilisée en France contre *L. maculans* car elle est compliquée à mettre en place. En effet, pour une efficacité optimale le traitement doit avoir lieu au moment de la dispersion des ascospores. Comme le relargage d'ascospores peut se faire durant plusieurs mois, la durée de traitement est beaucoup trop longue. De plus, l'efficacité des fongicides est très fortement diminuée en cas de pluie, alors que la dispersion des conidies et ascospores est favorisée par ces conditions (West *et al.*, 2002). Ces raisons, combinées à une volonté des pouvoirs publics de fortement baisser l'utilisation des fongicides en France, fait que la lutte chimique n'est utilisée pour lutter contre le phoma qu'en cas de risques élevés d'épidémie.

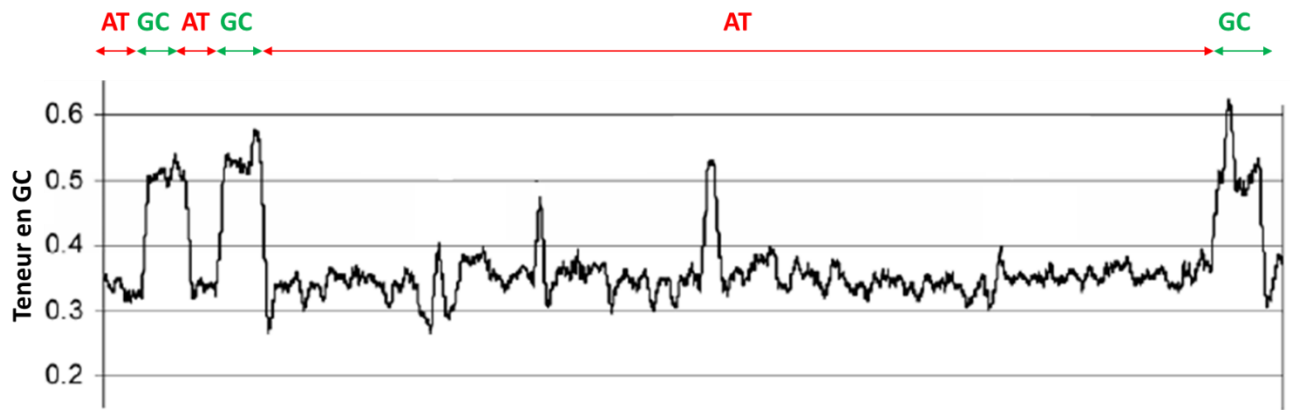


Figure 19: structure en isochores du génome de *L. maculans*.

Exemple d'une région génomique de 500 kb comprenant le gène d'avirulence *AvrLm6*. Le génome de *L. maculans* présente une alternance de régions équilibrées en bases G et C (isochores GC) et de régions riches en AT (isochores AT). Les isochores GC 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.

Adapté de Fudal et al. (2007).

La résistance variétale est donc le principal moyen de lutte contre le phoma du colza. Des cultivars de colza possédant deux types de résistance sont déployés : une résistance qualitative – totale et monogénique – basée sur des gènes de résistance majeurs (*Rlm*) et une résistance quantitative – partielle et polygénique – permettant de tolérer la maladie et de limiter la propagation du champignon dans la tige et le développement de la nécrose au collet en fin de cycle cultural. Les résistances qualitatives, même si elle présente l'avantage d'obtenir un arrêt total de la maladie, sont fréquemment contournées par des populations d'agents pathogènes adaptés. Par exemple la résistance *Rlm1*, déployée dans les années 1990, n'a été efficace que durant 3 saisons culturales avant d'être contournée (Rouxel *et al.*, 2003). Brun *et al.* (2010) ont par la suite montré que les résistances qualitatives du colza étaient moins fréquemment contournées par *L. maculans* lorsqu'elles étaient exprimées dans des cultivars présentant un fond génétique de résistance quantitative. Ce type de cultivars est effectivement actuellement préférentiellement utilisé par les sélectionneurs, ce qui explique probablement en partie pourquoi la résistance qualitative *Rlm7* a été efficace durant dix ans après son déploiement au champ. Cependant, des données récentes indiquent un début de contournement de cette résistance dans certaines régions de France (Balesdent *et al.*, 2015).

e) Gènes d'avirulence

Le premier séquençage du génome de *L. maculans* a permis de mettre en évidence plus de 650 gènes codant des effecteurs putatifs (Rouxel *et al.*, 2011). Ces gènes codent des petites protéines sécrétées, souvent riches en cystéines, avec peu ou pas d'homologues dans les bases de données. Certains de ces gènes sont spécifiquement exprimés dans les phases précoces de l'infection, et une fonction d'avirulence a été démontrée pour 7 d'entre eux (Balesdent *et al.*, 2013; Fudal *et al.*, 2007; Ghanbarnia *et al.*, 2015; Gout *et al.*, 2006; Parlange *et al.*, 2009; Plissonneau *et al.*, 2016; Van de Wouw *et al.*, 2014). La totalité des gènes d'avirulence de *L. maculans* identifiés jusqu'à présent se situent en isochore AT, et sept d'entre eux sont regroupés en deux

clusters génétique: *AvrLm1-AvrLm2-AvrLm6* et *AvrLm3-AvrLm4-AvrLm7-AvrLm9* (Balesdent *et al.*, 2002).

Si l'implication des petites protéines sécrétées de *L. maculans* dans l'avirulence a été mise en évidence à de nombreuses reprises, leur mode d'action et leur rôle dans le pouvoir pathogène ne sont pas connus. Aucune homologie de séquence ou de structure n'a permis de déduire une possible fonction pour les effecteurs de *L. maculans* par comparaison avec d'autres effecteurs d'agents phytopathogènes. Un effet sur la fitness fongique a pu être démontré pour *AvrLm4-7* et *AvrLm1*. On observe ainsi un effet mesurable de la présence ou absence de ces deux effecteurs en termes de nombres et taille de lésions foliaires, ainsi qu'en distance parcourue par le champignon à travers la tige, en condition contrôlée. De plus, lors d'expérimentations au champ sur des cultivars dépourvus du gènes de résistance *Rlm4*, il a été observé que des souches possédant *AvrLm4-7* étaient retrouvées à une plus grande fréquence que des souches en étant dépourvues. Enfin, la croissance systémique de *L. maculans* de la feuille à la tige est plus efficace en présence d'*AvrLm4-7* et *AvrLm1* (Huang *et al.*, 2006, 2010).

V. Objectifs de la thèse

L'équipe EPLM (Effecteur et Pathogénèse chez *Leptophaeria maculans*) étudie le pathosystème *L. maculans* / *B. napus* par une approche intégrée du gène à la parcelle agricole. L'objectif est de mieux décrire et comprendre l'adaptation des populations de *L. maculans* à leur plante hôte afin de pouvoir développer des stratégies de lutte durables et respectueuses de l'environnement. Or, si la résistance variétale est le principal moyen de lutte contre *L. maculans*, les résistances qualitatives disponibles sont peu nombreuses chez le colza et souvent rapidement contournées. Il convient donc d'identifier de nouvelles résistances vis-à-vis de *L. maculans* chez des espèces végétales proches du colza et de cloner les gènes d'avirulence correspondant chez *L. maculans*, mais également de proposer de nouvelles stratégies de lutte génétique contre *L. maculans*, notamment basées sur la connaissance des processus cellulaires et des protéines végétales ciblées par les effecteurs de *L. maculans*. Dans ce but, un grand nombre de gènes d'avirulence ont été identifiés et clonés chez *L. maculans* (onze gènes d'avirulence de *L. maculans* ont été mis en évidence génétiquement et 7 ont été clonés ; Gout *et al.*, 2006 ; Fudal *et al.*, 2007 ; Parlange *et al.*, 2009 ; Balesdent *et al.*, 2013 ; Van de Wouw *et al.*, 2013 ; Ghanbarnia *et al.*, 2014 ; Plissonneau *et al.*, 2016 ; Petit, Degrave, Fudal et Balesdent, Pers. Comm.), permettant notamment de mettre en évidence des interactions non-conventionnelles avec les gènes de résistance du colza (cf. article 1) et une évolution rapide de ces gènes d'avirulence sous pression de sélection (Rouxel et Balesdent, 2017). Très peu d'informations sont actuellement disponibles concernant la fonction effectrice de ces gènes d'avirulence au cours de l'infection, les protéines végétales et les processus cellulaires ciblés par ces effecteurs. En effet, si de nombreuses avancées ont été faites dans la caractérisation fonctionnelle des effecteurs bactériens, encore très peu de choses sont connues sur les effecteurs d'agents phytopathogènes eucaryotes. La plupart des effecteurs protéiques identifiés chez ces

agents pathogènes ne présentent aucune homologie avec des protéines connues, ce qui rend difficile l'élucidation de leur fonction et de leur rôle pendant l'infection.

La modification des plantes a toujours été un sujet très porteur dans le domaine de l'amélioration végétale (Stuiver and Custers, 2001). Depuis quelques années, les effecteurs sont considérés comme des outils de choix pour mieux décrypter le système immunitaire végétal et trouver de nouvelles sources de résistance aux agents phytopathogènes. En effet, la caractérisation fonctionnelle des effecteurs permet notamment d'accélérer l'identification et le clonage de gènes de résistance, ainsi qu'une meilleure gestion du déploiement des résistances au champ (Vleeshouwers et Oliver, 2014). De plus, la détermination du mode d'action de ces effecteurs, ainsi que des protéines végétales qu'ils ciblent et les processus cellulaires avec lesquels ils interfèrent, constitue un levier supplémentaire dans la lutte génétique contre les microorganismes pathogènes. En effet, en connaissant la cible d'un effecteur, il est possible de sélectionner des plantes n'exprimant pas cette cible, ou exprimant un isoforme de cette cible qui n'interagit plus avec l'effecteur. Cette stratégie a notamment été utilisée sur le locus *mlo* de l'orge, qui code une protéine membranaire facilitant l'infection par *B. graminis*. Kim *et al.*, (2002a) ont identifié des allèles récessifs de ce locus qui confèrent une résistance accrue à *B. graminis*. Cet exemple illustre bien qu'en décryptant de manière plus approfondie les interactions moléculaires plante-microorganisme, il est possible de développer de nouvelles méthodes de lutte potentiellement plus durables.

Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse est de caractériser fonctionnellement 4 effecteurs de *L. maculans* afin de déterminer leur mode d'action au cours de l'infection. Cette caractérisation fonctionnelle est menée sur 4 effecteurs précédemment étudiés au sein de l'équipe, pour lesquels très peu de données fonctionnelles sont disponibles à l'heure actuelle. Ces effecteurs ont la caractéristique de correspondre à des gènes d'avrulence engagés dans une relation gène-pour-gène non-conventionnelle avec le gène de résistance correspondant. Les relations gène-

pour-gène non-conventionnelles et leurs conséquences sur la gestion des résistances qualitatives font l'objet d'une mini-revue écrite pour le journal *Frontiers in Plant Science* et disponible à la fin de cette introduction bibliographique (Article 1 : **Complex Interactions between Fungal Avirulence Genes and Their Corresponding Plant Resistance Genes and Consequences for Disease Resistance Management**). Les effecteurs étudiés dans le cadre de ma thèse sont les suivants :

- *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2*, deux gènes d'avirulence nécessaires pour déclencher la reconnaissance par le gène de résistance *Rlm10* de la moutarde noire. *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* sont deux gènes voisins codant des effecteurs putatifs localisés en orientation inverse et séparés par une grande région intergénique. Ces deux gènes, ainsi que leur région intergénique, sont nécessaires pour déclencher la résistance associée au gène *Rlm10* de la moutarde noire. De manière inhabituelle pour des effecteurs de *L. maculans*, des homologues protéiques peuvent être trouvés dans les génomes d'autres champignons phytopathogènes. Les informations concernant l'identification, le clonage, la validation fonctionnelle et un début de caractérisation fonctionnelle d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* sont présentées dans le chapitre 1 de ce manuscrit sous la forme d'un article de recherche en révision pour le journal *New Phytologist* (Article 2 : **A two genes – for – one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus***), et sont complétées dans la suite du chapitre par des données d'analyse fonctionnelle obtenues au cours de ma thèse et permettant d'avoir une idée plus précise du mode d'action d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2*.

- *AvrLm4-7*, qui confère l'avirulence vis-à-vis de 2 gènes de résistance (*Rlm4* et *Rlm7*). *AvrLm4-7* est l'effecteur le plus étudié de *L. maculans* et celui pour lequel le plus de données fonctionnelles sont disponibles. Il est reconnu par deux protéines de résistance, *Rlm4* et *Rlm7* (Parlange *et al.*, 2009). Sa structure tridimensionnelle a été déterminée, permettant de mettre en évidence des résidus impliqués dans la reconnaissance par *Rlm4* et *Rlm7*, ainsi que dans la

translocation dans les cellules végétales (Blondeau, et al., 2015). La présence d'*AvrLm4-7* empêche la reconnaissance d'un autre gène d'avirulence, *AvrLm3*, par *Rlm3* (Plissonneau et al., 2006). Enfin, *AvrLm4-7* est fortement impliqué dans la fitness fongique (Huang et al., 2006). Le chapitre 2 est constitué des données fonctionnelles concernant *AvrLm4-7* obtenues au cours de ma thèse.

- *AvrLm3*, dont l'interaction avec *Rlm3* est masquée par la présence d'*AvrLm4-7* (Plissonneau et al., 2016). *AvrLm3* est présent dans presque toutes les souches de *L. maculans* séquencées à ce jour (Plissonneau et al. 2017), suggérant une implication importante d'*AvrLm3* au cours de l'infection. Le chapitre 3 de ce manuscrit présente les données fonctionnelles concernant *AvrLm3* obtenues au cours de ma thèse.

La caractérisation fonctionnelle de ces effecteurs inclut (i) la localisation subcellulaire de ces effecteurs *in planta*. La localisation d'une protéine peut en effet donner de précieuses indications concernant son mode d'action. (ii) une recherche de cibles végétales interagissant avec ces effecteurs par une approche double-hybride dans la levure. En effet, si l'on parvient à déterminer avec quelles cibles végétales interagissent les effecteurs de *L. maculans*, il sera plus facile de développer de nouvelles résistances, par exemple en sélectionnant des cultivars de colza n'exprimant pas cette cible ou produisant une cible modifiée ne permettant pas l'interaction avec l'effecteur. (iii) la génération de lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* exprimant ces effecteurs de manière stable afin d'étudier les processus cellulaires ciblés par ces effecteurs.

Mon projet de thèse est intégré au projet ANR StructuraLEP (2015-2018 ; coordination I. Fudal) visant à analyser fonctionnellement et structurellement des effecteurs de *L. maculans* et à rechercher leurs interactants. Dans le cadre de ce projet, l'équipe d'H. Van Tilbeurgh (I2BC, Orsay) est responsable de la production des effecteurs en système hétérologue et de leur cristallisation dans le but de déterminer leur structure tridimensionnelle.



Complex Interactions between Fungal Avirulence Genes and Their Corresponding Plant Resistance Genes and Consequences for Disease Resistance Management

Yohann Petit-Houdonot and Isabelle Fudal*

UMR BIOGER, Institut National De La Recherche Agronomique, AgroParisTech, Université Paris Saclay, Thiverval-Grignon, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Fabienne Vaillau,
Institut National De La Recherche
Agronomique Centre
Occitanie-Toulouse, France

Reviewed by:
Maud Bernoux,
Commonwealth Scientific and
Industrial Research Organisation
(CSIRO), Australia
Isabel M. L. Saur,
Max Planck Institute for Plant
Breeding Research (MPG), Germany

*Correspondence:
Isabelle Fudal
isabelle.fudal@inra.fr

Specialty section:
This article was submitted to
Plant Microbe Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 03 January 2017
Accepted: 02 June 2017
Published: 16 June 2017

Citation:
Petit-Houdonot Y and Fudal I (2017)
Complex Interactions between Fungal
Avirulence Genes and Their
Corresponding Plant Resistance
Genes and Consequences for Disease
Resistance Management.
Front. Plant Sci. 8:1072.
doi: 10.3389/fpls.2017.01072

During infection, pathogens secrete an arsenal of molecules, collectively called effectors, key elements of pathogenesis which modulate innate immunity of the plant and facilitate infection. Some of these effectors can be recognized directly or indirectly by resistance (R) proteins from the plant and are then called avirulence (AVR) proteins. This recognition usually triggers defense responses including the hypersensitive response and results in resistance of the plant. R—AVR gene interactions are frequently exploited in the field to control diseases. Recently, the availability of fungal genomes has accelerated the identification of AVR genes in plant pathogenic fungi, including in fungi infecting agronomically important crops. While single AVR genes recognized by their corresponding R gene were identified, more and more complex interactions between AVR and R genes are reported (e.g., AVR genes recognized by several R genes, R genes recognizing several AVR genes in distinct organisms, one AVR gene suppressing recognition of another AVR gene by its corresponding R gene, two cooperating R genes both necessary to recognize an AVR gene). These complex interactions were particularly reported in pathosystems showing a long co-evolution with their host plant but could also result from the way agronomic crops were obtained and improved (e.g., through interspecific hybridization or introgression of resistance genes from wild related species into cultivated crops). In this review, we describe some complex R—AVR interactions between plants and fungi that were recently reported and discuss their implications for AVR gene evolution and R gene management.

Keywords: avirulence genes, resistance genes, fungal effectors, resistance management, virulence factors

INTRODUCTION

During infection, pathogens secrete an arsenal of molecules, collectively called effectors, key elements of pathogenesis which modulate innate immunity of the plant and facilitate infection (Oliva et al., 2010). Plants have evolved resistance (R) genes encoding R proteins able to recognize, directly or indirectly, some of these effectors [then called avirulence (AVR) proteins]. Recognition of a pathogen AVR protein triggers a set of immune responses grouped under the term

Effector-Triggered Immunity (ETI), frequently leading to a rapid localized cell death termed the hypersensitive response (HR) (Jones and Dangl, 2006). Under the selection pressure exerted by R genes, pathogens can become virulent through evolution of their AVR gene repertoire. Mechanisms leading to virulence include complete deletion, inactivation, or down-regulation of the AVR gene, or point mutations allowing recognition to be evaded while maintaining the virulence function of the AVR protein (Jones and Dangl, 2006; Guttman et al., 2014). One class of R proteins corresponds to cell surface LRR-containing R proteins that are anchored to the plasma membrane via a transmembrane (TM) domain and sometimes include an intracellular kinase domain (Receptor-Like Proteins, RLP/Receptor like Kinases, RLK; Yang et al., 2012). The major class of identified R proteins however corresponds to intracellular nucleotide-binding and leucine-rich repeat receptors (NLR). NLR are multi-domain proteins containing a C-terminal leucine-rich repeat (LRR) domain, a central nucleotide-binding (NB) domain and a N-terminal domain often composed of a Toll/interleukin-1 receptor (TIR) or a coiled-coil (CC) domain (Takken and Govers, 2012). Their multi-domain structure allows R proteins to simultaneously recognize AVR proteins and trigger plant defense reactions. Four models of AVR recognition by R proteins have been proposed and found to co-exist. In the elicitor-receptor model, the R protein directly recognizes its corresponding AVR protein and triggers defense responses (Keen, 1990; Ja et al., 2000; Dodds et al., 2006; Catanzariti et al., 2010; Steinbrenner et al., 2015). In the guard model, the interaction between R and AVR proteins is indirect: the R protein detects modifications of an effector's host target protein, called a "guardee" (Dangl and Jones, 2001). In the decoy model, the R protein detects modifications in a plant protein (called a "decoy") that mimics the effector target and "traps" the AVR protein (van der Hoorn and Kamoun, 2008). Finally, in the recently proposed integrated decoy model, non-canonical domains mimicking the effector target are integrated into NLRs and play the role of "decoy" (Cesari et al., 2014a; Le Roux et al., 2015; Sarriset al., 2015).

Fungi are the most devastating pathogens of plants, including crops of major economic importance (Fisher et al., 2012). Genetic control is widely used to limit disease development, mainly through the use of major plant R genes recognizing fungal AVR genes. However, as more and more R and AVR genes are cloned and their molecular interactions are characterized, an increasing number of complex R—AVR gene interactions have been identified (Table 1). Such complex R—AVR gene interactions potentially result from long co-evolution between plants and pathogens and also from the way agronomic crops were obtained and improved, e.g., through interspecific hybridization or introgression of R genes from wild related species. In this review, we highlight some complex R—AVR gene interactions and discuss how they allow plants to expand pathogen recognition, how pathogens circumvent those plant resistances, and how complex interactions could be managed to improve crop disease resistance.

AVIRULENCE GENES RECOGNIZED BY SEVERAL RESISTANCE GENES

AVR genes recognized by several R genes were reported in the pathosystem *Leptosphaeria maculans*/oilseed rape. *L. maculans* is a hemibiotrophic ascomycete responsible for stem canker (Blackleg) of oilseed rape (*Brassica napus*) and is mainly controlled using specific R genes often combined with quantitative resistance. To date, 7 AVR genes from *L. maculans* have been cloned and all are located in repeat-rich, gene-poor genomic regions (Rouxel and Balesdent, 2017).

AvrLm1 is recognized by two R genes, Rlm1 and LepR3. The two R genes are located on different chromosomes and are thus expected to encode different R proteins, although direct evidence is missing to date since only LepR3 has been cloned (through map-based cloning; Larkan et al., 2013). AvrLm1 is located as a solo gene in the middle of a 269 kb repeat-rich region. Rlm1 resistance was deployed in the 1990s and overcome in only 3 years (Rouxel et al., 2003). The main mechanism leading to virulence toward Rlm1 was a large deletion of AvrLm1 and its surrounding region (Gout et al., 2007), supporting a limited role of AvrLm1 in fungal fitness which is cultivar-dependent (Huang et al., 2010). More recently, AvrLm1 was reported to be recognized by the R protein LepR3, a RLP (Larkan et al., 2013). LepR3 resistance was rapidly overcome in parts of Australia soon after its introduction (Sprague et al., 2006) as a consequence of the previous use of Rlm1 cultivars and the deletion of AvrLm1 in a high proportion of Australian *L. maculans* isolates (Gout et al., 2007).

AvrLm4-7 is also recognized by two R genes, namely Rlm4 and Rlm7. It is unclear whether Rlm4 and Rlm7, which are clustered in the same linkage group but not cloned, are two different genes or two alleles of the same gene (Delourme et al., 2004). In the field, Rlm4 resistance has been extensively used since the 1970s but is now largely overcome (Rouxel and Balesdent, 2017). The switch to virulence against Rlm4 was due to a single non-synonymous mutation which does not modify the overall 3-D structure of AvrLm4-7 (Blondeau et al., 2015) and does not affect recognition by Rlm7 (Parlange et al., 2009). Rlm7 resistance was deployed in 2004 and then used extensively (e.g., Rlm7 cultivars comprised 50–70% of the French oilseed crop in 2013; Balesdent et al., 2015). However, the evolution of French *L. maculans* populations toward virulence against Rlm7 was a long process (4% of virulent isolates in 2010, 19% in 2013). The first molecular events leading to virulence toward Rlm7 mainly corresponded to drastic events (deletion, accumulation of mutations) and also to three amino acid changes without major modification of protein structure (Daverdin et al., 2012; Blondeau et al., 2015). The durability of Rlm7 resistance may reflect the importance of AvrLm4-7 for fungal fitness and aggressiveness (Huang et al., 2006) but also the introduction of Rlm7 into cultivars with high levels of quantitative resistance (Balesdent et al., 2015) and the antagonistic role of AvrLm4-7 on the AvrLm3/Rlm3 interaction (see section An avirulence gene suppressing recognition of another avirulence gene below). In contrast to the AvrLm1/Rlm1–LepR3 interaction, the

TABLE 1 | Characteristics of fungal avirulence genes and plant resistance genes involved in complex interactions.

Type of interaction	Resistance (R) gene (R protein nature, plant species)	Use in the fields (durability)	Avirulence (AVR) gene (fungal species)	Interaction R/AVR	Involvement in fungal virulence	Main molecular mechanisms leading to virulence	References
AVR gene recognized by several R genes	Rlm1 (nd, Brassica napus)	In the 1990s (overcome in 3 years)	AvrLm1 (<i>L. stiposphaeria</i> maculans)	nd	Low (nutrifer dependent)	Large deletion (AvrLm1 and surrounding genomic region)	Rouxel et al., 2003; Gout et al., 2006, 2007; Sprague et al., 2006; Huang et al., 2010; Larkam et al., 2013
AVR gene recognized by several R genes	LepR3 (RLP, <i>B. napus</i>)	In 2000 in Australia (overcome in 2 years)					
AVR gene recognized by several R genes	Rlm4 (nd, <i>B. napus</i>)	Since the 1970s (1999 st)	AvrLm4-7 (<i>L. maculans</i>)	nd	High	One point mutation (no major change of the protein structure)	Huang et al., 2006; Parange et al., 2009; Diverdin et al., 2012; Balesdent et al., 2015; Blondeau et al., 2015;
AVR gene recognized by several R genes	Rlm7 (nd, <i>B. napus</i>)	Since 2005 (beginning of overcome in 2013)	AvrLm4-7 (<i>L. maculans</i>)	nd	High	Inactivating events (deletions, accumulation of mutations) three point mutations (no major change of the protein structure)	
AVR gene recognized by two "cooperating" R genes	Pik-1 and Pik-2 (NLR, <i>Oryza sativa</i>)	Serial deployment (nd)	AVR-Pik (Magnaporthe oryzae)	Direct with the HMA domain of Pik-1	nd	Point mutations at the interacting surface involved in Pik/AVR-Pik physical interaction	Yoshida et al., 2009; Kanzaki et al., 2012; Zhai et al., 2014; Maqbool et al., 2015
AVR gene recognized by two "cooperating" R genes	RG44 and RG45 (also called Pi-CO39, NLR, <i>O. sativa</i>)	nd (overcome)	AVR1-CO39 (<i>M. oryzae</i>)	Direct with the HMA domain of RG45	nd	Deletion	Faiman et al., 2002; Okuyama et al., 2011; Cesari et al., 2013; Ribot et al., 2013; de Guilen et al., 2015; Ortiz et al., 2017
AVR gene suppressing recognition of another AVR gene	RG44 and RG45 (also called Pi4, NLR, <i>O. sativa</i>)	nd (overcome)	AVR-Pi4 (<i>M. oryzae</i>)	Direct with the HMA domain of RG45	nd	Deletion/Point mutations (at the hydrophobic surface involved in interaction with RG45)	
AVR gene suppressing recognition of another AVR gene	I-2 (NLR, <i>Solanum lycopersicum</i>)	In the 1960s (efficient 20 years in combination with I)	AVR2 (<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. lycopersidium)	nd	Essential for full virulence	Suppression of I-2-mediated recognition by Avr1/Point mutations in AVR2 (maintaining effector function)	Rep et al., 2005; Houterman et al., 2008, 2009; Cazanarzi et al., 2015
AVR gene suppressing recognition of another AVR gene	I-3 (RLK, <i>S. lycopersicum</i>)	In the 1980s (nd)	AVR3 (<i>F. oxysporum</i> f.sp. lycopersidium)	nd	Essential for full virulence	Suppression of I-3-mediated recognition by Avr1	
AVR gene suppressing recognition of another AVR gene	Rlm3 (nd, <i>B. napus</i>)	nd	AvrLm3 (<i>L. maculans</i>)	nd	nd (conserved in <i>L. maculans</i> isolates)	Suppression of Rlm3-mediated recognition by AvrLm4-7	Pilsommeau et al., 2016, 2017

(Continued)

TABLE 1 | Continued

Type of interaction	Resistance (R) gene (R protein nature, plant species)	Use in the fields (durability)	Avirulence (AVR) gene (fungal species)	Interaction R/AVR	Involvement in fungal virulence	Main molecular mechanisms leading to virulence	Reference
Bipartite AVR gene recognized by one R gene	I-2 (NLK, <i>S. lycopersicum</i>)	In the 1960s (efficient 20 years in combination with I)	AVR2 (<i>F. oxysporum</i> f.sp. lycopersicium)	nd	Essential for full virulence	Point mutations in AVR2 (maintaining effector function)	Houterman et al., 2009; Ma et al., 2015
R gene recognizing several AVR genes in distinct organisms	C2 (RLP, <i>S. lycopersicum</i>)	In the 1940s (still efficient in combination with other Cf genes)	SIW5 (<i>F. oxysporum</i> f.sp. lycopersicium)	nd	Essential for full virulence	Conserved in <i>F. oxysporum</i> isolates	Ludener et al., 2002; Rooney et al., 2005; van Esse et al., 2008; Lozano-Jones et al., 2012; de Wit, 2016
			Avr2 (<i>Cladosporium fulvum</i>)	Indirect	High	Frameshift mutations	Ludener et al., 2002; Rooney et al., 2005; van Esse et al., 2008; Lozano-Jones et al., 2012; de Wit, 2016
			Cr-VAP1 (<i>Globodera rostochiensis</i>)	Indirect	Essential for infectivity		

nd, not determined; AVR, avirulence; R, resistance; NLK, Nucleotide-binding and Leucine-rich repeat Receptor; RLP, Receptor-Like Protein; RUK, Receptor-Like Kinase.
 *The late breakdown time does not reflect durability of Rlm4 since it has been used discontinuously.

AvrLm4-7/Rlm4-Rlm7 interaction illustrates that two R genes, or possibly two alleles of the same gene, targeting the same AVR gene can be deployed successively and be both durable in the field.

AVIRULENCE GENES RECOGNIZED BY TWO “COOPERATING” RESISTANCE GENES

AVR genes recognized by two distinct R genes that are both necessary for recognition were reported in the Magnaporthe oryzae/rice pathosystem. *M. oryzae*, the causal agent of rice blast, is mostly controlled using resistant rice cultivars harboring major R genes. Seven *M. oryzae* AVR genes have been cloned (Liu et al., 2013). Interestingly, four of those AVR genes (AVR-Pik, AVR-Pi, AVR1-CO39, and AVR-Pia) are involved in complex interactions, in that two “cooperating” R genes are necessary to recognize each AVR (respectively Pik-1/Pik-2, Pi-1/Pi-2, and RGA4/RGA5; Okuyama et al., 2011; Kanzaki et al., 2012; Cesari et al., 2013; Takagi et al., 2013).

Okuyama et al. (2011) showed that AVR-Pia is recognized by two head-to-head R genes, RGA4 and RGA5, both being required for resistance. These R genes also recognize another *M. oryzae* AVR gene, AVR1-CO39 (Cesari et al., 2013). In this pair of R proteins, RGA4 acts as constitutively active disease resistance and cell death inducer and is repressed by RGA5 in absence of the pathogen. Direct binding of AVR-Pia or AVR1-CO39 to RGA5 leads to RGA4 de-repression and activation of immune signal transduction (Cesari et al., 2014b). Effector binding to RGA5 occurs in a non-canonical C-terminal domain of RGA5 (called the RATX1/HMA domain) resembling a heavy metal-associated (HMA) domain protein from *Saccharomyces cerevisiae*, thought to function as an integrated decoy domain (Cesari et al., 2013, 2014b; Kroj et al., 2016). The Pik locus is also composed of two head-to-head genes separated by a non-coding intergenic region and a HMA domain is present in Pik-1, in this case between the CC and NB domains (Yoshida et al., 2009; Kanzaki et al., 2012). A physical interaction has been demonstrated between AVR-Pik and the HMA domain of Pik-1 (Zhai et al., 2014). Both AVR-Pik and the HMA domain of Pik-1 exhibit amino acid polymorphisms between pathogen isolates and rice cultivars (Yoshida et al., 2009; Kanzaki et al., 2012), located at the interface between Pik-1 and AVR-Pik, mediating their physical interaction and recognition (Maqbool et al., 2015). In *M. oryzae* isolate collections, most are virulent toward Pia and Pi-CO39 and have lost AVR-Pia and AVR1-CO39 (Farman et al., 2002; Cesari et al., 2013). Three isolates virulent toward Pia were found to carry an AVR-Pia allele with a SNP leading to a non-synonymous substitution, which abolishes interaction with RGA5 and subsequent recognition (Cesari et al., 2013). Recently, Ortiz et al. (2017) found that binding of AVR-Pia to the RATX1 domain of RGA5 involved hydrophobic interactions and that AVR-Pia also interacted with other, as yet undefined, regions of RGA5, increasing the overall effector binding affinity of RGA5 and allowing AVR-Pia recognition and plant defense induction despite the accumulation of point mutations in Avr-Pia and moderate affinity to RATX1. This work highlights the advantage

of integrating the decoy domain into the NLR, instead of having the decoy as an independent molecule. Indeed, even if physical interactions between R and AVR proteins favor diversification at the interfacing surfaces, the high resilience of RGA4/RGA5-mediated AVR-Pla recognition to reduction of AVR-Pla-RATX1 interaction strength limits the pathogen's ability to circumvent host recognition. The next step forward would be to fuse other effector targets to NLRs as integrated domains to test whether this can confer increased recognition specificity. These effector targets could themselves be engineered in order to be targeted by a larger panel of effectors and pathogens, such as PBS1 from *A. thaliana*, which cleavage by the bacterial protease AvrPphB is detected by the R protein RPS5, and in which substitution of AvrPphB cleavage site with cleavage sites from other effector proteases extended the recognition specificity of RPS5 to other pathogens (Kim et al., 2016).

AN AVIRULENCE GENE SUPPRESSING RECOGNITION OF ANOTHER AVIRULENCE GENE

Among the proposed roles of pathogen effectors is the suppression of ETI in order to circumvent plant defenses (Jones and Dangl, 2006). In some cases, an effector, which suppresses the AVR activity of another effector, can itself be recognized by an R gene, thus allowing mechanistic-based strategies to genetically control plant diseases. Two such cases of AVR genes hiding another AVR gene have been reported in *L. maculans* and *F. oxysporum*.

L. maculans avirulence gene AvrLm3 is recognized by Rlm3. This recognition is suppressed in presence of AvrLm4-7 which is itself recognized by Rlm4 and Rlm7. Indeed, silencing of AvrLm4-7 in an isolate virulent toward Rlm3 allowed recognition by Rlm3, and the complementation of an isolate avirulent toward Rlm3 with AvrLm4-7 conferred virulence on Rlm3 cultivars (Plissonneau et al., 2016), confirming the ability of AvrLm4-7 to suppress AvrLm3/Rlm3-mediated resistance and the presence of AvrLm3 in *L. maculans* populations. AvrLm3 was recently identified and is located in a telomeric region of the *L. maculans* genome (Plissonneau et al., 2016). The conservation of AvrLm3 despite its telomeric location suggests an involvement of AvrLm3 in fungal fitness (Plissonneau et al., 2017). It seems that the main mechanism to acquire virulence toward Rlm3 was not the deletion of AvrLm3 but rather the production of an effector, AvrLm4-7, that conceals AvrLm3.

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* (Fol) is a common soil fungus infecting tomato. Several Fol AVR genes were identified, including AVR1 (recognized by R genes I and I-1), AVR2 (recognized by I-2) and AVR3 (recognized by I-3; Rep et al., 2005; Houterman et al., 2008, 2009). AVR1 is involved in the suppression of I-3 and I-2-mediated recognition of AVR3 and AVR2 respectively. Deletion of AVR1 in an isolate virulent toward I-2 and I-3 allowed recognition by I-3 and I-2 plants, and the complementation of isolates avirulent toward I-3 or I-2 with AVR1 conferred virulence on I-3 and I-2 tomato plants. AVR3 and AVR2 were shown to be essential for full virulence of Fol

on tomato. In agreement, AVR3 and AVR2 are never deleted in Fol isolates, and no SNP preventing recognition by I-3 has been identified, while three SNPs preventing recognition by I-2 without altering virulence of the corresponding isolates were reported (Lievens et al., 2009). In contrast, AVR1 has no major effect on Fol virulence, suggesting that its role is mainly restricted to suppressing I-2 and I-3-mediated recognition (Houterman et al., 2008).

Such interactions offer great opportunities for the genetic control of plant diseases. In tomato, the combination of I-1 and I-2/I-3 may lead to a durable resistance toward Fol, since one R gene will be effective against an AVR gene important for fungal virulence (AVR3 or AVR2) and another against the suppressor of I-3/I-2-mediated resistance. The combination of Rlm7 and Rlm3 against *L. maculans* could also lead to the emergence of isolates virulent toward both resistances. Alternating two resistances in the field combined with a surveillance of Fol and *L. maculans* populations would allow counter-selection of virulent isolates.

A BIPARTITE AVIRULENCE GENE NECESSARY FOR RECOGNITION BY ONE RESISTANCE GENE

So far, only a single case of bipartite AVR gene/R gene interaction has been reported. In Fol, AVR2, which triggers I-2-mediated recognition and is required for full virulence on susceptible tomato (Houterman et al., 2009), shares its promoter region with SIX5, which also encodes a protein secreted in tomato xylem sap. Ma et al. (2015) recently reported that SIX5 is also required to trigger I-2-mediated recognition. Thus, deletion of SIX5 allows Fol to escape I-2-mediated resistance, while reintroduction of SIX5 restores avirulence toward I-2, showing that AVR2 and SIX5 are both necessary to induce I-2-mediated resistance. Avr2 and Six5 physically interact, suggesting that I-2 recognizes the Avr2/Six5 complex. Similar to AVR2, SIX5 is also present in all Fol isolates, and is required for full virulence on tomato (Ma et al., 2015). It is unlikely that specific resistances involved in such bipartite AVR gene/R gene interactions are more durable, since deletion or point mutation of only one of the AVR genes is sufficient to escape recognition by the corresponding R gene. Indeed, while no polymorphism was observed in the SIX5 sequence of isolates virulent toward I-2, three point mutations causing single amino acid changes were observed in AVR2, allowing Fol strains to escape I-2-mediated recognition without altering virulence.

RESISTANCE GENES RECOGNIZING SEVERAL AVIRULENCE GENES IN DISTINCT ORGANISMS

It has been hypothesized that pathogen effectors target a common set of plant proteins and that plants have evolved

surveillance systems to recognize multiple AVR genes sharing the same plant target (Mukhtar et al., 2011). Several R genes able to recognize distinct pathogens have been reported, which potentially decreases the need for chemical interventions and opens the path to broad-spectrum disease control. A notable example is Cf2 from tomato, which confers resistance to both the fungal pathogen *Cladosporium fulvum* and the nematode *Globodera rostochiensis* (Rooney et al., 2005; Lozano-Torres et al., 2012).

Several apoplastic effectors of oomycetes, fungi, bacteria and nematodes were reported to target papain-like cysteine proteases (PLCP; Kaschani et al., 2010; Lozano-Torres et al., 2012). Avr2, from the tomato leaf mold agent *C. fulvum*, targets the tomato PLCP Rcr3 and inhibits its activity. Its effector activity on Rcr3 is indirectly recognized by the tomato R gene Cf2, according to the guard model (Rooney et al., 2005). Cys protease activity profiling showed that Avr2 inhibited multiple extracellular Cys proteases, including Rcr3 and its close relative Pip1, and it was proposed by van der Hoorn and Kamoun (2008) that Pip1 was the operative target of Avr2 and Rcr3 acted as a decoy. Silencing of Avr2 significantly decreased *C. fulvum* virulence on tomato (van Esse et al., 2008). Interestingly, Rcr3 is also targeted by effectors from other pathogens. For example, an effector of the nematode *G. rostochiensis*, Gr-VAP1, physically interacts with Rcr3 and triggers a Cf2-dependent hypersensitive response in tomato (Lozano-Torres et al., 2012). Broad-spectrum resistances exert a strong selection pressure on pathogen populations, potentially leading to them being rapidly overcome. Indeed, even though Avr2 was demonstrated to be important for virulence, isolates of *C. fulvum* virulent toward Cf2 were rapidly reported (Luderer et al., 2002). However, Cf2 is still effective as a result of pyramiding with other specific R genes in tomato crops (de Wit, 2016).

CONCLUDING REMARKS

While complex interactions between bacterial AVR genes and plant R genes have been previously discovered and well-studied

(Cui et al., 2009; Khan et al., 2016), the characterization of plant/fungal interactions are emerging and show some similarities (cooperating R genes, R genes recognizing distinct pathogens, AVR gene suppressing recognition of another AVR gene) but also specificities (bipartite AVR gene). Among the R genes displaying complex interaction with AVR genes, some of the most promising are those conferring broad-spectrum resistances since they guard key components of plant immunity and, as such, target essential effectors. Even if they exert a strong selection pressure on pathogen populations, they may remain effective through pyramiding with other specific or quantitative R genes. Another promising strategy to manage durable resistances would be to target antagonistic interactions between AVR genes and to combine the corresponding R genes in the same cultivars through pyramiding or to sequentially use the R genes in rotation. Although antagonistic interactions between AVR genes have only been reported twice in plant-fungi pathosystems, they are probably more widely distributed than suspected. Indeed, in cereal powdery mildews it has been suggested that pairs of AVR genes and suppressors of AVR gene recognition could form the basis of specificity (Bourras et al., 2015, 2016).

AUTHORS CONTRIBUTIONS

Both authors reviewed literature, contributed to writing the manuscript, and approved it for publication.

FUNDING

YP was funded by a Young Scientist Funding by INRA. This work was supported by ANR (Structural LEP project; ANR-14-CE19-0019).

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Richard O'Connell (UMR Bioger, INRA, Grignon) for critical review and polishing of the manuscript.

REFERENCES

- Balesdent, M.-H., Plissonneau, C., Coudard, L., Daverdin, G., Le Meur, L., Carpezzat, J., et al. (2015). Résistance du colza au phoma: où en est l'efficacité de Rim7? *Phytoma* 684, 20–24.
- Blondeau, K., Blaise, F., Graille, M., Kale, S. D., Linglin, J., Ollivier, B., et al. (2015). Crystal structure of the effector AvrLm4-7 of *Leptospheria maculans* reveals insights into its translocation into plant cells and recognition by resistance proteins. *Plant J* 83, 610–624. doi: 10.1111/tpj.12913
- Bourras, S., McNally, K. E., Ben-David, R., Parlange, F., Roffler, S., Praz, C. R., et al. (2015). Multiple avirulence loci and allele-specific effector recognition control the Pm3 race-specific resistance of wheat to powdery mildew. *Plant Cell* 27, 2991–3012. doi: 10.1105/tpc.15.00171
- Bourras, S., McNally, K. E., Müller, M. C., Wicker, T., and Keller, B. (2016). Avirulence genes in cereal powdery mildews: the gene-for-gene hypothesis 2.0. *Front. Plant Sci.* 7:241. doi: 10.3389/fpls.2016.00241
- Catanzani, A. M., Dodds, P. N., Ve, T., Kobe, B., Ellis, J. G., and Staskawicz, B. J. (2010). The AvrM effector from flax rust has a structured C-terminal domain and interacts directly with the M resistance protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 49–57. doi: 10.1094/MPMI-23-1-0049
- Catanzani, A. M., Lim, G. T., and Jones, D. A. (2015). The tomato I-3 gene: a novel gene for resistance to Fusarium wilt disease. *New Phytol.* 207, 106–118. doi: 10.1111/nph.13348
- Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T., and Dodds, P. (2014a). A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs the “integrated decoy” hypothesis. *Front. Plant Sci.* 5:606. doi: 10.3389/fpls.2014.00606
- Cesari, S., Kanzaki, H., Fujiwara, T., Bernoux, M., Chalvon, V., Kawano, Y., et al. (2014b). The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *EMBO J* 33, 1941–1959. doi: 10.15252/embj.201487923
- Cesari, S., Thilliez, G., Ribot, C., Chalvon, V., Michel, C., Jauneau, A., et al. (2013). The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the Magnaporthe oryzae effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. *Plant Cell* 25, 1463–1481. doi: 10.1105/tpc.112.107201
- Cui, H., Xiang, T., and Zhou, J. M. (2009). Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. *Cell. Microbiol.* 11, 1453–1461. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01359.x

- Dangl, J. L., and Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833. doi: 10.1038/35081161
- Daverdin, G., Rouxel, T., Gout, L., Aubertot, J. N., Fudal, I., Meyer, M., et al. (2012). Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *PLoS Pathog.* 8:e1003020. doi: 10.1371/journal.ppat.1003020
- de Guillen, K., Ortiz-Vallejo, D., Gracy, J., Fournier, E., Kroj, T., and Padilla, A. (2015). Structure analysis uncovers a highly diverse but structurally conserved effector family in phytopathogenic fungi. *PLoS Pathog.* 11:e1005228. doi: 10.1371/journal.ppat.1005228
- Delourme, R., Pilet-Nayel, M. L., Archipiano, M., Horvais, R., Tanguy, X., Rouxel, T., et al. (2004). A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Phytopathology* 94, 578–583. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.6.578
- de Wit, P. J. G. M. (2016). *Cladoporium fulvum* effectors: weapons in the arms race with tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* 4, 1–23. doi: 10.1146/annurev-phyto-011516-040249
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., The, T., Wang, C. I., Ayliffe, M. A., et al. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8888–8893. doi: 10.1073/pnas.0602577103
- Farman, M. L., Eto, Y., Nakao, T., Tosa, Y., Nakayashiki, H., Mayama, S., et al. (2002). Analysis of the structure of the AVR1-CO39 avirulence locus in virulent rice-infecting isolates of *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 6–16. doi: 10.1094/MPMI.2002.15.1.6
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., et al. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186–194. doi: 10.1038/nature10947
- Gout, L., Fudal, I., Kuhn, M. L., Blaise, F., Eckert, M., Cattolico, L., et al. (2006). Lost in the middle of nowhere: the AvrLm1 avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Microbiol.* 60, 67–80. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05076.x
- Gout, L., Kuhn, M. L., Vincenot, L., Bernard-Samain, S., Cattolico, L., Barbetti, M., et al. (2007). Genome structure impacts molecular evolution at the AvrLm1 avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environ. Microbiol.* 9, 2978–2992. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01408.x
- Guttman, D. S., McHardy, A. C., and Schulze-Lefert, P. (2014). Microbial genome-enabled insights into plant-microorganism interactions. *Nat. Rev. Genet.* 15, 797–813. doi: 10.1038/nrg3748
- Houterman, P. M., Cornelissen, B. J., and Rep, M. (2006). Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathog.* 4:e1000061. doi: 10.1371/journal.ppat.1000061
- Houterman, P. M., Ma, L., van Ooijen, G., de Vroomen, M. J., Cornelissen, B. J., Takken, F. L. W., et al. (2009). The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J.* 58, 970–978. doi: 10.1111/j.1365-3113.2009.03838.x
- Huang, Y.-J., Balesdent, M.-H., Li, Z.-Q., Evans, N., Rouxel, T., and Fitt, B. D. L. (2010). Fitness cost of virulence differs between the AvrLm1 and AvrLm4 loci in *Leptosphaeria maculans* (Phoma stem canker of oilseed rape). *Eur. J. Plant Pathol.* 126, 279–291. doi: 10.1007/s10658-009-9539-7
- Huang, Y. J., Li, Z. Q., Evans, N., Rouxel, T., Fitt, B. D. L., and Balesdent, M.-H. (2006). Fitness cost associated with loss of the AvrLm4 avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 77–89. doi: 10.1007/s10658-005-2643-4
- Ja, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19, 4004–4014. doi: 10.1093/emboj/19.15.4004
- Jones, J. D., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. doi: 10.1038/nature05286
- Kanzaki, H., Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisaki, K., Hirabuchi, A., Alaux, L., et al. (2012). Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions. *Plant J.* 72, 894–907. doi: 10.1111/j.1365-3113.2012.05110.x
- Kaschani, F., Shabab, M., Bozkurt, T., Shindo, T., Schornack, S., Gu, C., et al. (2010). An effector-targeted protease contributes to defense against *Phytophthora infestans* and is under diversifying selection in natural hosts. *Plant Physiol.* 154, 1794–1804. doi: 10.1104/pp.110.158030
- Keen, N. T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24, 447–463. doi: 10.1146/annurev.gs.24.120190.002311
- Khan, M., Subramaniam, R., and Desveaux, D. (2016). Of guards, decoys, baits and traps: pathogen perception in plants by type III effector sensors. *Curr. Opin. Microbiol.* 29, 49–55. doi: 10.1016/j.mib.2015.10.006
- Kim, S. H., Qi, D., Ashfield, T., Helm, M., and Innes, R. W. (2016). Using decoy to expand the recognition specificity of a plant disease resistance protein. *Science* 351, 684–687. doi: 10.1126/science.124336
- Kroj, T., Chandud, E., Michel-Romiti, C., Grand, X., and Morel, J. B. (2016). Integration of decoy domains derived from protein targets of pathogen effectors into plant immune receptors is widespread. *New Phytol.* 210, 318–326. doi: 10.1111/nph.13869
- Larkan, N. J., Lydiate, D. J., Parkin, I. A., Nelson, M. N., Epp, D. J., Cowling, W. A., et al. (2013). The *Brassica napus* blackleg resistance gene LepR3 encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm1. *New Phytol.* 197, 595–605. doi: 10.1111/nph.12043
- Le Roux, C., Jauneau, A., Camborde, L., Trémouyagou, D., Kraut, A., Zhou, B., et al. (2015). A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell* 161, 1074–1088. doi: 10.1016/j.cell.2015.04.025
- Lievens, B., Houterman, P. M., and Rep, M. (2009). Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lyopersi* races and discrimination from other formae speciales. *FEMS Microbiol. Lett.* 300, 201–215. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01783.x
- Liu, W., Liu, J., Ning, Y., Ding, B., Wang, X., Wang, Z., et al. (2013). Recent progress in understanding PAMP- and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant* 6, 605–620. doi: 10.1093/mp/st015
- Lozano-Torres, J. L., Wilbers, R. H. P., Gawronski, P., Boshoven, J. C., Finkers-Tomczak, A., Cordavener, J. H., et al. (2012). Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 10119–10124. doi: 10.1073/pnas.1202867109
- Luderer, R., Takken, F. L., de Wit, P. J., and Josten, M. H. (2002). *Cladoporium fulvum* overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins. *Mol. Microbiol.* 45, 875–884. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03060.x
- Ma, L., Houterman, P. M., Gawełns, F., Cao, L., Sillo, F., Richter, H., et al. (2015). The AVR2-SIX5 gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato. *New Phytol.* 208, 507–518. doi: 10.1111/nph.13455
- Maqbool, A., Saitoh, H., Franceschetti, M., Stevenson, C. E., Uemura, A., Kanzaki, H., et al. (2015). Structural basis of pathogen recognition by an integrated HMA domain in a plant NLR immune receptor. *Elife* 4:e08709. doi: 10.7554/eLife.08709
- Mukhtar, M. S., Carvunis, A.-R., Dreze, M., Epple, P., Steinbröner, J., Moore, J., et al. (2011). Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science* 333, 596–601. doi: 10.1126/science.1203659
- Okuyama, Y., Kanzaki, H., Abe, A., Yoshida, K., Tamiru, M., Saitoh, H., et al. (2011). A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *Plant J.* 66, 467–479. doi: 10.1111/j.1365-3113.2011.04502.x
- Oliva, R., Win, J., Raffaele, S., Boutemy, L., Bozkurt, T. O., et al. (2010). Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell. Microbiol.* 12, 705–715. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01471.x
- Ortiz, D., Guillen, K. D., Cesari, S., Chalvon, V., Gracy, J., Padilla, A., et al. (2017). Recognition of the *Magnaporthe oryzae* effector AVR-Pia by the decoy domain of the rice NLR immune receptor RGA5. *Plant Cell* 29, 156–168. doi: 10.1105/tpc.16.00435
- Parlanga, F., Daverdin, G., Fudal, I., Kuhn, M. L., Balesdent, M. H., Blaise, F., et al. (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. *Mol. Microbiol.* 71, 851–863. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06547.x
- Pissonneau, C., Blaise, F., Ollivier, B., Leflon, M., Carpezet, J., Rouxel, T., et al. (2017). Unusual evolutionary mechanisms to escape

- effector-triggered-immunity in the fungal phytopathogen *Leptosphaeria maculans* *Mol. Ecol.* 26, 2183–2198. doi: 10.1111/mec.14046
- Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I., et al. (2016). A game of hide and seek between avirulence genes AvrLm4-7 and AvrLm3 in *Leptosphaeria maculans* *New Phytol.* 209, 1613–1624. doi: 10.1111/nph.13736
- Rep, M., Meijer, M., Houterman, P. M., van der Does, H. C., and Cornelissen, B. J. (2005). *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 15–23. doi: 10.1094/MPMI-18-0015
- Ribot, C., Césari, S., Abidi, I., Chalvon, V., Bournaud, C., Vallet, J., et al. (2013). The *Magnaporthe oryzae* effector AVR1-CO39 is translocated into rice cells independently of a fungal-derived machinery. *Plant J.* 74, 1–12. doi: 10.1111/tpj.12099
- Rooney, H. C., van't Klooster, J. W., van der Hoorn, R. A., Josten, M. H., Jones, J. D., and de Wit, P. J. (2005). *Cladosporium Avr2* inhibits tomato Rtr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* 308, 1783–1786. doi: 10.1126/science.1111404
- Rouxel, T., and Balesdent, M. H. (2017). Life, death and rebirth of avirulence effectors in a fungal pathogen of Brassica crops, *Leptosphaeria maculans* *New Phytol.* 214, 526–532. doi: 10.1111/nph.14411
- Rouxel, T., Penaud, A., Pinochet, X., Brun, H., Gout, L., Delourme, R., et al. (2003). A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation toward the Rlm1 resistance gene of oilseed rape. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 871–881. doi: 10.1023/A:1026189225466
- Sarris, P. F., Duxbury, Z., Ma, Y., Segonzac, C., Sklenar, J., Derbyshire, P., et al. (2015). A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. *Cell* 161, 1089–1100. doi: 10.1016/j.cell.2015.04.024
- Sprague, S. J., Marcroft, S. J., Hayden, H. L., and Howlett, B. J. (2006). Major gene resistance to blackleg in *Brassica napus* overcome within three years of commercial production in Southeastern Australia. *Plant Dis.* 90, 190–198. doi: 10.1094/PD-90-0190
- Steinbrenner, A. D., Goritschnig, S., and Staskawicz, B. J. (2015). Recognition and activation domains contribute to allele-specific responses of an *Arabidopsis* NLR receptor to a oomycete effector protein. *PLoS Pathog.* 11:e1004665. doi: 10.1371/journal.ppat.1004665
- Takagi, H., Uemura, A., Yaegashi, H., Tamiru, M., Abe, A., Mitsuoka, C., et al. (2013). MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F2 progeny bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene Pii. *New Phytol.* 200, 276–283. doi: 10.1111/nph.12369
- Takken, F. L., and Goverse, A. (2012). How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 375–384. doi: 10.1016/j.pbi.2012.05.001
- van der Hoorn, R. A., and Kamoun, S. (2008). From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* 20, 2009–2017. doi: 10.1105/tpc.108.060194
- van Esse, H. P., van't Klooster, J. W., Bolton, M. D., Yadeta, K. A., van Baarlen, P., Boeren, S., et al. (2008). The *Cladosporium fulvum* virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense. *Plant Cell* 20, 1948–1963. doi: 10.1105/tpc.108.059394
- Yang, X., Deng, F., and Ramonell, K. M. (2012). Receptor-like kinases and receptor-like proteins key to pathogen recognition and defense signaling in plant innate immunity. *Front. Biol.* 7, 155–166. doi: 10.1007/s11515-011-1185-8
- Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., et al. (2009). Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* 21, 1573–1591. doi: 10.1105/tpc.109.066324
- Zhai, C., Zhang, Y., Yao, N., Lin, F., Liu, Z., Dong, Z., et al. (2014). Function and interaction of the coupled genes responsible for Plk-h encoded rice blast resistance. *PLoS ONE* 9:e98067. doi: 10.1371/journal.pone.0098067

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Petit-Houdenot and Fudal. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Chapitre I :

AvrLm10

Le moyen de lutte le plus efficace contre le phoma du colza est la lutte génétique, c'est-à-dire l'utilisation de cultivars de colza exprimant une résistance quantitative et/ou qualitative contre *L. maculans*. A ce jour 11 interactions génétiques ont été identifiées entre des gènes d'avirulence de *L. maculans* et les gènes de résistance correspondants de *B. napus* (Rouxel et Balesdent, 2017) et 7 gènes d'avirulence de *L. maculans* ont été clonés (*AvrLm1*, *AvrLm2*, *AvrLm3*, *AvrLm4-7*, *AvrLm6*, *AvrLm11* et *AvrLmJ1*; Gout *et al.*, 2006; Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009; Balesdent *et al.*, 2013; Van de Wouw *et al.*, 2014; Ghanbarnia *et al.*, 2015; Plissonneau *et al.*, 2017). Le clonage de ces 7 gènes a permis de définir des caractéristiques communes aux gènes d'avirulence de *L. maculans* : (i) ils codent des petites protéines sécrétées n'ayant pas ou peu d'homologies avec des protéines connues ; (ii) ils sont localisés dans des régions génomiques riches en éléments répétés (isochores AT : Rouxel *et al.*, 2011) et sont très exprimés durant les phases précoces de l'infection ; (iii) ils échappent à la reconnaissance par leur gène de résistance correspondant par des mécanismes variés incluant des délétions complètes ou partielles des régions génomiques dans lesquels ils sont localisés, des inactivations par le mécanisme de RIP ou des mutations ponctuelles n'entraînant pas de perte de fonction de la protéine (Rouxel et Balesdent, 2017).

Le colza est un hybride interspécifique entre *B. rapa* et *B. oleracea*, deux espèces proches phylogénétiquement dont les génomes diploïdes se sont hybridés pour former le génome allotétraploïde de *B. napus* (U, 1935). Le colza possède donc des caractéristiques génomiques héritées de ses deux espèces parentales, y compris des gènes de résistance. Ainsi, les gènes de résistance *Rlm1*, *Rlm4* et *Rlm7* sont également présents chez *B. rapa* et semblent provenir de cette espèce (Leflon *et al.*, 2007). Les résistances qualitatives du colza étant rares et souvent rapidement contournées, d'autres gènes de résistance contre *L. maculans* sont fréquemment recherchés chez les espèces parentales. On peut citer le gène *Rlm11* de *B. oleracea*, qui reconnaît le gène d'avirulence *AvrLm11* (qui présente la particularité d'être localisé sur un

chromosome dispensable ; Balesdent *et al.*, 2013), ou encore les gènes *Rlm8* de *B. rapa* et *RlmMex* de *B. oleracea*, qui reconnaissent tous deux le gène d'avirulence *AvrLmMex* (Degrave, Rouxel et Balesdent, comm. pers.). Mais des sources de résistance sont également disponibles chez d'autres plantes du genre *Brassica*, comme les gènes *Rlm5* et *Rlm6* de *B. juncea* (Balesdent *et al.*, 2002). Enfin, une potentielle source de résistance a été identifiée chez *B. nigra*. Cette résistance semble être conférée par un seul gène, *Rlm10*, contre lequel peu d'isolats virulents ont été identifiés à ce jour (Chevre *et al.*, 1996; Kutcher *et al.*, 2010). La région génomique comprenant ce gène a été introgressée dans des cultivars de *B. napus*, et ces cultivars ont été mis au champ durant 2 saisons culturales à 6 localisations différentes en France afin de forcer l'apparition de souches virulentes et ainsi identifier par clonage positionnel le gène d'avirulence correspondant à *Rlm10* (Projet ANR AvirLep 2008-2011).

Avant mon arrivée, l'équipe avait initié l'identification et le clonage du gène d'avirulence *AvrLm10* de *L. maculans* reconnu par le gène de résistance *Rlm10*. Grâce à un clonage positionnel classique, *AvrLm10* a été cartographié dans une région sub-télomérique comprenant un isochore AT. Deux gènes, en orientation inverse, séparés par une région intergénique de 7,6 kb, exprimés pendant l'infection primaire et codant des petites protéines sécrétées avaient été prédits dans cet isochore AT. Ces gènes présentant les mêmes caractéristiques que les gènes d'avirulence déjà clonés chez *L. maculans*, ils constituaient de bons candidats pour *AvrLm10* et ont été renommés *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2*.

Afin de déterminer lequel de ces deux gènes est reconnu par *Rlm10*, des expériences de complémentation fonctionnelle et de « silencing » avaient été réalisées. De manière intéressante, une souche virulente vis-à-vis de *Rlm10*, complémentée avec un seul de ces gènes est toujours capable d'infecter un cultivar possédant *Rlm10*. Seule la complémentation avec les deux gènes et leur région intergénique permet d'induire une reconnaissance par *Rlm10*. De même, le « silencing » d'un seul de ces gènes est suffisant pour échapper à cette reconnaissance.

L'ensemble de ces résultats a permis de conclure qu'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* étaient tous les deux nécessaires pour induire la reconnaissance par *Rlm10*. Plusieurs hypothèses peuvent permettre d'expliquer ce résultat : (i) *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* interagissent physiquement et / ou (ii) ces deux effecteurs possèdent une cible végétale commune. C'est dans ce contexte que je me suis attelé à la caractérisation fonctionnelle d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* et à l'élucidation de leur possible interaction physique. Les informations concernant l'identification, le clonage et la validation fonctionnelle d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* ainsi que l'élucidation de leur interaction physique sont présentés sous la forme d'un article de recherche en révision pour le journal *New Phytologist* (Article 2). Dans le reste du chapitre seront présentés d'autres résultats d'analyse fonctionnelle que j'ai obtenus au cours de ma thèse. Dans un premier temps, j'ai recherché les cibles végétales d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2*, les compartiments cellulaires ciblés par *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* (en les exprimant avec leurs peptides signaux d'adressage extracellulaire ou en les exprimant dans une plante plus proche de leur plante hôte) et les processus cellulaires ciblés par ces effecteurs (via des tests de suppression de la mort cellulaire dans le tabac). J'ai également cherché à déterminer quels événements moléculaires permettaient d'échapper à la reconnaissance par *Rlm10*. Enfin, comme des orthologues d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* avaient été trouvés dans des génomes d'autres champignons phytopathogènes, j'ai également cherché à savoir si des paralogues pouvaient être présents dans le génome de *L. maculans*.

A two genes – for – one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*

Authors

Yohann Petit-Houdenot*¹, Alexandre Degrave*¹, Michel Meyer¹, Françoise Blaise¹, Bénédicte Ollivier¹, Claire-Line Marais¹, Alain Jauneau², Corinne Audran³, Susana Rivas³, Hortense Brun⁴, Thierry Rouxel¹, Isabelle Fudal^{1§}, Marie-Hélène Balesdent^{§1}

¹UMR BIOGER, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Avenue Lucien Brétignières, BP 01, F-78850 Thiverval-Grignon, France.

²Fédération de Recherche 3450, Plateforme Imagerie, Pôle de Biotechnologie Végétale, Castanet-Tolosan, France.

³LIPM, Université de Toulouse, INRA, CNRS, Castanet-Tolosan, France.

⁴INRA, UMR1349 IGEPP, Le Rheu, France.

*** Both authors contributed equally to the work.**

§ Corresponding authors:

Isabelle Fudal

Phone number: +33-1 30 81 45 93

Email: isabelle.fudal@inra.fr

Marie-Hélène Balesdent

Phone number: +33-1 30 81 45 73

Email: marie-helene.balesdent@inra.fr

Word count:

Introduction: 1035

Material and Methods: 1454

Results: 1809

Discussion: 1872

Acknowledgements: 83

Total: 6253

Summary

- Interactions between *Leptosphaeria maculans*, causal agent of stem canker of oilseed rape, and its Brassica hosts are models of choice to explore the multiplicity of “gene-for-gene” complementarities and how they diversified to increased complexity in the course of plant-pathogen co-evolution. Here, we confirm this postulate by investigating the *AvrLm10* avirulence that induces a resistance response when recognized by the *Brassica nigra* resistance gene *Rlm10*.
- Using genome-based map-based cloning, we identified and cloned two *AvrLm10* candidates as two head-to-head genes located in a sub-telomeric repeat-rich region of the genome. The *AvrLm10* genes encode small secreted proteins and show expression profiles *in planta* similar to those of all *L. maculans* avirulence genes identified so far.
- Complementation and silencing assays indicated that both genes are necessary to trigger *Rlm10* resistance. Y2H, BiFC and FRET-FLIM assays showed that the two *AvrLm10* proteins physically interact *in vitro* and *in planta*.
- Some avirulence genes are recognized by two distinct resistance genes and some avirulence genes hide the recognition specificities of another. Our *L. maculans* model illustrates an additional case where two head-to-head genes are necessary to induce resistance. Interestingly, recognizable orthologues exist for both genes in other phytopathogenic species, with a similar genome organization, which may point to an important conserved effector function linked to heterodimerization of the two proteins.

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

Introduction

Fungi are the most devastating pathogens of plants, including crops of major economic importance (Fisher *et al.*, 2012). Genetic control is widely used to cope with fungal disease and it mainly relies on the use of major resistance genes. Major resistance genes obey the gene-for-gene interaction model that states that for each gene controlling resistance in the host there is a corresponding gene controlling avirulence in the pathogen (Flor, 1971). Pathogen avirulence genes can be recognized directly or indirectly by plant resistance genes triggering a set of defense responses termed Effector-triggered immunity (ETI) and frequently leading to an hypersensitive response (HR; Jones and Dangl, 2006). Since single-gene resistances exert a selection pressure on a single gene of the pathogen, they are easily defeated by pathogen species with a high adaptive potential (Rouxel and Balesdent, 2017). Virulence can be acquired through loss or mutation(s) of avirulence genes, leading to a compatible interaction and disease development. Molecular plant-microbe interactions are thus subjected to an “arms race” between plants and pathogens (Anderson *et al.*, 2010). The ever-growing number of avirulence genes cloned in filamentous fungi infecting agronomically important crops indicates that, even if the canonical gene-for-gene model is still the rule, more and more non-conventional gene-for-gene relationships exist (Bourras *et al.*, 2016). Examples of variations in the canonical model include cases where an avirulence gene is recognized by several resistance genes, a resistance gene recognizes avirulence genes from distinct organisms or an avirulence gene hides another avirulence gene (Petit-Houdenot and Fudal, 2017). These non-conventional relationships may have consequences on the molecular mechanisms leading to avirulence switch to virulence and, consequently, on resistance gene management. While ability of avirulence genes to hide another avirulence gene could be explained by long co-evolution of pathogens

with their host plant, cases of avirulence genes recognized by several resistance genes may be explained by the way that agronomic crops were obtained (e.g. through interspecific hybridization) and improved (through introgression of resistance genes from wild related species into cultivated crops).

The Dothideomycete *Leptosphaeria maculans* is the causal agent of stem canker disease of oilseed rape (*Brassica napus*). The most efficient way to control this disease is genetic control combining qualitative and quantitative resistance of the host plant (Brun *et al.*, 2010). To date, eleven relationships between avirulence genes from *L. maculans* (*AvrLm*) and major resistance genes (*Rlm*) from *Brassica* species have been genetically identified (Rouxel and Balesdent, 2017). *B. napus* is a natural interspecific hybrid which belongs to a group of genetically linked *Brassica* species. *Brassica nigra* (black mustard – BB genome), *B. rapa* (AA genome) and *B. oleracea* (CC genome) are three diploid species who hybridized one another to form the three allotetraploid species *B. napus* (AACC), *Brassica juncea* (AABB) and *Brassica carinata* (BBCC) (U, 1935). While available sources of resistance are sparse in modern *B. napus* cultivars, which are famed to have a narrow genetic basis, resistance sources are available in those closely related plant species and are resources of choice to introgress novel resistances in *B. napus*. Indeed some resistance genes of *B. napus* such as *Rlm1*, *Rlm4* and *Rlm7* are present also in *B. rapa* and likely originate from this progenitor (Leflon *et al.*, 2007). Other *Rlm* genes not yet used in *B. napus* encompass *Rlm11* from *B. rapa*, which recognizes the avirulence gene *AvrLm11* of *L. maculans*, localized on a dispensable chromosome of the fungus (Balesdent *et al.*, 2013), or *Rlm5* and *Rlm6* from *B. juncea* (Balesdent *et al.*, 2002). *Rlm6* is already introgressed in some oilseed rape genotypes, but this resistance source has not been exploited commercially yet (Chèvre *et al.*, 2008). Seven *L. maculans* avirulence 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; Van de Wouw *et al.*, 2014;

Ghanbarnia *et al.*, 2015; Plissonneau *et al.*, 2016) and allowed us to define their common characteristics: *L. maculans* avirulence genes (i) encode small secreted proteins with no or low homologies in the databases, (ii) are located in repeat-rich regions of the genome (Rouxel *et al.*, 2011), (iii) can evade recognition by resistance genes through a large variety of mechanisms including large deletions, inactivation through accumulation of mutations or point mutations (Rouxel and Balesdent, 2017), (iv) are, for part of them, highly involved in fungal aggressiveness (*AvrLm4-7*, *AvrLm3*; Huang *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2010; Plissonneau *et al.*, 2017), (v) may show non-conventional relationships with their cognate resistance gene (*AvrLm1* is recognized by the resistance genes *Rlm1* and *LepR3*; *AvrLm4-7* is recognized by *Rlm4* and *Rlm7*; *AvrLm4-7* hides *AvrLm3* from *Rlm3*-mediated recognition; Gout *et al.*, 2006; Parlange *et al.*, 2009; Larkan *et al.*, 2013; Plissonneau *et al.*, 2016).

A potentially efficient resistance source has been identified in *B. nigra*. This resistance is conferred by a single gene, called *Rlm10* (Chèvre *et al.*, 1996), against which very few virulent isolates of *L. maculans* have been identified to date (Kutcher *et al.*, 2010). *Rlm10* has been introgressed in *B. napus* but has not been yet deployed in fields. *B. nigra* is the first *Brassica* species that diverged from the Brassicaceae family (*B. nigra* and *B. oleracea* diverged 20 Mya; Arias *et al.*, 2014). Deciphering the interaction between *Rlm10* and *AvrLm10* would allow us determining (i) if *AvrLm10* shares the same characteristics as previously cloned *L. maculans* avirulence genes, (ii) if *AvrLm10* and *Rlm10* display a canonical gene-for-gene relationship and eventually (iii) whether resistance sources from distantly related species may be more durable.

In this paper, we investigate the relationship between *Rlm10* from *B. nigra* and *AvrLm10* and describe original features compared to previously characterized interactions between *L. maculans* avirulence genes and resistance genes from species more closely related to *B. napus* : (i) *AvrLm10* and *Rlm10* do not display canonical gene-for-gene relationship since *AvrLm10* corresponds to two close head-to-head avirulence genes, *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* and both

genes are necessary to trigger *Rlm10*-mediated recognition; (ii) while *L. maculans* avirulence genes often have no homologues in the databases, both *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* and their genome organization are conserved in several fungal phytopathogen species; (iii) *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* physically interact *in planta*; and (iv) *AvrLm10-1* negatively regulates fungal aggressiveness by restraining leaf lesion development.

Material and Methods

Leptosphaeria maculans, bacteria and plant growth conditions

Isolate HB-S7 (previously S7) is a single-ascospore isolate recovered from a pseudothecium developed at the stem base of the monosomic *B. napus*-*B. nigra* oilseed rape addition line 'LA41' possessing the *Rlm10* locus (Brun *et al.*, 2001). This isolate belongs to the race Av1-5-6-7-(8), i.e. is avirulent toward *Rlm1*, *Rlm5-7* but virulent toward other resistances including *Rlm10* (Brun *et al.*, 2001, Leflon *et al.*, 2007). The v23.1.3 (aka JN3) (Av1-4-5-6-7-8-10) and v23.1.2 (aka JN2) (Av5-6-7-8-10) isolates of *L. maculans* (Balesdent *et al.*, 2002) are avirulent towards *Rlm10* and were used for cloning *AvrLm10*. Isolate v70.94 is a progeny isolate from the HB-S7xJN2 cross, and is virulent toward *Rlm10* and *Rlm1* (Av5-6-7-(8)). *In vitro* crosses and progeny isolates recovery were performed as previously described (Balesdent *et al.*, 2013). All fungal cultures were maintained on V8 juice agar medium, and highly sporulating cultures were obtained on V8 juice, as previously described by Ansan-Melayah *et al.* (1995).

Escherichia coli strains DH5 α and DB3.1 (Invitrogen) were grown in LB medium at 37°C. *Agrobacterium tumefaciens* strains C58C1, C58::pGV2260 and GV3101::pMP90 (Hellens *et al.*, 2000) were grown in LB or YEB media (bacto-beef extract: 5g/l, bacto-yeast extract: 1g/l, bacto peptone: 5g/l, saccharose: 5g/l, MgSO₄: 1M) at 28°C. Antibiotics were used at the following concentrations: rifampicin 25 μ g/ml, ampicilin 50 μ g/ml, kanamycin, streptomycin, spectinomycin and gentamycin 100 μ g/ml.

B. napus plants were grown in growth chambers with 16 h of day (22 °C, 80% humidity) and 8 h of night (18 °C, 100% humidity). *Nicotiana benthamiana* plants were grown in growth chambers with 16 h of day (25 °C, 50% humidity) and 8 h of night (22 °C, 50% humidity).

Inoculation tests

All isolates were phenotyped for their virulence towards *Rlm1* and *Rlm10* 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), Columbus (*Rlm1-Rlm3*) and Fu-Eurol 74 (*Rlm10*). Symptoms were scored 12-21 days post-inoculation (dpi) 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).

For aggressiveness studies, isolates were inoculated on the two susceptible varieties Aviso and ES-Astrid using 10–12 inoculation points per isolate per plant variety. At 12 dpi, cotyledons were scanned to measure lesion areas. Experiments were repeated twice. Median lesion areas were calculated and the data were subjected to ANOVA and to non-parametric correlation tests (Spearman correlation) using XLSTAT 2013.4.03.

DNA manipulation and genetic mapping

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).

The generation of minisatellite markers or markers specific for junctions of repeated elements, the primer design and marker mapping were performed as previously described (Plissonneau *et al.*, 2016).

RNA extraction, reverse transcription and qRT-PCR analysis

RNA-extraction and reverse transcription were performed as described by Plissonneau *et al.* (2016). Quantitative RT-PCR was performed using a 7900 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). To evaluate the expression profile of avirulence genes during infection, Ct values were analysed as described by Muller *et al.* (2002). In silencing assays, the residual expression of *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2*, compared to those of the wild type isolate, were analysed according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). For each value measured, two technical replicates and two biological replicates were done. All primers used for qRT-PCR are detailed in Table S1.

Vector construction for complementation, silencing and transient expression

The construction of vectors used in our study is detailed in Supplementary methods 1 and Table S2.

Fungal transformation

A. tumefaciens – mediated transformation (ATMT) was performed as described by Gout *et al.* (2006). Transformants were selected on minimal medium supplemented with 50 µg/ml nourseothricin (WERNER, BioAgents, Jena, Germany), purified by single conidium isolation and maintained on selective medium.

Annotation of *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* genes

Annotation of 5' and 3' untranslated regions (UTR), transcription start and stop sites and intron positions were performed following PCR amplification and sequencing of 3'- and 5'-ends of cDNA using the SMARTer RACE cDNA Amplification kit (Clontech) according to manufacturer's recommendation and using 5'raceAvrLm10-1, 3'raceAvrLm10-1, 5'raceAvrLm10-2, nested5'raceAvrLm10-2, 3'raceAvrLm10-2 and nested3'raceAvrLm10-2 (Table S1) as specific primers. Gene annotation was confirmed using RNA-seq data from Gervais *et al.*, (2016) and the CLC Genomics Workbench v7.5.1 (Qiagen, Venlo, Netherlands).

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 *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* without the signal peptide sequences were amplified from cDNA of isolate JN3 (Table S1) and introduced into vectors pGADT7 and pGBKT7, respectively. Vectors pGADT7 (bait protein) and pGBKT7 (prey protein) were introduced into *Saccharomyces cerevisiae* strains Y187 and Y2HGold, respectively. Crosses between Y187-*AvrLm10-1* and Y2HGold-*AvrLm10-2* were performed by co-culture of both strains for 24 h in 2x YPDA broth at 30°C and 200 rpm. Serial dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4})

⁴) were spotted on selective media and incubated for 3-5 days at 30°C. For all Y2H experiments, a positive control (the diploid strain Y187-T x Y2HGold-P53) and a negative control (the diploid strain Y187-T x Y2HGold-Lam) were included according to manufacturer's recommendations.

Transient expression assays

A. tumefaciens strains C58C1 or GV3101::pMP90 containing Gateway-compatible vectors expressing *AvrLm10-1*, *AvrLm10-2* or *AvrLm4-7* from the CaMV-35S promoter were grown overnight in 10ml LB with appropriate antibiotics at 28°C. Overnight cultures were diluted 5-fold in YEB medium with appropriate antibiotics and incubated at 28°C during 4 h. Bacterial cultures were then centrifuged 5 min at 5200 g, and pellets were resuspended in agroinfiltration medium (MES: 10 mM, MgCl₂: 10mM, acetosyringone 10 mM, Acetosyringone: 200µM) to OD₆₀₀=0.5. After 2-3 h at room temperature in the dark, *Agrobacterium* suspensions were infiltrated in 4-5 weeks old *N. benthamiana* leaves using a 1 ml syringe.

For the subcellular localization determination experiments, agrobacteria transformed with Gateway-compatible vectors pSite-2CA and pSite-6C1, constitutively expressing *AvrLm10-1*, *AvrLm10-2* or *AvrLm4-7* fused to eGFP and Tag-RFP respectively, were prepared as previously described. For the BiFC experiments, bacteria transformed with Gateway-compatible vectors pSite-nEYFP-C1, pSite-nEYFP-N1, pSite-cEYFP-C1 and pSite-cEYFP-N1 expressing *AvrLm10-1*, *AvrLm10-2* or *AvrLm4-7* were prepared as previously described, and bacterial suspensions were mixed in a 1:1 ratio, and infiltrated. All the cloning procedures are detailed in Supplementary methods 1 and Table S2, and the Gateway vectors have been described by Martin *et al.* (2009).

Confocal laser scanning microscopy

Microscopy analyses were performed using a Leica TCS SPE laser scanning confocal microscope and a 63 x water objective lens. *N. benthamiana* leaves were observed 48h post-infiltration. The following excitation and emission wavelengths were used; GFP: excitation 488 nm, emission captured using a 489 - 509 nm broad-pass filter; RFP: excitation 532 nm, emission 558 to 582 nm; YFP: excitation 488 nm, emission 514 to 527 nm; chlorophyll: excitation 432 nm, emission captured using a 660 - 690 nm broad-pass filter. The detector gain was between 800 and 900, with an amplifier offset of -0.6. All images are representative of at least ten scans.

FRET-FLIM and Data Analysis

Fluorescence lifetime of the donor was experimentally measured in the presence and absence of the acceptor. FRET efficiency (E) was calculated by comparing the lifetime of the donor (GFP-AvrLm10-1) in the presence (t_{DA}) or absence (t_D) of the acceptor (AvrLm10-2-RFP): $E=1-(t_{DA})/(t_D)$. Statistical comparisons between control (donor) and assay (donor + acceptor) lifetime values were performed by Student t -test. FRET-FLIM measurements were performed using a FLIM system coupled to a streak camera (Krishnan *et al.*, 2003). The light source ($\lambda = 840$ nm) was a pulsed infrared laser working at 2 MHz (Spectra-Physics, USA). All images were acquired with a 60x oil immersion lens (Plan Apo 1.4 numerical aperture, IR) mounted on an inverted microscope (Eclipse TE2000E, Nikon, Japan) coupled to the FLIM system. The fluorescence emission was directed back out into the detection unit through a GFP band pass filter (520/25 nm). The FLIM unit was composed of a streak camera (Streakscope C4334, Hamamatsu Photonics, Japan) coupled to a fast and high sensitivity CCD camera (model C8800-53C, Hamamatsu). For each cell, average fluorescence decay profiles were plotted and lifetimes were estimated by fitting data with an exponential function using a non-linear least-squares estimation procedure (detailed in Camborde *et al.*, 2017, in press).

Results

Avirulence towards *Rlm10* is controlled by a single gene and genetically linked to *AvrLm1*

Isolates HB-S7 (Av1-5-6-7-(8), virulent on *Rlm10*, *Mat1-2*) and JN2 (Av5-6-7-8-10, avirulent on *Rlm10*, *Mat1-1*) were crossed. A total of 114 random progeny isolates were recovered and phenotyped for virulence toward *Rlm10* and *Rlm1*. A 47:67 A:V segregation ratio for virulence on *Rlm10* was observed in the progeny, consistent with a single gene control of the phenotype ($p(\text{CHI}2) = 0.061$). A segregation distortion was observed for virulence toward *Rlm1* (70V:44A, $p(\text{CHI}2) = 0.015$). The high number of parental types in the progeny (103) compared to recombinant isolates between virulence toward *Rlm1* and *Rlm10* (11; Table 1) suggested that the locus responsible for avirulence toward *Rlm10* was genetically linked to *AvrLm1*. In order to exploit the predicted effector repertoire from the sequenced isolate JN3 (Av1,4,5,6,7,8,10, avirulent on *Rlm10*, *Mat1-2*), JN3 was crossed with v70.94, a *Mat1-1* progeny of cross #70 virulent on *Rlm10*. The single gene control of virulence toward *Rlm10* was confirmed (39V:43A, $p(\text{CHI}2) = 0.659$), as was its linkage with *AvrLm1* (Table 1).

Fine mapping of *AvrLm10* identifies erroneous assembly in the genomic region

In the course of *AvrLm1* and *AvrLm6* cloning, a BAC-clone contig encompassing this region was entirely sequenced, from which markers and a genetic map of the region were designed (Gout *et al.* 2006, Fudal *et al.* 2007). *AvrLm1*, *AvrLm10* and the two markers *MinLm1* and *MycPKS*, bordering the *AvrLm1*-*AvrLm6* region on its 5' and 3' sides, respectively, were mapped in cross #72, indicating that *AvrLm10* was located at 10.7 cM from *MycPKS*, on the 3' side of the linkage group. *MinLm1*, *AvrLm1* and *AvrLm6* mapped on the super-contig 6 (SC6) of the whole sequence of JN3, while *MycPKS* was located on the 5' side of SC11 (Fig. 1), suggesting that *AvrLm10* locates on SC11. However, examination of gene order on the BAC-clone contig and on SC11 revealed inconsistent gene order, although the sequences

corresponded to the same isolate. Alignment of SC11 and the BAC-contig confirmed an inversion of the sequence in the 5' end of SC11 (Fig. 1). Minisatellite and repeat-junction markers were generated in the region confirming a misassembly in the region; the 5' end of SC11 linked in an inverse order to SC6, while markers located in the rest of SC11 build up an independent linkage group. Those results indicate that the *AvrLm10* locus is located in a telomeric AT-rich region, either at the end of SC6 or in the first 276 kb of SC11.

Two neighbouring genes encoding Small Secreted Proteins (SSP) are candidates for *AvrLm10*

From the effector repertoire of JN3, only two effector gene candidates, situated head-to-head in this region, were identified. *Lema_P086540.1* and *Lema_P086550.1* displayed a presence/absence polymorphism following PCR amplification between avirulent and virulent parental isolates. If taking into account as a marker the PCR amplification of both genes, the two markers fully co-segregated with the avirulence locus.

We performed manual annotation of *Lema_P086540.1* and *Lema_P086550.1* by RACE-PCR and confirmed the automated annotation of *Lema_P086540.1* but not the intron prediction of *Lema_P086550.1*. *Lema_P086540.1* is 938 nt long, with a 249-bp 5' UTR, a 167-bp 3' UTR and three introns, and encodes a 102 amino acid, cysteine-rich (seven cysteines in the mature protein) secreted protein (SignalP 4.1, Petersen *et al.*, 2011). *Lema_P086550.1* is 829 nt long, with a 133-bp 5' UTR, a 112-bp 3' UTR and one intron, and encodes a 164 amino acid, cysteine-poor (one cysteine in the mature protein) secreted protein. *Lema_P086540.1* and *Lema_P086550.1* showed similar expression kinetics *in planta* (Fig. S1). Their expression peaked 7 dpi, similar to the typical pattern of expression of *L. maculans* effectors during the early stages of plant infection. The two genes are separated by a 7.6 kb intergenic region. This intergenic region is made of degenerated relics of transposable elements (TEs) and does not contain other expressed sequence between the two candidate avirulence genes (Fig.2A, B). The

intergenic region mostly encompasses TEs with low or medium copy numbers, one of which only being represented 10 times in the genome. In contrast, the whole region is surrounded by high copy number retrotransposons that are present in more than 1000 copies in the genome (Fig. 2A, Rouxel *et al.* 2011).

Homologs for proteins encoded by *Lema_P086540.1* and *Lema_P086550.1* with the same head-to-head orientation and the same cysteine spacing were found in other fungal species such as *Leptosphaeria biglobosa thlaspii* – another *Leptosphaeria* species belonging to the same species complex as *L. maculans* (Grandaubert *et al.*, 2014) –, but not in other members of the species complex. *Lema_P086540.1* and *Lema_P086550.1* homologs were also found in two other Dothideomycetes species and in some Sordariomycetes such as *Colletotrichum* species, all of them being fungal pathogens of plants (Table 2). Homologs for the protein encoded by *Lema_P086550.1* in *Colletotrichum spp* are annotated as histidine permeases. However the histidine-permease domains found in *Colletotrichum* homologs were not found in *Lema_P086550.1* protein. We cannot thus hypothesize about a potential function for this protein.

Lema_P086540.1 protein also showed homology with proteins of another phytopathogenic Dothideomycete and a Leotiomycete, and with the Sordariomycete *Fusarium oxysporum* avirulence protein Six5 (Table 2), shown to be recognized by the same tomato resistance protein as Avr2, whose encoding gene is located head-to-head with *SIX5* (Ma *et al.* 2015). However in this case the protein encoded by *AVR2* is not homologous to the *Lema_P086550.1* protein.

Both *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* are needed to induce avirulence

Six constructs, containing either each of the candidate genes alone, or the two genes, with or without their intergenic region (Fig. 2C) were introduced via ATMT in isolate v70.94, virulent

on *Rlm10*. 13, 5 and 6 transformants containing *Lema_P086540.1*, *Lema_P086550.1* or both genes without their intergenic region, and 7, 5 and 8 transformants containing *Lema_P086540.1*, *Lema_P086550.1* (and part of their intergenic region) or both genes including their entire intergenic region, respectively (Fig. 2C), were inoculated to *B. napus* cvs Westar and FU-Eurol-74 (Fig. 2C and Fig. S2). All isolates were virulent on the susceptible cultivar Westar. Isolate v70.94 complemented with either *Lema_P086540.1* or *Lema_P086550.1* alone, with part of or without the intergenic region remained virulent on *Rlm10*. Complementation with the two genes without the intergenic region restored an atypical avirulence characterized by a delayed resistance response. Complementation with the two genes and their intergenic region restored the avirulent phenotype, suggesting the two genes and their intergenic region are necessary to induce full resistance (Fig. 2C).

As a complementary approach, each gene was silenced using RNAi in the avirulent isolate JN3. The relative expression level of the candidate genes in transformed isolates ranged between 7% and more than 100% of that of the wild-type isolate (Fig. 3). Following inoculation, all transformants remained virulent on the susceptible control Westar (data not shown). When inoculated on *Rlm10* plants, a range of phenotypes was observed. Transformants showing a weak level of silencing (i.e. an expression level higher than 30% or 45 % of that of JN3 for *Lema_P086540.1* and *Lema_P086550.1*, respectively) were still avirulent on *Rlm10* plants. In contrast, isolates with a higher level of silencing escaped recognition by *Rlm10* (Fig. 3). In addition, the efficiency of the recognition, as measured by the percentage of inoculated *Rlm10* plants displaying a typical HR, negatively correlated with the level of silencing (Spearman correlation, $p < 0.0001$ for each gene; Fig. 3). These results confirmed that expression of both *Lema_P086540.1* and *Lema_P086550.1* is necessary to induce *Rlm10*-mediated recognition and those genes were renamed *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* respectively.

AvrLm10-1 and AvrLm10-2 physically interact *in vitro* and *in planta*

Since *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* are both required for *Rlm10*-mediated recognition, we examined whether their products physically interact using the yeast two-hybrid system. Diploid yeast strains from the cross between Y187-*AvrLm10-1* and Y2HGold-*AvrLm10-2* grew on selective media, while Y187-*AvrLm10-1* or Y2HGold-*AvrLm10-2* alone did not (Fig. 4A). These data suggested that AvrLm10-1 and AvrLm10-2 proteins physically interact *in vitro*.

In order to confirm the interaction between these two proteins *in planta*, Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) experiments were performed. All possible combinations (N and C-terminal parts of YFP fused to either N or C-terminal parts of AvrLm10-1 or AvrLm10-2) were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves using *A. tumefaciens*. Two combinations allowed us to observe YFP fluorescence: the N-terminal part of the YFP fused to the N-terminal part of AvrLm10-1 coexpressed with the C-terminal part of the YFP fused to the C-terminal part of AvrLm10-2 (nEYFP-AvrLm10-1 + AvrLm10-2-cEYFP; Fig. 4B), and the C-terminal part of the YFP fused to the N-terminal part of AvrLm10-1 coexpressed with the N-terminal part of the YFP fused to the N-terminal part of AvrLm10-2 (cEYFP-AvrLm10-1 + nEYFP-AvrLm10-2; data not shown). In both cases, a YFP fluorescence signal was observed in the nucleus of tobacco cells. This YFP fluorescence suggested a physical interaction between AvrLm10-1 and AvrLm10-2. AvrLm4-7 fused to cEYFP (AvrLm4-7-cEYFP) co-expressed with nEYFP-AvrLm10-1 was used as negative control and no YFP fluorescence was detected, highlighting the specificity of the interaction between AvrLm10-1 and AvrLm10-2 (Fig. S4).

To further validate this interaction, an *in planta* fluorescence resonance energy transfer–fluorescence lifetime imaging (FRET-FLIM) analysis was performed. AvrLm10-1 and AvrLm10-2 fused to GFP and RFP, respectively, were expressed in leaf epidermal cells of *N. benthamiana*. Confocal laser scanning microscopy of GFP-AvrLm10-1- and AvrLm10-2-RFP-

expressing cells detected fluorescent signals in both the cytoplasm and the nucleus (Fig. 4C), indicating that both fusion proteins diffuse freely between the nucleus and the cytoplasm, which is in accordance with their low molecular weight. Immunoblot analysis with anti-GFP and anti-RFP antibodies confirmed proper expression of the recombinant proteins (Fig. S3). FRET-FLIM experiments were performed on the cytoplasm of co-transformed cells. AvrLm4-7 fused to RFP, which was also detected in both the cytoplasm and the nucleus of *N. benthamiana* cells (Fig. S4), was used as negative control. The lifetime of GFP fluorescence was significantly reduced in cells co-expressing GFP-AvrLm10-1 and AvrLm10-2-RFP compared with cells expressing GFP-AvrLm10-1 alone (Table 3). This is indicative of *in planta* interaction between AvrLm10-1 and AvrLm10-2. Conversely, co-expression of GFP-AvrLm10-1 and AvrLm4-7-RFP resulted in a non-significant reduction of the GFP fluorescence lifetime was observed when co-expressing GFP-AvrLm10-1 and AvrLm4-7-RFP despite the subcellular colocalization of both proteins (Table 3).

Taken together, these results suggested that AvrLm10-1 and AvrLm10-2 interact physically *in planta*.

AvrLm10-1, but not AvrLm10-2, has a negative effect on lesion size

Nine and 15 isolates silenced for either *AvrLm10-1* or *AvrLm10-2*, respectively, were used to estimate the role of each gene in aggressiveness. Each isolate was inoculated on two susceptible varieties and cotyledon lesion areas were measured 12 dpi. Using ANOVA, we detected an effect of both the plant variety and the fungal isolate on lesion size, but no variety x isolate interaction. The leaf lesion size was negatively correlated to the level of residual expression of *AvrLm10-1*, i.e. lesion size increased when *AvrLm10-1* was silenced ($p=0.025$) (Fig. S5, Table S3). In contrast, silencing of *AvrLm10-2* had no significant effect on leaf lesion size.

Discussion

In this study we characterized two *L. maculans* genes involved in an unusual two (avirulence) genes – for – one (resistance) gene relationship. Avirulence toward *Rlm10* was firstly thought to be controlled by a single gene following genetic analyses. Genome-assisted map-based cloning pointed again to an AT-isochores genome environment, as it has been systematically reported for *L. maculans* avirulence genes thus far (Rouxel and Balesdent, 2017). Map-based identification of the genetic interval was complicated by an incorrect assembly of this genomic region, artificial merging of two chromosome ends and inversion of the distal part of the chromosome so that telomeric repeats are located ca. 350 kb from the extremity of the chromosome. Reassembly, fine mapping and a presence/absence polymorphism analysis next pointed to two genes showing all the characteristics of typical *L. maculans* avirulence genes (i.e. genome location and isolation in the middle of large AT-isochores, typical expression pattern of “early” effectors with a peak of *in planta* expression 7 dpi, and small-sized genes encoding proteins predicted to be secreted, with no recognizable functional domain and, in one case, enriched in cysteine residues). Their genome location is unusual in that it is clearly telomeric, the two genes being located less than 100 kb from the chromosome extremity and at ca. 13 kb from the nearest telomeric repeat. While this location has been commonly found for avirulence genes of other filamentous phytopathogens such as *Magnaporthe oryzae* (Farman et al., 2002), this is only the second avirulence gene of *L. maculans* after *AvrLm3* (Plissonneau et al., 2016) with a telomeric location.

The most prominent feature of *AvrLm10*, however, is that avirulence is conferred by two head-to-head genes, *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2*, with a similar pattern of expression. Silencing of only one of two genes is sufficient to escape *Rlm10* recognition and both *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* as well as their intergenic region are necessary to confer full avirulence towards *Rlm10* genotypes. To our knowledge a similar genome organization and cooperation of two

genes to trigger avirulence has only been described in *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Fol) where the avirulence genes *Avr2* and *SIX5* are recognized by the same tomato resistance gene, *I-2* (Ma *et al.* 2015). As for *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2*, *Avr2* and *SIX5* are two head-to-head genes separated by a 1609 bp intergenic region, localized in a TE-enriched ‘B’ chromosome (Schmidt *et al.*, 2013). Using Y2H and BiFC approaches Ma *et al.* (2015) showed that *Avr2* and *SIX5* physically interact. A physical interaction has also been found here between *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* using Y2H, BiFC and FRET-FLIM assays. Thus *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* are expressed in the same plant tissues at the same time, and *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* physically interact *in planta*. The formation of an heterodimer may be linked with the pathogen lifestyle: *L. maculans* is an apoplastic pathogen while Fol is a xylem invader. In both cases, secreted proteins must be protected against the harsh physical conditions of the apoplastic fluids or xylem sap (Doehlemann and Hemetsberger 2013). Usually, secreted proteins, and noticeably effectors, are rich in cysteine residues to withstand those conditions (Sperschneider *et al.* 2015), but while this is the case for *AvrLm10-1* and *Six5*, *AvrLm10-2* and *Avr2* only present one and two cysteine residues, respectively. It is thus possible that stabilization in the form of heterodimers protects *AvrLm10-2* and *Avr2* after their secretion outside of the fungal cell and before their uptake by plant cells, as it has already been observed for other protein couples (Kramer *et al.*, 2004; Schmalen *et al.*, 2014). If formation of heterodimers may be important firstly for protein stabilization in intercellular spaces, the question is whether this is also important for recognition by the resistance protein and/or for effector function. We may thus hypothesize that Rlm10 is only able to recognize structural features linked to a complex between *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2*. In the case of the *Avr2*-*Six5*-*I2* interaction, Ma *et al.* (2015) showed that heterodimers can be formed between *Six5* and a virulent isoform of *Avr2* which does not trigger the *I-2* mediated response. This strongly suggests that triggering the resistance response is independent of heterodimer formation. Only

very few isolates virulent towards *Rlm10* are available in our collection due to the lack of use of this resistance source in the field. In addition, the few virulent isolates identified show complete inactivation of either *AvrLm10-1* or *AvrLm10-2* via RIP mutations or deletions (MH Balesdent, unpublished data). We are thus unable to evaluate at present whether heterodimer formation is possible with virulent isoforms and whether this is a prerequisite for *Rlm10*-triggered resistance.

Interestingly, in both *Fol* and *L. maculans*, interacting avirulence proteins are encoded by neighboring head-to-head genes. It is likely that this genomic organization reflects the need for the two proteins to act together: if both genes are located in close proximity, there is less chance to lose one of them by homologous recombination, which would render the second gene ineffective. In *Fol*, the 1.6 kb intergenic region is considered as a common promoter governing the concerted expression of the *Avr2* and *SIX5* gene. Head-to-head genes and short shared promoters are usual features in *L. maculans* essential genome (GC-isochores), and are indicative of a common regulation (Elliott and Howlett, 2006; Remy *et al.*, 2008). In AT-isochores, in contrast, effector-encoding genes are mostly present as solo genes in the middle of TEs and are subjected to a chromatin-based regulation allowing the concerted expression of multiple effector genes located in independent genomic regions as a function of their general genome location rather than of the sharing of common promoters (Soyer *et al.*, 2014). In this respect it is unlikely that the 7.6 kb intergenic region between *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* behaves as a shared promoter. In spite of this probable lack of common regulation of expression due to a common promoter region, the importance of the two genes in fungal pathogenicity is strongly substantiated by (i) their unusually high level of similarity between putative orthologs compared to other avirulence proteins described to-date in *L. maculans*; (ii) the conservation of their genome organization in a series of unrelated fungal phytopathogens; and (iii) the discontinuous phylogenetic placement of the occurrence of this orthologous gene pair in fungal

species. *AvrLm10-1* shows a strong level of conservation in a series of Dothideomycete species related to *L. maculans* but also in many Sordariomycete species, and noticeably in related *Colletotrichum* and *Fusarium* species. This is unusual for avirulence proteins often showing very low or no homology in other fungal species. *AvrLm10-2* is much less conserved but is found to be associated to the *AvrLm10-1* ortholog in two Dothideomycete species and four *Colletotrichum* species (*C. salicilis*, *C. simmondsii*, *C. nymphaeae* and *C. orchidophilum*). In all these cases, the genes are organized in a head-to-head fashion with a short intergenic region (≤ 1 kb) that may indicate a common regulation. To our knowledge, investigation of the involvement of this gene pair in pathogenicity has not been performed for these other species. In all these cases, the genes are located in the regular core genome of the fungi and are directly surrounded by other genes. In *L. maculans*, Grandaubert *et al.* (2014) showed that five of seven avirulence genes investigated showed break of synteny with related species and have been displaced in TE-rich regions of the genome in the course of evolution. The *AvrLm10-1-AvrLm10-2* pair is thus another example of avirulence genes that have been “moved” to the plastic genome of *L. maculans* during evolution (Grandaubert *et al.*, 2014). Importantly, the head-to-head organization has been conserved in this accessory genome compartment. Of main significance, *AvrLm10-1* shares 37% sequence similarity with *Six5*, and five out of their seven cysteine residues are perfectly aligned. *Avr2*, in contrast, has no homology with *AvrLm10-2* but the similarity of the organization of the series of gene pairs orthologs in *L. maculans* and *Colletotrichum* species with the *SIX5-AVR2* gene pair organization, located in a TE-rich genome environment, in a species related to *Colletotrichum*, along with a similar ability to form heterodimers, may indicate some extent of functional homology in effector function between the *AvrLm10-1-AvrLm10-2* and *Six5-Avr2* pairs.

Another unusual particularity of the *AvrLm10-1-AvrLm10-2* pair lies in its effect on lesion size. Until now, all three tested *L. maculans* avirulence genes have been shown to promote

lesion development (Huang *et al.*, 2010; Novakova *et al.*, 2016; Plissonneau *et al.*, 2017). Isogenic lines or isolates complemented with the avirulence gene induced larger lesions than those in which the gene was absent. In contrast, silencing of the avirulence allele induced smaller lesions on cotyledons. These effects make sense for a leaf pathogen that relies on leaf lesion size for asexual sporulation. Here, we observed different behaviors when silencing *AvrLm10-1* or *AvrLm10-2*. No significant effect on leaf lesion size was observed when silencing *AvrLm10-2* whereas silencing *AvrLm10-1* led to an increase in lesion size, suggesting that this latter effector contributes to limitation of lesion expansion and may thus balance the effect of other effectors. While this effect is counter-intuitive for a leaf pathogen, it may be coherent with the specific lifecycle of *L. maculans*. Indeed, contrasting with many other fungal leaf pathogens, the leaf lesion is just one step in the fungal life cycle and asexual sporulation is considered as dispensable in the fungal pathogenic cycle (Rouxel and Balesdent, 2005). Following leaf lesion development, *L. maculans* has a very long endophytic period. It thus makes sense that to restrict leaf lesion development it needs to prevent early leaf senescence that would compromise its ability to reach in time the leaf vascular tissue and eventually head to the stem. In this context, effectors with unusual effect may have been selected during *L. maculans* evolution to circumscribe the detrimental effect of extensive leaf lesions and keep the leaf alive until the end of the infection.

Cooperation of two proteins in the form of homodimers has been described in a few cases to be indispensable for effector function. In other models, such as *AvrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Gurlebeck *et al.*, 2005) or a series of crinkler effectors from oomycete phytopathogens (van Damme *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016), effector function depends on homodimerization to manipulate plant gene expression or suppress plant immunity. In filamentous fungi, we describe here the second case where an heterodimer, guided by close genomic proximity of the genes and common regulatory regions, is involved in effector

recognition. However the importance of this protein association to induce *Rlm10*- triggered resistance remains elusive. Even if the molecular mechanism explaining why both *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* are necessary to trigger *Rlm10* recognition is not yet determined, our findings, along with those of Ma *et al.* (2015), provide examples of non-canonical gene-for-gene interactions between pathogens and their host plant. In *F. oxysporum*, *Avr2* was firstly identified as the avirulence gene triggering *I-2*-mediated resistance in tomato (Houterman *et al.* 2009) and later work showed that the *AVR2–SIX5* gene pair is required to activate *I-2*-mediated resistance (Ma *et al.* 2015)., Based on these and our findings, it is tempting to speculate that, despite the limited number of available strategies for validation of gene function and the globally low number of avirulence genes currently cloned in fungi, gene cooperation may be a more common strategy to trigger avirulence than previously anticipated (Bourras *et al.*, 2016).

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, and Julie Gervais for her advices for the utilization of the CLC Genomic workbench. This work was funded by the French National Research Agency projects AvirLep (ANR GPLA07-024C) and StructuraLEP (ANR-14-CE19-0019). Yohann Petit-Houdenot was funded by a Young Scientist Funding by INRA. Research at the LIPM is supported by the French Laboratory of Excellence project “TULIP” (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

Authors contribution

I.F, T.R, S.R and M.H.B. planned and designed the research. All authors performed the experiments. Y.P.H, A.D, M.M, F.B, B.O, C.L.M, S.R, H.B, T.R, I.F and M.H.B analyzed the data. Y.P., I.F., M.H.B. and T.R. drafted the manuscript, which was reviewed and revised by all authors.

A.J. acquired and analysed data in streak-FLIM.

References

Anderson JP, Gleason CA, Foley RC, Thrall PH, Burdon JB, Singh KB. 2010. Plants versus pathogens: an evolutionary arms race. *Funct. Plant Biol.* FPB 37, 499–512.

Ansan-Melayah D, Balesdent MH, Buée M, Rouxel T. 1995. Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 85: 1525-1529.

Arias T, Beilstein MA, Tang M, McKain MR, Pires J.C. 2014. Diversification times among *Brassica* (Brassicaceae) crops suggest hybrid formation after 20 million years of divergence. *Am. J. Bot.* 101, 86–91.

Balesdent MH, Attard A, Kühn ML, Rouxel T. 2002. New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 92, 1122–1133.

Balesdent MH, Barbetti MJ, 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 MH, Fudal, I, Ollivier B, Bally P, Grandaubert J, Eber F, Chèvre AM, Leflon M, Rouxel T. 2013. The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytol.* 198, 887–898.

Bourras S, McNally KE, Müller MC, Wicker T, Keller B. 2016. Avirulence genes in cereal powdery mildews: the gene-for-gene hypothesis 2.0. *Plant Biot. Interact.* 241.

Brun H, Ruer D, Levivier S, Somda I, Renard M, Chèvre AM. 2001. Presence in *Leptosphaeria maculans* populations of isolates virulent on resistance introgressed into *Brassica napus* from the *B. nigra* B genome. *Plant Pathol.* 50, 69–74.

- Brun H, Chèvre AM, Fitt BD, Powers S, Besnard AL, 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 Phytol.* 185, 285–299.
- Camborde L, Jauneau A, Dumas B, Gaulin E. 2017.** Detection of nucleic acids - protein interactions *in planta* using fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature protocol*, in press.
- Chèvre AM, Eber F, This P, Barret P, Tanguy X, Brun H, Delseny M, Renard M. 1996.** Characterization of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *B. napus*-*B. nigra* addition lines. *Plant Breed.* 115, 113–118.
- Chèvre AM, Brun H, Eber F, Letanneur JC, Vallée P, Ermel M, Glais I, Li H, Sivasithamparam K, Barbetti MJ. 2008.** Stabilization of resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*-*B. juncea* recombinant lines and its introgression into spring-type *Brassica napus*. *Plant Dis.* 92, 1208–1214.
- van Damme M, Bozkurt TO, Cakir C, Schornack S, Sklenar J, Jones AME, and Kamoun S. 2012.** The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* translocates the CRN8 kinase into host plant cells. *PLOS Pathog.* 8, e1002875.
- Doehlemann G, Hemetsberger C. 2013.** Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytol.* 198, 1001–1016.
- Elliott CE, Howlett BJ. 2006.** Overexpression of a 3-Ketoacyl-CoA thiolase in *Leptosphaeria maculans* causes reduced pathogenicity on *Brassica napus*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19, 588–596.
- Farman ML, Eto Y, Nakao T, Tosa Y, Nakayashiki H, Mayama S, et al. 2002.** Analysis of the structure of the AVR1-CO39 avirulence locus in virulent rice-infecting isolates of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 6–16.
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ. 2012.** Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186–194.
- Flor H.H. 1971.** Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275–296.

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*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 459–470.

Gervais J, Plissonneau C, Linglin J, Meyer M, Labadie K, Cruaud C, Fudal I, Rouxel T, Balesdent MH. (2016). Different waves of effector genes with contrasted genomic location are expressed by *Leptosphaeria maculans* during cotyledon and stem colonization of oilseed rape. *Mol. Plant Pathol.*

Ghanbarnia K, Fudal I, Larkan NJ, Links MG, Balesdent MH, Profotova B, Fernando WGD, Rouxel T, Borhan MH. (2015). Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm2* using an intraspecific comparative genomics approach. *Mol. Plant Pathol.* 16, 699–709.

Gout L, Fudal I, Kuhn ML, Blaise F, Eckert M, Cattolico L, Balesdent MH, Rouxel T. 2006. Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Microbiol.* 60, 67–80.

Grandaubert J, Lowe RGT, Soyer JL, Schoch CL, Van de Wouw AP, 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.

Gürlebeck D, Szurek B, Bonas U. 2005. Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 42, 175–187.

Hellens R, Mullineaux P, Klee H. 2000. Technical Focus: A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* 5, 446–451.

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. *Plant J.* 58, 970–978.

Huang YJ, Li ZQ, Evans N, Rouxel T, Fitt BDL, Balesdent MH. 2006. Fitness cost associated with loss of the *AvrLm4* avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *Eur. J. Plant Pathol.* 114: 77-89.

Huang YJ, Balesdent MH, Li ZQ, 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). *Eur. J. Plant Pathol.* 126: 279-291.

Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.

Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A. 2004. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* 24, 938–944.

Krishnan RV, Masuda A, Centonze VE, Herman B. 2003. Quantitative imaging of protein-protein interactions by multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy using a streak camera. *J. Biomed. Opt.* 8, 362–367.

Kutcher HR, Balesdent MH, Rimmer SR, Rouxel T, Chèvre AM, Delourme R, Brun H. 2010. Frequency of avirulence genes in *Leptosphaeria maculans* in western Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 32, 77–85.

Larkan NJ, Lydiate DJ, Parkin IAP, Nelson MN, Ep 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 Phytol.* 197, 595–605.

Leflon M, Brun H, Eber F, Delourme R, Lucas MO, Vallée P, Ermel M, Balesdent MH, Chèvre AM. 2007. Detection, introgression and localization of genes conferring specific resistance to *Leptosphaeria maculans* from *Brassica rapa* into *B. napus*. *Theor. Appl. Genet.* 115, 897–906.

Li Q, Zhang M, Shen D, Liu T, Chen Y, Zhou JM, Dou D. 2016. A *Phytophthora sojae* effector PsCRN63 forms homo-/hetero-dimers to suppress plant immunity via an inverted association manner. *Sci. Rep.* 6, 26951.

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.

U N. 1935. Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan. J. Bot.* 7: 389–452.

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 Phytol.* 208, 507–518.

Martin K, Kopperud K, Chakrabarty R, Banerjee R, Brooks R, and Goodin MM. 2009. Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 59, 150–162.

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.

Nováková M, Šašek V, Trdá L, Krutinová H, Mongin T, Valentová O, Balesdent MH, Rouxel T, Burketová L. 2016. *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm4-7 affects salicylic acid (SA) and ethylene (ET) signalling and hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in *Brassica napus*. *Mol. Plant Pathol.* 17, 818–831.

Parlange F, Daverdin G, Fudal I, Kuhn ML, Balesdent MH, 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. *Mol. Microbiol.* 71, 851–863.

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

Petit-Houdenot Y, Fudal I. 2017. Complex interactions between fungal avirulence genes and their corresponding plant resistance genes and consequences for disease resistance management. *Front. Plant Sci.* 8:1072

- Plissonneau C, Daverdin G, Ollivier B, Blaise F, Degrave A, Fudal I, Rouxel T, Balesdent MH. 2016.** A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.* 209, 1613–1624.
- Plissonneau C, Blaise F, Ollivier B, Leflon M, Carpezat J, Rouxel T, and Balesdent MH. 2017.** Unusual evolutionary mechanisms to escape effector-triggered immunity in the fungal phytopathogen *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Ecol.* 26, 2183–2198
- Remy E, Meyer M, Blaise F, Simon UK, Kuhn D, Chabir M, Riquelme M, Balesdent MH, Rouxel T. 2008.** The *Lmgpi15* gene, encoding a component of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis pathway, is required for morphogenesis and pathogenicity in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.* 179, 1105–1120.
- Rouxel T, Balesdent MH. 2005.** The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Mol. Plant Pathol.* 6, 225–241.
- Rouxel T, Balesdent MH. 2017.** Life, death and rebirth of avirulence effectors in a fungal pathogen of *Brassica* crops, *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol* 214: 526–532
- 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. *Nat. Commun.* 2, 202.
- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, Barrell B. 2000.** Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 16, 944–945.
- Schmalen I, Reischl S, Wallach T, Klemz R, Grudziecki A, Prabu JR, Benda C, Kramer A, Wolf E. 2014.** Interaction of circadian clock proteins CRY1 and PER2 is modulated by zinc binding and disulfide bond formation. *Cell* 157, 1203–1215.
- Schmidt SM, Houterman PM, Schreiber I, Ma L, Amyotte S, Chellappan B, Boeren S, Takken FLW, Rep M. 2013.** MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum*. *BMC Genomics* 14, 119.

Sperschneider J, Dodds PN, Gardiner DM, Manners JM, Singh KB, Taylor JM. 2015. Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi. *PLoS Pathog* 11, e1004806.

Soyer JL, Ghalid ME, Glaser N, Ollivier B, Linglin J, Grandaubert J, Balesdent MH, 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.

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. *Mol. Plant Pathol.* 15, 523–530.

Tables and figures

Table 1: Segregation analysis of interaction phenotypes toward *Rlm1* and *Rlm10* in *Leptosphaeria maculans*

Interaction phenotype on		n° of isolates (and type of phenotypic class) in the progeny	
<i>Rlm1</i>	<i>Rlm10</i>	in cross 70 (JN2 x HB-S7)	in cross 72 (JN3 x v70.94)
A ¹	A	4 (recombinant phenotype)	36 (JN3 phenotype)
A	V	40 (HB-S7 phenotype)	5 (recombinant phenotype)
V	A	63 (JN2 phenotype)	7 (recombinant phenotype)
V	V	7 (recombinant phenotype)	34 (v70.94 phenotype)

¹ A, the isolate is avirulent toward the corresponding *Rlm* gene, V, the isolate is virulent

1 **Table 2: Conservation of the synteny observed at the *AvrLm10* locus.**

Organism	Class	Homolog for AvrLm10-1	Size (aa)	Cysteine number	Signal peptide	% identity with AvrLm10-1	Alignment length (aa)	Homolog for AvrLm10-2	Size (aa)	Cysteine number	Signal peptide	% identity with AvrLm10-2	Alignment length (aa)	Gene orientation	Size of intergenic region (bp)
<i>Colletotrichum salicis</i>	Sordariomycetes	KXH27015	119	7	Yes	59	84	KXH27014	166	2	Yes	41	93	Head-to-head	748
<i>Colletotrichum simondsii</i>	Sordariomycetes	KXH44036	119	7	Yes	58	83	KXH44035	206	2	No	38	94	Head-to-head	646
<i>Colletotrichum nymphae</i>	Sordariomycetes	KXH36920	125	7	Yes	55	82	KXH36921	170	2	Yes	37	83	Head-to-head	765
<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	Sordariomycetes	OHF02955	119	7	Yes	48	69	OHF02954	173	2	Yes	38	89	Head-to-head	1129
<i>Setosphaeria turcica</i>	Dothideomycetes	XP_008020186	120	7	Yes	40	72	XP_008020185	170	2	Yes	29	90	Head-to-head	1121
<i>Bipolaris maydis</i>	Dothideomycetes	XP_014072602	120	7	Yes	40	70	XP_014072601	177	2	Yes	31	83	Head-to-head	1083
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Dothideomycetes	XP_007580734	102	4	Yes	32	41							Tail-to-tail	651
<i>Fusarium oxysporum</i>	Sordariomycetes	FJ767863	122	7	Yes	37	59							Head-to-head	943
<i>Rhynchosporium agropyri</i>	Leotiomycetes	CZS99469	122	7	Yes	45	68							Head-to-head	3157
<i>Leptosphaeria biglobosa thlaspii</i>	Dothideomycetes	Lb_ibcn65_P011645	61			64	61	Lb_ibcn65_P011644	170			39	92		

2

Table 3: FRET-FLIM analysis shows that AvrLm10-1 physically interacts with AvrLm10-2 in the cytoplasm of *N. benthamiana* cells

Donor	Acceptor	τ ^(a)	SEM ^(b)	Δt ^(c)	N ^(d)	E ^(e)	p-value ^(f)
GFP-AvrLm10-1	-	2.444	0.014	-	64	-	-
GFP-AvrLm10-1	AvrLm10-2- RFP	2.008	0.025	436	75	17.8	7.6 x 10 ⁻²⁹
GFP-AvrLm10-1	AvrLm4-7-RFP	2.391	0.015	54	68	2.2	0.01

^aMean lifetime in nanoseconds. Average fluorescence decay profiles were plotted and fitted with exponential functions using a nonlinear square estimation procedure. Mean lifetime was calculated according to $\tau = \sum \alpha_i \tau_i^2 / \sum \alpha_i \tau_i$ with $I(t) = \sum \alpha_i e^{-t/\tau_i}$.

^bStandard error of the mean

^c $\Delta t = \tau_D - \tau_{DA}$, where τ_D is the lifetime in the absence of the acceptor and τ_{DA} is the lifetime of the donor in the presence of the acceptor

^dTotal number of measured cells

^ePercentage of FRET efficiency ($E = 1 - \tau_{DA}/\tau_D$)

^fP value of the difference between the donor lifetimes in the presence and in the absence of the acceptor (Student's *t*-test)

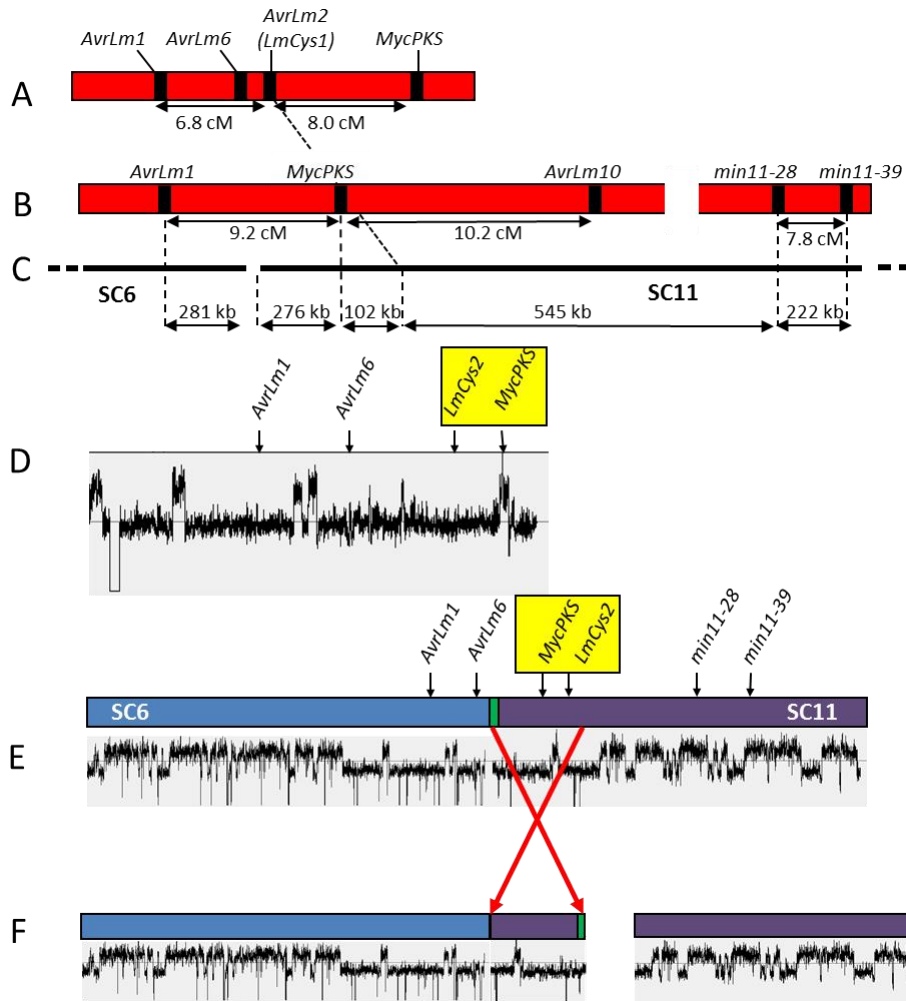


Figure 1. Evidence for wrong genomic assembly in the *AvrLm10* region and identification of the region encompassing the *AvrLm10* locus.

A. Genetic map encompassing *AvrLm1*, *AvrLm2* and *AvrLm6*, from Gout *et al.* (2006) and Fudal *et al.* (2007). **B.** Genetic mapping of *AvrLm10* in cross #72 (this study); In A and B, genetic distances are expressed in centimorgans (cM). **C.** Localization of linked markers on super-contigs (SC) SC6 and SC11 of the JN3 whole genome sequence; **D.** Gene order and GC content of the region identified from whole sequencing of a BAC-clone contig containing *AvrLm1* and *AvrLm6* (Gout *et al.*, 2006; Fudal *et al.*, 2007). **E.** Suggested assembly between SC6 and SC11 supercontigs, based on genetic linkage between *AvrLm1* and *MycPKS*; the green vertical bar corresponds to a region rich in telomeric repeats; note that the gene order is not compatible with that found from BAC-clone whole sequencing shown in (D); **F.** Most probable genome assembly, following truncation of SC11 into two independent regions, and re-assembly of the 5' end of SC11 (in reverse order) to the 3' end of SC6. With this re-assembly, telomeric repeats are located at the end of the reconstructed SC, and the *AvrLm10* locus is located between the *MycPKS* marker and the 3' end of the chromosome.

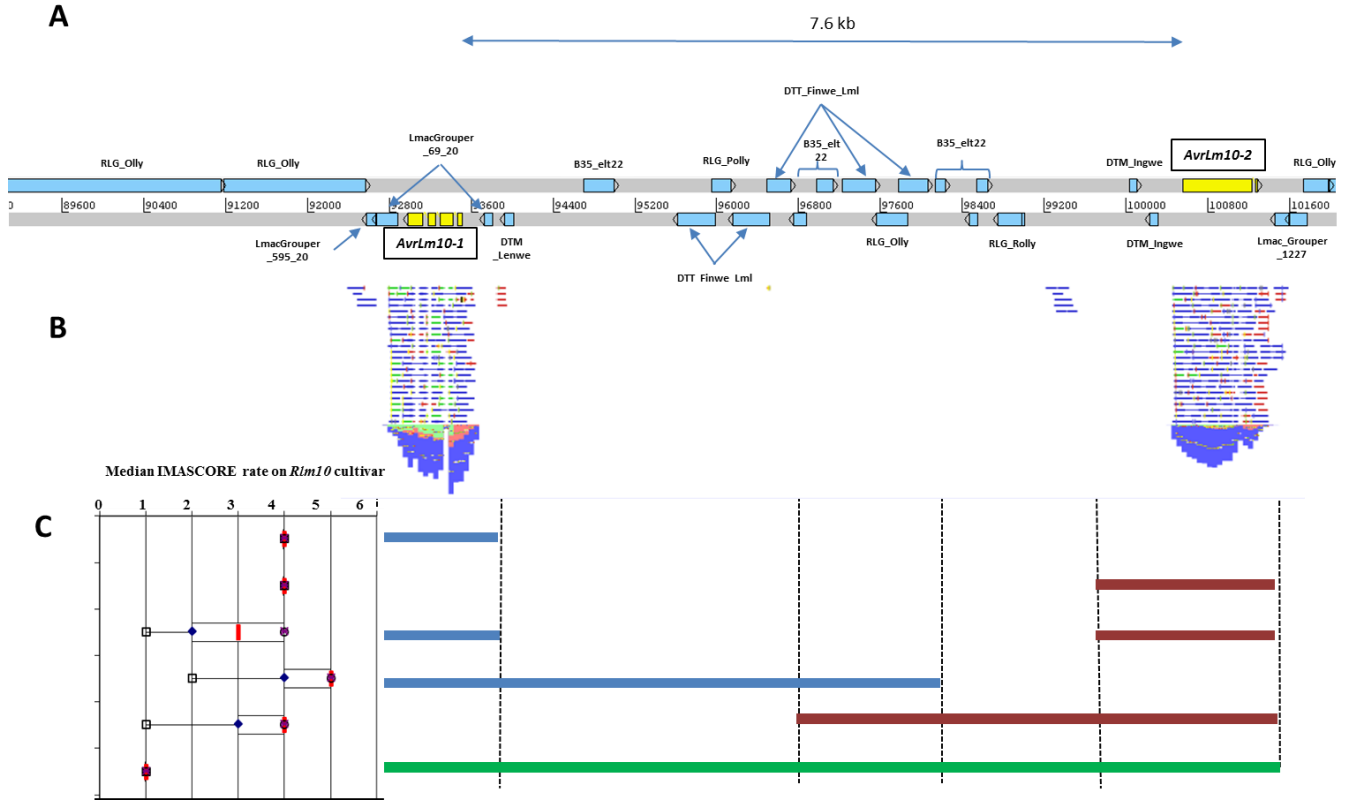


Fig. 2. AvrLm10-1, AvrLm10-2 and the intergenic region between the two genes are necessary to induce Rlm10-mediated recognition.

A. A focused Artemis view (Rutherford et al., 2000) of the intergenic region between the two *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* genes. The two genes (with exon in yellow; note that *AvrLm10-2* has been reannotated using RACE PCR, departing from an inadequate automated prediction) are surrounded by a typical AT-rich genome environment made of mosaics of the most common high copy number retrotransposons of the genome (mostly RLG-Olly in pale blue). The two genes are transcribed in opposite directions. The 7.6 kb intergenic region is made of an unusual mosaic of low-to-medium copy numbers DNA-transposons and uncharacterized repeats interspersed with remnants of retrotransposons (Long Terminal Repeats of RLG_Rolly, RLG_Olly and RLG_Polly) and DNA transposons (Terminal Inverted Repeats of DTM_Lenwe and DTM_Ingwe), suggesting the region was subjected to intense transposition activity. Two related DNA transposons, DTT_Finwe-1.2_Lml and DTT_Finwe-3_Lml are represented as complete copies interrupted by LTRs of RLG_Rolly or RLG_Olly or by part of the uncharacterized element B3.5_element22. Note that the uncharacterized repeat LmacGrouper_69_20, specific to *L. maculans* 'brassicae', and only showing 10 copies in the genome surrounds *AvrLm10-1* and partially overlaps both with the 5' and the 3' UTR of the gene.

B. Mapping of RNAseq reads against v23.1.3 genome was performed using the CLC Genomic workbench. RNA-seq data corresponded to cotyledons of the susceptible cultivar Darmor-

bzh infected by v23.1.3 7dpi (Plissonneau *et al.*, 2016).

C. Complementation assays using different combinations of *AvrLm10-1* / *AvrLm10-2* genomic region. Constructs containing *AvrLm10-1*, *AvrLm10-2* or both genes were transformed into v70.94, an isolate virulent towards *Rlm10*. Transformants carrying *AvrLm10_1*, *AvrLm10_2* or both genes were inoculated on cotyledons of a cultivar carrying *Rlm10* (Fu-Eurol 74) or of a susceptible cultivar (Westar; see Fig S2). Pathogenicity was scored 13 dpi. Results are expressed as a mean scoring using the IMAScore rating comprising six infection classes (IC), where IC1 to IC3 corresponded to resistance and IC4 to IC6, to susceptibility (Balesdent *et al.*, 2005) and represented using box-plots.

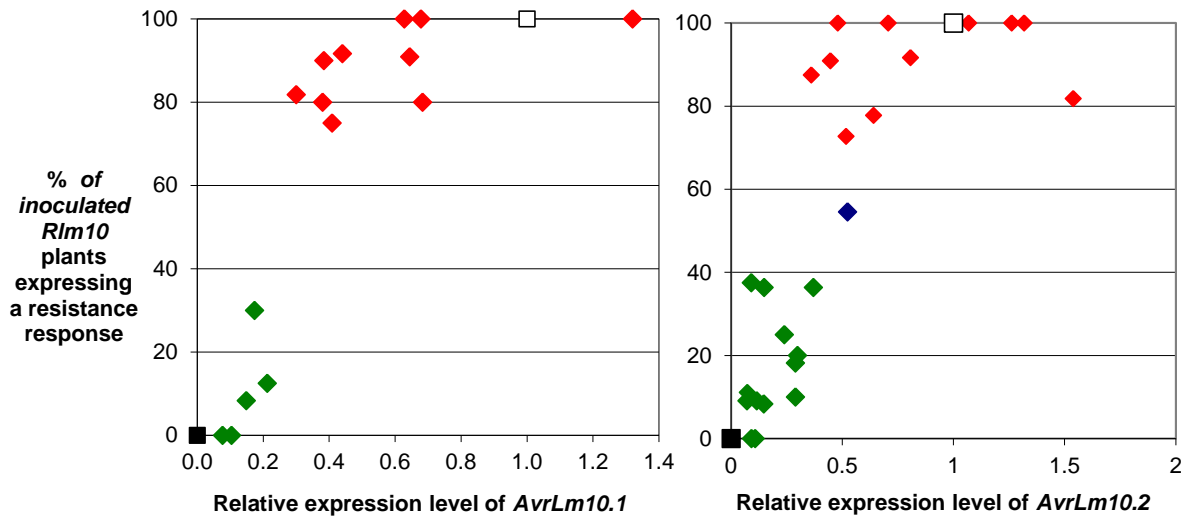


Figure 3. Interaction phenotypes of *Leptosphaeria maculans* isolates silenced for two *AvrLm10* candidate genes, in relation to the relative expression of the genes.

Each dot corresponds to one isolate inoculated on *Rlm10* plants. In (A) and (B) diamonds correspond to isolates silenced for Lema_P086540.1 and Lema_P086550.1, respectively. White square, the avirulent wild type isolate JN3; black square, the virulent isolate HB-S7. Each isolate was inoculated on 10-12 *Rlm10* plants. The percentage of plants showing a resistance reaction (disease rating <3 on a 1-6 scale) was measured. The relative expression level was estimated following qRT-PCR from RNA extracted from infected cotyledons of the susceptible control plants Westar, 7 days post inoculation (the time of peak expression of the *L. maculans* effector genes). The experiment was repeated twice with similar results.

A

		Mating control	Selection			
AD	BD	-LT	-LTHA	-LT + Au	-LTHA + Au	
AvrLm10-1	AvrLm10-2					
AvrLm10-1						
	AvrLm10-2					
T	P53					
T	Lam					

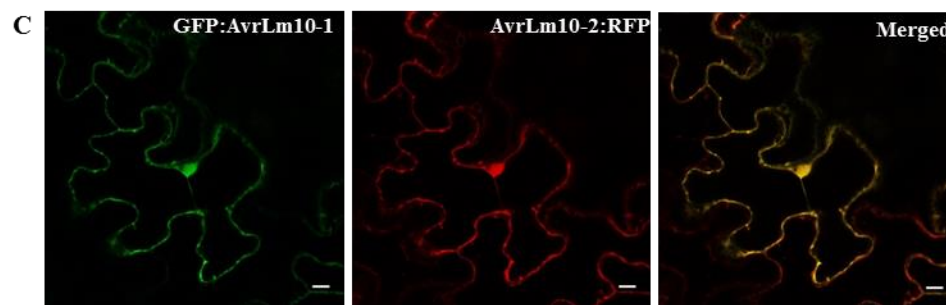
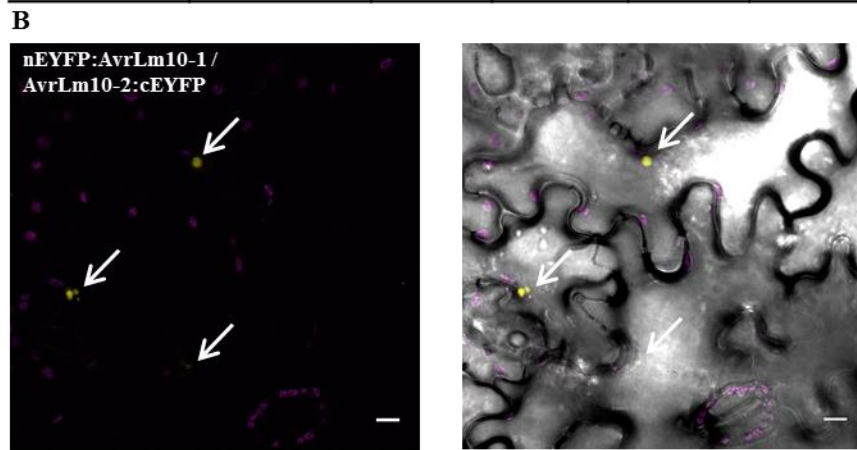


Figure 4: AvrLm10-1 and AvrLm10-2 physically interact in the yeast two-hybrid system and *in planta*.

A. Interaction of AvrLm10-1 with AvrLm10-2 constructs was assayed by a yeast two-hybrid experiment. Activation Domain (AD):AvrLm10-1 and Binding Domain (BD):AvrLm10-2 vectors alone were used as controls. A positive control (the diploid strain Y187-T x Y2HGold-P53) and a negative control (the diploid strain Y187-T x Y2HGold-Lam) were included. Cultures of diploid yeast clones were adjusted to an OD of 0.1 and spotted on synthetic Quadruple Drop-Out (QDO) medium (-Trp/-Leu/-Ade/-His) and on QDO + aureobasidin (-Trp/-Ade/-His + aureobasidin) to

assay for interactions and on Double Drop-Out (DDO) medium (-Trp/-Leu) to monitor growth of diploids. Pictures were taken after 5 days of growth.

B. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) constructs of nEYFP-AvrLm10-1 or nEYFP-AvrLm4-7 and AvrLm10-2-cEYFP were transiently co-expressed in *N. benthamiana* leaves using *A. tumefaciens*. Fluorescence was detected by confocal microscopy. Yellow fluorescence (highlighted by white arrowheads) is due to complementation of the yellow fluorescent protein (YFP) halves and indicates that AvrLm10-1 and AvrLm10-2 likely interact. Magenta fluorescence corresponds to chloroplast autofluorescence. nEYFP-AvrLm4-7 and AvrLm10-2-cEYFP coexpression serve as a negative control (AvrLm4-7 having the same nucleocytoplasmic localisation as AvrLm10-1 and AvrLm10-2 in tobacco cells; Fig. S4). Scale bars represent 10 μm .

C. Single-plane confocal images of tobacco epidermal leaf cells infiltrated with *A. tumefaciens* and expressing GFP-AvrLm10-1 and AvrLm10-2-RFP 48 hpi. GFP-AvrLm10-1- and AvrLm10-2-RFP were detected in both the cytoplasm and the nucleus of *N. benthamiana* epidermal cells. Immunoblot analysis with anti-GFP and anti-RFP antibodies confirmed proper expression of the recombinant proteins (Fig. S4). Scale bars represent 10 μm .

Supporting Information

Methods S1: Vector construction for complementation, silencing and transient expression.

Methods S2: Protein extraction and western blotting

Fig. S1: Expression of AvrLm10_1 and AvrLm10_2 during oilseed rape infection.

Fig. S2: Complementation assays in order to identify AvrLm10.

Fig. S3: Immunoblotting shows expression of GFP-AvrLm10-1 and AvrLm10-2-RFP in tobacco leaves.

Fig. S4: As a BiFC negative control, the *L. maculans* effector AvrLm4-7 does not physically interact with AvrLm10-2

Fig. S5: Relationship between the residual expression of two effector genes and the mean leaf lesion size developed on susceptible varieties.

Table S1: Primers used for vector constructions and qRT-PCR

Table S2: vectors used in this study. Vectors for complementation and silencing experiments are homemade. Vectors for transient expression assays are from Martin et al. (2009).

Table S3: Analysis of the “variable leaf lesion size” as a function of the variety and the isolate used

Methods S1: Vector construction for complementation, silencing and transient expression.

The binary vector pPZPnat1, which carries the nourseothrycin acetyltransferase gene (*nat1*) conferring resistance to the antibiotic nourseothricin, was used in all *Agrobacterium-tumefaciens* mediated transformation of *L. maculans*.

For functional complementation experiments, six different vectors were constructed. A first fragment of 1214 bp containing the *AvrLm10-1* gene along with its promoter region and the beginning of the TE sequences bordering this gene was amplified using the primers AvrLm10-1 SpeF which contains a *SpeI* site and AvrLm10-1 XbaR which contains a *XbaI* site. A second fragment of 5500 bp containing also the *AvrLm10-1* gene along with a sequence of 4675 bp upstream its initiation codon was amplified using the primers ForwAvrLm10-1 with a flanking *SacII* site and RevAvrLm10-1 with a flanking *PacI* site. A third fragment of 1811 bp containing the *AvrLm10-2* gene along with its promoter sequence was amplified using the primers AvrLm10-2F and AvrLm10-2R. A fourth fragment of 4670 pb containing the *AvrLm10-2* gene along with a sequence of 3765 bp upstream of its initiation codon was amplified using the primers ForwAvrLm10-2 with a flanking *PacI* site and RevAvrLm10-2 with a flanking *XhoI* site. A fifth fragment of 8890 pb containing the *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* genes along with the long intergenic region of 7220 bp separating these two head-to-tail genes was amplified with ForwAvrLm10-1 and RevAvrLm10-2. The resulting PCR products were inserted into pGEM-T Easy vector (Promega, France), generating vectors pGEM-AvrLm10-1, pGEM-AvrLm10-1long, pGEM-AvrLm10-2, pGEM-AvrLm10-2long and pGEM-AvrLm10-1long + AvrLm10-2long, respectively. The orientation of the insert of pGEM-AvrLm10-1long, pGEM-AvrLm10-2long and pGEM-AvrLm10-1long + AvrLm10-2long was checked by sequencing the extremities of these plasmids.

The 1.2 kb *XbaI/SpeI* fragment of pGEM-AvrLm10-1, the 5.5 kb *SacII/SalI* fragment of pGEM-AvrLm10-1long, the 1.8 kb *SacII/SpeI* fragment of pGEM-AvrLm10-2, the 4.7 kb *SacII/XhoI* fragment of pGEM-AvrLm10-2long and the 8.9 kb *SacII/XhoI* fragment of pGEM-AvrLm10-1 + AvrLm10-2 were inserted into pPZPnat1 linearized with the corresponding restriction enzymes, yielding plasmids pPZPnat1-AvrLm10-1, pPZPnat1-AvrLm10-1long, pPZPnat1-AvrLm10-2, pPZPnat1-AvrLm10-2long and pPZPnat1-AvrLm10-1long + AvrLm10-2long.

To construct a plasmid containing the *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* genes in the same orientation without the intergenic region, the orientation of the insert of pPZPnat1-AvrLm10-2 was first determined by digesting this plasmid with *MspI*. Then, the 1.2 kb *SpeI* fragment of pGEM-AvrLm10-1 was inserted into *SpeI*-linearized pPZPnat1-AvrLm10-2 and the orientation of the newly inserted fragment was checked by digesting the plasmid with *XbaI*. The resulting plasmid was named pPZPnat1-AvrLm10-1 + AvrLm10-2.

The two silencing vectors were constructed by inserting two inversely oriented fragments for *AvrLm10-1* and for *AvrLm10-2* into pJK11. These fragments were PCR amplified with primers SilAvrLm10-1*HindIII*F1 / SilAvrLm10-1*Bam*HIR1 and primers SilAvrLm10-1*EcoRI*F2 / SilAvrLm10-1*Bam*HIR2 and with primers SilAvrLm10-2*HindIII*F1 / SilAvrLm10-2*Bam*HIR1 and primers SilAvrLm10-2*EcoRI*F2 / SilAvrLm10-2*Bam*HIR2 using cDNA as template. The resulting PCR products were digested and ligated into the *HindIII/EcoRI*-linearized pJK11 vector. The resulting plasmids place the hairpin inverted repeat fragments under the control of the promoter of *Glomerella cingulata pgdA* and the terminator of *Aspergillus nidulans trpC*. These expression cassettes were excised by *XhoI* and *SpeI*, and subcloned into the corresponding sites of pPZPnat1, generating vectors pPZPnat1-AvrLm10-1sil and pPZPnat1-AvrLm10-2sil.

The different constructs were then introduced into *A. tumefaciens* strain C58pGV2260 by electroporation at 1.5 kV, 200 ohms and 25 μ F.

To generate *AvrLm10-1*, *AvrLm10-2* and *AvrLm4-7* Gateway-compatible constructs, *AvrLm10-1*, *AvrLm10-2* and *AvrLm4-7* were amplified from just downstream the signal peptide cleavage site until the stop codon using cDNA obtained from total RNAs from JN3 mycelium, Phusion polymerase (New England Biolabs), and standard PCR conditions. PCR primers used in this study are listed in Table X. PCR products flanked by the *attB* sites were recombined in the Gateway-compatible entry vector pDONR221 (Invitrogen) via a BP reaction to obtain the corresponding entry clones with *attL* sites. Inserts cloned into the entry clones were subsequently recombined into the destination vectors pSite-2CA, pSite-6C1, pSite-nEYFP-C1, pSite-nEYFP-N1, pSite-cEYFP-C1 and pSite-cEYFP-N1 (Martin et al., 2009) via an LR reaction to create the expression constructs. Those expression constructs were then transformed into *A. tumefaciens* strains C58C1 or GV3101::pMP90 as described previously.

Methods S2: Protein extraction and western blotting

0.5 g of leaves were ground in 1 ml of 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 mM EDTA, 1% SDS, 1% β -mercapto-ethanol, 10% glycerol, 0.025% bromophenol blue, 1 mM PMSF protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher, Rockford, USA) and were centrifuged at 5000 g for 15 min at 4°C. Supernatant was boiled with 4X Laemmli Sample Buffer (Biorad, Hercules, USA) for 5 min. 15 μ l of samples were run through a 10% polyacrylamide gel containing SDS. After electrophoresis, proteins were blotted onto PVDF membranes using semi-dry blotting for 30 min at 15 V (Biorad, Hercules, USA). Skimmed milk powder (5%) was used as blocking agent and hybridization was carried out in the presence of 0.05% Tween 20. Mouse anti-GFP antibody was used at a 1:10,000

dilution (Invitrogen, Camarillo, USA) and monoclonal anti -RFP (RF5R) at a 1:2000 dilution (Thermo Fisher, Rockford, USA)). As secondary antibody Goat-anti-mouse conjugated with horseradish peroxidase (Dako,Glostrup,Denmark) was used at a 1:20.000 dilution. The presence of the antigenic proteins was visualized using ECL Immobilon (Millipore, Billerica, USA).

Table S1: Primers used for vector constructions and qRT-PCR

AvrLm10-1noPS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGACTTGCACGACTTCTGCGC
AvrLm10-1stop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACCTAAGACAAATAATAGAGCCG
AvrLm10-1nostop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTAAGACAAATAATAGAGCCG
AvrLm10-2noPS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGCCACTCGACAATCCATTTC
AvrLm10-2stop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACATATTTTGCCAATCTCCAATAAAGC
AvrLm10-2nostop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATATTTTGCCAATCTCCAATAAAGC
AvrLm4-7noPS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTGTAGAGAGGCCTCAATATC
AvrLm4-7stop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGTCGCAACCACGAGTCCTTG
AvrLm4-7nostop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGTCGCAACCACGAGTCCTTG
AvrLm10-1 SpeF	GCTAGGGTAACTAGTAACTCCCCT
AvrLm10-1 XbaR	GAGCTCTAGATTCTCCTGGGGTACG
ForwAvrLm10-1	AAACCGCGGAGCTCTATTTTCTCCTGGGGTACG
RevAvrLm10-1	GGGTTAATTAAGTTTAGGTTATGTTAGGGTCGTC
AvrLm10-2F	CTGCAAGTCGACCCATAGTAAGCA
AvrLm10-2R	ATCCTAACAAGCTTGCGCATAGACG
ForwAvrLm10-2	CCCTTAATTAACCCTATTAGGTAAAGCGTGTGG
RevAvrLm10-2	GGCTCGAGATCCTAACAAGCAAGCGCATAGACG
5'raceAvrLm10-1	CACGAGAGTTGGTCCCGTAT
3'raceAvrLm10-1	ATGCTTGCCTGGAAGACAGT
5'raceAvrLm10-2	CCGTTGCCTATTGATGGTTC
nested5'raceAvrLm10-2	GGTATTTTCGTGGGTGGTGTC
3'raceAvrLm10-2	GCGACAGGAATCACAACCTT

nested3'raceAvrLm10-2	CTTGGAACCCAATGTTGACC
SilAvrLm10-1HindIII1	GAGAGAAAGCTTTCAAAAAGCGGCCTTCTC
SilAvrLm10-1EcoRIF2	GAGAGAGAATTCTCAAAAAGCGGCCTTCTC
SilAvrLm10-1BamHIR1	GAGAGAGGATCCTCAATGCGGCCTGTTTCT
SilAvrLm10-1BamHIR2	GAGAGAGGATCCGAAGTTAAGAGAGCAGGTGAGG
SilAvrLm10-2HindIII1	GAGAGAAAGCTTCTCATTTCATCTCCTACCAACG
SilAvrLm10-2EcoRIF2	GAGAGAGAATTCCTCATTTCATCTCCTACCAACG
SilAvrLm10-2BamHIR1	GAGAGAGGATCCTCAAAGGTGACTCGATAGCC
SilAvrLm10-2BamHIR2	GAGAGAGGATCCGGATATTCAAAGGGGGTTGAGC
AvrLm10_1QF	ACAGGAGAACACTGACGGCT
AvrLm10_1QR	GCATGGACTATCGTAGCGTTAT
AvrLm10_2QF	ATGTAAATAACGTAGGAAAGGATATTCA
AvrLm10_2QR	TTGACCCTGGCTTTCGTTTC
TubQF	aagaactcactcctactcgt
TubQR	TGAATAGCTCCTGAATGG
ActQF	AGTGCGATGTTCGATGTCAG
ActQR	AAGAGCGGTGATTTCTTCT
pGBKT7AvrLm10-1noPS-EcoRIU	GAGAGAGAATTCGACTTGCACGACTTCTGCGC
pGBKT7AvrLm10-1nostop-BamHIL	GAGAGAGGATCCCCCTAAGACAAATAATAGAGCCG
pGBKT7AvrLm10-2noPS-EcoRIU	GAGAGAGAATTCGCGCCACTCGACAATCCATTTTC
pGBKT7AvrLm10-2nostop-BamHIL	GAGAGAGGATCCCCATATTTTGCCAATCTCCAATAAAGC

Table S2: vectors used in this study. Vectors for complementation and silencing experiments are homemade. Vectors for transient expression assays are from Martin et al. (2009).

Experiments	Vector	Description
Complementation	pPZPnat1-AvrLm10-1	
	pPZPnat1-AvrLm10-1long	
	pPZPnat1-AvrLm10-2	
	pPZPnat1-AvrLm10-2long	
	pPZPnat1-AvrLm10-1+AvrLm10-2	
	pZPnat1-AvrLm10-1long + AvrLm10-2long	
Silencing	pPZPnat1-[AvrLm10-1si]	
	pPZPnat1-[AvrLm10-2]	
Transient expression	pSite-2CA-AvrLm10-1noPS	EGFP transient/stable expression vector.
	pSite-6C1-AvrLm10-2noPS	TagRFP transient/stable expression vector.
	pSite-6C1-AvrLm4-7noPS	TagRFP transient/stable expression vector.
	pSite-nEYFP-N1-AvrLm10-1noPS	Half-YFP transient/stable expression vector.
	pSite-nEYFP-C1-AvrLm10-1noPS	Half-YFP transient/stable expression vector.
	pSite-cEYFP-N1-AvrLm10-1noPS	Half-YFP transient/stable expression vector.
	pSite-cEYFP-C1-AvrLm10-1noPS	Half-YFP transient/stable expression vector.
	pSite-nEYFP-N1-AvrLm10-2noPS	Half-YFP transient/stable expression vector.
pSite-nEYFP-C1-AvrLm10-2noPS	Half-YFP transient/stable expression vector.	

pSite-cEYFP-N1-AvrLm10-2noPS	Half-YFP transient/stable expression vector.
pSite-cEYFP-C1-AvrLm10-2noPS	Half-YFP transient/stable expression vector.
pSite-nEYFP-N1-AvrLm4-7noPS	Half-YFP transient/stable expression vector.
pSite-nEYFP-C1-AvrLm4-7noPS	Half-YFP transient/stable expression vector.
pSite-cEYFP-N1-AvrLm4-7noPS	Half-YFP transient/stable expression vector.
pSite-cEYFP-C1-AvrLm4-7noPS	Half-YFP transient/stable expression vector.

Table S3: Analysis of the “variable leaf lesion size” as a function of the variety and the isolate used

Source of variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean Sum of Squares	F	Pr > F
for <i>AvrLm10-1</i>					
Variety	1	1792.940	1792.940	36.370	< 0.0001
isolate	8	2280.981	285.123	5.784	0.001
Variety*isolate	8	367.868	45.984	0.933	0.514
for <i>AvrLm10-2</i>					
Variety	1	9079.020	9079.020	47.493	< 0.0001
isolate	14	7626.351	544.739	2.850	0.000
Variety*isolate	14	2558.290	182.735	0.956	0.498

For each series of silenced isolates (i.e nine isolates resulting from RNAi silencing of *AvrLm10-1*, upper part of the table, or 15 isolates for resulting from RNAi silencing of *AvrLm10-2*, lower part), two varieties (AVISO and ES Astrid) were inoculated at 12 to 20 inoculation sites. Leaf lesions were measured at 12 dpi and the experiment was repeated twice.

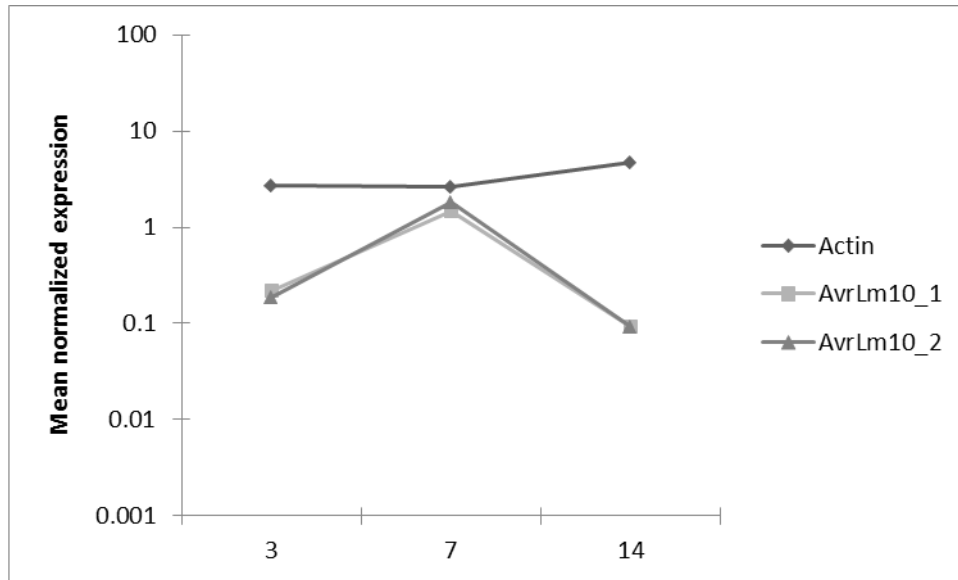


Figure S1: Expression of *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* during oilseed rape infection.

Expression of *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* was analyzed in the avirulent isolate v23.1.3 by quantitative RT-PCR. 3-14, RT-PCR products obtained from RNA isolated from oilseed rape cotyledons (Westar) 3 to 14 days post-infection. RNA extracted from uninfected cotyledons and water were used as negative controls. Actin was used as control of gene constitutively expressed. Gene expression levels are relative to β - β -tubulin. Each time point is the average of two biological and two technical replicates.

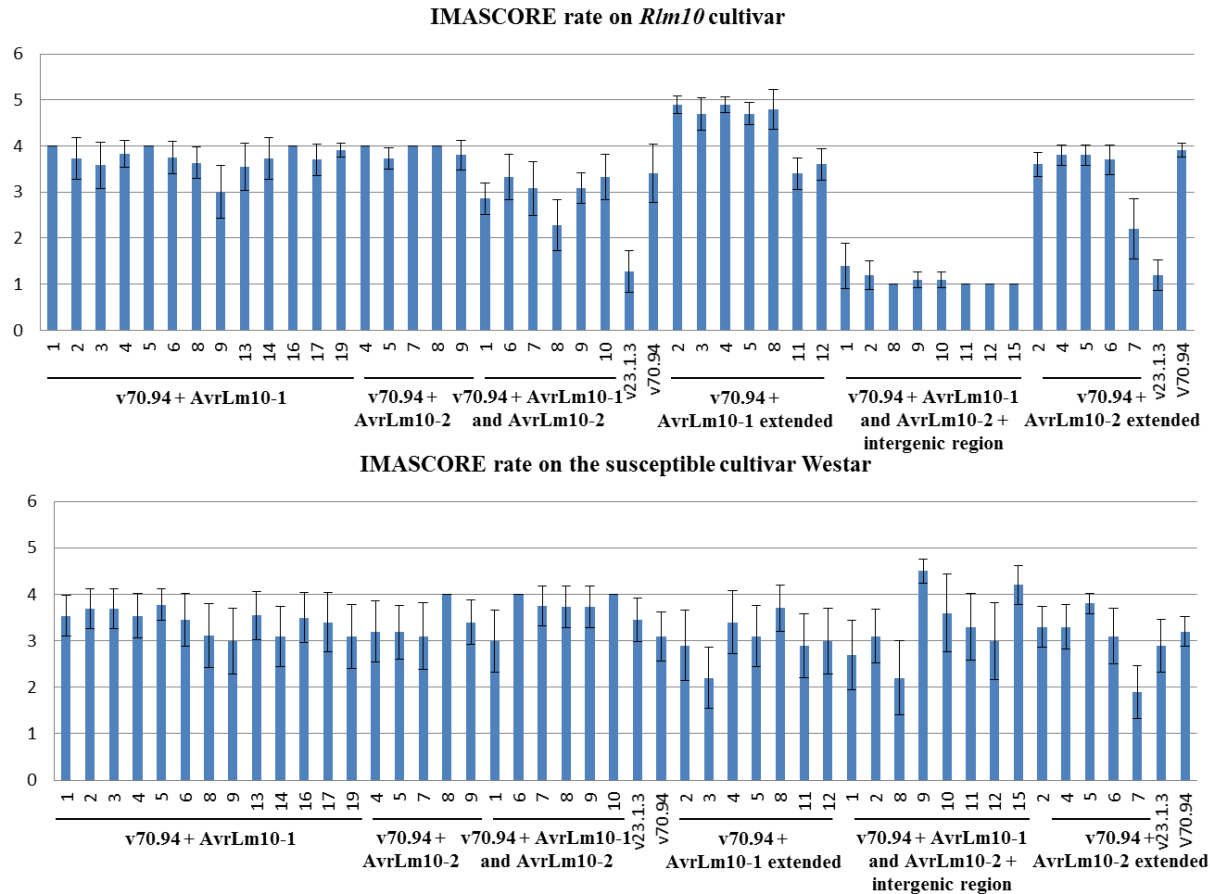


Figure S2: Complementation assays in order to identify *AvrLm10*

Wild type isolates v23.1.3 (avirulent on *Rlm10*) and v70.94 (virulent on *Rlm10*) and v70.94 transformants carrying *AvrLm10-1*, *AvrLm10-2* or both genes were inoculated on cotyledons of a cultivar carrying *Rlm10* (FuEurol74, A) or of a susceptible cultivar (Westar, B). Pathogenicity was measured 13 dpi. Results are expressed as a mean scoring using the IMASCORE rating comprising six infection classes (IC), where IC1 to IC3 corresponded to resistance and IC4 to IC6, to susceptibility (Balesdent et al., 2006). Error bars indicate the standard deviation of technical replicates.

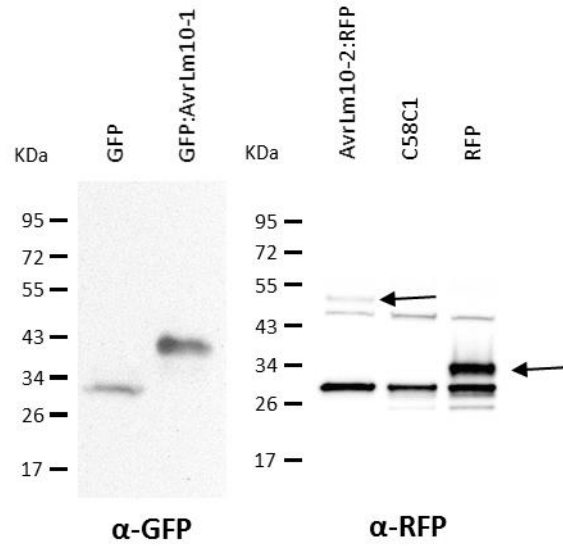


Figure S3: Immunoblotting shows expression of GFP-AvrLm10-1 and AvrLm10-2-RFP in tobacco leaves

GFP-AvrLm10-1 and AvrLM10-2-RFP were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves by *Agrobacterium* infiltration. Protein extracts were analyzed by immunoblotting with anti-GFP (α -GFP) and anti-RFP (α -RFP) antibodies.

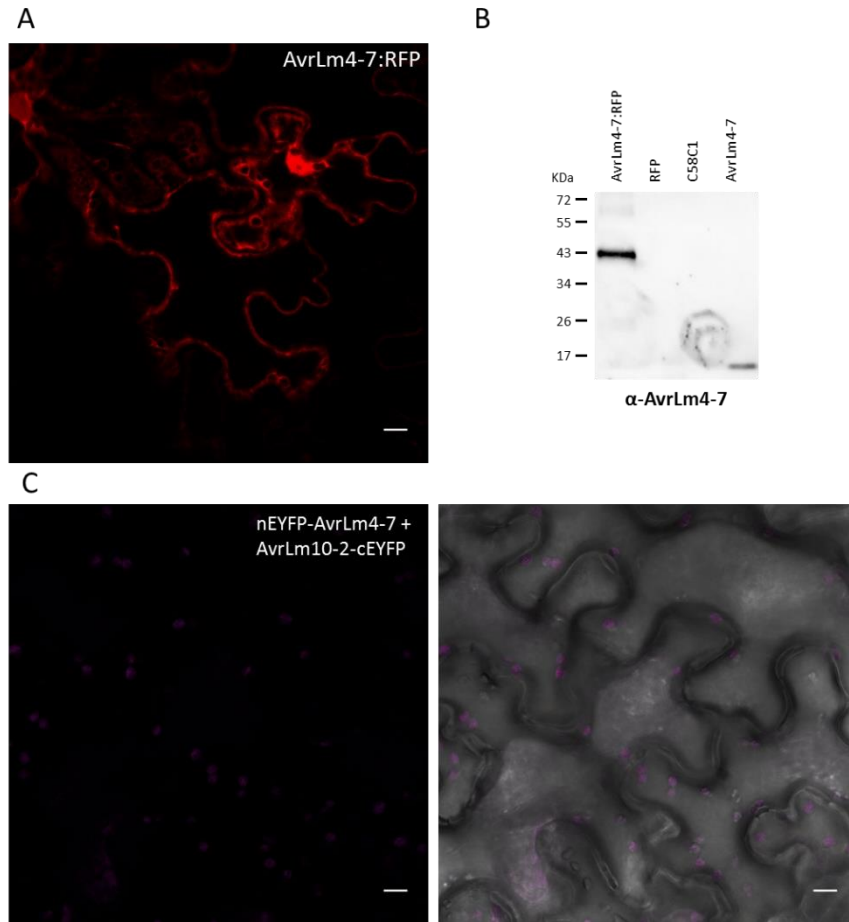


Figure S4: As a BiFC negative control, the *L. maculans* effector AvrLm4-7 does not physically interact with AvrLm10-2

A: Single-plane confocal images of tobacco epidermal leaf cells infiltrated with *A. tumefaciens* and expressing AvrLm4-7-RFP 48 hpi. AvrLm4-7-RFP was detected in both the cytoplasm and the nucleus of *N. benthamiana* epidermal cells. Scale bar represents 10 μ m.

B: Immunoblot analysis with anti-AvrLm4-7 antibody confirmed proper expression of the recombinant protein. AvrLm4-7-RFP was transiently expressed in *N. benthamiana* leaves by *Agrobacterium* infiltration. Protein extracts were analyzed by immunoblotting anti-AvrLm4-7 (α -AvrLm4-7) antibody.

C: Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) constructs of AvrLm10-2-cEYFP and nEYFP-AvrLm4-7 were transiently co-expressed in *N. benthamiana* leaves using *A. tumefaciens*. Fluorescence was detected by confocal microscopy. Absence of yellow fluorescence indicates that AvrLm4-7 and AvrLm10-2 do not interact. Magenta fluorescence corresponds to chloroplast autofluorescence. Scale bars represent 10 μ m.

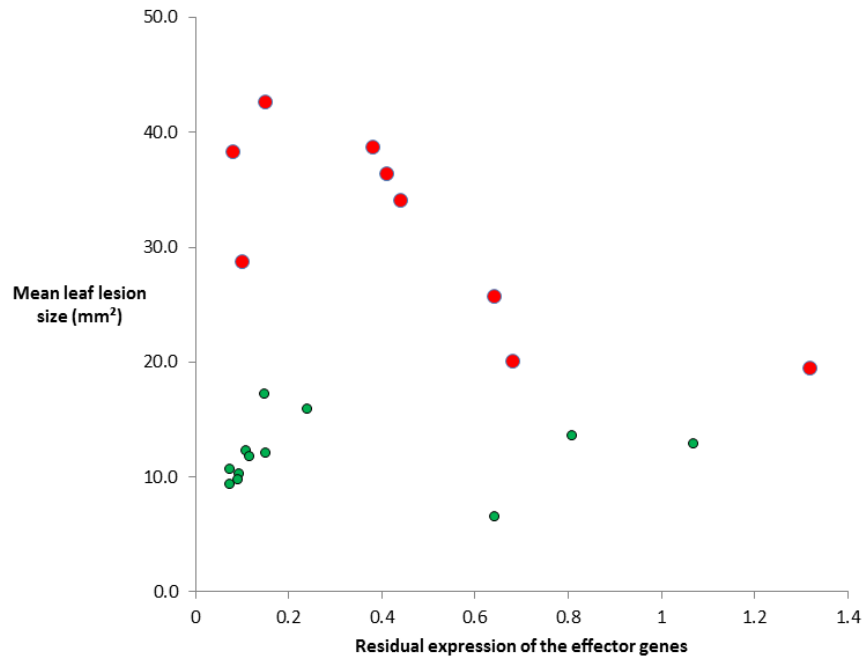


Fig. S5: Relationship between the residual expression of two effector genes and the mean leaf lesion size developed on susceptible varieties.

Red and green dots: isolates obtained following RNAi silencing of *Avrlm10-1* and *AvrLm10-2*, respectively. The relative expression level was estimated following qRT-PCR from RNA extracted from infected cotyledons of the susceptible control plants Westar, 7 dpi (the time of peak expression of the *L. maculans* effector genes). Each dot corresponds to one isolate inoculated on two susceptible plant genotypes. Each isolate was inoculated on 10-12 plants of each plant genotype and the leaf lesion area was measured 12 dpi. Silencing of *Avrlm10-2* has no effect on leaf lesion size, while silencing of *Avrlm10-1* increases the leaf lesion size.

Résultats complémentaires

1. Identification de cibles végétales d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 par crible double

hybride

Dans le but de mieux comprendre le mode d'action d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2, j'ai cherché à déterminer leurs cibles végétales grâce à la technique du double hybride dans la levure. Le crible a été réalisé contre une banque d'ADNc obtenus suite à l'infection d'un cultivar de colza 02.23.3.1 (*Rlm7*) par la souche de *L. maculans* 19.4.24 (interaction compatible ; AvrLm3 avrLm7), afin d'enrichir la banque en transcrits pertinents dans le cas d'une infection. Les prélèvements ont été faits à 3, 7 et 14 jours post-infection sur cotylédons de colza.

J'ai effectué plusieurs cribles avec AvrLm10-1 et AvrLm10-2 séparément. Lorsqu'un crible de ce type est fait, on s'attend dans un premier temps à trouver beaucoup de clones (de l'ordre de 500, répartis sur une centaine de boîtes), qui sont repiqués sur des milieux de croissance plus sélectifs afin de se débarrasser des faux positifs (cf : Matériels et Méthodes). Cependant, dans le cas d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2, j'ai obtenu à chaque fois beaucoup plus de clones (entre 6000 et 7000 pour chaque crible), et le repiquage d'une partie de ces clones sur des milieux plus stringents ne m'a pas permis de réduire le nombre d'interactants potentiels.

Tableau 1 : Cibles végétales potentielles d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 identifiées par crible double hybride.

Fonction	Compartiment cellulaire*	Nombre d'occurrences*	Clones**		
Pathogenesis-related protein 1-like	Apoplasme	3	<u>55, 86, 124</u>	ADNc plante	
Cathepsin B-like	Apoplasme	1	<u>63</u>		
Fatty acid 2-hydroxylase	Cytoplasme	1	<u>56</u>		
Unknown	unknown	1	<u>74</u>		
Uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	unknown	2	<u>65, 70</u>		
Putative Chlorophyl a-b binding protein	Chloroplaste	2	<u>61, 102</u>		
Beta-galactosidase 4	Cytoplasme	2	<u>59, 99</u>		
Kunitz-type protease inhibitor	Cytoplasme	3	<u>4, 84, 92</u>		
Probable Serine/Threonine protein kinase	Cytoplasme	1	<u>26</u>		
<i>Leptosphaeria maculans</i> JN3 hypothetical protein	ND	1	NA		ADNc Leptosphaeria
Similar to 40S ribosomal protein S16	ND	2	NA		
<i>Leptosphaeria maculans</i> JN3 predicted protein	ND	1	NA		
<i>Leptosphaeria maculans brassicae</i> wa74_scaffold00178 complete sequence	ND	1	NA		
<i>Leptosphaeria maculans</i> JN3 hypothetical protein (structural components of ribosome?)	ND	3	NA		
Similar to lanthionine synthetase C-like protein 1	ND	1	NA		
Similar to sodium P-type ATPase	ND	2	NA		
<i>Leptosphaeria maculans brassicae</i> wa74_scaffold00658 complete sequence	ND	1	NA		
PREDICTED: <i>Octopus bimaculoides</i> trithorax group protein osa-like	ND	1	NA	ADNc divers	
<i>Nematostella vectensis</i> predicted protein	ND	1	NA		
Yeast two-hybrid vector pGADCg	ND	3	NA		
Empty	ND	1	NA		

* : nombre de fois où ce clone a été retrouvé durant le crible.

** : la prédiction du compartiment subcellulaire a été réalisée au moyen de l'utilitaire en ligne TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000).

***: numérotation des clones tel que présentée dans la validation des interactions par double-hybride (Figure 1). Les clones soulignés correspondent à des clones contenant un ADNc pour lesquels l'interaction physique a été validée.

AvrLm10-1 et AvrLm10-2 interagissant physiquement, j'ai fait l'hypothèse que la co-expression d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 lors du crible double-hybride et l'interaction entre ces deux protéines permettrait de masquer un « sticky domain », de stabiliser le complexe et de l'empêcher d'interagir de manière non-spécifique. J'ai donc réalisé le même crible double hybride avec une construction exprimant AvrLm10-1 et AvrLm10-2, séparées par un polylinker composé de glycines et d'acides aminés polaires (glutamine et asparagine ; Fig. 1A) afin de donner un maximum de flexibilité au complexe entre les deux protéines. Dans un premier temps, un grand nombre de clones a à nouveau été obtenu (environ 6500 clones sur 110 boîtes), mais le repiquage de 180 clones (pris sur l'ensemble des boîtes) sur milieux plus stringents a permis d'éliminer une partie des clones : seuls 34 de ces 180 clones ont poussé sur des milieux contenant du 3 amino-triazole (un inhibiteur de biosynthèse de l'histidine). Sur ces 34 clones poussant sur milieux sélectifs, 17 contenaient un ADNc de colza (correspondant à 9 gènes différents), 12 contenaient un ADNc de *L. maculans* correspondant à 8 gènes, et 5 contenaient un ADNc « indéterminé » correspondant à 4 gènes différents. *S. cerevisiae* a été co-transformée avec les 17 ADNc contenant des séquences issues de plantes et avec le plasmide exprimant AvrLm10-1 et AvrLm10-2 afin de valider ces interactions par double-hybride direct. L'interaction a été validée pour 15 de ces clones (Fig. 1B), correspondant à 8 protéines indiquées dans le Tableau 1. Certaines de ces protéines sont des « usual suspects » retrouvés dans la plupart des cribles double-hybride (e.g. Chlorophyl a-b binding protein). D'autres correspondent probablement à des protéines de levure ayant des orthologues chez la plante (beta-galactosidase 4). Mais certaines constituent des candidates prometteuses pouvant être ciblées par des effecteurs de champignon phytopathogène, comme la pathogenesis-related protein 1-like (PR1), ou la cathepsin B-like (une cystéine-protéase extracellulaire).

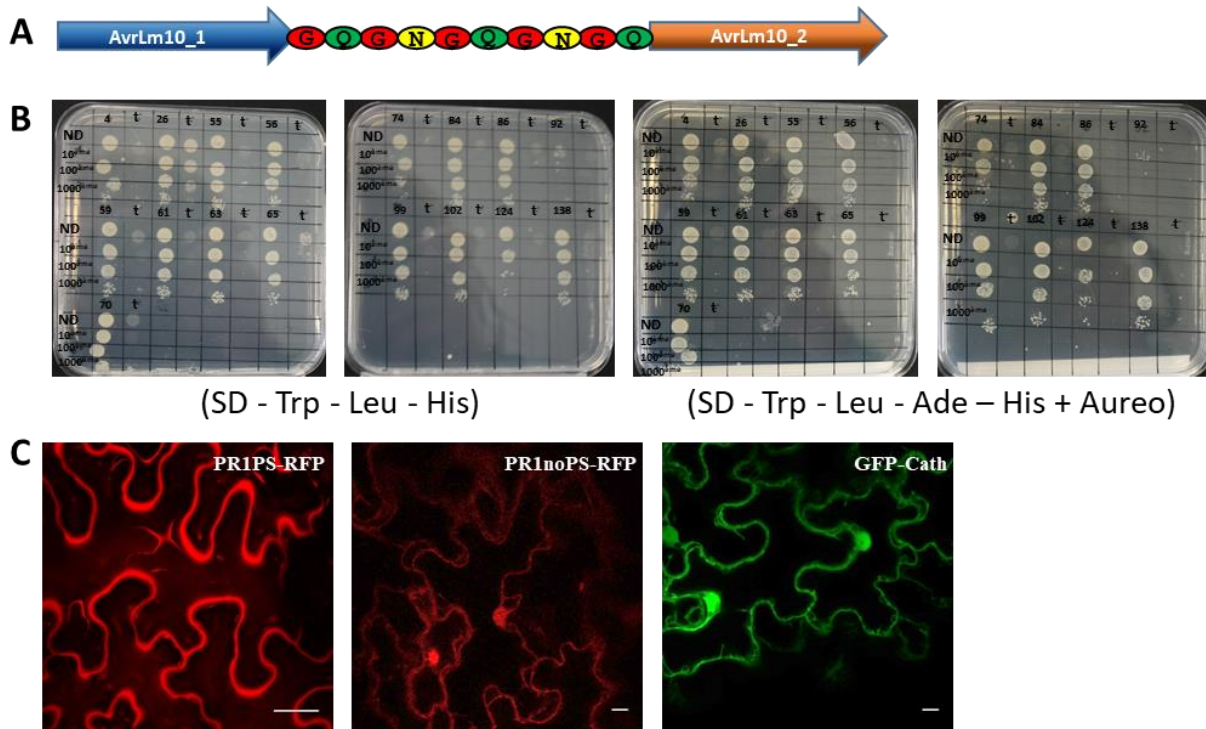


Figure 1 : Validation des cibles végétales potentielles d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 identifiées par crible double-hybride.

A : représentation schématique de la construction utilisée pour identifier par crible double-hybride les protéines interagissant avec le complexe AvrLm10-1 / AvrLm10-2. Les deux protéines recombinantes sont séparées par un « linker » de 10 acides aminés constitué de 5 glycines (G) et 5 acides aminés polaires (Asparagines – N – et Glutamine – Q). **B** : test double-hybride direct entre les levures transformées avec la construction décrite en A et les ADNc issus du crible double-hybride correspondant à des protéines végétales. Les deux milieux de sélection (SD – Trp – Leu – His et SD – Trp – Leu – His – Ade + Aureo) permettent de valider les interactants. ND : non-dilué. t : témoin négatif (test de l'interaction des cibles végétales potentielles avec la protéine p53). Les numéros de clones correspondent à ceux présentés dans le Tableau 1. **C** : expression transitoire de PR1 et de la Cathepsine de *B. napus* (*BnaA03g38630D* et *BnaAnng17870D* respectivement), fusionnés à la RFP et la GFP respectivement, dans *N. benthamiana*. La fluorescence a été observée par microscopie confocale 48h après infiltration, à un grossissement de x63. L'échelle représente 10 µm.

Ces deux cibles potentielles ont été sélectionnées pour une validation par BiFC *in planta*. J'ai cloné les gènes codant ces cibles dans un vecteur BiFC ainsi que dans des vecteurs permettant leur fusion à la GFP ou la RFP et j'ai exprimé transitoirement ces constructions dans des cellules épidermiques de feuilles de *N. benthamiana*. La protéine PR1 est localisée dans l'apoplasme lorsqu'elle est exprimée avec son peptide signal, et dans le cytoplasme et le noyau lorsqu'elle est exprimée sans. La cathepsine présente également une localisation nucléo-cytoplasmique lorsqu'elle est exprimé sans son peptide signal (Fig. 1C). Comme AvrLm10-1 et AvrLm10-2 semblent être tous deux nécessaires pour obtenir un complexe stable, ma stratégie a été d'exprimer la cible et un des effecteurs dans des vecteurs BiFC, et le deuxième effecteur dans un vecteur neutre (sans tag) permettant son expression constitutive (sous le même promoteur). Cependant, nous avons observé une fluorescence avec le vecteur neutre seul, ce qui ne nous a pas permis de conclure quant à l'interaction d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 avec PR1. La stratégie alternative que nous envisageons maintenant de tester est d'exprimer directement la construction AvrLm10-1-polylinker-AvrLm10-2 dans un vecteur BiFC.

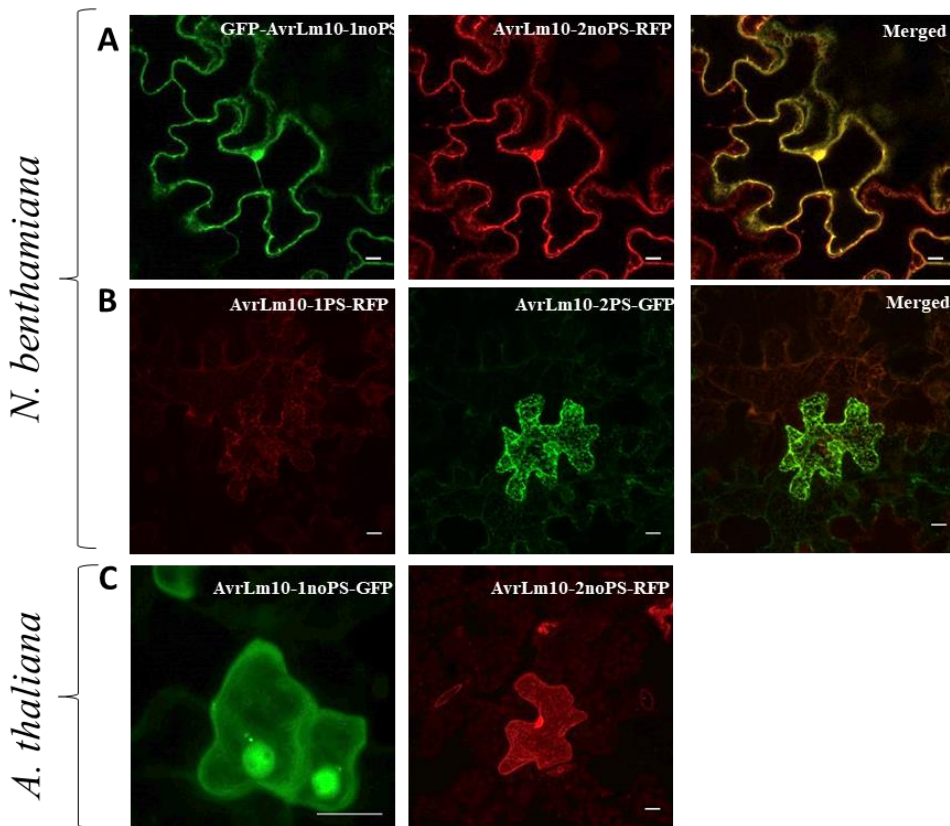


Figure 3: localisation subcellulaire d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 dans *N. benthamiana* et *A. thaliana*.

AvrLm10-1 et AvrLm10-2 ont été fusionnées à la GFP ou la RFP et ont été transitoirement exprimées dans *N. benthamiana* ou *A. thaliana*. La fluorescence a été observée par microscopie confocale 48h après infiltration, à un grossissement de x63.

A : expression transitoire d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 sans leurs peptides signaux dans *N. benthamiana*. **B :** expression transitoire d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 avec leurs peptides signaux dans *N. benthamiana*. **C :** expression transitoire d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 sans leurs peptides signaux dans *A. thaliana*. Les images correspondent à une projection maximale d'un ensemble d'images prises à différentes profondeurs. Les échelles représentent 10 μm.

2. Localisation subcellulaire d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2

Comme indiqué dans les résultats de l'article 2, AvrLm10-1 et AvrLm10-2 ont toutes les deux une localisation nucléo-cytoplasmique lorsqu'elles sont fusionnées à un fluorochrome et exprimées transitoirement dans *N. benthamiana* sans leur peptide signal (Fig. 3A). J'ai également testé la localisation d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 sans peptide signal dans une plante de la famille des *Brassicaceae*, *Arabidopsis thaliana* (Figure 3C). J'ai pu confirmer la localisation nucléocytoplasmique d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 dans cette plante plus proche phylogénétiquement du colza. On ne peut cependant pas exclure que ces effecteurs, qui sont sécrétés par *L. maculans* dans l'apoplasme, y restent localisés et ne soient pas transportés dans la cellule végétale. Afin de tester cette hypothèse, j'ai exprimé de façon transitoire *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* avec leur peptide signal dans le tabac. Dans ce contexte, la fluorescence a été observée dans le réticulum endoplasmique, même lorsqu'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* sont co-exprimées (Fig. 3B).

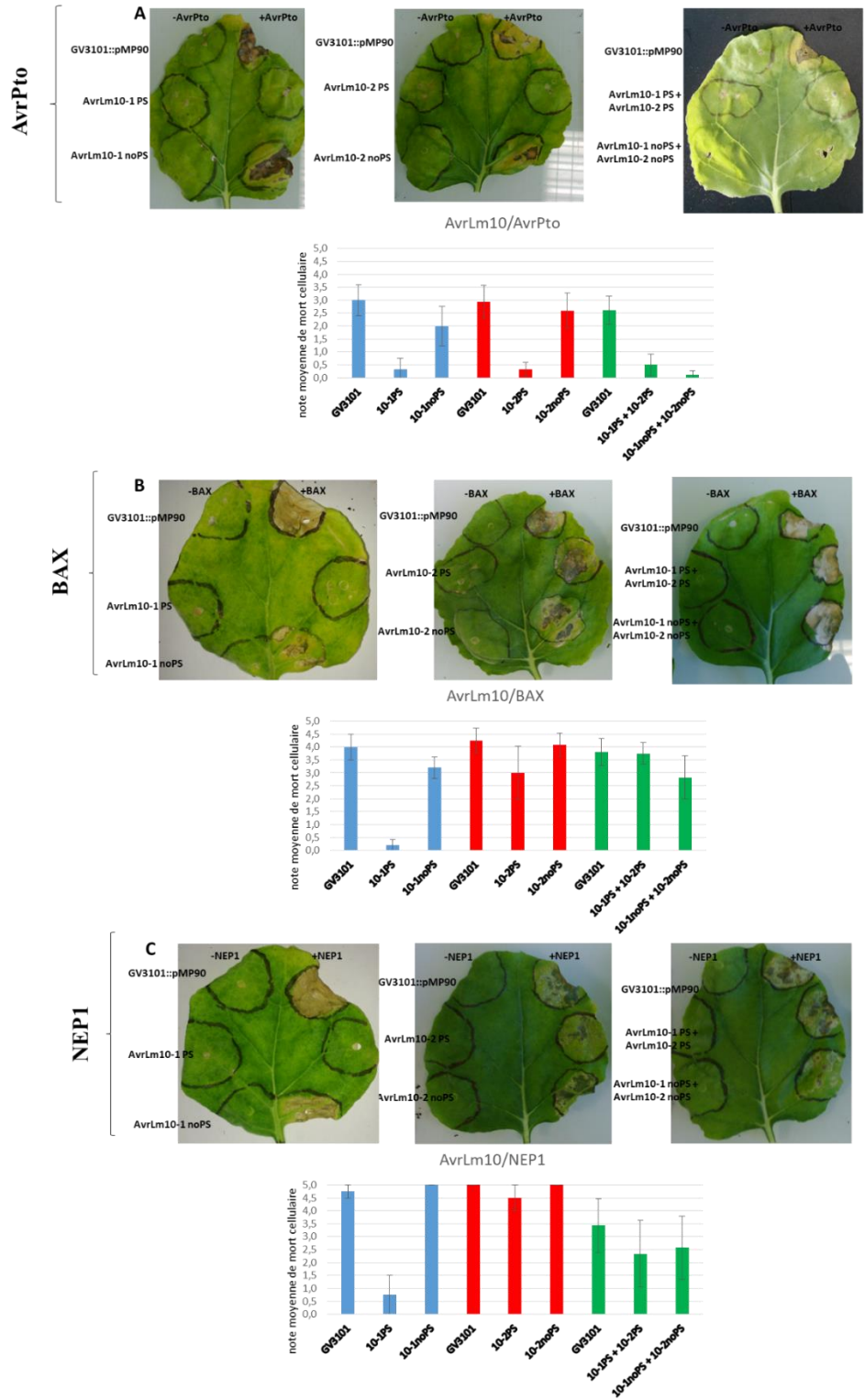


Figure 4: AvrLm10-1 et AvrLm10-2 suppriment la mort cellulaire

(Légende page 170)

3. Suppression de la mort cellulaire par AvrLm10-1 et AvrLm10-2

Afin de déterminer si AvrLm10-1 et AvrLm10-2 sont impliquées dans la suppression des réactions de défense de la plante, j'ai réalisé des tests de suppression de la mort cellulaire. *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* ont été exprimés transitoirement, avec ou sans leur peptide signal, dans des feuilles de *N. benthamiana*, avec un vecteur neutre (sans tag) permettant leur expression constitutive. 24h plus tard, 3 inducteurs de la mort cellulaire ont été exprimés à leur tour : *BAX* (un facteur proapoptotique murin, inducteur général), *NEP1* (un effecteur nécrotique de *C. higginsianum*, inducteur général), et *AvrPto* (un effecteur de *P. syringae* reconnu par un gène de résistance de *N. benthamiana*, marqueur de l'ETI). Il apparaît qu'AvrLm10-1 avec son peptide signal est capable de supprimer la mort cellulaire provoquée par les 3 inducteurs (Fig. 4A). Les mêmes expériences ont été réalisées avec une construction permettant d'exprimer *AvrLm10-1* fusionné à la GFP avec ou sans son peptide signal. Les résultats indiquent que la présence d'un tag GFP en C-terminal n'empêche pas AvrLm10-1 d'effectuer son activité de suppression de la mort cellulaire (Fig. 5). Les localisations observées pour AvrLm10-1 lors de cette expérience restent les mêmes que celles observées dans la Figure 3. De plus, la mort cellulaire provoquée par AvrPto est également supprimée par AvrLm10-2 lorsqu'il est exprimé avec son peptide signal, et par la coexpression d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 avec ou sans leur peptide signal (Fig. 4B).

Figure 4 (page 168): AvrLm10-1 et AvrLm10-2 suppriment la mort cellulaire

AvrLm10-1 et AvrLm10-2 ont été exprimés transitoirement dans des feuilles de *N. benthamiana*, avec ou sans leur peptide signal de sécrétion. 24h plus tard les inducteurs de la mort cellulaire AvrPto, BAX et NEP1 ont été exprimés à leur tour. La souche d'agrobactérie GV3101 exprimant le vecteur vide (pMP90) a été utilisée comme témoin. **A** : images et scores moyens des tests de suppression de la mort cellulaire provoquée par AvrPto. **B** : images et scores moyens des tests de suppression de la mort cellulaire provoquée par BAX. **C** : images et scores moyens des tests de suppression de la mort cellulaire provoquée par NEP1. Les notations ont été réalisées entre 7 et 10 jours après infiltration de l'inducteur de mort cellulaire. Les graphiques présentent des moyennes de plusieurs expériences indépendantes (entre 3 et 6 selon l'inducteur), avec pour chaque expérience entre 3 et 6 feuilles testées sur au moins deux plantes différentes.

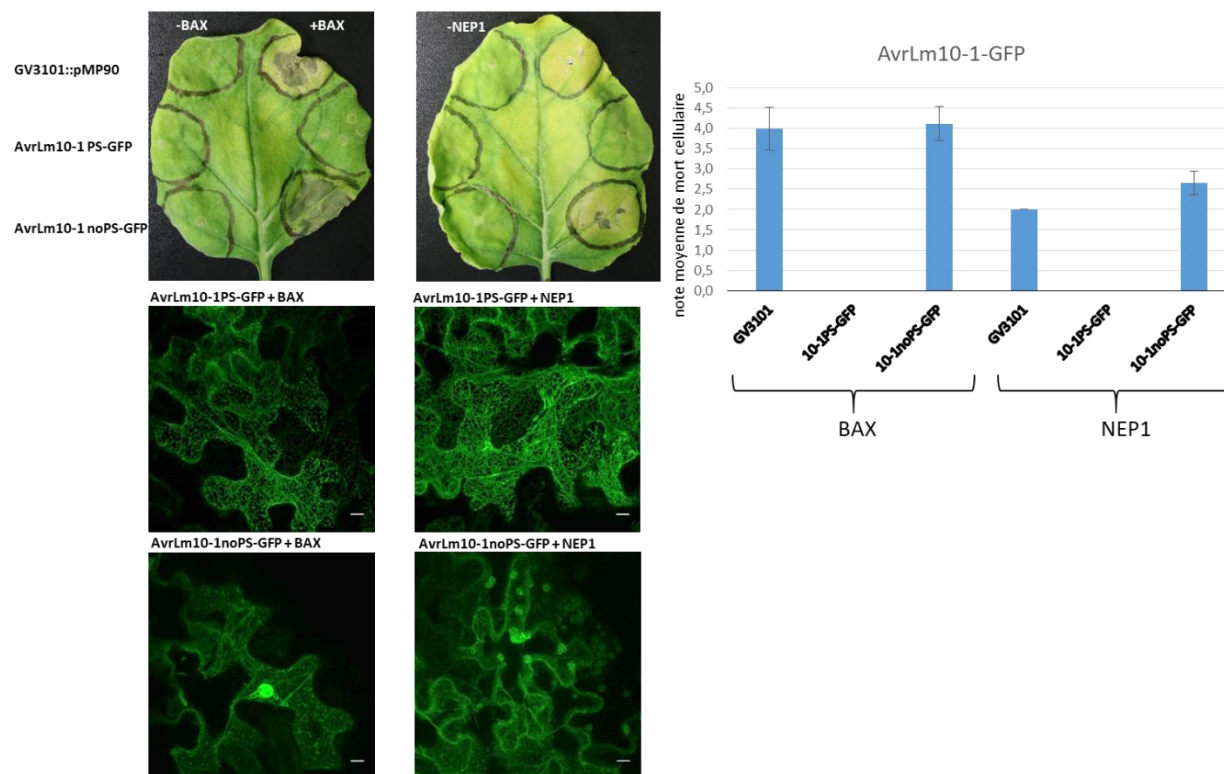


Figure 5: L'ajout d'un fluorochrome n'impacte pas la capacité d'AvrLm10-1 à supprimer la mort cellulaire.

AvrLm10-1 a été exprimé transitoirement dans des feuilles de *N. benthamiana*, avec ou sans son peptide signal de sécrétion, et couplé à la GFP en C-terminal. 24h plus tard les inducteurs de la mort cellulaire BAX et NEP1 ont été exprimés à leur tour. La souche d'agrobactérie GV3101 exprimant le vecteur vide (pMP90) a été utilisée comme témoin. La bonne expression de la fusion effecteur-fluorochrome a été observée par microscopie confocale 48h après infiltration, à un grossissement de x63. L'échelle représente 10 μ m. Les notations ont été réalisées entre 7 et 10 jours après infiltration de l'inducteur de mort cellulaire. Les graphiques présentent des moyennes de plusieurs expériences indépendantes, avec pour chaque expérience entre 3 et 6 feuilles testées sur au moins deux plantes différentes.

Tableau 2 : Polymorphisme d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 dans les souches naturelles de *L. maculans* virulentes vis-à-vis de Rlm10.

Année de prélèvement	Lieu de prélèvement	Souche	Amplification AvrLm10-1*	Amplification AvrLm10-2**	Polymorphisme AvrLm10-1***	Polymorphisme AvrLm10-2****
2008	Rosieres	AVL36	-	-	NA	NA
2008	Rosieres	AVL37		+	Asn 84 Asp Cys 118 Tyr	Asp 145 Asn
2008	Rosieres	AVL38	-	-	NA	NA
2008	Rosieres	AVL43		+	Glu 27 Stop	NA
2008	En Crambade	AVL127	-	+	NA	NA
2008	En Crambade	AVL150	-	-	NA	NA
2008	En Crambade	AVL151	-	+	NA	NA
2008	Rennes	AVL218	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL219	-	+	NA	NA
2008	Rennes	AVL221	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL222	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL223	-	+	NA	NA
2008	Rennes	AVL224	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL225	-	+	NA	NA
2008	Rennes	AVL279	-	+	NA	NA
2008	Rennes	AVL280	-	+	NA	NA
2008	Rennes	AVL281	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL282	-	+	NA	NA
2008	Rennes	AVL283	-	+	NA	NA
2008	Rennes	AVL284	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL287	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL288	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL289	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL290	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL291	-	+	NA	NA
2008	Rennes	AVL292	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL293	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL294	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL295	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL296	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL297	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL298	-	-	NA	NA
2008	Rennes	AVL299	-	+	NA	NA
2008	Grignon	AVL387	-	+	NA	NA
2008	Grignon	AVL392	-	-	NA	NA
2009	Grignon	AVL1034	+	+	Asp 57 Stop	NA
2009	Mondonville	AVL1102	+	+	NA	Met 92 Ile
2009	Mondonville	AVL1097	-	+	NA	NA
2009	Verneuil	AVL1127	+	-	NA	NA
2009	Mondonville	AVL1099	-	-	NA	NA
2009	Mondonville	AVL1100	-	-	NA	NA
2009	Mondonville	AVL1103	-	-	NA	NA
2009	Verneuil	AVL1128	-	-	NA	NA
2009	Verneuil	AVL1130	-	-	NA	NA
2009	Grignon	AVL1031	-	-	NA	NA
2009	Mondonville	AVL1168	-	+	NA	NA
2009	Mondonville	AVL1169	-	-	NA	NA

(Légende page 174)

4. Polymorphisme d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 dans les souches naturelles

La résistance *Rlm10* n'ayant pas encore été utilisée au champ, la majeure partie des souches naturelles de *L. maculans* sont avirulentes vis-à-vis de *Rlm10*. Afin de favoriser l'apparition de souches virulentes vis-à-vis de *Rlm10*, un cultivar de *B. napus*, dans lequel a été introgressée une région génomique de *B. nigra* contenant *Rlm10*, a été mis au champ. Des isolats de *L. maculans* ont été prélevés au champ entre 2008 et 2009 sur cultivar *Rlm10* dans 6 parcelles réparties en France. Les isolats obtenus ont été phénotypés pour leur virulence vis-à-vis de *Rlm10* en conditions contrôlées, et les gènes *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* ont été amplifiés par PCR et séquencés afin de déterminer les évènements moléculaires associés au passage à la virulence vis-à-vis de *Rlm10*.

78 souches ont été inoculées sur cultivars *Rlm10* en conditions contrôlées. Sur ces 78 souches, 47 étaient virulentes vis-à-vis de *Rlm10*. L'amplification par PCR d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* dans ces souches virulentes révèle que 28 de ces souches ont perdu *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2*, 14 ont perdu *AvrLm10-1* seulement, une a perdu *AvrLm10-2* seulement, et 4 présentes au moins un SNP dans leur séquence par rapport à l'allèle présent chez la souche avirulente de référence v23.1.3. Sur ces 4 souches, 2 présentent un SNP conduisant à la production d'une protéine AvrLm10-1 tronquée (après le 27ème ou le 57ème acide aminé), une a un changement d'acide aminé dans la séquence d'AvrLm10-2 (Met 92 Ile), et la dernière a 2 changements d'acides aminés dans la séquence d'AvrLm10-1 (Asn 84 Asp et Cys 118 Tyr) et un dans la séquence d'AvrLm10-2 (Asp 145 Asn) (Tableau 2). Enfin, sur les 31 souches avirulentes sur *Rlm10*, le séquençage du locus AvrLm10 pour 7 d'entre elles n'a montré aucun polymorphisme de séquence, la séquence d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 dans ces souches est exactement la même que dans la souche de référence (données non présentées).

Tableau 2 (page 172): Polymorphisme d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* dans les souches naturelles de *L. maculans* virulentes vis-à-vis de *Rlm10*.

* : résultat de l'amplification d'*AvrLm10-1* par PCR. ** : résultat de l'amplification d'*AvrLm10-2* par PCR. *** : polymorphisme observé dans la séquence d'*AvrLm10-1*. **** : polymorphisme observé dans la séquence d'*AvrLm10-2*. Le polymorphisme est déterminé en alignant les séquences avec la séquence d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* de la souche de référence v23.1.3 avirulente vis-à-vis de *Rlm10*. Les séquences amplifiées correspondent à la région génomique comprenant *AvrLm10-1* ou *AvrLm10-2* ainsi que leurs régions 5' et 3' UTR.

5. Paralogues d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 dans le génome de *L. maculans*

Habituellement, aucun homologue n'est trouvé dans les bases de données pour les protéines d'avirulence de *L. maculans*. Cependant, dans le cas d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2, des homologues ont été trouvés chez plusieurs Dothideomycètes (*Setosphaeria turcica*, *Bipolaris maydis*, *L. biglobosa thlaspii*...) et Sordariomycètes (*Colletotrichum spp.*...), tous pathogènes de plantes (cf : Article 2, Fig. 6). De plus, les gènes codant ces homologues sont également voisins et organisés en orientation inverse dans les génomes de ces champignons phytopathogènes.

J'ai identifié des gènes paralogues à *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* dans d'autres régions du génome de *L. maculans*. Ainsi la souche de référence v23.1.3 possède 3 paires de paralogues à *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2*, tous également organisés en orientation inverse. Ces paralogues présentent entre 38 et 64% de similarité avec *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* et sont localisées dans différentes régions du génome (Tableau 3, Fig. 7). L'un d'entre eux est localisé en isochores AT et est surexprimé durant les phases cotylédonaire de l'infection, tandis que les deux autres sont localisés en isochores GC et sont exprimés dans le pétiole de la plante infectée. Sur ces 3 paralogues, 2 sont parfaitement conservés dans Nz-t4 (une autre souche de *L. maculans* dont la séquence génomique est disponible).

Tableau 3 : Identification de paralogues d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 chez *Leptosphaeria maculans* 'brassicae'

Espèce	ID dernière annotation JN3	Taille de la protéine (AA)	% ID avec le paralogue (blast P)	% similarité avec le paralogue (blast P)	e value blastP	Stade d'expression*	localisation dans le génome de <i>L. maculans</i>	Conservation dans Nz-T4	cystéines	Peptide-signal prédit**
<i>L. maculans brassicae</i>	Lmb_jn3_07875 (AvrLm10-1)	120	na	na	na	Infection primaire (cotylédons)	télomère (fin SC8)	100%	7	oui
<i>L. maculans brassicae</i>	Lmb_jn3_08094	123	40%	51%	1.0E-18	Infection secondaire (pétiotes)	Milieu SC09, îlot de 7 gènes	100%	7	oui
<i>L. maculans brassicae</i>	Lmb_jn3_09745	124	36%	54%	1.0E-17	Infection primaire (cotylédons)	télomère (fin SC11)	absent	7	oui
<i>L. maculans brassicae</i>	Lmb_jn3_04095	124	36%	50%	7.0E-15	Infection secondaire (pétiotes)	télomère SC4, bordure GC	100%	7	oui
<i>L. maculans brassicae</i>	Lmb_jn3_07874 (AvrLm10-2)	190	na	na	na	Infection primaire (cotylédons)	télomère (fin SC8)	100%	1	oui
<i>L. maculans brassicae</i>	Lmb_jn3_08095	171	27%	38%	1.0E-05	Infection secondaire (pétiotes)	Milieu SC09, îlot de 7 gènes	100%	1	oui
<i>L. maculans brassicae</i>	Lmb_jn3_09746	180	25%	41%	5.0E-04	Infection primaire (cotylédons)	télomère (fin SC11)	absent	2	oui
<i>L. maculans brassicae</i>	Lmb_jn3_04096	180	32%	49%	0.56	Infection secondaire (pétiotes)	télomère SC4, bordure GC	100%	1	oui

* : les données d'expression proviennent d'une analyse RNAseq réalisée sur l'ensemble du cycle de *L. maculans* sur colza, tel que décrit dans Gervais *et al.* (2016) ** : la prédiction des peptides-sigaux a été réalisée grâce à l'utilitaire SignalP 4.1 (Petersen *et al.*, 2011).

A AvrLm10-1
 1 MRFVIVLPI-----VASFL-----RUSPADLHDYCACQYKFNSSVDMYAATDLAAGDCRFG (*L. maculans*)
 KXH27015 1 MRFVIVLPI-----VASFL-----RUSPADLHDYCACQYKFNSSVDMYAATDLAAGDCRFG (*C. salicilis*)
 KXH44036 1 MRFVIVLPI-----VASFL-----RUSPADLHDYCACQYKFNSSVDMYAATDLAAGDCRFG (*C. simondsii*)
 KXH36920 1 MRFVIVLPI-----VASFL-----RUSPADLHDYCACQYKFNSSVDMYAATDLAAGDCRFG (*C. nymphae*)
 OHF02955 1 MHLAVVFA-----FTLPI-----SLSHAKHDYCACQYKFNSSVDMYAATDLAAGDCRFG (*C. orchidophilum*)
 XP_008020186 1 MYLHITLL-----PAFW-----SAVAAREVDFCSQYDNNCTYFAHTDILAEDCAEP (*S. turcoica*)
 XP_014072602 1 MYLHITLL-----PAFW-----SAVAAREVDFCSQYDNNCTYFAHTDILAEDCAEP (*B. maydis*)
 XP_007580734 1 MCFBATHLALTAVALTHF-----CFAAARQHACACCAAAGSEVAVVAVAVVQYVNFNR (*N. parvum*)
 FJ767863 1 MRFVIVLPI-----VASFL-----RUSPADLHDYCACQYKFNSSVDMYAATDLAAGDCRFG (*F. oxysporum*)
 CZS99469 1 MRFVIVLPI-----VASFL-----RUSPADLHDYCACQYKFNSSVDMYAATDLAAGDCRFG (*R. agropyri*)
 Lb_ibcn65_P0116 1 MRFVIVLPI-----VASFL-----RUSPADLHDYCACQYKFNSSVDMYAATDLAAGDCRFG (*L. biglobosa*)

AvrLm10-1 50 YTFACAKDQFWIGRHSFGPFRFQGAFLKAETGRIDGDRFHNACLEDSSGGASTCFNCGSIQ (*L. maculans*)
 KXH27015 50 YTYGQDSGQFWIGRHSFGPFRFQGRFLKATSSGIDGKRFYNNCRRYAANDATCFNCETRK (*C. salicilis*)
 KXH44036 50 YTYGQDSGQFWIGRHSFGPFRFQGRFLKATSSGIDGKRFYNNCRRYAANDATCFNCETRK (*C. simondsii*)
 KXH36920 56 YTYGQDSGQFWIGRHSFGPFRFQGRFLKATSSGIDGKRFYNNCRRYAANDATCFNCETRK (*C. nymphae*)
 OHF02955 49 YTYGQDSGQFWIGRHSFGPFRFQGRFLKATSSGIDGKRFYNNCRRYAANDATCFNCETRK (*C. orchidophilum*)
 XP_008020186 50 YTYGQDNNELWIPAPNFGYGRFSSGRYLRLNPNGRIDGTFYNNCRRYAANDATCFNCETRK (*S. turcoica*)
 XP_014072602 50 YTYGQDNNELWIPAPNFGYGRFSSGRYLRLNPNGRIDGTFYNNCRRYAANDATCFNCETRK (*B. maydis*)
 XP_007580734 55 YELSTLP-----STLEQGAHFACTYALPKSSGIDGDRFYNCRRYAANDATCFNCETRK (*N. parvum*)
 FJ767863 49 YLWQCPAPWFDHRHKPGRFACRYLKAANGRIDGDRFYNCRRYAANDATCFNCETRK (*F. oxysporum*)
 CZS99469 50 YTYGQDSGQFWIGRHSFGPFRFQGRFLKATSSGIDGDRFYNCRRYAANDATCFNCETRK (*R. agropyri*)
 Lb_ibcn65_P0116 50 YTYGQDSGQFWIGRHSFGPFRFQGRFLKATSSGIDGDRFYNCRRYAANDATCFNCETRK (*L. biglobosa*)

AvrLm10-1 110 ENPDG-SINCL-R (*L. maculans*)
 KXH27015 110 EYPDG-SINCL-R (*C. salicilis*)
 KXH44036 110 EYPDG-SINCL-R (*C. simondsii*)
 KXH36920 116 EYPDG-SINCL-R (*C. nymphae*)
 OHF02955 109 EYPDG-HLCCA-S (*C. orchidophilum*)
 XP_008020186 110 WNPDR-NVMCI-G (*S. turcoica*)
 XP_014072602 110 SNGDL-ALICT-G (*B. maydis*)
 XP_007580734 ----- (*N. parvum*)
 FJ767863 109 QV-RN-VIKCDA (*F. oxysporum*)
 CZS99469 110 LLSDGRSIVCDQT (*R. agropyri*)
 Lb_ibcn65_P0116 110 ENPDG-SINCL-R (*L. biglobosa*)

B AvrLm10-2
 1 MLWFIAIFIAAALCAPDNEFLOPRGT-ACCSYVREAFAPGLPRIRIDIDTTHETPFSAEK (*L. maculans*)
 KXH27014 1 MLWFIAIFIAAALCAPDNEFLOPRGT-ACCSYVREAFAPGLPRIRIDIDTTHETPFSAEK (*C. salicilis*)
 KXH44035 1 MRFVIVLPI-----VASFL-----RUSPADLHDYCACQYKFNSSVDMYAATDLAAGDCRFG (*C. simondsii*)
 KXH36921 1 MLWFIAIFIAAALCAPDNEFLOPRGT-ACCSYVREAFAPGLPRIRIDIDTTHETPFSAEK (*C. nymphae*)
 OHF02954 1 MLWFIAIFIAAALCAPDNEFLOPRGT-ACCSYVREAFAPGLPRIRIDIDTTHETPFSAEK (*C. orchidophilum*)
 XP_008020185 1 MFWLIFLFLSLASCSEPK-IL-VRRG--LSCDLFPSSADLEVFHNNGNMTRONVPEVD (*S. turcoica*)
 XP_014072601 1 MFWLIFLFLSLASCSEPK-IL-VRRG--LSCDLFPSSADLEVFHNNGNMTRONVPEVD (*B. maydis*)
 Lb_ibcn65_P0116 1 MLWFIAIFIAAALCAPDNEFLOPRGT-ACCSYVREAFAPGLPRIRIDIDTTHETPFSAEK (*L. biglobosa*)

AvrLm10-2 60 -PEVVTTPPGGNPRITVPLTQWTHGDRNHNLEYRMWRPEPSI-GN----GWRVTFEVQITCP (*L. maculans*)
 KXH27014 58 -NPE-----LSCPLNFWAGSDRHRLEYRAWRSIGSN-----LNVHLEVOVTCY (*C. salicilis*)
 KXH44035 45 -----DCEPFGYTYGQNS-----G----- (*C. simondsii*)
 KXH36921 59 -TEP-----LSCPLNFWAGSDRHRLEYRAWRSIGRD-G-----LNVHLEVOVTCY (*C. nymphae*)
 OHF02954 61 DTEP-----LSCPLNFWAGSDRHRLEYRAWRSIGRD-G-----LNVHLEVOVTCY (*C. orchidophilum*)
 XP_008020185 57 HTEP-----LCEPLFRWAGSGPCHHTTRAWRSADQQ-SEYSGSHWANFELQVTFP (*S. turcoica*)
 XP_014072601 59 HTEP-----LCEPLFRWAGSGPCHHTTRAWRSADQQ-SEYSGSHWANFELQVTFP (*B. maydis*)
 Lb_ibcn65_P0116 59 -PELS-----GPNSTLALSTWWSVHDHMDVYRIWRSPERPD-----THTVNFVVOVTCY (*L. biglobosa*)

AvrLm10-2 114 INNGQFLAPSLEFNVDGCFRSVARLALGSSGRSGFARSSTEFTRVGDRTNINRSFHC (*L. maculans*)
 KXH27014 104 ANVVFVFGAQSRR-GNCDGFLSRVINGLAVSSGSNRYPRRTTFSVAGIHRNNVNLV (*C. salicilis*)
 KXH44035 60 -----WIGRSVSGSGFRFQGRFLKATSSGIDGKRFYNNCRRYAANDATCFNCETRK (*C. simondsii*)
 KXH36921 105 ANVVFVFGAQSRR-GNCDGFLSRVINGLAVSSGSNRYPRRTTFSVAGIHRNNVNLV (*C. nymphae*)
 OHF02954 110 ANVVFVFGAQSRR-VDDDEGLSHVINGLAVSSGSNRYPRRTTFSVAGIHRNNVNLV (*C. orchidophilum*)
 XP_008020185 108 LSLFVNFVFGAQSRR-SGSDGFLSRVINGLAVSSGSNRYPRRTTFSVAGIHRNNVNLV (*S. turcoica*)
 XP_014072601 106 LSLFVNFVFGAQSRR-SGSDGFLSRVINGLAVSSGSNRYPRRTTFSVAGIHRNNVNLV (*B. maydis*)
 Lb_ibcn65_P0116 108 ASVAGVFTTNSRR-TNNDPGLSQSVRVAAGSGRNRYPRRTTFSVAGIHRNNVNLV (*L. biglobosa*)

AvrLm10-2 174 DWQN-----M----- (*L. maculans*)
 KXH27014 163 NWR-----I----- (*C. salicilis*)
 KXH44035 94 RFAANDA-TCFNCETKFEYFDGSILC (*C. simondsii*)
 KXH36921 164 NWSKYT-----T----- (*C. nymphae*)
 OHF02954 166 -WPEIGVS-----I----- (*C. orchidophilum*)
 XP_008020185 167 NWR-----R----- (*S. turcoica*)
 XP_014072601 165 NWRKVPILPLRP--Y----- (*B. maydis*)
 Lb_ibcn65_P0116 167 NWQLHPRRT-GPNLW----- (*L. biglobosa*)

Figure 6 (page 177): Alignements des séquences d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 avec celles de leurs orthologues chez différents champignons phytopathogènes.

A : Alignement des séquences d'AvrLm10-1 et de ses orthologues. **B :** Alignement des séquences d'AvrLm10-2 et de ses orthologues. Les résidus identiques dans au moins 50% des séquences sont indiqués en noir, alors que les résidus en gris correspondent à des remplacements par des acides aminés présentant les mêmes propriétés physico-chimiques. Les alignements multiples ont été réalisés au moyen de l'interface T-Coffee (Di Tommaso *et al.*, 2011) et de l'utilitaire BoxShade.

Discussion

L'analyse fonctionnelle d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 nous apporte des éléments concernant le mode d'action de ces deux effecteurs. Le crible double-hybride réalisé nous a permis d'identifier des interactants potentiels pour ces deux effecteurs, en particulier une protéine PR1 et une cystéine protéase. AvrLm10-1 et AvrLm10-2 présentent une localisation nucléo-cytoplasmique sans leur peptide signaux d'adressage extracellulaire, dans le tabac comme dans *A. thaliana*, mais sont localisés dans le reticulum endoplasmique lorsqu'ils sont exprimés avec des peptides signaux. AvrLm10-1 et AvrLm10-2 sont capables de supprimer la mort cellulaire provoquée par AvrPto lorsqu'ils sont exprimés avec leurs peptides signaux, et AvrLm10-1 est également capable de supprimer les morts cellulaires provoquées par BAX et NEP1. Par ailleurs, nous avons pu identifier les événements moléculaires permettant d'échapper à la reconnaissance par Rlm10, l'évènement majeur étant, pour l'instant, la perte d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2*. Enfin, plusieurs paralogues d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* sont retrouvés dans le génome de *L. maculans*, indiquant que ces deux gènes font partie d'une famille multigénique.

Une des cibles végétales les plus « prometteuses » pour AvrLm10-1 et AvrLm10-2 est une protéine PR1. Les protéines PR1 ont été découvertes en 1970 dans les fluides extracellulaires de tabac infecté et une activité antimicrobienne a été mise en évidence pour ces protéines (Van Loon and Van Kammen, 1970). Gamir *et al.* (2017) ont récemment proposé que cette activité antimicrobienne pourrait être due à la capacité de PR1 à se lier aux stérols. Dans le modèle proposé, PR1 séquestrerait les ergostérols de la paroi des agents pathogènes, entraînant une activité antimicrobienne particulièrement efficace contre les microorganismes auxotrophes pour les stérols. Plusieurs effecteurs de *P. nodorum* interagissent physiquement avec des protéines PR1 et inhibent

leur activité. ToxA inhibe spécifiquement la protéine PR1-5 dimérique du blé (Lu *et al.*, 2014), et Tox3 cible pour sa part 6 protéines PR1 différentes (Breen *et al.*, 2016). Ces deux effecteurs sont des toxines peptidiques provoquant une nécrose lorsqu'un gène de sensibilité est présent chez la plante hôte selon un modèle gène-pour-gène inverse. Cependant, il a récemment été suggéré que ces effecteurs auraient en fait un double rôle au cours de l'infection : un premier rôle de déclencheur de la mort cellulaire, nécessaire au développement de l'agent pathogène nécrotrophe, et un deuxième rôle de suppresseur de réactions de défense via l'inhibition de l'activité de PR1 (Breen *et al.*, 2017a, 2017b). De la même façon, nous pouvons faire l'hypothèse qu'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 seraient capable d'inhiber l'activité de PR1, ce qui serait en concordance avec leur capacité à supprimer la mort cellulaire provoquée par plusieurs inducteurs de la mort cellulaire sur tabac (Figure 3), et avec la capacité d'AvrLm10-1 de limiter la taille des nécroses sur cultivar sensible de colza (Article 2).

La deuxième cible potentielle d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 est une cystéine-protéase extracellulaire de la famille des cathepsines. Les cathepsines sont des cysteine-exopeptidases lysosomales de la famille des papain-like. Certaines cathepsines végétales sont impliquées dans les réactions de défense et le déclenchement de la HR, même si leur mode d'action précis n'a pas encore été déterminé (van der Hoorn et Jones, 2004). Plusieurs cathepsines B de tabac sont impliqués dans la résistance non-hôte des plantes du genre *Nicotiana* contre les bactéries *E. amylovora* et *P. syringae pv. tomato*, et sont également nécessaires pour la HR déclenchée par la reconnaissance de l'effecteur Avr3a par la protéine de résistance R3a (Gilroy *et al.*, 2007). De plus, les cathepsines AtCathB1, 2 et 3 de *A. thaliana* ont un effet quantitatif sur la résistance basale de la plante contre *P. syringae pv. tomato* et sont impliqués dans le déclenchement de la HR provoquée par la reconnaissance d'AvrB par RPM1 (McLellan *et al.*, 2009). Des effecteurs ciblant des protéases végétales extracellulaires ont précédemment été décrits. C'est notamment le cas de

l'effecteur Avr2 de *C. fulvum* qui inhibe de nombreuses protéases extracellulaires de tomate tel que Rcr3, Pip1 ou encore C14 (van Esse *et al.*, 2008). L'oomycète *P. infestans* fait également usage de plusieurs effecteurs inhibant des protéases végétales, comme les effecteurs EPI1 et EPI10 qui inhibent tous deux la serine-protéase P69B (Tian *et al.*, 2004, 2005), Avrblb2 qui inhibe la sécrétion de la protéase de tomate C14, ou encore EPIC1 et EPIC2B qui inhibent l'activité de plusieurs cystéine-protéase (Kaschani *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2007). Enfin, l'effecteur Pit2 de *U. maydis* inhibe l'activité de 5 cystéine-protéase de maïs, dont certaines présentent une activité dans l'apoplasme des cellules végétales (Mueller *et al.*, 2013). Pour des agents pathogènes, tels que *C. fulvum* ou *L. maculans*, qui colonisent l'apoplasme de leur plante hôte, il est pertinent de se protéger des molécules de défense sécrétées par la plante hôte dans le milieu extracellulaire (Sperschneider *et al.*, 2015).

Les cibles végétales potentielles d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 sont deux protéines sécrétées ayant un mode d'action extracellulaire. AvrLm10-1 et AvrLm10-2 pourraient donc être des effecteurs apoplastiques, ayant également un mode d'action extracellulaire. Cette hypothèse est en concordance avec le fait qu'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 ne sont capables de supprimer la mort cellulaire provoquée par AvrPto que lorsqu'ils sont exprimés avec leur peptide signal d'adressage extracellulaire, et qu'AvrLm10-1 ne supprime la mort cellulaire provoquée par BAX et NEP1 que lorsqu'il est exprimé avec son peptide signal. Cependant, la localisation de ces effecteurs avec leur peptide signal reste difficile à déterminer : une fluorescence est détectée dans le réticulum endoplasmique lorsqu'ils sont exprimés avec leur peptide signal, qu'ils soient ou non co-exprimés. Cela pourrait être dû à une mauvaise sécrétion de ces effecteurs par le système de sécrétion des cellules végétales. De plus, la GFP étant connue pour être instable en milieu extracellulaire, il est

également possible qu'AvrLm10-2 avec son peptide signal soit bien extracellulaire mais ne soit pas observable.

AvrLm10-1 et AvrLm10-2 interagissent physiquement l'une avec l'autre (Article 2). Plusieurs observations faites dans l'équipe d'H. van Tilbeurgh (I2BC, Orsay) suggèrent qu'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 seraient des « protéines collantes » ayant une grande affinité de liaison et interagissant de manière aspécifique avec un grand nombre de protéines. AvrLm10-1 et AvrLm10-2 sont difficiles à purifier et à éluer (AvrLm10-2 reste collé aux résines de purification, les deux protéines précipitent lors de l'élimination du tag de solubilisation Thiorédoxine). Afin d'améliorer la production d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2, H. van Tilbeurgh et al. ont essayé de stabiliser les deux protéines en utilisant des α -rep, des protéines artificielles ayant des domaines répétés afin de former des hélices (Chevrel *et al.*, 2015). Le but était de cribler des banques d' α -rep afin de trouver un partenaire artificiel à nos protéines d'intérêt. Cependant, AvrLm10-1 et AvrLm10-2 interagissaient avec énormément d' α -rep lors des criblages primaires ce qui n'a pas permis de poursuivre cette stratégie. Dans le cas des deux effecteurs de *F. oxysporum* Avr2 et SIX5 qui interagissent également physiquement l'un avec l'autre, M. Rep et al. ont émis l'hypothèse que Six5 (homologue d'AvrLm10-1) facilitait le passage d'Avr2 d'une cellule végétale à une autre via les plasmodesmes (comm. pers.). On pourrait de la même façon faire l'hypothèse qu'AvrLm10-1 aurait un rôle de chaperonne assurant la stabilité d'AvrLm10-2 dans le milieu extracellulaire. AvrLm10-2 ne comportant qu'une seule cystéine, une chaperone pourrait lui permettre de résister aux conditions inhospitalières du milieu apoplastique. Il a été montré pour plusieurs effecteurs que la formation d'homodimères était indispensable pour leur fonction de virulence, mais également d'avirulence. L'effecteur AvrBs3 de *X. campestris* forme ainsi des homodimères, et cette homodimérisation est nécessaire pour sa localisation dans le noyau des cellules végétales, pour sa

reconnaissance par la protéine de résistance Bs3 et pour sa fonction de virulence (le déclenchement d'une hypertrophie cellulaire au niveau des feuilles) (Gürlebeck *et al.*, 2005). De même, l'homodimérisation de l'effecteur PsCRN63 de *P. sojae* est nécessaire au déclenchement de la mort cellulaire provoquée par cet effecteur, ainsi qu'à la suppression des voies de signalisation menant à la PTI (Li *et al.*, 2016). Chez plusieurs bactéries phytopathogènes, il a été montré que les effecteurs associés au système de sécrétion de type III (T3Es : Type 3 effectors) sont fréquemment associés à une chaperonne qui les stabilise et les empêche de s'engager dans des interactions non-spécifiques. De plus, ce type de chaperonne est souvent codé par un gène voisin de celui codant l'effecteur en question (Page and Parsot, 2002; Singer *et al.*, 2004). A ce jour, il n'existe pas d'autres exemples d'association hétéromultimérique d'effecteurs de champignons phytopathogènes, à l'exception des effecteurs Six5 et Avr2 de *F. oxysporum* (Ma *et al.* 2015) et de 4 effecteurs d'*U. maydis* (Ludwig *et al.*, 2017, communication orale). Il serait intéressant dans le futur de déterminer si la présence d'AvrLm10-1 stabilise d'une quelconque manière AvrLm10-2.

L'évènement majeur associé au passage à la virulence vis-à-vis de *Rlm10* est la perte d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2*. Cette observation est contradictoire avec l'effet d'*AvrLm10-1* sur l'agressivité de *L. maculans* sur cotylédons de colza. En effet, dans le cas de gènes codant des effecteurs impliqués dans l'agressivité du champignon, on s'attend à observer plus de SNP que de délétions (Huang *et al.*, 2006). Cependant, nous observons dans cette étude les premiers événements de passage à la virulence vis-à-vis de *Rlm10*, dans des isolats obtenus suite au déploiement au champ d'un cultivar possédant *Rlm10*. Il est possible qu'en déployant cette résistance au champ pendant plusieurs années, d'autres évènements moléculaires permettant un gain de virulence vis-à-vis de *Rlm10* tout en maintenant l'activité effectrice d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* soient observés. Ainsi, lors de l'étude du contournement d'autres résistances par *L. maculans*, des situation très contrastées ont

été observées : alors qu'*AvrLm1*, qui n'est que faiblement impliqué dans l'agressivité de *L. maculans*, a été majoritairement perdu dans les populations de *L. maculans* (Gout et al., 2006 ; Huang et al., 2010), pour *AvrLm4-7*, qui est fortement impliqué dans la fitness de *L. maculans*, l'événement moléculaire majoritairement présent dans les population de *L. maculans*, après plusieurs dizaines d'années d'utilisation de cultivars possédant *Rlm4*, est un changement d'un acide aminé permettant d'échapper à la reconnaissance par *Rlm4* tout en maintenant l'activité effectrice d'*AvrLm4-7* (Huang et al., 2006 ; Parlange et al. 2009).

Plusieurs orthologues d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* sont retrouvés chez d'autres espèces de champignons phytopathogènes, suggérant un rôle important de ces deux gènes pour la pathogénie. De plus, plusieurs paralogues organisés en orientation inverse dans le génome de *L. maculans* ont également été trouvés, pour la plupart localisés dans des régions riches en TEs, et sont exprimés spécifiquement pendant l'infection soit lors de l'infection précoce sur cotylédons, soit pendant l'infection sur tige. Il semble donc qu'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* fassent partie d'une famille multigénique dont les membres pourraient intervenir à différentes étapes du cycle infectieux. Il serait intéressant de rechercher ces paralogues dans d'autres espèces phytopathogènes. De plus, si l'interaction d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* avec une cible végétale telle que PR1 ou une cystéine protéase est confirmée, il sera intéressant de déterminer si les autres membres de la famille multigénique sont également capables d'interagir avec cette cible ou même d'interagit entre eux pour former un hétérodimère.

Chapitre II :

AvrLm4-7

Introduction

AvrLm4-7 est un gène d'avirulence de *L. maculans* reconnu par deux gènes de résistance : *Rlm4* et *Rlm7* (Parlange *et al.*, 2009). Ces deux gènes de résistance étant localisés dans le même groupe de liaison génétique mais pas encore clonés, nous ne savons pas s'il s'agit bien de deux gènes différents ou de deux allèles d'un même gène (Delourme *et al.*, 2006). La résistance *Rlm4* a été massivement utilisée depuis les années 1970 et est largement contournée à l'heure actuelle (Rouxel and Balesdent, 2017). *AvrLm4-7* échappe à la reconnaissance par *Rlm4*, tout en maintenant la reconnaissance par *Rlm7*, via un changement d'un nucléotide qui entraîne la substitution d'une glycine par une arginine en position 120 de la protéine *AvrLm4-7* (Parlange *et al.*, 2009). La résistance *Rlm7* est relativement efficace, puisqu'en 2010 (6 ans après son déploiement au champ et son utilisation dans 50 % des parcelles de colza françaises), seules 4% de souches virulentes vis-à-vis de *Rlm7* étaient trouvées en France. Cependant cette proportion est passée à 19% en 2013, indiquant probablement un début de contournement par les populations françaises de *L. maculans* (Balesdent *et al.*, 2015).

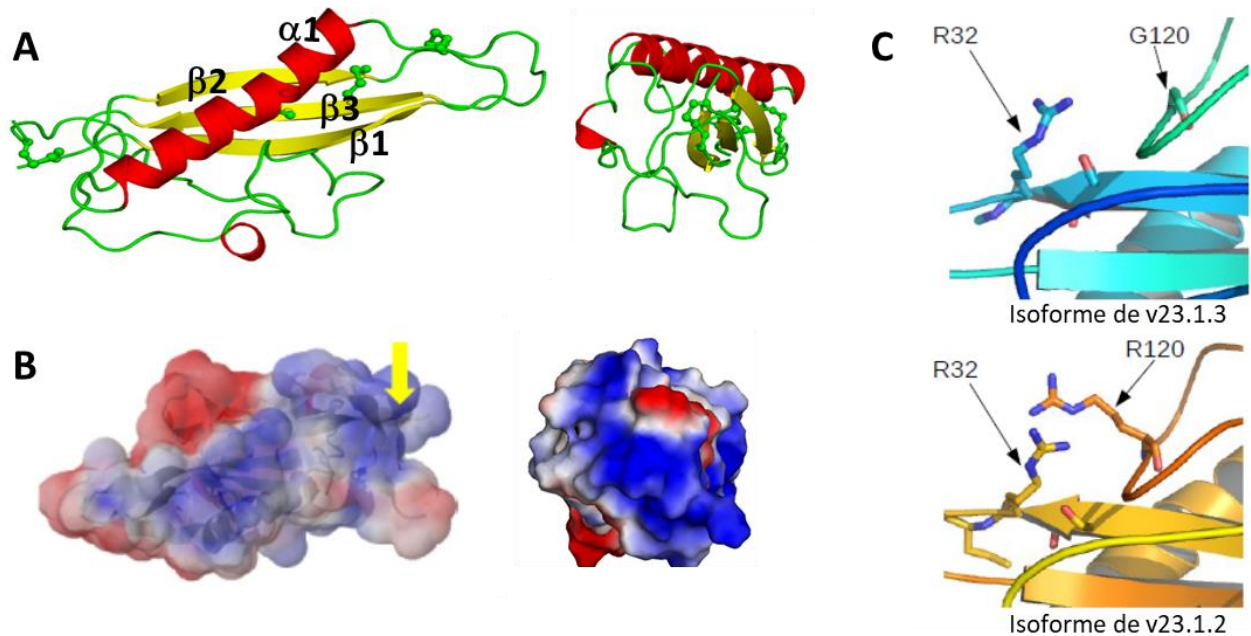


Figure 1 : caractéristiques structurales d'AvrLm4-7

A : représentation de la structure 3D d'AvrLm4-7. L'hélice α est représentée en rouge et les 3 feuillets β en jaune. **B** : représentation du potentiel électrostatique à la surface d'AvrLm4-7. Une couleur bleue représente un potentiel positif, le rouge représente un potentiel négatif. Le potentiel électrostatique a été déterminé grâce à l'outil APBS (<http://www.poissonboltzmann.org>; Baker *et al.*, 2001). **C** : superposition des structures de deux isoformes d'AvrLm4-7 au niveau de la région comprenant la substitution d'un acide aminé permettant la reconnaissance par *Rlm4*. L'isoforme présent chez la souche v.23.1.2 (virulent sur cultivar *Rlm4*) ne diffère de l'isoforme présent chez la souche v23.1.3 que pour un acide aminé (une arginine remplace une glycine en position 120). Le RMSD de la superposition est de 0,9482 Å pour 129 résidus alignés.

Une structure 3D d'une isoforme d'AvrLm4-7 reconnue uniquement par *Rlm7* a été obtenue par cristallographie et diffraction aux rayons X avec une résolution de 2.3 Å (Blondeau *et al.*, 2015). AvrLm4-7 est composée de 3 feuillets β recouverts par une hélice α (Fig. 1A). La surface de la protéine est globalement chargée positivement (Fig.1B), ce qui laisse penser à une interaction avec des molécules chargées négativement telles que des acides nucléiques. Une interaction avec un ADN double-brin de 10 pb a en effet été validée par ITC (Isothermal Titration Calorimetry) ainsi que par des mesures d'intensité de fluorescence en présence d'acides nucléiques tagués à la fluorescéine. Une deuxième structure 3D d'une isoforme reconnue par *Rlm4* et *Rlm7* (dont le résidu 120 est une glycine au lieu d'une arginine) a été obtenue récemment, permettant d'observer que le résidu polymorphe dont la modification permet d'échapper à la reconnaissance par *Rlm4* est situé dans une boucle externe, et que cette modification n'affecte pas la conformation globale de la protéine (Fig. 1C, I. Gallay, comm. pers.). Trois autres substitutions permettant d'échapper à la reconnaissance par *Rlm7* sont également localisées dans des boucles externes de la structure, et n'impactent probablement pas sa conformation globale (Blondeau *et al.*, 2015).

AvrLm4-7 présente une analogie structurale avec les effecteurs de la famille RALPH (RNase-Like Proteins expressed in Haustoria) de *B. graminis*. Ces effecteurs sont des analogues structuraux d'une ribonucléase (RNase), ce qui laisse penser qu'ils ont tous évolués à partir d'une RNase ancestrale (Pedersen *et al.*, 2012). Ils interagissent avec des acides nucléiques tout comme AvrLm4-7, et des expériences de pull-down ont également montré qu'ils interagissaient avec une protéine ribosomale (P. Spanu, comm. pers.). Enfin, ces effecteurs suppriment la mort cellulaire provoquée par JIP60 (jasmonate-induced protein), une ribosome-inactivating protein (RIP) impliquée dans le déclenchement de la HR (Chaudhry *et al.*, 1994 ; P. Spanu, comm. pers.). Ces effecteurs pourraient donc supprimer l'ETI en empêchant le déclenchement de la HR. Ces données

sur les analogues structuraux de la famille RALPH m'ont amené à faire l'hypothèse qu'AvrLm4-7 pourrait avoir un mode d'action similaire.

Par ailleurs, lorsqu'un allèle fonctionnel d'*AvrLm4-7* est présent chez *L. maculans*, le gène d'avirulence *AvrLm3* n'est plus reconnu par le gène de résistance correspondant *Rlm3* (Plissonneau *et al.*, 2016). Quatre hypothèses peuvent permettre d'expliquer cette observation. *AvrLm4-7* et *AvrLm3* pourraient partager une même cible végétale, et être en compétition pour interagir avec elle (Fig. 2A). Alternativement, *AvrLm4-7* pourrait modifier cette cible de manière à ce qu'elle ne puisse plus interagir avec *AvrLm3* (Fig. 2B). *AvrLm4-7* pourrait également directement modifier ou dégrader *AvrLm3* (Fig. 2C). Ces trois premières hypothèses ont été partiellement invalidées au cours de la thèse de Clémence Plissonneau dans la mesure où les cibles double-hybride réalisés pour *AvrLm3* et *AvrLm4-7* contre une même banque cDNA n'ont pas permis d'identifier de cibles végétales communes, et qu'aucune interaction physique n'a pu être mise en évidence par crible double-hybride direct entre *AvrLm3* et *AvrLm4-7* (Plissonneau *et al.* 2016). La quatrième hypothèse est qu'*AvrLm4-7* serait un suppresseur des voies de signalisation menant à l'ETI déclenchée par la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3* (Fig. 2D). C'est sur cette hypothèse que j'ai basé mon travail de thèse.

Je présente dans ce chapitre les résultats obtenus lors de la caractérisation fonctionnelle d'*AvrLm4-7*. La première étape de ces travaux a consisté à rechercher des cibles végétales pour *AvrLm4-7*. La seconde étape a été de déterminer la localisation subcellulaire d'*AvrLm4-7* dans les cellules végétales. Puis, suivant l'hypothèse qu'*AvrLm4-7* est un suppresseur de l'ETI, des tests de suppression de la mort cellulaire dans le tabac ont été effectués. Enfin, afin de déterminer plus précisément quels processus cellulaires *AvrLm4-7* impacte, des lignées transgéniques d'*A. thaliana*

exprimant cet effecteur de manière stable ont été générées et testées pour leur sensibilité à différents agents pathogènes.

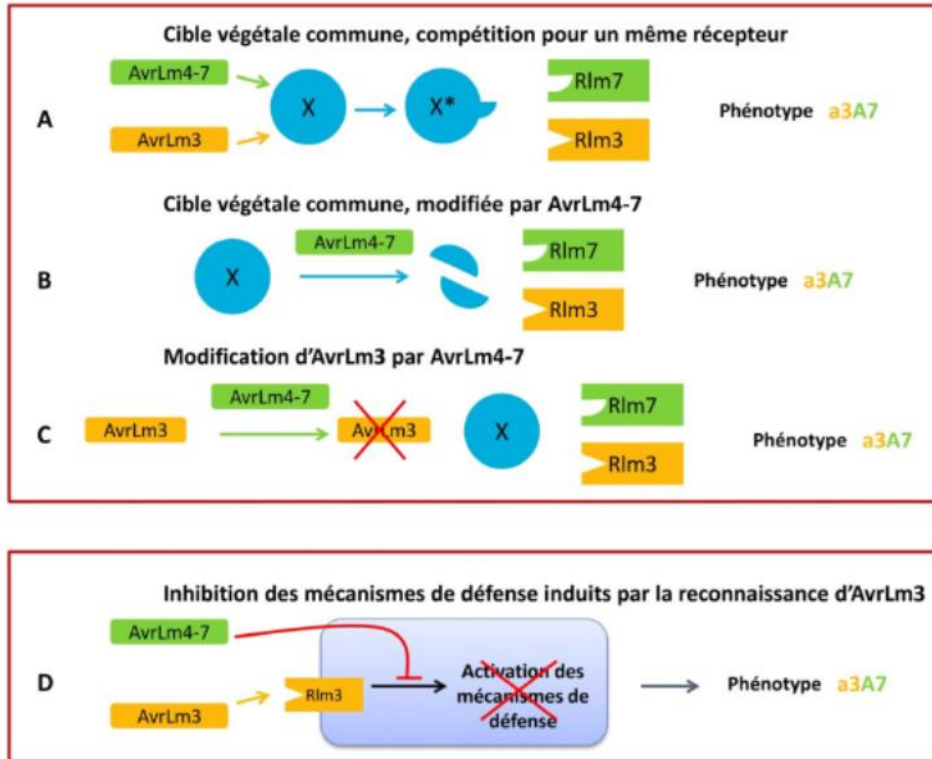


Figure 2 : Hypothèses pouvant expliquer la suppression de la reconnaissance d'AvrLm3 par Rlm3 en présence d'AvrLm4-7.

A : AvrLm3 et AvrLm4-7 interagissent avec un même récepteur, l'interaction d'AvrLm4-7 avec ce récepteur empêche la reconnaissance d'AvrLm3. **B :** AvrLm3 et AvrLm4-7 interagissent avec une même cible, AvrLm4-7 modifie cette cible empêche la reconnaissance d'AvrLm3. **C :** AvrLm4-7 modifie AvrLm3, qui n'est plus reconnue. **D :** AvrLm4-7 supprime les réactions de défense déclenchées par la reconnaissance d'AvrLm3.

Résultats

1. Identification de cibles végétales d'AvrLm4-7 par crible double hybride

Un premier crible double-hybride a été réalisé dans l'équipe avant mon arrivée. Le crible a été fait contre une banque d'ADNc obtenus suite à l'infection du cultivar de colza 02.23.3.1 (*Rlm7*) par la souche de *L. maculans* 19.4.24 (interaction compatible ; la souche est virulente sur cultivar *Rlm7* et avirulent sur cultivar *Rlm3*), afin d'enrichir la banque en transcrits pertinents dans le cas d'une infection. Les prélèvements ont été faits à 3, 7 et 14 jours post-infection sur cotylédons de colza. La banque a été clonée dans le plasmide pGADT7 afin de fusionner les ADNc au domaine d'activation des gènes rapporteurs du crible, tandis qu'*AvrLm4-7* a été cloné dans le plasmide pGBKT7 pour le fusionner au domaine de liaison au promoteur de ces gènes rapporteurs. Ce crible a permis d'identifier puis de valider 6 cibles végétales potentielles par double-hybride directe (Tableau 1). Une de ces cibles potentielles est une protéine ribosomale, comme observé pour les effecteurs de la famille RALPH, analogues structuraux d'*AvrLm4-7*, chez *B. graminis*, et constitue de fait la cible la plus prometteuse. Cette cible est localisée dans les chloroplastes des cellules végétales lorsqu'elle est exprimé transitoirement dans *N. benthamiana* (Fig. 3), et possède un peptide signal d'adressage aux chloroplastes d'après l'utilitaire en ligne TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000).

Plus récemment, un deuxième crible double-hybride a été réalisé par la plate-forme ORFeome (C. Lurin, Orsay) contre une banque de 10600 CDS (Coding Sequences) correspondant à environ la moitié des ORF d'*A. thaliana*. Ce crible a permis de mettre en évidence 6 autres cibles végétales potentielles, aucune n'étant commune avec celles identifiées lors du crible contre la banque d'ADNc de colza infecté (Tableau 2).

Tableau 1: Cibles végétales potentielles d'AvrLm4-7 identifiées par crible double hybride contre une banque d'ADNc de colza infecté par *L. maculans*.

Interactant	Nombre d'occurrences*	Fonction	Compartiment cellulaire**
BnaC02g04820D	2	Ribosomal protein L10 family	Intracellulaire
BnaC08g28500D	1	Glycosyl hydrolase	Plasmodesme
BnaA09g19810D	7	Ubiquitine	Nucleocytoplasmique
BnaCnng33260D	1	Trypsin-like serine protease	Choloroplastes
BnaA08g15930D	1	Cinnamyl alcohol dehydrogenase 8	Inconnu
BnaC08g15940D	1	Unknown	Inconnu

Ces interactants potentiels ont été validés par double-hybride direct.

* : nombre d'occurrence où ce clone a été retrouvé durant le crible.

** : la prédiction du compartiment subcellulaire a été réalisée au moyen de l'utilitaire en ligne TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000).

Tableau 2: Cibles végétales potentielles d'AvrLm4-7 identifiées par crible double hybride contre une banque d'ORF d'*A. thaliana*.

Interactant	Fonction*	Compartiment cellulaire*
At3G51960.1	bZIP transcription factor induced by Salt stress and promoting salt tolerance	Nucléo-cytoplasmique
At4G25200.1	Mito mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial	Mitochondries
At5G22355.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein (zinc ion binding)	Inconnu
At1G22920.2	Similar to JAB1, a specific mammalian coactivator of AP-1 transcription	Nucléo-cytoplasmique
At5G13890.3	Unknown	Endomembranes
At1G58100.1	TCP8 (TCP transcription factor family)	Noyau

*: la fonction et la localisation subcellulaire ont été déterminées d'après les informations disponibles sur <https://www.arabidopsis.org/>

2. Localisation subcellulaire d'AvrLm4-7

J'ai exprimé transitoirement *AvrLm4-7* fusionné à la *GFP* dans des feuilles de *N. benthamiana*. Cet effecteur présente une localisation nucléo-cytoplasmique lorsqu'il est exprimé avec ou sans son peptide signal d'adressage extracellulaire (Fig. 4). Ces résultats sont en concordance avec ceux de Blondeau *et al.* (2015) qui avaient également observé une localisation nucléo-cytoplasmique pour cet effecteur. De plus, Blondeau *et al.* (2015) avaient mis en évidence, par des expériences de bombardement de particules dans des feuilles de colza, qu'*AvrLm4-7* était reconnu par *Rlm4* et *Rlm7* à l'intérieur des cellules végétales, et ont également mis en évidence une translocation d'*AvrLm4-7* dans des racines de soja et des cellules de mammifères. Toutes ces expériences vont dans le sens d'un mode d'action intracellulaire pour *AvrLm4-7*.

3. Suppression de la mort cellulaire par AvrLm4-7

AvrLm4-7 étant capable de masquer la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3*, j'ai fait l'hypothèse qu'*AvrLm4-7* serait un suppresseur de l'ETI. Afin de valider cette hypothèse j'ai cherché à savoir si *AvrLm4-7* était capable de supprimer la mort cellulaire provoquée par différents inducteurs de mort cellulaire. J'ai donc transitoirement exprimé *AvrLm4-7* dans des feuilles de *N. benthamiana*, et coexprimé les inducteurs de la mort cellulaire BAX, NEP1, INF1 et *AvrPto* 24h plus tard.

Il apparaît qu'*AvrLm4-7* est capable de supprimer la mort cellulaire provoquée par un marqueur de l'ETI (*AvrPto*), mais aussi de la PTI (INF1, une élicitrine de *P. infestans*) ainsi que la mort cellulaire provoquée par des inducteurs généraux (BAX et NEP1). Cette suppression de la mort cellulaire a lieu qu'*AvrLm4-7* soit ou non exprimé avec son peptide signal d'adressage extracellulaire (Fig. 5), et est très efficace (les niveaux de mort cellulaire sont très faibles, voire nuls, en présence d'*AvrLm4-7*).

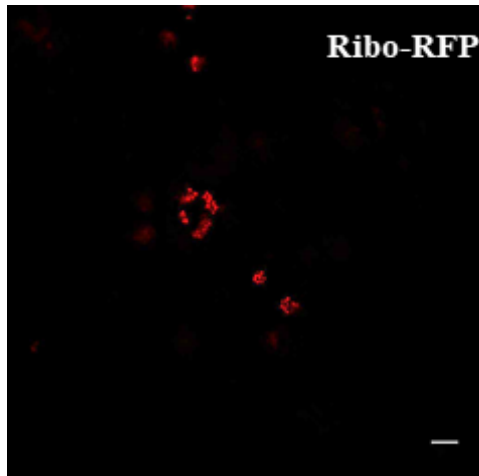


Figure 3: Localisation subcellulaire de la cible d'AvrLm4-7 dans *N. benthamiana*.

Ribo (protéine ribosomale, codée par le gène *BnaC02g04820D* du colza) a été fusionnée à la RFP et transitoirement exprimée dans *N. benthamiana* avec ou sans son peptide signal d'adressage extracellulaire. La fluorescence a été observée par microscopie confocale 48h après infiltration, à un grossissement de x63. L'échelle représente 10 μm .

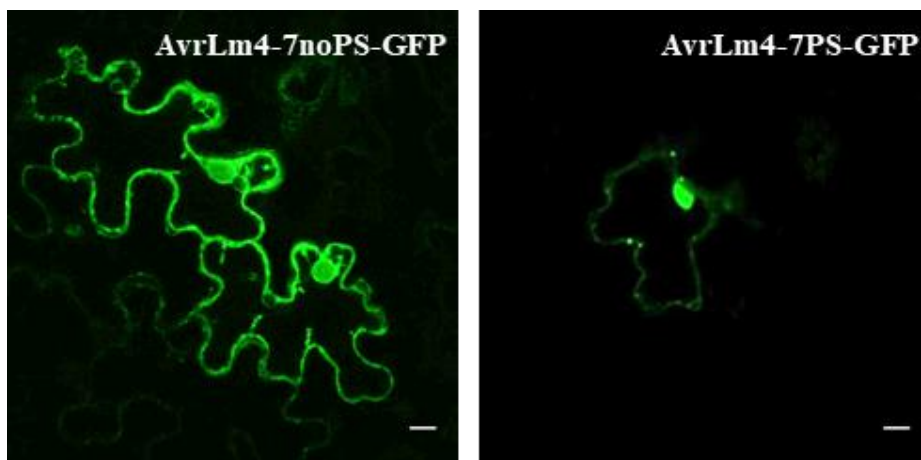


Figure 4: Localisation subcellulaire d'AvrLm4-7 dans *N. benthamiana*.

AvrLm4-7 a été fusionné à la GFP et transitoirement exprimé dans *N. benthamiana* avec ou sans son peptide signal d'adressage extracellulaire. La fluorescence a été observée par microscopie confocale 48h après infiltration, à un grossissement de x63. L'échelle représente 10 μm .

AvrLm4-7 est un analogue structural des effecteurs RALPH de *B. graminis* qui suppriment la mort cellulaire provoquée par JIP60, une Ribosomal Inactivating Protein impliquée dans les réactions de défense. Afin de déterminer si le mode d'action d'AvrLm4-7 pourrait être comparable à celui de ces effecteurs de *B. graminis*, j'ai réalisé les mêmes tests de suppression de la mort cellulaire en exprimant transitoirement le gène codant JIP60 chez l'orge. Encore une fois, AvrLm4-7 est capable de supprimer très efficacement cette mort cellulaire lorsqu'il est exprimé avec ou sans son peptide signal (Fig. 6).

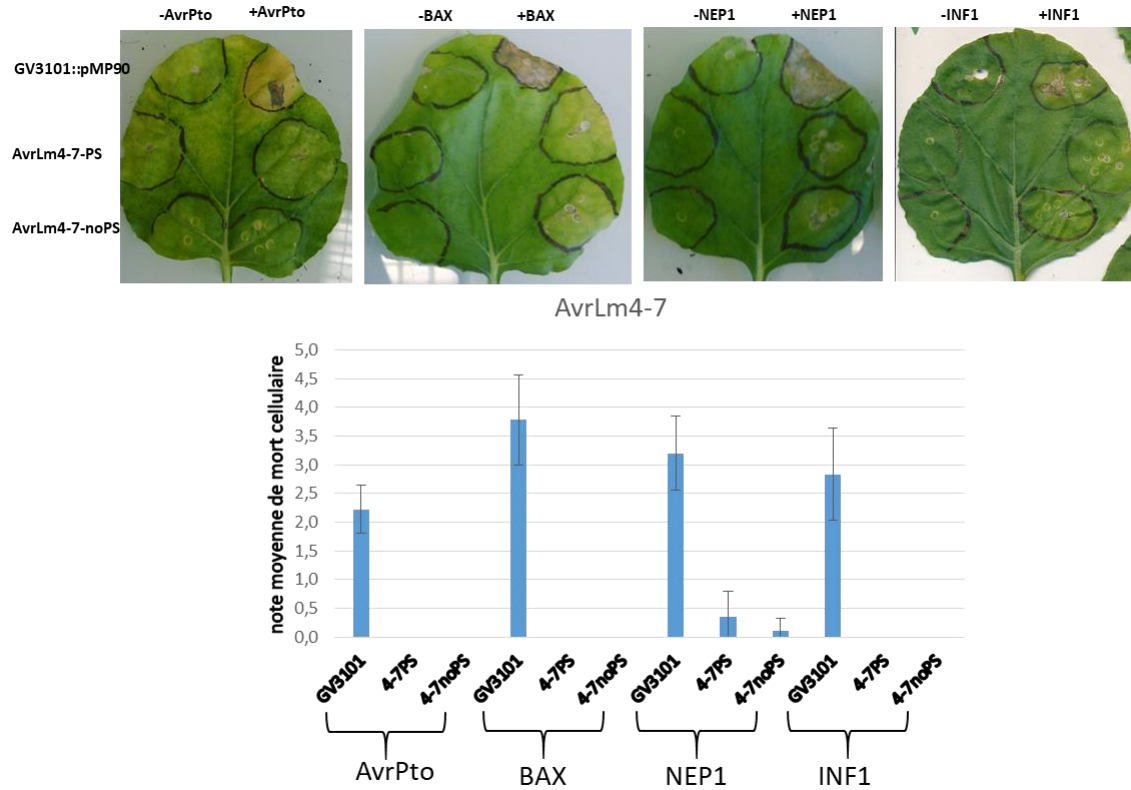


Figure 5: AvrLm4-7 supprime la mort cellulaire provoquée par plusieurs inducteurs.

AvrLm4-7 a été exprimé transitoirement dans des feuilles de *N. benthamiana*, avec ou sans son peptide signal de sécrétion. 24h plus tard les inducteurs de la mort cellulaire AvrPto, BAX, NEP1 et INF1 ont été exprimés à leur tour. La souche d'agrobactérie GV3101 exprimant le vecteur vide (pMP90) a été utilisée comme témoin. Les notations ont été réalisées entre 7 et 10 jours après infiltration de l'inducteur de mort cellulaire, et correspondant à la moyenne de plusieurs expériences indépendantes (entre 3 et 6 selon l'inducteur), avec pour chaque expérience entre 3 et 6 feuilles testées sur au moins deux plantes différentes.

4. Génération et caractérisation morphologique de lignées transgéniques d'*A. thaliana* exprimant constitutivement *AvrLm4-7*

Afin de déterminer les processus cellulaires ciblés par *AvrLm4-7*, des lignées transgéniques d'*A. thaliana* l'exprimant de manière stable et constitutive *AvrLm4-7*, avec ou sans son peptide signal d'adressage extracellulaire, ont été générées. A l'issue du processus de sélection, 3 lignées ont été retenues pour chaque transgène (avec ou sans peptide signal) : 2 lignées homozygotes à insertion simple, et une lignée présentant plus d'une insertion du transgène, afin de déterminer si d'éventuels phénotypes liés à l'expression d'*AvrLm4-7* auraient un effet dose. La présence du transgène dans les lignées d'*A. thaliana* a été vérifiée par PCR, et le niveau d'expression d'*AvrLm4-7* dans les lignées a été évalué par qRT-PCR (Fig. 7).

Les lignées transgéniques exprimant *AvrLm4-7* ne présentent aucune différence morphologique avec l'écotype sauvage Col0 (Fig. 8) : es plantes poussent à la même vitesse et aucune différence de taille de feuilles, de tiges ou de fleurs n'est observée.

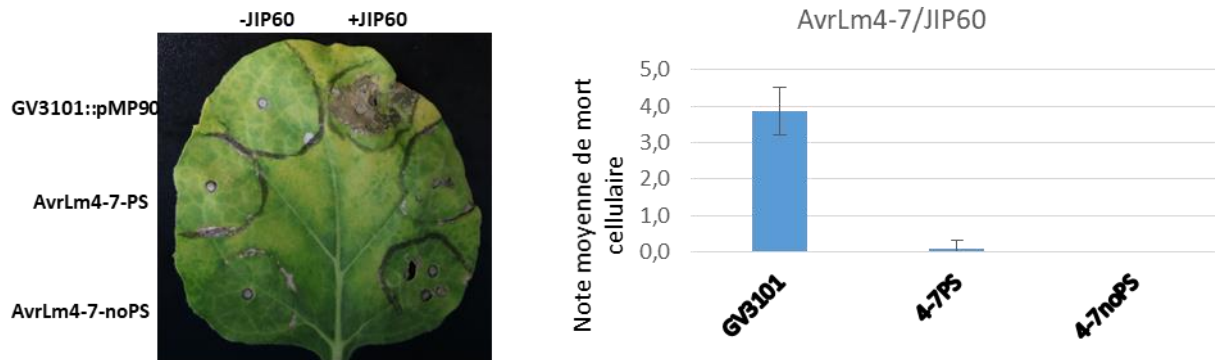


Figure 6: AvrLm4-7 supprime la mort cellulaire provoquée par JIP60

AvrLm4-7 a été exprimé transitoirement dans des feuilles de *N. benthamiana*, avec ou sans son peptide signal de sécrétion. 24h plus tard JIP60 a été exprimé à son tour. La souche d'agrobactérie exprimant le vecteur vide (pMP90) a été utilisée comme témoin. Les notations ont été réalisées entre 7 et 10 jours après infiltration de l'inducteur de mort cellulaire, et représentent la moyenne de 5 expériences indépendantes au cours desquelles entre 6 et 11 feuilles ont été infiltrées sur 3 ou 4 plantes différentes.

5. Caractérisation des lignées transgéniques d'*A. thaliana* exprimant constitutivement *AvrLm4-7* pour leur sensibilité à différents champignons pathogènes nécrotrophes, hémibiotrophes et biotrophes.

Afin de déterminer si l'expression stable d'*AvrLm4-7* affecte la sensibilité des lignées transgéniques aux stress biotiques, ces lignées ont été inoculées avec différents agents pathogènes fongiques présentant des modes de vie contrastés (biotrophe obligatoire, hémibiotrophe, nécrotrophe).

Les lignées transgéniques exprimant *AvrLm4-7* de manière stable ont été inoculées avec 3 espèces de *Colletotrichum* : *C. higginsianum* (espèce pathogène d'*A. thaliana*), *C. destructivum* et *C. orbiculare* (espèces non pathogènes d'*A. thaliana*). Les symptômes observés après infection des lignées transgéniques avec *C. higginsianum* ne sont pas plus importants que ceux observés sur l'écotype Col0. De plus, *C. destructivum* et *C. orbiculare* ne sont pas capables d'infecter les lignées transgéniques, indiquant que l'expression stable d'*AvrLm4-7* ne permet pas de supprimer la résistance non-hôte (données non présentées).

Les lignées transgéniques ont également été inoculées avec la souche de référence B05-10 de *Botrytis cinerea* (agent pathogène nécrotrophe). La taille moyenne des nécroses sur les lignées transgéniques n'est pas significativement différente de celle des nécroses sur l'écotype Col0 à l'exception de deux lignées (Fig. 9), indiquant que l'expression stable d'*AvrLm4-7* n'augmente pas la sensibilité d'*A. thaliana* à *B. cinerea*.

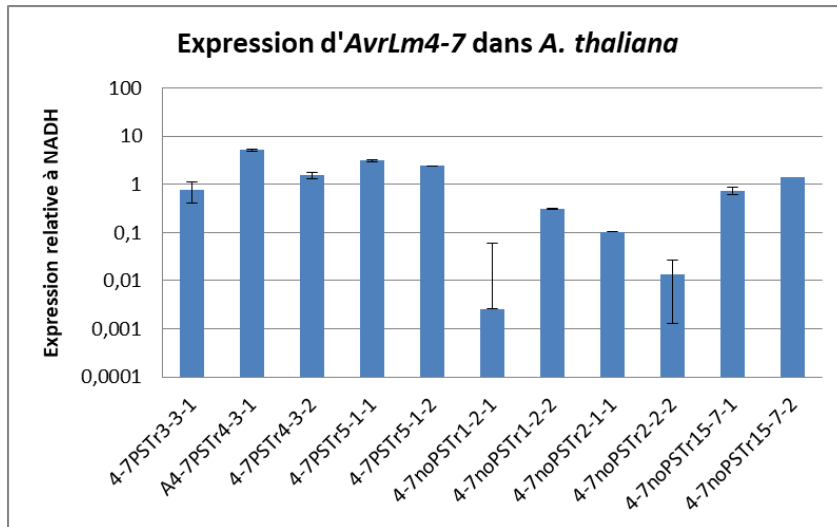


Figure 7: les lignées transgéniques d'*A. thaliana* expriment *AvrLm4-7*.

Expression d'*AvrLm4-7* dans les lignées transgéniques d'*A. thaliana*. Le niveau d'expression d'*AvrLm4-7* est relatif à l'expression du gène de ménage *NADH*. L'expression pour chaque lignée correspond à la moyenne de deux répétitions biologiques et deux répétitions techniques. Les noms des transformants exprimant *AvrLm4-7* avec (4-7PS) ou sans (4-7noPS) son peptide-signal sont indiqués sous la forme d'un code à deux chiffres (Tr4-3...). Le troisième chiffre correspond au nombre de la répétition technique (Tr4-3-1...).



Figure 8: l'expression stable d'*AvrLm4-7* dans *A. thaliana* n'affecte pas la morphologie des plantes.

Morphologie des plantes exprimant *AvrLm4-7* de manière stable comparé à l'écotype de référence Col0. Les plantes ont été cultivées en jours courts (alternance de 8h de jour et 16h de nuit). Les noms des transformants exprimant *AvrLm4-7* avec (4-7PS) ou sans (4-7noPS) son peptide-signal sont indiqués sous la forme d'un code à deux chiffres (Tr4-3...).

Les lignées transgéniques ont également été inoculées avec 2 souches de *L. maculans* (JN2 et v70.1.11). *L. maculans* n'est pas capable d'infecter l'écotype Col0 (Bohman *et al.*, 2004), et n'est pas non plus capable d'infecter les lignées transgéniques exprimant *AvrLm4-7*: aucun symptôme n'est observé après inoculation et le dépôt de callose se fait de la même façon sur les lignées transgéniques et sur l'écotype Col0 (Fig. 10 et données non présentées).

Enfin, les lignées transgéniques ont été inoculées avec l'agent pathogène biotrophe *Erysiphe cruciferarum*. Le rapport entre le nombre d'hyphes secondaires formés par rapport au nombre total de spores germées a été déterminé 2 jours post-inoculation.

Collectivement, ces résultats indiquent que l'expression stable d'*AvrLm4-7* dans *A. thaliana* n'affecte pas la sensibilité de ces lignées à différents agents pathogènes fongiques.

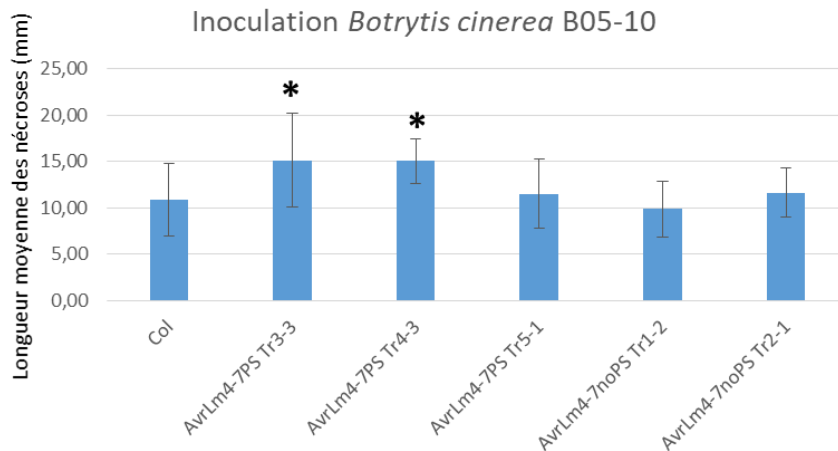


Figure 9: l'expression stable d'AvrLm4-7 dans *A. thaliana* n'affecte pas la sensibilité des plantes à *Botrytis cinerea*.

Les lignées transgéniques ont été inoculées avec des spores de *Botrytis cinerea* (souche de référence B05-10). La taille des nécroses a été mesurée 6 jours après infection au cours de 4 expériences indépendantes. Les étoiles indiquent des différences statistiquement significatives avec le témoin Col0 (test t de Student, $p < 0,05$).

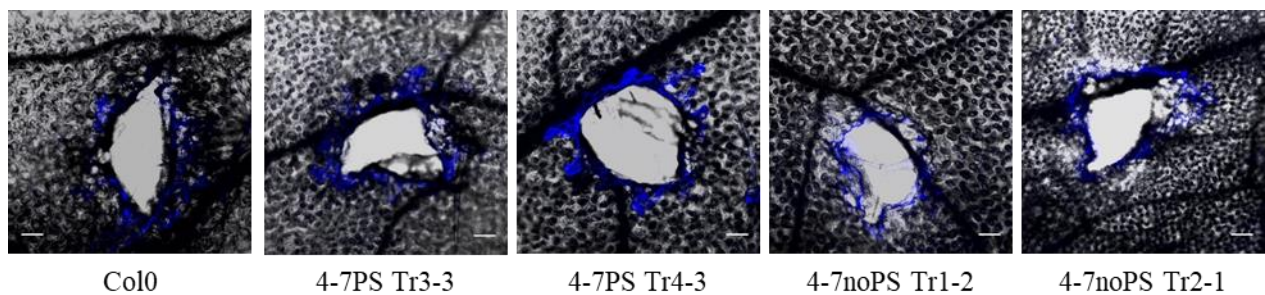


Figure 10: l'expression stable d'AvrLm4-7 dans *A. thaliana* n'affecte pas le dépôt de callose suite à l'inoculation par *Leptosphaeria maculans*.

Les lignées transgéniques ont été inoculées avec des spores de *Leptosphaeria maculans* (souche v77.1.11). La callose a été marquée au bleu d'aniline 7 jours post-inoculation, et les observations ont été faites au microscope confocal à un grossissement de x63. L'échelle représente 10 μ m. Les noms des transformants exprimant AvrLm4-7 avec (4-7PS) ou sans (4-7noPS) son peptide-signal sont indiqués sous la forme d'un code à deux chiffres (Tr4-3...).

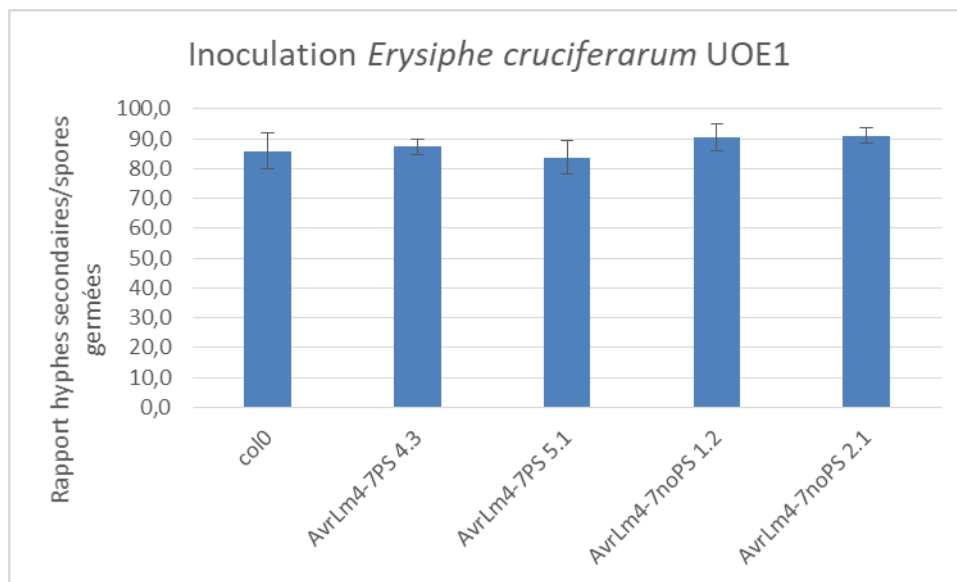


Figure 11: l'expression stable d'AvrLm4-7 dans *A. thaliana* n'affecte pas la sensibilité des plantes à *Erysiphe cruciferarum*.

Les lignées transgéniques ont été inoculées avec des spores de *E. cruciferarum*. Le rapport entre le nombre d'hyphes secondaires formés par rapport au nombre total de spores germées a été déterminé 2 jours post-inoculation au cours de 2 expériences indépendantes.

Discussion

Les résultats obtenus lors de la caractérisation fonctionnelle d'AvrLm4-7 nous permettent d'améliorer notre compréhension de son mode d'action dans la cellule végétale. AvrLm4-7 présente une localisation nucléo-cytoplasmique, qu'il soit exprimé avec ou sans son peptide signal, ce qui suggère un mode d'action intracellulaire. Les cribles double-hybride réalisés ont permis de mettre en évidence des cibles végétales potentielles, dont une protéine ribosomale qui correspond au type de cibles végétales avec lesquelles interagissent les effecteurs RALPH de *B. graminis*, analogues structuraux d'AvrLm4-7. La présence d'AvrLm4-7 permet de supprimer la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3*, et AvrLm4-7 est capable de supprimer la mort cellulaire associée aux inducteurs de la mort cellulaire BAX, NEP1, INF1, AvrPto et JIP60. Cependant, les lignées d'*A. thaliana* exprimant *AvrLm4-7* de façon constitutive ne présentent aucune différence morphologique ou de sensibilité aux maladies comparativement à l'écotype sauvage Col0.

AvrLm4-7 présente des analogies structurales avec les effecteurs RALPH de *B. graminis*, qui sont eux-mêmes des analogues structuraux de ribonucléases. Les ribonucléases peuvent remplir de nombreux rôles dans les interactions hôte-pathogène ou la compétition entre microorganismes. Elles sont souvent à la base des systèmes toxine-antitoxine utilisés par les bactéries pour éliminer des compétiteurs partageant la même niche écologique (Cook *et al.*, 2013). Elles sont généralement classées en deux types qui ont pour point commun de cibler très spécifiquement une séquence conservée dans la plupart des ARN ribosomaux, la boucle sarcine-ricine. Les Ribosome-Inactivating Proteins (RIPs) provoquent la dépurination de l'ARNr 28S via le clivage de la liaison entre une adénine et le ribose (Walsh *et al.*, 2013). Les ribotoxines fongiques quand à elles dégradent directement l'ARNr 28S sans passer par une dépurination (Olombrada *et al.*, 2017). Dans les deux cas, le résultat est une inhibition totale et irréversible de la traduction. Un effecteur de *Z.*

tritici possédant une activité ribonucléase a récemment été caractérisé : *Zt6* présente deux pics d'expression, un premier 24h post-infection, et le second 14 jours post-infection. Cet effecteur présente une activité ribonucléase et une toxicité contre les cellules végétales, ainsi que contre des levures et des bactéries, mais pas contre *Z. tritici*, ce qui suggère une implication dans la compétition contre d'autres microorganismes présents lors de l'infection du blé par *Z. tritici* (Kettles *et al.*, 2017). Dans le cas des effecteurs de *B. graminis*, l'activité ribonucléase n'a pas été conservée, de même que les résidus habituellement présents dans le site actif de ce type de protéines (Pedersen *et al.*, 2012). En revanche ces effecteurs, s'ils ne possèdent plus d'activité ribonucléase, sont impliqués dans la suppression des défenses de la plante. On peut citer BEC1054 qui cible une protéine PR5 afin de supprimer la PTI, ou l'effecteur SvrPm3^{al/f1} qui supprime l'ETI déclenchée par la reconnaissance d'AvrPm3^{a2/f2} par Pm3a/f (Bourras *et al.*, 2015, 2016; Parlange *et al.*, 2015 ; Pennington *et al.*, 2016). L'effecteur BEC054 interfère avec les réactions immunitaires de l'hôte qui impliquent des ARN ribosomiaux (Spanu *et al.*, 2017). D'autres effecteurs de *B. graminis* présentent des analogies structurales avec des ribonucléases, comme AvrPm2 de *B. graminis* f. sp. *hordei*, qui présente deux homologues chez les espèces proches *B. g. triticales* et *B. g. secalis*, ces trois gènes d'avirulence étant reconnus par le même gène de résistance Pm2 du blé.

Spanu (2015) a proposé que ces effecteurs analogues aux ribonucléases suppriment l'immunité végétale via des interactions avec les ARNr de la plante hôte. L'effecteur BEC1054 présente plusieurs points communs avec AvrLm4-7 : il est structuralement analogue à des ribonucléases. Il interagit avec des acides nucléiques, ainsi qu'avec une protéine ribosomale, et supprime la mort cellulaire provoquée par JIP60 (P. Spanu, comm. pers). On peut supposer qu'AvrLm4-7 ne présente pas de fonction ribonucléase : aucun domaine caractéristique des ribonucléases, ni aucune analogie structurale avec ces protéines n'a été mis en évidence, et l'expression d'AvrLm4-7 dans

des cellules végétales, animales, bactériennes ou fongiques ne présente aucune toxicité. En revanche, AvrLm4-7 est capable de supprimer la mort cellulaire, notamment celle induite par JIP60, ce qui laisserait supposer comme pour les effecteurs de *B. graminis* que seul le rôle de suppresseur des réactions de défense a été conservé.

Plusieurs exemples d'effecteurs supprimant l'ETI déclenchée par la reconnaissance d'un autre effecteur ont été rapportés, mais les événements moléculaires menant à cette suppression sont pour le moment largement méconnus. Ainsi l'effecteur Avr1 de *F. oxysporum f.sp. lycopersici* supprime la reconnaissance des effecteurs Avr2 et Avr3 par les gènes de résistance *I2* et *I3* de la tomate via un mécanisme encore inconnu (Houterman *et al.*, 2008). Il en va de même pour plusieurs effecteurs de *B. graminis*, incluant SvrPm3^{al/fl}, qui permettent de supprimer la reconnaissance d'un autre effecteur (Bourras *et al.*, 2015, 2016; Parlange *et al.*, 2015). Les mécanismes moléculaires de suppression de l'ETI sont mieux connus chez les bactéries, en particulier chez *P. syringae*. Ainsi, l'effecteur AvrRpt2 dégrade la protéine RIN4, dont la phosphorylation par l'effecteur AvrRPM1 entraîne l'ETI. AvrRpt2 supprime donc spécifiquement l'ETI déclenchée par AvrRPM1 (Mackey *et al.*, 2003). De même, l'effecteur AvrPphB supprime la reconnaissance d'AvrB en clivant la kinase RIPK (RPM1 Interacting Protein Kinase), responsable de l'activation de RPM1 suite à la phosphorylation de RIN4 (Russell *et al.*, 2015). Enfin, l'effecteur HopD1 interfère avec l'activité du facteur de transcription NTL9, qui intervient dans les réactions de défense de la PTI comme de l'ETI. Cependant, HopD1 ne supprime pas la PTI déclenchée par NTL9, mais uniquement et spécifiquement l'ETI. Il s'agit donc d'un suppresseur spécifique de l'ETI (Block *et al.*, 2014). Les tests de suppression de mort cellulaire sur feuilles de *N. benthamiana* nous ont montré que l'expression transitoire d'AvrLm4-7 permet d'interférer à la fois avec la PTI et l'ETI, ce qui est cohérent compte-tenu de la conservation des voies de signalisation menant à ces deux réponses

(Tsuda *et al.*, 2010). De plus, AvrLm4-7 est capable de supprimer la mort cellulaire lorsqu'il est exprimé avec ou sans son peptide-signal. Cela est en adéquation avec la localisation intracellulaire d'AvrLm4-7 observée par Blondeau *et al.* (2015) et confirmée par mes observations. Cependant, l'expression constitutive d'*AvrLm4-7* dans *A. thaliana* n'augmente pas la sensibilité des lignées obtenues aux agents pathogènes, quel que soit leur mode de vie et leur interaction avec *A. thaliana*.

Chapitre III :

AvrLm3

Introduction

La résistance *Rlm3* a été largement utilisée depuis le début des années 1990, puis maintenue dans la plupart des cultivars de colza depuis cette époque (Rouxel et Balesdent, 2017). Plusieurs études réalisées en France et en Europe entre 2000 et 2006 ont démontré qu'il n'existait quasiment aucun isolat avirulent vis-à-vis de *Rlm3* dans les populations naturelles de *L. maculans* (Balesdent *et al.*, 2006; Stachowiak *et al.*, 2006). L'hypothèse a d'abord été faite que la résistance *Rlm3* avait été largement contournée, tout comme l'avait été la résistance *Rlm1* en l'espace de trois saisons culturales (Rouxel *et al.*, 2003). Cependant, l'apparition d'isolat virulents vis-à-vis de *Rlm3* est, de façon surprenante, accompagnée de l'apparition concomitante d'isolats avirulents vis-à-vis de *Rlm3* (Plissonneau *et al.*, 2006). De plus, une analyse des populations mondiales de *L. maculans* a montré que 95% des souches isolées en Amérique du Nord étaient soit virulentes sur *Rlm7* et avirulentes sur *Rlm3*, soit avirulente sur *Rlm7* et virulentes sur *Rlm3* (Dilmaghani *et al.*, 2009). Ces observations ont mené Plissonneau *et al.* (2016) à faire l'hypothèse que la présence d'*AvrLm7* empêchait la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3*. Il a effectivement été confirmé lors du clonage du gène d'avirulence *AvrLm3* que ce gène était présent dans toutes les souches de *L. maculans* isolées à ce jour et que sa reconnaissance par *Rlm3* est supprimée en présence d'*AvrLm4-7* (Plissonneau *et al.*, 2016).

Mon hypothèse concernant le rôle d'*AvrLm4-7* dans la suppression de la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3* était qu'*AvrLm4-7* serait un supprimeur de l'ETI (cf. chapitre II), capable d'empêcher le déclenchement des réactions de défense suite à la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3*. Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que les effecteurs supprimant l'ETI sont des effecteurs étant apparu plus tardivement afin de masquer la reconnaissance d'autres effecteurs (Block *et al.*, 2014; Houterman *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011). J'ai donc émis l'hypothèse qu'*AvrLm3* serait un

effecteur apparu plus précocément qu'*AvrLm4-7* dans l'histoire évolutive de *L. maculans*, et qu'il était impliqué dans la suppression de réactions de défense plus générales, comme la PTI ou les défenses basales.

Ce chapitre regroupe plusieurs résultats obtenus au cours de ma thèse concernant la caractérisation fonctionnelle d'*AvrLm3*. J'ai déterminé la localisation subcellulaire d'*AvrLm3* par expression transitoire dans *N. benthamiana* et *A. thaliana*. J'ai également réalisé des tests de suppression de la mort cellulaire afin de déterminer si *AvrLm3* était impliqué dans la suppression des réactions de défense de la plante. Des cibles végétales ont été recherchées pour cet effecteur afin de déterminer avec quels processus cellulaires il pouvait interférer. Enfin des lignées transgéniques d'*A. thaliana* exprimant *AvrLm3* de manière stable et constitutive ont été générées, et les phénotypes associés à l'expression d'*AvrLm3* dans ces lignées ont été étudiés.

Résultats

1. Localisation subcellulaire d'*AvrLm3*

J'ai exprimé transitoirement *AvrLm3* fusionné à la *GFP* ou la *RFP* dans des feuilles de *N. benthamiana*. Cet effecteur présente une localisation nucléo-cytoplasmique lorsqu'il est exprimé sans son peptide signal d'adressage extracellulaire (Fig. 1A). Cependant, lorsqu'il est exprimé avec son peptide signal, *AvrLm3* est localisé dans l'apoplasme des cellules végétales (Fig. 1A). Afin de s'assurer que la localisation observée est bien une localisation extracellulaire, j'ai co-exprimé la *GFP* et *AvrLm3* avec son peptide signal fusionné à la *RFP*. Ainsi le cytoplasme des cellules est marqué avec la GFP, et la localisation apoplastique d'*AvrLm3* est d'autant plus visible (Fig. 1B).

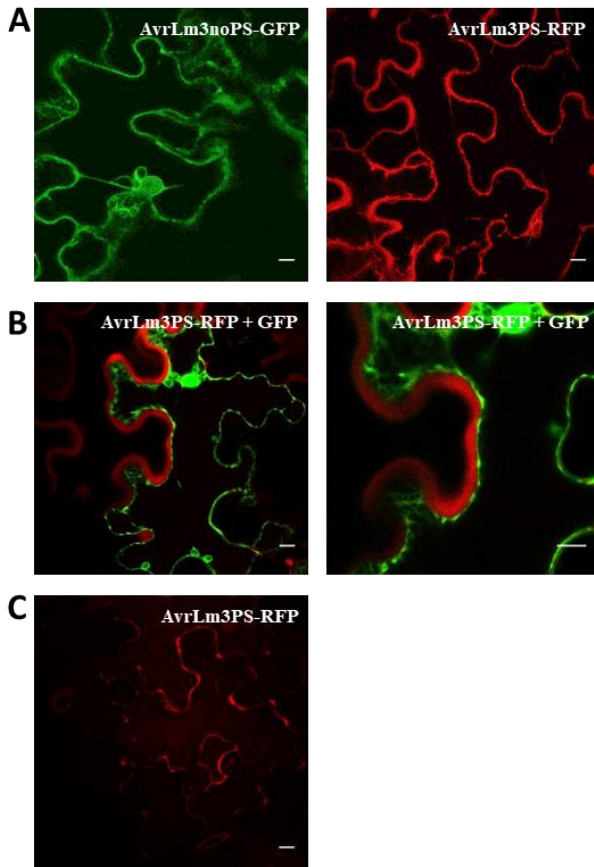


Figure 1: localisation subcellulaire d'AvrLm3 dans *N. benthamiana* et *A. thaliana*.

AvrLm3 a été fusionné à la GFP ou la RFP et a été transitoirement exprimés avec ou sans son peptide signal dans *N. benthamiana* ou *A. thaliana*. La fluorescence a été observée par microscopie confocale 48h après infiltration, à un grossissement de x63.

A : expression transitoire d'AvrLm3 sans son peptide signal fusionné à la GFP (AvrLm3noPS-GFP) et d'AvrLm3 avec son peptide signal fusionné à la RFP (AvrLm3PS-RFP) dans *N. benthamiana*. **B :** Co-expression transitoire d'AvrLm3 avec son peptide signal et de la GFP dans *N. benthamiana*. La deuxième image correspond à un zoom sur une partie de la cellule observée. **C :** expression transitoire d'AvrLm3 avec son peptide signal fusionné à la RFP (AvrLm3PS-RFP) dans *A. thaliana*. Les échelles représentent 10 μ m.

Afin de tester la localisation dans une plante plus proche du colza, j'ai exprimé transitoirement *AvrLm3* avec son peptide signal fusionné à la *RFP* dans des plantules d'*A. thaliana*. Cette fois également, *AvrLm3* avec son peptide signal présente une localisation extracellulaire (Fig. 1C). *AvrLm3* avec son peptide signal est donc localisé dans l'apoplasme des cellules végétales dans le tabac comme dans une Brassicacée.

2. Identification de cibles végétales d'AvrLm3 par crible double hybride

Un crible double-hybride avait été réalisé dans le cadre de la thèse de C. Plissonneau afin d'identifier des protéines végétales interagissant avec *AvrLm3* (Plissonneau, 2015). Le crible a été réalisé contre une banque d'ADNc obtenus suite à l'infection du cultivar de colza Darmor par la souche de *L. maculans* v23.1.3 (interaction compatible, *AvrLm7 avrLm3*), afin d'enrichir la banque en transcrits pertinents dans le cas d'une infection. Les prélèvements ont été faits à 3, 7 et 14 jours post-infection sur cotylédons de colza. La banque a été clonée dans le plasmide pGADT7 afin de fusionner les ADNc au domaine d'activation des gènes rapporteurs du crible, tandis qu'*AvrLm3* a été cloné dans le plasmide pGBKT7 pour le fusionner au domaine de liaison au promoteur de ces gènes rapporteurs. Ce crible a permis d'identifier puis de valider 4 cibles végétales potentielles par double-hybride directe (Tableau 1). Sur ces 4 cibles, une seule est prédite comme étant sécrétée et serait donc compatible avec la localisation apoplastique d'*AvrLm3*. Il s'agit d'une myrosinase-associated protein (iMyaP9), une protéine impliquée dans le clivage de la forme de stockage des glucosinolates en principes actifs ayant notamment des propriétés antimicrobiennes et répulsives pour les insectes (Halkier and Gershenzon, 2006). J'ai exprimé transitoirement cette cible dans *N. benthamiana* et *A. thaliana*. Sans son peptide signal d'adressage extracellulaire, cette protéine présente une localisation nucléo-cytoplasmique (Fig. 2A et 2C).

Tableau 1 : Cibles végétales potentielles d'AvrLm3 identifiées par crible double hybride contre une banque d'ADNc de colza infecté par *L. maculans*

Interactant	Nombre d'occurrences*	Fonction	Compartiment cellulaire**
BnaC06g13840D	1	Endoplasmic Reticulum Membrane protein	Réticulum endoplasmique
BnaC06g06760D	1	Myrosinase Associated protein	Apoplasme
BnaC01g38670D	2	ATPase	Inconnu
BnaA09g55550D	1	Inconnue	Inconnu

Ces interactants potentiels ont été validés par double-hybride direct.

* : nombre de fois où ce clone a été retrouvé durant le crible.

** : la prédiction du compartiment subcellulaire a été réalisée au moyen de l'utilitaire en ligne

TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2000).

Cependant, lorsqu'elle est exprimé avec son peptide signal, la localisation de cette cible ne correspond à aucune localisation cellulaire connue : de la fluorescence RFP est observée sous la forme de longs filaments intracellulaire convergeant en agrégats (Fig. 2B et 2D). La localisation des 3 autres cibles, identifiées par double-hybride, a également été déterminée par expression transitoire dans le tabac : l'une des protéines est localisée dans les chloroplastes (Fig. 2E) et les deux autres dans le réticulum endoplasmique (Fig. 2F et 2G).

3. Suppression de la mort cellulaire par AvrLm3

Afin de déterminer si AvrLm3 est impliqué dans la suppression des réactions de défense, j'ai effectué des tests de suppression de la mort cellulaire dans *N. benthamiana*. J'ai donc co-exprimé transitoirement AvrLm3 avec les inducteurs de la mort cellulaire BAX, NEP1, INF1 et AvrPto. AvrLm3 est capable de supprimer ces trois morts cellulaires, mais uniquement lorsqu'il est exprimé sans son peptide signal (Fig. 3).

4. Génération de lignées transgéniques d'*A. thaliana* exprimant AvrLm3 constitutivement.

Des lignées transgéniques exprimant *AvrLm3* de manière stable et constitutive, avec ou sans son peptide signal d'adressage extracellulaire, ont été générées. A l'issue du processus de sélection, 3 lignées ont été retenues pour chaque transgène (avec ou sans peptide signal) : 2 lignées homozygotes à insertion simple, et une lignée présentant plus d'une insertion du transgène, afin de déterminer si d'éventuels phénotypes liés à l'expression d'*AvrLm3* auraient un effet dose. La bonne intégration du transgène a été vérifiée par PCR, et son expression a été vérifiée par qRT-PCR (Fig. 4).

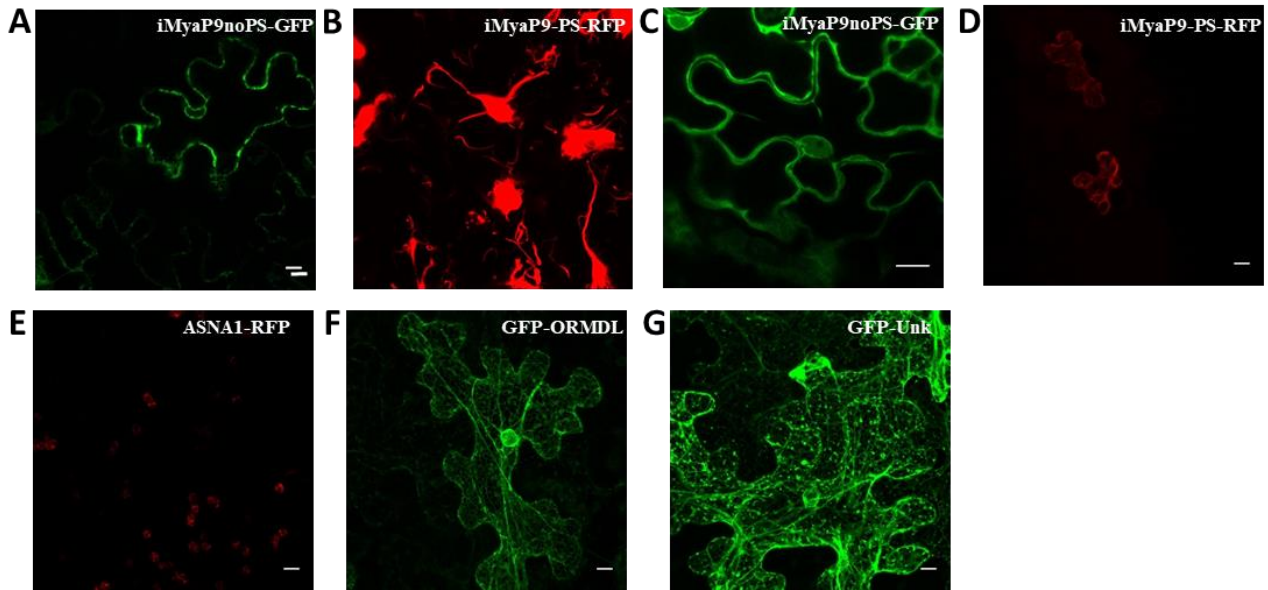


Figure 2: localisation subcellulaire dans *N. benthamiana* et *A. thaliana* des cibles potentielles d'AvrLm3 identifiées lors du crible double-hybride.

Les cibles ont été fusionnées à la GFP ou la RFP et transitoirement exprimées (avec ou sans le peptide signal d'adressage extracellulaire dans le cas de iMyaP9) dans *N. benthamiana* ou *A. thaliana*. La fluorescence a été observée par microscopie confocale 48h après infiltration, à un grossissement de x63.

A : expression transitoire de iMyaP9 sans son peptide signal fusionné à la *GFP* (iMyaP9noPS-GFP) dans *N. benthamiana*. **B** : expression transitoire de iMyaP9 avec son peptide signal fusionné à la *RFP* (iMyaP9PS-RFP) dans *N. benthamiana*. L'image correspond à une projection maximale d'un ensemble d'images prises à différentes profondeurs. **C** : expression transitoire d'iMyaP9 sans son peptide signal fusionné à la *GFP* (iMyaP9noPS-GFP) dans *A. thaliana*. **D** : expression transitoire d'iMyaP9 avec son peptide signal fusionné à la *RFP* (iMyaP9PS-RFP) dans *A. thaliana*. L'image correspond à une projection maximale d'un ensemble d'images prises à différentes profondeurs. **E** : expression transitoire d'ASNA1 fusionné à la *RFP* (ASNA1-RFP). **F** : expression transitoire d'ORMDL fusionné à la *GFP* (GFP-ORMDL). **G** : expression transitoire d'Unk fusionnée à la *GFP* (GFP-Unk). Les échelles représentent 10 μ m.

Les lignées transgéniques exprimant *AvrLm3* ne présentent aucun défaut morphologique (Figure 5). Les plantes poussent à la même vitesse que l'écotype de référence Col0, et aucune différence de taille de feuilles, de tiges ou de fleurs n'est observée.

5. L'expression stable d'*AvrLm3* n'affecte pas la sensibilité d'*A. thaliana* à différents agents pathogènes nécrotrophes et hémibiotrophes.

Les lignées transgéniques exprimant *AvrLm3* ont été infectées par différents agents pathogènes aux modes de vie contrastés. L'expression d'*AvrLm3* n'affecte pas la sensibilité des plantes à *C. higginsianum*, et ne permet pas l'infection par les espèces non pathogènes *C. destructivum* et *C. orbiculare* (données non présentées). De même, l'expression d'*AvrLm3* ne permet pas à *L. maculans* (isolats JN2 et v70.1.11) d'infecter ces plantes (données non présentées).

Les lignées transgéniques exprimant *AvrLm3* ont également été infectées par la souche B05-10 de *B. cinerea*. La taille moyenne des nécroses sur les lignées transgéniques n'est pas significativement différente de celle des nécroses sur l'écotype Col0 (Fig. 6), indiquant que l'expression stable d'*AvrLm3* n'augmente pas la sensibilité des lignées transgéniques à *B. cinerea*.

Enfin, les lignées transgéniques ont également été infectées avec l'agent pathogène biotrophe obligatoire *E. cruciferarum*. Le rapport entre le nombre d'hyphes secondaires formés par rapport au nombre total de spores germées a été déterminé 2 jours post-inoculation (Fig. 7).

Collectivement, ces résultats indiquent que l'expression constitutive d'*AvrLm3* n'affecte pas la sensibilité d'*A. thaliana* à différents agents pathogènes présentant des modes de vie différents.

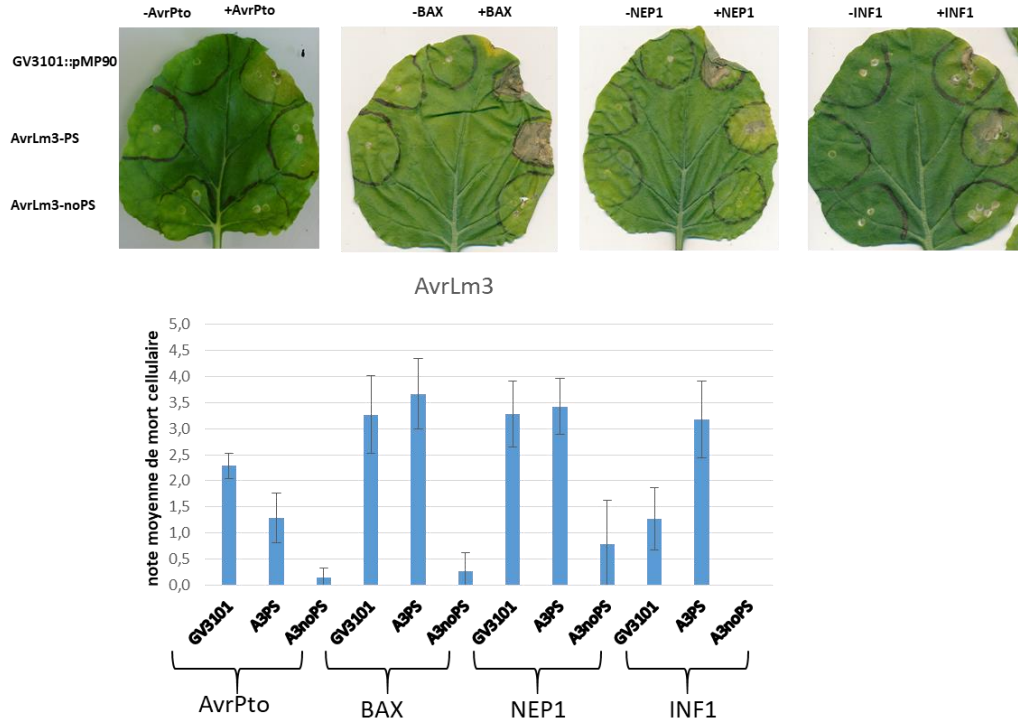


Figure 3: AvrLm3 supprime la mort cellulaire provoquée par plusieurs inducteurs.

AvrLm3 a été exprimé transitoirement dans des feuilles de *N. benthamiana*, avec ou sans son peptide signal. 24h plus tard les inducteurs de mort cellulaire AvrPto, BAX, NEP1 et INF1 ont été exprimés à leur tour. La souche d'agrobactérie GV3101 exprimant le vecteur vide (pMP90) a été utilisée comme témoin. Les notations ont été réalisées entre 7 et 10 jours après infiltration de l'inducteur de mort cellulaire, et représentent la moyenne de plusieurs expériences indépendantes (entre 2 et 4 selon l'inducteur), avec pour chaque expérience entre 3 et 5 feuilles testées sur au moins deux plantes différentes.

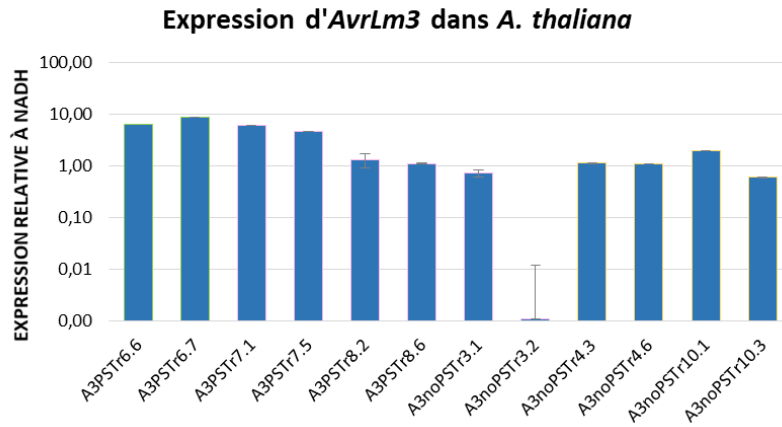


Figure 4: les lignées transgéniques d'*A. thaliana* expriment *AvrLm3*.

Expression d'*AvrLm3* dans les lignées transgéniques d'*A. thaliana*. Le niveau d'expression d'*AvrLm3* est relatif à l'expression du gène de ménage *NADH*. L'expression pour chaque lignée correspond à la moyenne de deux répétitions biologiques et deux répétitions techniques. Les noms des transformants exprimant *AvrLm3* avec (A3PS) ou sans (A3noPS) son peptide signal sont indiqués sous la forme d'un code à deux chiffres (Tr6-6...).



Figure 5: l'expression stable d'*AvrLm3* dans *A. thaliana* n'affecte pas la morphologie des plantes.

Morphologie des plantes exprimant *AvrLm3* de manière stable comparée à l'écotype de référence Col0. Les plantes ont été cultivées en jours courts (alternance de 8h de jour et 16h de nuit). Les noms des transformants exprimant *AvrLm3* avec (A3PS) ou sans (A3noPS) son peptide-signal sont indiqués sous la forme d'un code à deux chiffres (Tr6-6...).

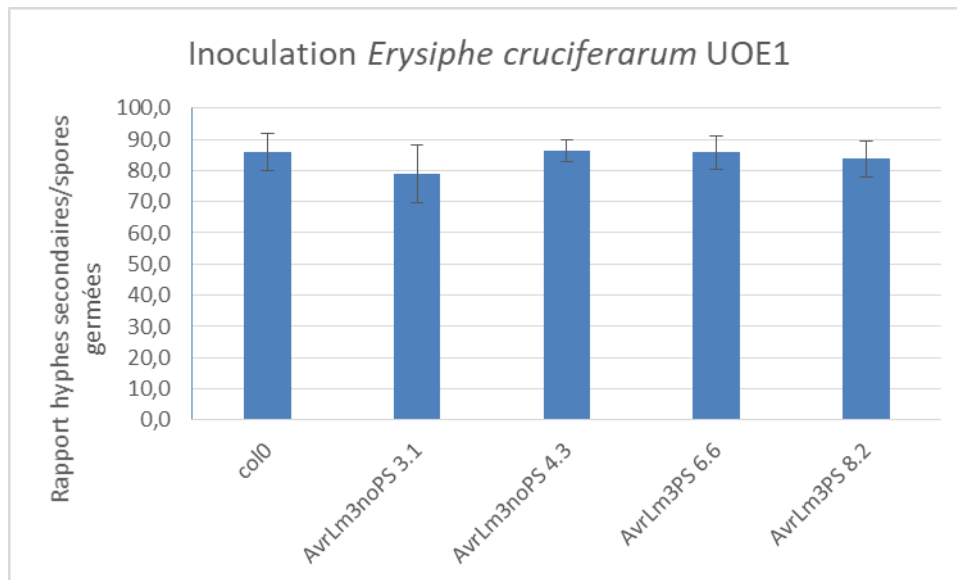


Figure 6: l'expression stable d'AvrLm3 dans *A. thaliana* n'affecte pas la sensibilité des plantes à *Erysiphe cruciferarum*.

Les lignées transgéniques ont été inoculées avec des spores d'*E. cruciferarum*. Le rapport entre le nombre d'hyphes secondaires formés par rapport au nombre total de spores germés a été déterminé 2 jours post-inoculation au cours de 2 expériences indépendantes.

Discussion

Les résultats présentés au cours de ce chapitre nous permettent d'envisager un possible mode d'action pour AvrLm3. Cet effecteur est localisé dans l'apoplasme des cellules foliaires de *N. benthamiana* lorsqu'il est exprimé avec son peptide-signal, ce qui peut indiquer d'un mode d'action extracellulaire. De manière concomitante avec cette observation, une des cibles retrouvée lors du crible double-hybride réalisé contre AvrLm3 est une protéine sécrétée dans l'apoplasme et impliquée dans le système myrosinase-glucosinolate. AvrLm3 est capable de supprimer la mort cellulaire induite par BAX, NEP1, INF1 et AvrPto. Enfin, l'expression stable d'AvrLm3 dans *A. thaliana* ne semble pas provoquer de différence particulière avec l'écotype de référence Col0 tant au niveau de la morphologie des plantes que de leur sensibilité à différents agents pathogènes.

La suppression de la reconnaissance d'un gène d'avirulence grâce à un autre gène d'avirulence a déjà été observée un autre pathosystème impliquant des champignons. En effet, le gène *AVR1* de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici (Fol)* supprime la reconnaissance de deux gènes d'avirulence, *AVR2* et *AVR3*, par les gènes de résistance de la tomate *I2* et *I3* respectivement (Houterman et al., 2008). *AVR2* et *AVR3* sont présents dans toutes les souches de *Fol* isolées à ce jour et sont impliqués quantitativement dans la pathogénie du champignon. Plissonneau *et al.* (2017) suggèrent un rôle important d'AvrLm3 dans la pathogénie de *L. maculans* car ce gène n'est jamais délété ou inactivé, et présente chez les isolats virulents un nombre important de SNP conduisant à la production d'une isoforme conservant potentiellement sa fonction effectrice tout en échappant à la reconnaissance par *Rlm3*. En effet, le passage de l'avirulence à la virulence dans le cadre d'une pression de sélection conjointe *Rlm3/Rlm7* semble se faire soit par l'introduction de SNP dans *AvrLm4-7* et la conservation d'AvrLm3, soit par la génération d'un allèle virulent d'AvrLm3 et l'inactivation d'AvrLm4-7. Cette évolution vers la virulence suggère un rôle majeur

d'*AvrLm3* dans la pathogénie de *L. maculans*, même si cela ne se traduit pas par un effet majeur lorsqu'*AvrLm3* est exprimé dans *A. thaliana*.

AvrLm3 présente des homologies de séquence avec l'effecteur ECP11-1 de *C. fulvum*, un effecteur apoplastique, très conservé, fortement produit pendant toute l'infection sur tomate et induisant une mort cellulaire sur des variétés sauvages de tomates (Mesarich *et al.*, 2017). De manière intéressante, lorsqu'une souche de *L. maculans* virulente vis-à-vis de *Rlm3* est complétée avec le gène codant ECP11-1, elle est reconnue par un cultivar possédant *Rlm3*. En revanche, *AvrLm3* exprimé de façon transitoire dans des variétés sauvages de tomate n'est pas capable d'induire une mort cellulaire (C. Mesarich, MH. Balesdent, I. Fudal, communication personnelle). A nouveau, la conservation d'*AvrLm3* dans les populations de *L. maculans* (Plissonneau *et al.*, 2017) et son homologie avec un effecteur très conservé de *C. fulvum* suggère un rôle important de ces deux effecteurs dans la pathogénie fongique. Il convient maintenant de déterminer si ces deux effecteurs ont effectivement un rôle important pour la pathogénie fongique chez *L. maculans* et *C. fulvum*, s'ils présentent des cibles végétales communes et enfin, si la présence d'*AvrLm4-7* est capable de masquer la reconnaissance d'ECP11-1 par *Rlm3*.

D'après la logique du modèle en zig-zag, les effecteurs supprimant l'ETI sont apparus plus tard au cours de l'évolution d'un pathosystème, dans le but de supprimer la reconnaissance d'un effecteur par une protéine de résistance. Cet effecteur dont la reconnaissance est supprimée devrait donc être apparu plus tôt au cours de l'histoire évolutive de ce pathosystème, et devrait être impliqué dans la suppression d'un type de défense plus précoce. Par exemple, l'effecteur *AvrB* de *P. syringae*, dont la reconnaissance par la protéine de résistance *RPM1* est supprimée par l'effecteur *AvrPphB*, cible la kinase *MPK4*, entraînant une perturbation de la balance hormonale de la plante en faveur de la production d'acide jasmonique, et à terme une augmentation de la sensibilité de la plante (Cui *et*

al., 2010). Dans cet exemple, AvrB est un suppresseur de la PTI qui est reconnu par la protéine de résistance RPM1. En l'occurrence cette reconnaissance se fait via l'interaction d'AvrB avec une autre de ses cibles, RIN4, dont la phosphorylation par AvrB entraîne l'activation de la kinase RIPK et le déclenchement de l'ETI. Plus tard au cours de la coévolution entre *P. syringae* et ses plantes-hôtes, un autre effecteur a été acquis, AvrPphB, qui permet de supprimer la reconnaissance d'AvrB par RPM1 (Russell *et al.*, 2015). Dans le cas d'AvrLm3, ce modèle serait validé si iMyaP9 est confirmée comme une cible d'AvrLm3. On retrouverait ainsi un effecteur dont le mode d'action serait de supprimer des défenses précoces – en l'occurrence le système myrosinase-glucosinolate. Par ailleurs, AvrLm3 est capable de supprimer la mort cellulaire induite par le PAMP INF1, ce qui est en concordance avec ce rôle hypothétique de suppresseur de la PTI et des défenses précoces de la plante. AvrLm3 aurait par la suite été reconnu par la protéine de résistance Rlm3, puis cette reconnaissance aurait été supprimée par un autre effecteur, AvrLm4-7, au cours de l'histoire évolutive du pathosystème *L. maculans* / colza.

Le système myrosinase-glucosinolate est un système de défense spécifique des plantes de l'ordre des Capparales (qui inclut notamment les familles des Brassicaceae, Capparaceae et Caricaceae) (Halkier et Gershenzon, 2006). Les glucosinolates sont des métabolites secondaires dont la forme de stockage est composée de trois parties : un β -D-glucopyranose, lié à un ester hydroximosulfate, auxquels s'ajoutent un groupement R variable selon le type de glucosinolate et composé d'un à huit acides aminés (Halkier et Gershenzon, 2006). Les myrosinases pour leur part sont des enzymes de la famille des glycosides hydrolases qui vont hydrolyser le groupement glucopyranose des glucosinolates pour former un glucose et un résidu aglycone libre. C'est ce résidu qui va se réarranger pour former différents composés en fonction de l'environnement physico-chimique, des protéines associées aux myrosinases et de la nature du groupement R du

glucosinolate originel (Halkier et Gershenzon, 2006). Des nombreux cofacteurs participent à cette dégradation, parmi lesquels les Myrosinase-binding Proteins (MyBP) et les Myrosinase-associated Proteins (MyAP) (Bones et Rossiter, 1996). La cible potentielle d'AvrLm3 est une MyaP (iMyaP9), qui présente des homologies de séquence avec les protéines de la famille des lipases (Taipalensuu *et al.*, 1997). Son expression est induite en cas de blessure, mais aussi en présence de jasmonate, méthyl-jasmonate et acide abscissique (Andreasson *et al.*, 1999; Taipalensuu *et al.*, 1997). Les produits de dégradation des glucosinolates sont divers (isothiocyanates, nitrilles, cyanoepithioalkanes...) et vont avoir différents effets (Bones et Rossiter, 1996). Ils peuvent être répulsifs de certains herbivores, alors que d'autres seront au contraire attracteurs (Halkier et Gershenzon, 2006). Ils peuvent également être fongicides et permettre à la plante de lutter contre l'infection par un champignon phytopathogène. Les glucosinolates peuvent avoir deux effets distincts : un effet antimicrobien à large spectre d'une part, et un effet potentialisateur sur les réactions de défense d'autre part (Laluk et Mengiste, 2010). En effet chez *A. thaliana*, la protéine PEN2 (Penetration specific) agit comme une myrosinase atypique qui dégrade les glucosinolates et est impliquée dans la redirection de composés antimicrobiens vers le site d'infection et la formation de dépôts de callose, tout cela d'une manière glucosinolate-dépendant (Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2008). Les glucosinolates sont fortement impliqués dans les réactions de défense d'*A. thaliana* contre *B. cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Alternaria brassicola* (Buxdorf *et al.*, 2013; Stotz *et al.*, 2011) ainsi que dans la défense de *B. napus* contre *S. sclerotiorum* (Wei *et al.*, 2016). De plus, Robin *et al* (2017) ont récemment démontré que des souches de *L. maculans* étaient capables de supprimer la production de glucosinolates par *B. oleracea* au cours de l'infection, alors que les cultivars résistants étaient toujours capables de les produire. Si l'interaction d'AvrLm3 avec iMyaP9 se confirme, il s'agirait du premier exemple décrit d'un effecteur d'agent phytopathogène ciblant le système myrosinase-glucosinolate. Ce mode d'action serait cohérent avec le modèle

proposé dans lequel AvrLm3 serait impliqué dans la suppression d'une voie de défense précoce : AvrLm3 empêcherait iMyaP9 d'accomplir son rôle au sein du complexe chargé de dégrader les glucosinolates pour former une molécule destinée à lutter contre *L. maculans*. Ce mode d'action est en cours de validation de plusieurs façons. D'une part, l'interaction d'AvrLm3 avec sa cible potentielle est en cours de confirmation par différentes techniques (BiFC, coimmunoprécipitation). D'autre part, des expériences de dosage des glucosinolates sont actuellement en cours dans les lignées transgéniques d'*A. thaliana* exprimant *AvrLm3*, ainsi que dans des lignées mutantes pour l'homologue de iMyaP9 chez *A. thaliana*.

La localisation extracellulaire d'AvrLm3 est cohérente avec sa possible interaction avec une cible extracellulaire, iMyaP9. On peut imaginer qu'AvrLm3 interagit avec iMyaP9 dans l'apoplasme des cellules végétales avant son recrutement dans le complexe chargé de dégrader les glucosinolates, réduisant ainsi la quantité de glucosinolates à action fongicide dans l'apoplasme. Cependant, la capacité d'AvrLm3 à supprimer la mort cellulaire dans *N. benthamiana* uniquement lorsqu'il est exprimé sans son peptide signal n'est pas cohérente avec l'ensemble du modèle. Une explication pourrait être que le mode d'action d'AvrLm3 est intracellulaire mais qu'il n'est pas efficacement transloqué dans les cellules végétales de *N. benthamiana* : ainsi la mort cellulaire ne serait inhibée que lorsque cet effecteur est exprimé directement dans le cytoplasme des cellules foliaires (sans son peptide-signal), alors qu'une mauvaise translocation l'empêcherait d'inhiber la mort cellulaire lorsqu'il est exprimé avec son peptide-signal. De même, la localisation extracellulaire observée lorsqu'AvrLm3 est fusionné à la RFP serait expliquée par son absence de translocation. Cette explication remettrait cependant en cause l'implication d'AvrLm3 dans la suppression du système myrosinase-glucosinolate. Une autre explication pourrait être qu'AvrLm3 possède deux rôles lors du processus infectieux de *L. maculans* (comme cela a récemment été

démontré pour plusieurs effecteurs : Breen *et al.*, 2017a; Liu *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2014) : un premier dans l'inhibition de la réponse du système myrosinase-glucosinolate, et un second dans la suppression de la mort cellulaire via un mécanisme encore inconnu.

Matériels et Méthodes

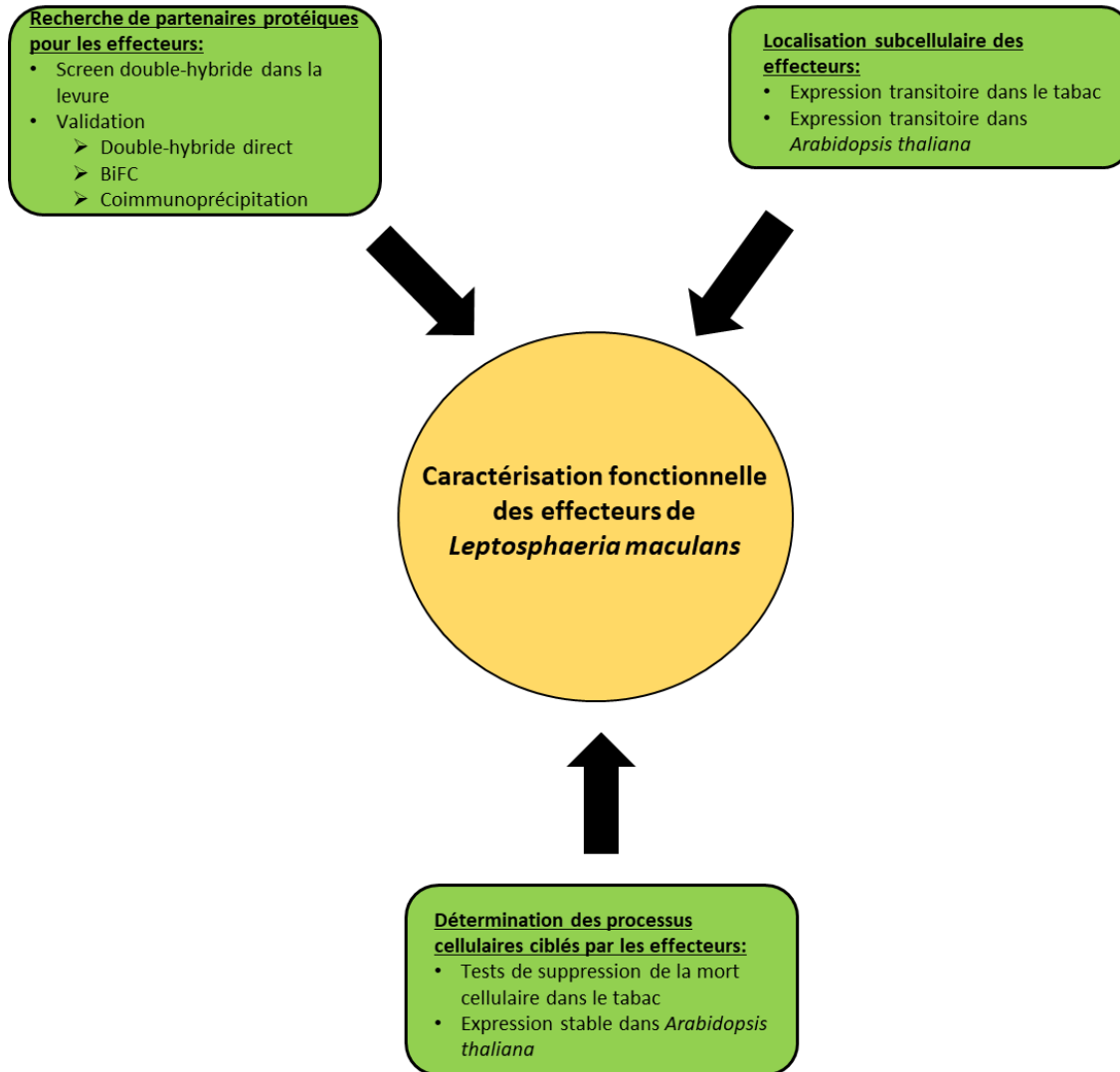


Figure 1: Principaux axes de recherche et approches développés au cours de la thèse

La caractérisation fonctionnelle des effecteurs de *L. maculans* réalisée au cours de ma thèse s'est articulée autour de trois axes principaux (Fig. 1):

- La localisation subcellulaire des effecteurs dans le tabac et dans une plante de la famille des *Brassicaceae*, *Arabidopsis thaliana*.
- La recherche des protéines végétales ciblées par les effecteurs.
- La détermination des processus cellulaires ciblés par les effecteurs via leur expression stable dans *A. thaliana* et la recherche de phénotypes associés à l'expression des effecteurs dans la plante, ainsi que par des tests de suppression de la mort cellulaire dans le tabac.

Culture des plantes et microorganismes

La culture de *N. benthamiana* se fait en terre à 25°C et 50% d'humidité relative en jours longs (alternance de 16h de jour et 8h d'obscurité).

La culture d'*A. thaliana* se fait en terre à 22°C en jours longs (alternance de 16h de jour et 8h d'obscurité) pour favoriser la montée à graines, en jours courts (alternance de 8h de jour et 16h d'obscurité) pour favoriser la croissance végétative, ou en jours intermédiaires (alternance de 12h de jour et 12h d'obscurité) pour les inoculations de *Colletotrichum sp.*.

La culture de *B. napus* se fait en terre avec une alternance de jour (16h, 22°C, 80% d'humidité) et de nuit (8h, 18°C, 100% humidité).

Les souches DH5 α et DB3.1 (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis) de *Escherichia coli* ont été cultivées sur un milieu LB (peptone 10 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 10 g/l) à 37°C. Les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 et GV3101::pMP90 ont été cultivées sur milieu LB ou YEB (bacto-beef extract: 5g/l, bacto-yeast extract: 1g/l, bacto peptone: 5g/l, saccharose: 5g/l, MgSO₄:

1M) à 28°C. Les souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* Y187 et Y2H-Gold sont cultivées sur milieu SD (Yeast nitrogen Base sans acides aminés – Sigma, Darmstadt, Allemagne - 6,7 g/l, glucose 20 g/l, 10X Quadruple Drop-Out solution 0,6 ml/l) ou YPDA (Peptone 20 g/l, extrait de levure 10 g/l, glucose 20 g/l). La 10X Quadruple Drop-Out (QDO) solution est composée des éléments suivants en solution dans de l'eau stérile : Arginine, Méthionine et Uracile 200 mg/l, Isoleucine, Lysine, Tyrosine 300 mg/l, Phénylalanine 500 mg/l, Valine 1500 mg/l, Thréonine 2000 mg/l.

L. maculans est cultivé sur un milieu V8 (10% jus V8, CaCO₃ 30 mM) à 25°C. *Colletotrichum sp.* sont cultivées sur un milieu Mathur-agar (Peptone 2,00 g/l, Magnesium sulphate, heptahydrate 1,22 g/l, Potassium dihydrogène phosphate 2,72 g/l, Sucrose 2,80 g/l, Agar 20,00 g/l) à 25°C. *Botrytis cinerea* est cultivé sur un milieu ML (Malt 20 g/l, levures 5 g/l) à 25°C.

Clonages et vecteurs

Les gènes d'intérêt ont été amplifiés à partir d'ADNc de la souche de référence v23.1.3 pour les gènes codant les effecteurs, ou à partir d'ADNc de colza infecté par *L. maculans* pour les gènes codant les cibles végétales, à l'aide de la Taq polymérase Phusion (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis) et de conditions de PCR adaptées. Les amorces utilisées pour ces amplifications sont résumées dans le Tableau S1. les produits PCR flanqués des sites de recombinaisons attB ont été recombinaisonnés dans des vecteurs pDONR221 (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis) via une réaction de recombinaison BP afin d'obtenir les vecteurs d'entrée portant des séquences attL selon les recommandations du fournisseur (<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cloning/gateway-cloning/protocols.html#bp>). Les inserts clonés dans les vecteurs d'entrée ont par la suite été insérés dans des vecteurs de destination via une réaction de recombinaison LR.

Ces vecteurs de destination sont ensuite transformés dans les souches d'agrobactéries C58C1 ou GV3101::pMP90.

Pour les tests d'interaction en double-hybride, les ADNc obtenus lors des cribles sont amplifiés à partir de colonies de levures avec les amorces pGADT7-AD_prey_F et pGADT7-AD_prey_R. Les levures sont par la suite transformées avec l'amplicon obtenu, le plasmide pGADT7 linéarisé par une digestion SmaI et le plasmide Y2H-Gold contenant le gène d'intérêt.

Crible double-hybride dans la levure

Les cribles double-hybride ont été réalisés avec le kit Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (ClonTech, Takara, Shiga, Japon) selon les recommandations du fabricant. Les gènes d'intérêt (*AvrLm3*, *AvrLm4-7*, *AvrLm10-1*, *AvrLm10-2* et *AvrLm10-1-polylinker-AvrLm10-2*) ont été amplifiés par PCR à partir d'ADNc issus de la souche de référence v23.1.3 et clonés dans le vecteur pGBKT7 après double digestion BamHI/EcoRI. Les ADNc issus des différentes banques utilisées pour les cribles ont été clonés dans le vecteur pGADT7. Les vecteurs pGBKT7 et pGADT7 ont été transformés dans les levures Y2HGold et Y187 respectivement.

Pour les cribles, une colonie fraîche de Y2HGold transformée avec le gène d'intérêt est mise en culture pendant une nuit dans 50 ml de SD sans tryptophane (SD – Trp) à 30°C et 250 rpm. Lorsque la culture a atteint une DO de 0,8 elle est centrifugée (5 min à 1000 rpm) et resuspendue dans du milieu SD à une concentration de 1.10^8 levures/ml (comptage à la cellule de Malassez). La resuspension est mélangée à un aliquot de 1 ml de levures Y187 transformées avec la banque d'ADNc à une concentration minimale de 2.10^7 levures/ml, et incubée à 30°C et 50 rpm pendant environ 20h. Lorsque des zygotes sont formés, la culture est centrifugée 10 minutes à 1000 rpm et resuspendue dans 10 ml de YPDA. Cette resuspension est étalée sur des boîtes de SD sans tryptophane et sans leucine (SD – Trp - Leu) à raison de 100 µl par boîte. Les levures sont ensuite

incubées à 30°C. Après 3 à 5 jours les colonies qui ont poussé sont repiquées sur des milieux plus stringents : SD sans tryptophane, leucine, adénine et histidine (SD – Trp – Leu – Ade - His), en présence d'auréobasidine (0.1 µg/ml à 0.5µg/ml) et d'aminotriazole (0.5 mM à 50 mM). Pour les tests d'interaction double-hybride, un gène d'intérêt ou un ADNc correspondant à un interactant potentiel identifié lors d'un crible est cloné dans le vecteur pGADT7, le gène codant l'effecteur est cloné dans le vecteur pGBKT7, et ces constructions sont co-transformées dans des levures Y2HGold. Les levures obtenues sont resuspendues dans de l'eau stérile et diluées en cascade (10^{ème}, 100^{ème}, 1000^{ème}). Des gouttes de la resuspension pure et ses dilutions sont déposées sur différents milieux sélectifs: SD/-Leu/-Trp (milieu non sélectif, ne permet de sélectionner que les levures transformées avec les deux vecteurs), SD/-Leu/-Trp/+Auréobasidine (125ng/mL final), SD/-Leu/-Trp/-His, SD/-Leu/-Trp/-His/+10mM3AT, SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade, SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/+Auréobasidin (125ng/mL final).

Expression transitoire dans *N. benthamiana*

Les souches d'*A. tumefaciens* C58C1 ou GV3101::pMP90 exprimant les gènes d'intérêt sous contrôle du promoteur CaMV-35S sont mises en cultures dans 10 ml de LB avec les antibiotiques appropriés à 28°C et 220-250 rpm. Environ 16h plus tard, 2 ml ces pré-cultures sont dilués 5 fois dans 10 ml de YEB en présence d'antibiotiques, et remises en culture pour 4h à 28°C et 220-250 rpm, puis centrifugées 5 min à 5000 rpm et resuspendues dans le milieu d'agroinfiltration (MES: 10 mM, MgCl₂: 10mM, acetosyringone10 mM, Acetosyringone: 200µM) à une DO dépendant de l'expérience réalisée (cf. paragraphe suivant). Les agrobactéries resuspendues sont laissées 2 à 3h à température ambiante à l'obscurité, puis infiltrées dans la face inférieure de feuilles de *N. benthamiana* âgées de 4 à 5 semaines avec une seringue de 1 ml sans aiguille.

Pour les expériences de localisation subcellulaire, les agrobactéries exprimant les constructions protéine d'intérêt / fluorochrome sont resuspendues dans le milieu d'infiltration à une DO de 0,5. Pour les expériences de BiFC, chaque culture d'agrobactérie est resuspendue à une DO de 1, et les différentes resuspensions sont par la suite mélangées volume à volume. Pour les expériences de suppression de la mort cellulaire, la culture d'agrobactérie exprimant le gène d'intérêt est resuspendue à une DO de 0,8, et celle exprimant l'inducteur de la mort cellulaire est resuspendue à une DO de 0,5.

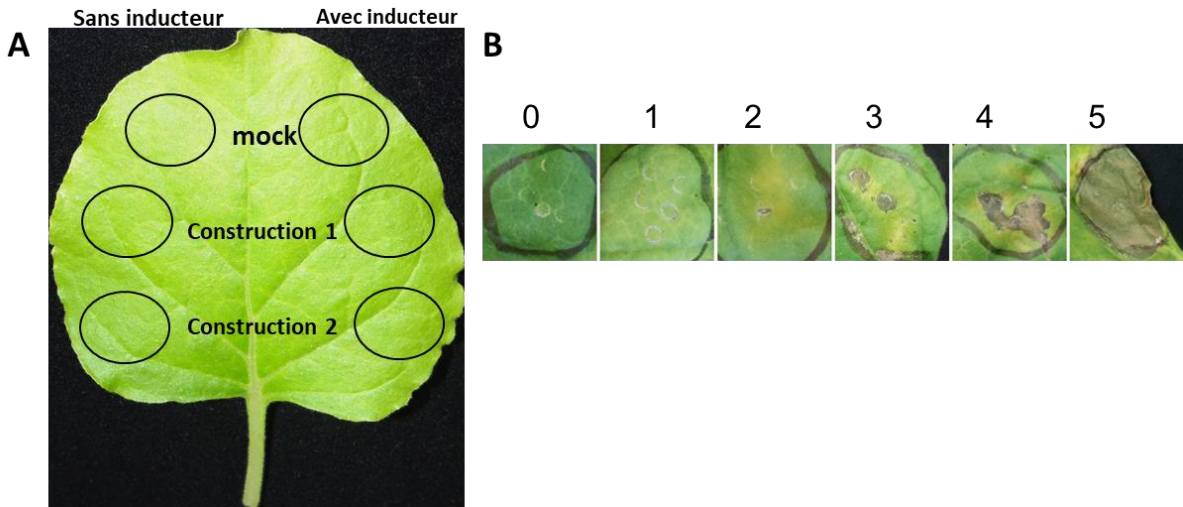


Figure 2: tests de suppression de la mort cellulaire dans *N. benthamiana*

A: les agrobactéries exprimant les différentes constructions à tester ou le vecteur vide (mock) sont infiltrées en deux séries de cercles situés de part et d'autre de la feuille. 24h plus tard l'inducteur de la mort cellulaire est infiltré sur un seul de ces côtés. **B:** échelle de notation des tests de mort cellulaire 0: aucun symptôme visible. 1: décoloration. 2: jaunissement. 3: petites zones nécrotiques sous forme de points couvrant moins de 25% de la zone infiltrée. 4: 25-50% de la zone infiltrée est nécrosée. 5: 50-100% de la zone infiltrée est nécrosée. Adapté de Gervais (2017).

Test de suppression de la mort cellulaire dans *N. benthamiana*

Les suppresseurs potentiels de la mort cellulaire sont exprimés transitoirement dans *N. benthamiana* comme décrit précédemment, selon le plan d'inoculation présenté dans la Fig.2A. La mort cellulaire est observée à 7-10 jours post-infiltration et noté selon le système de notation présenté dans la Fig.2B. La séquence codant l'inducteur de mort cellulaire BAX a été amplifiée à partir d'un vecteur fourni par Brett Tyler (Oregon State University, Corvallis, USA : Dou *et al.*, 2008b). L'inducteur de mort cellulaire NEP1 a été fourni par Richard O'Connell (INRA, Grignon, France). L'inducteur de mort cellulaire AvrPto a été fourni par Mathieu Gourgues (INRA, Sophia-Antipolis, France) avec l'aimable autorisation de Joanna Jelenska (University of Chicago, Chicago, USA). L'inducteur de mort cellulaire JIP60 a été fourni par Pietro Spanu (Imperial College, Londres, UK). La séquence codant l'inducteur de mort cellulaire INF1 a été amplifiée à partir d'un vecteur fourni par Shiv Kale (Virginia Bioinformatics Insitutite, Blacksburg, USA).

Expression transitoire dans *A. thaliana*

Des graines d'*A. thaliana* stérilisées sont semées sur des grilles de 10µm posées sur du milieu MS (MS 2,2 g/l, saccharose 10 g/l, agar 8 g/l) coulé dans une plaque de culture 6 puits (Dominique Dutscher, Brumath, France). Les boîtes sont incubées 2 jours à 4°C à l'obscurité, puis sont transférées dans un phytotron réglé en jours courts (alternance de 8h de jour et 16h d'obscurité).

Les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 ou GV3101::pMP90 exprimant les gènes d'intérêt sous contrôle du promoteur CaMV-35S sont mises en cultures dans 10 ml de LB avec les antibiotiques appropriés à 28°C et 220-250 rpm pendant environ 30h. Les cultures sont ensuite centrifugées 15 min à 5000 rpm et resuspendues à une DO de 0,5 dans le milieu d'agroinfiltration.

Les plantules d'*A. thaliana* ayant passé 4 jours dans le phytotron sont recouvertes de la suspension d'agrobactéries, puis placées dans une cloche à vide et infiltrées sous vide 2 fois durant 2 min. La suspension d'agrobactéries est ensuite retirée, et les plaques 6 puits replacées dans le phytotron .

Sélection de lignées transgéniques d'*A. thaliana*

La transformation et la sélection de plantes transgéniques T0 a été réalisée par Mathieu Gourgues (INRA, Sophia-Antipolis, France) selon la méthode développée par Clough et Bent (1998). Les graines T1 d'*A. thaliana* sont stérilisées dans un tube eppendorf de 1,5 ml contenant 1 ml de solution de stérilisation (éthanol 70%, SDS 0,05%) pendant 3 min, rincées 3 fois dans 1 ml d'éthanol 95% et resuspendue dans un fond d'eau stérile (à hauteur de graines). Les graines sont ensuite semées à la pipette 20 µl sur milieu Murashige et Skoog (Duchefa, Haarlem, Pays-Bas) contenant 50 µg/ml de kanamycine. Une fois le semis effectué, les boîtes sont incubées à 4°C et à l'obscurité pendant 2 jours. Les boîtes sont ensuite placées dans un phytotron réglé en jours longs (alternance de 16h de jour et 8h d'obscurité, 22°C).

Les plantules résistantes sont comptées 14 jours après le transfert dans le phytotron. Pour la sélection des plantes T₀, des lignées présentant 100 % de plantules résistantes à la kanamycine sont sélectionnées. Pour la sélection des plantes T₁, des lignées présentant 25% de plantules sensibles et 75% de plantules résistantes sont sélectionnés ($X^2 < 3,841$). Pour la sélection de plantes T₂, des lignées présentant 100% de plantules résistantes sont sélectionnées. Les plantes sélectionnées sont repiquées en godets de terre individuels pour multiplication. Le protocole de sélection de lignées transgéniques d'*A. thaliana* est schématisé dans la Fig. 3.

Microscopie confocale

Les observations microscopiques ont été effectuées sur un microscope confocal Leica TCS SPE avec un objectif à immersion à eau 63X ou un objectif sans immersion 10X. Les longueurs d'onde

d'émission et d'excitation suivantes ont été utilisées : GFP: excitation 488 nm, émission 489 - 509 nm; RFP: excitation 532 nm, émission 558 à 582 nm; YFP: excitation 488 nm, émission 514 à 527 nm; chlorophylle: excitation 432 nm, émission 660 à 690 nm ; bleu d'aniline : excitation 405 nm, émission 450 à 490 nm. Le gain est réglé à une valeur comprise entre 800 et 900, avec un offset de -0,6.

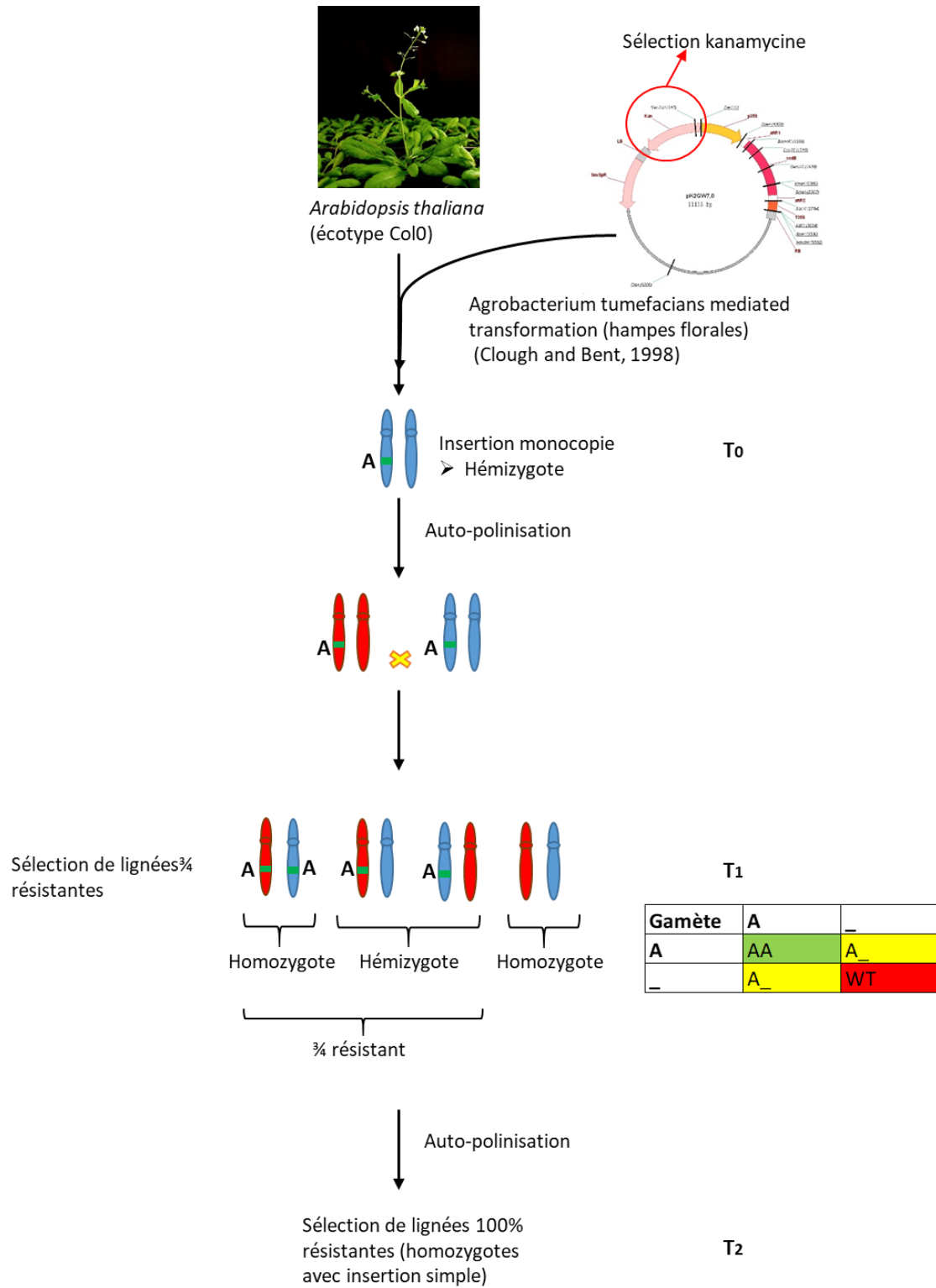


Figure 3: schéma simplifié de la sélection de lignées transgéniques d'*A. thaliana*.

Test de pathogénie avec *Leptosphaeria maculans*

Les souches de *L. maculans* sont mises en culture sur V8 jusqu'à ce que le mycelium ait recouvert la boîte. Un plug de mycélium est ensuite transféré sur une nouvelle boîte de V8 jusqu'à sporulation, comme précédemment décrit (Ansan-melayah *et al.*, 1995). Les spores sont récupérées dans 3-5 ml d'eau stérile, filtrées et diluées à $1 \cdot 10^7$ spores/ml. Des cotylédons de colza de 10 jours sont inoculés, après blessure, avec 10 μ l de cette suspension de spores, mis sous cloche à l'obscurité à température ambiante durant 48h, puis remis en chambre de culture aux conditions appropriées pour le colza. Les symptômes sont notés 14 jours post-inoculation selon l'échelle de notation IMAScore dont les modalités sont les suivantes : 1 : réaction hypersensible. 2 : petites lésions noires de 3 à 6 mm. 3 : petites lésions noires de 6 à 12 mm. 4 : collapsus cellulaire gris-vert. 5 : collapsus cellulaire gris-vert, présence de pycnides. 6 : collapsus cellulaire gris-vert, présence de beaucoup de pycnides. La plante est considérée résistante pour une note comprise entre 1 et 3, et sensible pour une note de 4 ou supérieur (Fig. 4).

Test de pathogénie avec *Colletotrichum spp*

Les souches de *Colletotrichum spp* sont mises en culture sur Mathur-agar jusqu'à ce que le mycelium ait recouvert la boîte. Un plug de mycelium est transféré dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de Mathur-agar, et le champignon est laissé à pousser durant 10 jours. Les spores sont récoltées en ajoutant 10 ml d'eau stérile dans l'erlenmeyer et en récupérant ces 10 ml d'eau après légère agitation, puis sont diluées à une concentration de $2 \cdot 10^5$ spores/ml. Cette suspension de spores est inoculée au spray sur des plantes d'*A. thaliana* ayant poussé 4 à 5 semaines en jours intermédiaires. Les plantes inoculées sont ensuite placées sous cloche et abondamment arrosées, puis replacées dans un phytotron réglé en jours intermédiaires. Les symptômes sont analysés à 4 et 5 jours post-inoculation.

Test de pathogénie avec *Botrytis cinerea*

La souche B05-10 de *B. cinerea* est mise en culture durant 10 jours, et les conidies sont récupérées dans un tampon sucrose-phosphate (sucrose 10 mM, K₂HPO₄ 10 mM) et diluées à 10⁵ spores/ml. Des feuilles détachées d'*A. thaliana* de 4 à 5 semaines sont inoculées, après blessure, avec 10 µl de cette suspension de spores. Les feuilles inoculées sont placées dans une boîte transparente dont le fond a été recouvert avec du papier humide, et incubées en chambre de culture à 21°C en jours longs. Les longueurs de nécroses sont mesurées 6 jours post-inoculation. Les différences de longueurs de nécrose entre génotypes ont été comparées avec un test t de Student avec une P-value de 0,05.

Test de pathogénie avec *Erysiphe cruciferarum*

La souche UOE1 d' *E. cruciferarum* est cultivée et mise à sporuler sur des plantes d'*A. thaliana* de 4 semaines. Des plantes d'*A. thaliana* de 4 semaines sont inoculées en les frottant avec les feuilles infectées. Afin d'inoculer chaque plante de manière homogène, des plateaux contenant chacun 8 pots ont été surmontés d'une tour de décantation de 20 cm. Chaque pot contient 5 plantes de même génotype, et les différents génotypes ont été distribués de manière aléatoire sur les plateaux. Les feuilles infectées sont récoltées 2 jours post-infection et marquées au bleu trypan. Pour chaque génotype, 5 à 9 feuilles ont été utilisées pour déterminer le ratio d'hyphes secondaires par rapport au nombre de spores germées après observation au microscope optique. Les différences de ratio entre génotypes ont été comparées avec un test t de Student avec une P-value de 0,05.

Marquage de la callose

Les feuilles d'*A. thaliana* ont été décolorées de 2h à toute la nuit dans un mélange 3:1 d'éthanol-chloroforme, puis incubées dans des bains successifs de lactophénol concentré à 100%, 75%, 50%, 25%, puis dans 2 bains successifs d'eau osmosée (15 min par bain, sous agitation), et enfin incubées

une nuit dans une solution d'eau contenant 0,07M de K_2HPO_4 et 0,01% de bleu d'aniline (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA). Les feuilles sont montées entre lame et lamelle dans la solution d'incubation, et les lames sont scellées à la colle.

Marquage au bleu trypan

Les feuilles d'*A. thaliana* infectées sont incubées dans une solution de bleu trypan (10 ml acide lactique, 10 ml glycerol, 10 g phénol, 10 mg bleu trypan, 10 ml eau distillée) portée à ébullition durant 1 min, puis décolorées au chloral hydrate (2,5 g/ml) durant au moins 30 min.

Discussion générale

La caractérisation fonctionnelle des effecteurs AvrLm10-1, AvrLm10-2, AvrLm4-7 et AvrLm3 réalisée au cours de ma thèse permet de mieux comprendre le mode d'action des effecteurs de *L. maculans* et de proposer de nouvelles pistes quant à leur rôle au cours du processus infectieux. Ces connaissances peuvent nous permettre de proposer de nouvelles stratégies de lutte contre *L. maculans* via la génération de colza moins sensibles à la maladie. Nous avons en effet pu identifier des cibles potentielles pour les quatre effecteurs de *L. maculans* étudiés et avons pu montrer que ces effecteurs étaient capables de supprimer la mort cellulaire. Ces effecteurs présentent des homologies de séquence ou de structure avec des effecteurs putatifs chez d'autres champignons phytopathogènes, permettant également d'envisager des stratégies de lutte ciblant plusieurs agents pathogènes à la fois. Enfin, la mise en évidence d'interactions non-conventionnelles des effecteurs de *L. maculans* avec des gènes de résistance du colza permettent également de proposer des stratégies de gestion plus durables de ces résistances spécifiques.

1. Comment utiliser la connaissance des cibles végétales et processus cellulaires ciblés par les effecteurs de *L. maculans* en sélection variétale afin de diminuer la sensibilité des plantes aux maladies ?

De par leur implication forte dans les processus infectieux des agents phytopathogènes, les effecteurs sont des outils de choix pour accélérer et améliorer l'identification, la caractérisation et le déploiement de nouvelles sources de résistance qualitatives ou quantitatives.

L'utilisation de variétés exprimant des gènes de résistance majeurs exerce une importante pression de sélection sur les populations d'agents pathogènes, qui contournent rapidement ces résistances qualitatives. Ainsi la coévolution entre les plantes cultivées et les agents pathogènes les infectant prend la forme d'un cycle qualifié de « boom and burst cycle », et de nouvelles sources de résistances doivent régulièrement être identifiées (Brown et Tellier, 2011). Une alternative à la

caractérisation de nouvelles sources de résistance spécifique est d'identifier des facteurs de sensibilité ciblés au cours du processus infectieux et de les modifier (Gawehns *et al.*, 2013). Ce type de résistance, apparentée à de la résistance quantitative, serait potentiellement plus durable. Ainsi le locus *mlo* de l'orge a été introgressé dans les années 1940 et est très utilisé au champ depuis les années 1980 (Ortiz *et al.*, 2002). *Mlo* code une protéine membranaire impliquée dans le trafic vésiculaire, essentielle au bon déroulement de l'infection de l'orge par *B. graminis*. Des homologues de ce gène existent chez d'autres plantes, notamment la tomate et *A. thaliana*. La protéine Mlo2 d'*A. thaliana* est ciblée par l'effecteur de *P. syringae* HopZ2 (Lewis *et al.*, 2012) et sa délétion entraîne une diminution quantitative de l'infection par *P. syringae* et *Golovinomyces orontii* (Vogel et Somerville, 2000). Les gènes de sensibilité peuvent être utilisés de deux façons. La première est de sélectionner des plantes n'exprimant pas le gène qui facilite l'infection par l'agent pathogène. C'est ce qui a été fait pour le locus *mlo*, menant à une résistance quantitative durable contre *B. graminis* (Ortiz *et al.*, 2002). Plusieurs cibles d'effecteurs d'agents pathogènes pourraient être utilisées à cette fin. Plusieurs effecteurs ciblent par exemple des ubiquitine-ligase végétales. L'effecteur Avr3a de *P. infestans* empêche la sécrétion de l'ubiquitine ligase CMPG1, facilitant le processus infectieux (Bos *et al.*, 2010). Un défaut de sporulation de *P. infestans* a été constaté dans le cas de l'infection de plants de *N. benthamiana* « silencés » pour *CMPG1*, et la délétion de l'homologue de *CMPG1* dans le riz, *Spl11*, permet à cette plante de quantitativement mieux résister à *M. oryzae* et *Xanthomonas oryzae* (Yin *et al.*, 2000). La deuxième façon d'utiliser les gènes de sensibilité intervient lorsque ce gène est essentiel à la plante ou si sa délétion affecte d'autres processus. Par exemple, l'effecteur AvrB de *P. syringae* diminue le niveau d'acide salicylique dans *A. thaliana* en ciblant la MAP-Kinase MPK4 (Cui *et al.*, 2010). La délétion de *MPK4* augmente la résistance des plantes à *P. syringae* et *Peronospora parasitica*, mais entraîne également une augmentation de la sensibilité à *A. brassicicola*, ainsi qu'un phénotype de nanisme

et des déclenchements spontanés de mort cellulaire (Petersen *et al.*, 2000). De la même façon, même si l'absence du locus *mlo* a peu d'impact sur l'orge et augmente sa résistance à *B. graminis*, elle augmente sa sensibilité à *M. oryzae*, ce qui rend impossible l'utilisation de variétés n'exprimant pas ce locus dans des régions où orge et riz sont cultivés dans des zones géographiques proches (Jarosch *et al.*, 1999). Dans les cas où une délétion du gène de sensibilité altère le développement de la plante ou sa résistance aux maladies, il est possible de sélectionner des plantes exprimant un allèle du gène de sensibilité permettant la production d'une protéine fonctionnelle mais n'interagissant plus avec l'effecteur qui la cible. Ainsi Kim *et al.* (2002a) ont identifié des allèles récessifs du locus *mlo* qui confèrent une résistance accrue à *B. graminis*, permettant ainsi de diminuer la sensibilité à cet agent pathogène sans pour autant augmenter la sensibilité à *M. oryzae*.

Au cours des dernières années, des études haut-débit ont permis de rechercher des cibles aux effecteurs de plusieurs agents pathogènes, notamment *P. syringae* (Mukhtar *et al.*, 2011; Üstün *et al.*, 2016), *H. parasitica* (Mukhtar *et al.*, 2011), *M. larici-populina* (Petre *et al.*, 2015), *P. striiformis* (Petre *et al.*, 2016) ou *B. graminis* (Pennington *et al.*, 2016). Ces travaux ont permis de recenser les cibles végétales interagissant avec des effecteurs d'agents phytopathogènes et d'identifier des protéines végétales fréquemment ciblées par des effecteurs de plusieurs agents pathogènes, menant au concept de « hub » (Mukhtar *et al.*, 2011). Les cibles potentielles des effecteurs de *L. maculans* ont pour certaines déjà été décrites comme ciblées par des effecteurs d'autres agents pathogènes, alors que d'autres sont totalement inédites. La protéine PR1, potentiellement ciblée par AvrLm10-1 et AvrLm10-2, avait déjà été rapportée comme cible de deux effecteurs de *P. nodorum*, ToxA et Tox3 (Breen *et al.*, 2017a; Lu *et al.*, 2014). Ces travaux ont mis en évidence que même si ToxA et Tox3 sont des toxines hôte-spécifique exprimées par un agent pathogène nécrotrophe dans le but de déclencher une nécrose, le champignon a toujours

besoin de se protéger de molécules de défense ayant un effet microbicide. Lors de l'infection du colza par *L. maculans*, l'expression de *PR1* (ainsi que la production d'acide salicylique) est induite dès le début de l'infection en cas de réaction compatible comme incompatible. Cependant, l'amplitude de l'induction de *PR1* est bien plus importante lors de la réaction incompatible, ce qui témoigne de l'importance de *PR1* dans les réactions de l'ETI (Šašek *et al.*, 2012). Au vu de l'importance fondamentale des protéines *PR1* dans les réactions de défense de la plante, il semble cohérent que ces protéines constituent un hub pour les effecteurs, et il est probable que la délétion simple de tous les gènes codant des protéines *PR1* entraînerait une augmentation importante de la sensibilité de la plante à de nombreux agents pathogènes. En revanche, la délétion sélective de certains allèles, ou leur modification pour que la protéine ne soit plus en mesure d'interagir avec *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2*, reste une solution envisageable. *ToxA* interagit spécifiquement avec une seule protéine *PR1*, alors que *Tox3* interagit avec 6 des 23 protéines *PR1* du blé (Breen *et al.*, 2017a). Il serait intéressant de déterminer avec combien de protéines *PR1* du colza interagissent *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2*.

AvrLm4-7 interagirait avec une protéine ribosomale, tout comme l'effecteur *BEC1054* de *B. graminis*, qui présentent des analogies structurales avec des ribonucléases. Spanu (2015) a suggéré que ce type d'effecteur interagissait avec des ARN afin de moduler les réactions de défense de la plante. Plusieurs effecteurs interférant avec des ARN ont été décrits. Chez *Phytophthora* spp, l'effecteur *PSR1* (*Phytophthora* Suppressor of RNA Silencing 1) interfère avec la synthèse des microRNA (miRNA) et des siRNA (small interfering RNAs) (Qiao *et al.*, 2015), alors que *PSR2* inhibe l'accumulation des ta-siRNA (trans-acting small interfering iRNA) (Xiong *et al.*, 2014), entraînant une augmentation drastique de la sensibilité d'*A. thaliana* et du haricot à plusieurs espèces de *Phytophthora*. Chez le champignon nécrotrophe *B. cinerea*, ce sont directement des ARN

interférents qui jouent le rôle d'effecteurs et qui suppriment l'expression de plusieurs gènes de défense (Weiberg *et al.*, 2013). Dans le cas de BEC1054 et AvrLm4-7, il reste à déterminer si le mode d'action de ces effecteurs correspond à une action directe sur une protéine ribosomale, ou s'ils agissent sur des ARN. Si l'action se fait au niveau des ARN, et qu'AvrLm4-7 se retrouve en complexe nucléo-protéique avec la protéine ribosomale, la stratégie de la modification de cible s'en trouvera compliquée.

Enfin, la cible potentielle d'AvrLm3 est totalement inédite pour un effecteur. Le système myrosinase-glucosinolate se retrouve principalement chez les plantes de la famille des Brassicaceae. Dans les années 1960, les efforts de sélection variétale sur le colza visaient principalement à obtenir des cultivars dont les graines contenaient moins d'acide érucique et de glucosinolates (cultivars « double zéro » ; Johnson et Jellis, 2013). Par la suite il a été démontré que même si la teneur en glucosinolates de ces graines est faible, les tissus végétatifs de la plante en contiennent toujours et la sensibilité de ces cultivars aux insectes ravageurs n'est pas impactée (Johnson et Jellis, 2013). Les glucosinolates peuvent avoir différents impacts sur l'infection en fonction de la plante et de l'agent pathogène considérés : les indoles-glucosinolates sont responsables du maintien de *Colletotrichum tofieldiae* dans son rôle d'endophyte bénéfique des racines d'*A. thaliana* (Hiruma *et al.*, 2016). Les glucosinolates participent fortement aux réactions de défense d'*A. thaliana* contre *B. cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* et *Alternaria brassicola* (Buxdorf *et al.*, 2013; Stotz *et al.*, 2011), ainsi qu'à celle du colza contre *S. sclerotiorum* (Wei *et al.*, 2016), alors que leur accumulation est inversement corrélée à la résistance du colza à *Alternaria spp* dans certaines conditions (Giamoustaris et Mithen, 1997). Concernant *L. maculans*, Robin *et al* (2017) ont démontré que la résistance spécifique de *B. oleracea* à ce champignon est corrélée à la production des deux classes principales de glucosinolates, les indoles-glucosinolates et les

glucosinolates aliphatiques. Au contraire, les variétés les plus sensibles sont impactées dans leur capacité à produire plusieurs types de glucosinolates, ce qui pourrait être causé par la production par *L. maculans* d'un effecteur capable de supprimer leurs voies de biosynthèse. Andreasson *et al.* (2001) ne sont pas parvenus à démontrer une implication du système myrosinase-glucosinolate dans l'interaction *L. maculans/B. napus*, mais cette étude ne concerne qu'une seule souche et deux cultivars au stade cotylédonaire. Or il convient de garder à l'esprit que l'influence des glucosinolates dépend énormément des génotypes de la plante et de l'agent pathogène, ainsi que des tissus concernés (certaines résistances ne sont pas exprimées au stade plantule, mais seulement dans la plante adulte) (Tierens *et al.*, 2001; Wretblad et Dixelius, 2000). Si la cible potentielle d'AvrLm3 venait à être confirmée, il s'agirait du premier exemple d'effecteur ciblant le système myrosinase-glucosinolate décrit à ce jour. L'action la plus probable d'AvrLm3 est une suppression de la production de glucosinolates suite à la modification de la myrosinase-associated protein iMyaP9. Une étude plus poussée de l'implication exacte d'iMyaP9 dans cette voie de biosynthèse, via le dosage de glucosynolates dans des lignées d'*A. thaliana* mutées pour l'orthologue d'*iMyaP9*, est en cours. Elle permettra de mieux comprendre l'impact d'AvrLm3 sur les défenses de *B. napus* au niveau du système myrosinase-glucosinolate.

2. La suppression de la mort cellulaire par les effecteurs de *L. maculans* est-elle cohérente avec leur possible mode d'action ?

Tous les effecteurs de *L. maculans* étudiés dans le cadre de cette thèse suppriment la mort cellulaire provoquée par au moins un inducteur. Wang *et al.* (2011) ont constaté que les effecteurs de *P. sojae* agissaient en deux vagues. Les effecteurs Early (E) suppriment la mort cellulaire induite par INF1, alors que les effecteurs Immediate-Early (IE) suppriment les morts cellulaires induites par INF1, BAX et d'autres effecteurs de *P. sojae*. Cette observation est cohérente avec le fait qu'AvrLm4-7,

impliqué dans la suppression de la reconnaissance d'AvrLm3, est également capable de supprimer la mort cellulaire provoquée par tous les inducteurs testés. Les voies de signalisation menant à l'ETI provoquée par la reconnaissance d'AvrPto ont été très bien décryptées (Oh et Martin 2011, Introduction Fig. 12). En revanche très peu de choses sont encore connues concernant les cascades de signalisation menant à la mort cellulaire provoquée par les autres inducteurs testés. Kanneganti *et al.* (2006) ont comparé les voies de signalisation menant à la mort cellulaire provoquée par 3 Nlp (NEP1-Like Proteins) de *P. infestans* à celle induite par INF1, et ont conclu que la présence de SGT1 et Hsp90 est nécessaire pour ces deux types de mort cellulaire (tout comme l'ETI déclenchée par la reconnaissance d'AvrPto), mais que certaines protéines comme la MAPKK MEK2, le facteur de transcription TGA2.2 et la protéine NPR1 ne sont nécessaires que pour le déclenchement de la mort cellulaire induite par les Nlp. Concernant BAX, si les cascades de signalisation menant à l'apoptose ont été très bien décrites chez les mammifères, très peu d'études se sont intéressées à la mort cellulaire induite par BAX chez les plantes. On sait que l'adressage de BAX à la membrane des mitochondries est indispensable au déclenchement de cette mort cellulaire, et que, comme chez les mammifères, cette liaison à la membrane des mitochondries déclenche des dommages membranaires et le relargage de grandes quantités de cytochrome C (Lacomme et Santa Cruz, 1999). En revanche, si ce relargage est connu pour activer des protéines caspases responsables du déclenchement de l'apoptose dans les cellules de mammifères, le mécanisme reliant le relargage du contenu des mitochondries à la mort cellulaire est inconnu chez les plantes. Baek *et al.* (2004) ont cependant démontré qu'il existe deux voies de signalisation menant à la mort cellulaire induite par BAX chez *A. thaliana* : une dépendante des ROS, et une indépendante. Le décryptage des voies de signalisation menant à la mort cellulaire provoquée par chaque inducteur pourrait permettre de déterminer à quel niveau agissent les effecteurs de *L. maculans*.

Malgré la capacité d'AvrLm3 et AvrLm4-7 à supprimer différents types de mort cellulaire, leur expression stable dans *A. thaliana* n'entraîne aucune augmentation majeure de la sensibilité des lignées transgéniques à divers agents pathogènes. Le mécanisme de suppression pourrait correspondre à un mécanisme plus général encore à déterminer. Il serait possible d'utiliser le pathosystème *P. syringae* / *A. thaliana* afin de mettre en évidence un rôle des effecteurs dans la suppression de la PTI ou de l'ETI. En effet, Block *et al* (2014) ont démontré que l'effecteur HopD1 était capable de supprimer l'ETI après expression stable dans *A. thaliana* et en inoculant ces lignées transgéniques avec des souches de *P. syringae* exprimant des gènes d'avirulence reconnus par *A. thaliana*. De même, il est possible de mettre en évidence le rôle d'un effecteur dans la suppression de la PTI. Des plantes traitées avec des peptides flg22 purifiés grandissent moins vite que des plantes non traitées à cause du coût énergétique inhérent aux réactions de défense qui se fait au détriment de la croissance de la plante (Gómez-Gómez et Boller, 2002). Or certains effecteur sont capables de supprimer ce déficit de croissance, indiquant un rôle dans la suppression de la PTI (Pel *et al.*, 2014). Enfin, il est possible que le phénotype causé par l'expression stable d'AvrLm3 et AvrLm4-7 dans *A. thaliana* n'ait pas pu être mis en évidence par les expériences réalisées au cours de ma thèse. Ces effecteurs pourraient par exemple inhiber la production de ROS.

Si la suppression de la mort cellulaire, déclenchée lors de l'induction de la PTI ou de l'ETI, est un mécanisme courant en ce qui concerne les effecteurs d'agents pathogènes, ce rôle peut paraître contradictoire avec certaines cibles potentielles identifiées pour les effecteurs de *L. maculans*. La cible potentielle d'AvrLm3 est un composant du système myrosinase-glucosinolate, qui n'a pas pour effet de déclencher la mort cellulaire. AvrLm10-1 et AvrLm10-2 quant à eux cibleraient potentiellement une protéine de la famille des PR1, qui ont un effet directement antimicrobien et sans rapport direct avec le déclenchement de la HR. Si cette cible venait à être confirmée, le mode

d'action le plus probable d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2 serait une action directe sur PR1 afin de supprimer l'effet délétère de cette protéine sur *L. maculans* et faciliter l'infection, et non la suppression de la mort cellulaire. Cependant plusieurs études récentes ont démontré que des effecteurs de *P. nodorum* ont deux rôles distincts au cours du processus infectieux. ToxA et Tox3 provoquent tous deux une nécrose lorsque le gène de sensibilité correspondant est exprimé par la plante, mais interagissent également avec des protéines PR1 afin de faciliter l'infection (Breen *et al.*, 2017a; Lu *et al.*, 2014). De même, Tox1, en plus de son rôle de toxine hôte-spécifique, protège la chitine de *P. nodorum* contre les chitinases végétales (Liu *et al.*, 2016). Une double localisation a également été observée pour l'effecteur RTP1 de *U. fabae*, pour lequel un double-rôle a été hypothétisé : un rôle extracellulaire, et un deuxième intracellulaire (Kemen *et al.*, 2013; Pretsch *et al.*, 2013). Il est donc tout à fait possible que les effecteurs de *L. maculans* étudiés dans le cadre de cette thèse jouent deux rôles : un premier dans la protection de *L. maculans* contre un mécanisme de défense particulier (l'action des protéines PR1 dans le cas d'AvrLm10-1 et AvrLm10-2, ou le système myrosinase-glucosinolate dans le cas d'AvrLm3), et un second dans la suppression de la mort cellulaire. En ce qui concerne AvrLm4-7 en revanche, le mécanisme semble cohérent. Spanu *et al.*, (2017) ont émis l'hypothèse que l'effecteur BEC1054 agit au niveau des complexes nucléo-protéiques des ribosomes afin de supprimer la mort cellulaire provoquée par des Ribosomal Inactivating Proteins (RIPs). Par analogie un mécanisme similaire peut être imaginé pour AvrLm4-7 et avoir pour conséquence de supprimer la reconnaissance d'AvrLm3 par *Rlm3*.

3. Les effecteurs de *L. maculans* sont-ils conservés structurellement et / ou fonctionnellement chez d'autres champignons phytopathogènes ?

Les effecteurs fongiques et d'oomycètes ont été initialement décrits comme des protéines ne possédant pas ou peu d'homologues chez d'autres organismes. Cependant de plus en plus

d'effecteurs sont identifiés et ajoutés aux bases de données, et aujourd'hui ce critère de sélection semble présenter de plus en plus d'exceptions à la règle. Les effecteurs de *L. maculans* ont ainsi été initialement considérés comme des protéines sans homologues. Cependant la publication récente de nouveaux génomes fongiques a permis de trouver des gènes codant des protéines orthologues à AvrLm10-1 et AvrLm10-2 chez plusieurs Dothideomycètes et Sordariomycètes. Ces protéines orthologues sont de plus codées par des gènes localisés en orientation inverse, tout comme *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2*. Une conservation de syntenie aussi complète n'a jamais été observée pour des gènes codant des effecteurs d'agents pathogènes, et pourrait indiquer un rôle fondamental de ce duo d'effecteurs dans le processus infectieux. Il reste à déterminer si les gènes orthologues d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* sont également impliqués dans la pathogénie dans les autres espèces les exprimant. Il serait également intéressant de déterminer si ces effecteurs potentiels interagissent également avec des protéines PR1, ce qui confirmerait le rôle de « hub » de ces protéines dans le cadre des interactions plante/microorganisme phytopathogène. AvrLm3 présente pour sa part des homologies de séquence avec l'effecteur ECP11-1 de *C. fulvum*, un autre Dothideomycète. Encore une fois cet exemple démontre qu'à mesure que notre connaissance des effecteurs augmente, de plus en plus d'homologies sont retrouvées pour ce type de protéines. *ECP11-1* est, tout comme *AvrLm3*, très conservé chez *C. fulvum* et fortement exprimé pendant l'infection sur tomate (Mesarich *et al.*, 2017). La complémentation d'une souche de *L. maculans* virulente vis-à-vis de *Rlm3* avec *ECP11-1* entraîne la reconnaissance de cette souche par un cultivar possédant *Rlm3*, ce qui suggère soit que la reconnaissance se fait par une interaction directe via la reconnaissance d'un domaine conservé entre ECP11-1 et AvrLm3, soit qu'ECP11-1 et AvrLm3 ont une fonction effectrice commune dont l'activité est détectée par Rlm3. La capacité d'AvrLm4-7 à supprimer la reconnaissance d'*ECP11-1* par *Rlm3* sera prochainement testée. Une autre protéine d'avirulence de *L. maculans*, AvrLm6, présente également une famille d'homologues chez les

Dothideomycètes *Venturia inaequalis* et *Venturia pirina*. La transformation d'une souche de *L. maculans* virulente vis-à-vis de *Rlm6* par l'homologue présentant le plus haut pourcentage d'identité avec AvrLm6 n'a cependant pas permis d'induire une reconnaissance par *Rlm6* (Shiller et al., 2015). Deux effecteurs de *C. fulvum*, Avr4 et Ecp2, présentent également des homologues chez d'autres Dothidéomycètes dont *Mycosphaerella fijiensis*, qui peuvent être reconnus par les protéines de résistance Cf4 et Cf-Ecp2 chez la tomate, permettant d'envisager d'utiliser ces gènes de résistance chez le bananier pour lutter contre *M. fijiensis* (Stergiopoulos et al., 2010).

AvrLm4-7 pour sa part ne présente aucune homologie de séquence avec d'autres protéines. En revanche AvrLm4-7 présente une analogie structurale avec les effecteurs RALPH de *B. graminis*, qui seraient issus d'une ribonucléase ancestrale (Pedersen et al., 2012). Cette analogie de structure pourraient être indicatrice soit d'une famille d'effecteurs présente chez plusieurs organismes, possiblement issue d'une évolution convergente et possédant des modes d'action proches, soit d'une évolution diversifiante ayant permis une diversification des fonctions de ces effecteurs et de leurs cibles végétales. L'identification d'une protéine ribosomale comme cible d'AvrLm4-7 suggère plutôt une conservation de fonction avec les effecteurs RALPH. Il serait également intéressant de déterminer si les effecteurs RALPH peuvent être reconnus par *Rlm4* ou *Rlm7*. Plusieurs cas d'effecteurs possédant des analogues structuraux ont été décrits chez les champignons et les oomycètes. Lors de la détermination de la structure 3-D des effecteurs AVR1-CO39 et AVR-Pia de *M. oryzae*, il a été mis en évidence une structure commune en sandwich β pour ces deux effecteurs alors qu'ils n'ont pas d'homologie de séquence. Une recherche de similarités structurales pour d'autres effecteurs de *M. oryzae* a permis d'identifier une famille d'effecteurs ayant une structure conservée, les effecteurs MAX (*Magnaporthe* Avrs and ToxB like), surexprimés pendant la phase biotrophe de l'infection sur riz. Cette famille d'effecteurs est retrouvée dans un grand

nombre d'ascomycètes phytopathogènes et en expansion chez *M. oryzae* et *M. grisea* (de Guillen et al., 2015). Chez les oomycètes, une structure 3-D commune, appelée domaine WY, a été décrite pour des effecteurs RXLR de l'ordre des Peronosporales. Cette structure favorise la flexibilité et la diversification des effecteurs avec des variations d'acides aminés, des insertions et délétion en surface de la protéine, et une stabilisation grâce aux régions hydrophobes conservées, permettant aux effecteurs de cette famille de cibler une grande diversité de protéines végétales et d'être reconnus par différentes protéines de résistance (Boutemy et al., 2011 ; Win et al, 2012).

4. Une meilleure connaissance des effecteurs fongiques permet-elle d'améliorer le spectre d'action des résistances qualitatives et leur gestion ?

La caractérisation fonctionnelle des effecteurs et des protéines de résistance peut permettre d'améliorer la qualité des résistances qualitatives disponibles. L'édition de gènes de résistance permet d'augmenter le nombre de gènes d'avirulence reconnus, ou d'augmenter la sensibilité du niveau de reconnaissance permettant de déclencher les réactions de défense. Ainsi, la modification du gène de résistance *R3a* de la pomme de terre a permis d'augmenter son spectre de reconnaissance à plusieurs souches de *P. infestans* (Segretin *et al.*, 2014), et la mutation de son homologue dans la tomate, *I2*, permet d'acquérir une résistance partielle à *P. infestans* en plus de celle déjà conférée contre *F. oxysporum* (Giannakopoulou *et al.*, 2015). Plusieurs effecteurs de *M. oryzae* ciblent des protéines végétales contenant un domaine HMA (Heavy-Metal Associated). Ces effecteurs sont reconnus par des gènes de résistance possédant un domaine HMA intégré, selon le modèle de l' « integrated decoy ». Maqbool *et al.*, (2015) ont démontré que la protéine de résistance Pik-1 reconnaît plusieurs variants naturels de l'effecteur Avr-Pik avec des affinités différentes selon la nature des acides aminés présents au niveau de l'interface d'interaction. De plus, une meilleure affinité entre Pik-1 et Avr-Pik se traduit par une meilleure résistance de la plante. Ces

observations, ainsi que les travaux d'édition de protéines de résistance cités précédemment, permettent d'imaginer une meilleure gestion des résistances contre *M. oryzae* au moyen de protéines de résistance reconnaissant leur protéine d'avirulence correspondante avec une meilleure affinité et/ou reconnaissant plus de protéines d'avirulence (S. Kamoun, communication personnelle). Dans le cadre du pathosystème *L. maculans* / *B. napus*, le manque de gènes de résistance clonés est limitant. En effet, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7* et *Rlm10* n'ont pas encore été identifiés et clonés. Cependant les homologies de séquence et de structure observées permettent d'imaginer plusieurs façons d'exploiter les résistances qualitatives. En effet, si AvrLm3 possède un orthologue chez *C. fulvum* qui est également reconnu par *Rlm3*, on peut imaginer que d'autres orthologues existent dans d'autres espèces fongiques, potentiellement capables d'infecter le colza. Si ces orthologues sont également reconnus par *Rlm3*, une stratégie d'édition du gène de résistance *Rlm3* pourrait être envisagée afin d'augmenter son spectre de reconnaissance. La même stratégie pourrait être envisagée avec AvrLm4-7, qui semble de surcroît faire partie d'une famille d'effecteurs présentant des analogies structurales, ou avec AvrLm10-1 et AvrLm10-2, qui possèdent beaucoup d'orthologues dans d'autres espèces de champignons phytopathogènes.

Par ailleurs, l'étude du pathosystème *L. maculans* / *B. napus* a permis de mettre en évidence plusieurs interactions génétiques entre gène de résistance et gène d'avirulence différant du modèle gène-pour-gène classique (Petit-Houdenot et Fudal, 2017 ; Article 2). Ces interactions atypiques sont autant de leviers supplémentaires permettant de mieux gérer les résistances qualitatives contre *L. maculans*. Ainsi, alors que la résistance *Rlm4* ciblant AvrLm4-7 avait été utilisée depuis les années 1970 et que les populations de *L. maculans* étaient très majoritairement virulentes vis-à-vis de *Rlm4*, une nouvelle résistance ciblant AvrLm4-7, *Rlm7*, s'est avérée efficace et durable, avec, malgré une utilisation massive de cette résistance, un début de contournement au bout de 10 ans

d'utilisation, montrant que deux protéines de résistance ciblant un effecteur ayant un rôle important dans la fitness fongique pouvaient être utilisées successivement. De même, la capacité d'AvrLm4-7 à supprimer la reconnaissance d'AvrLm3 par Rlm3 permet également d'envisager des stratégies de gestion coordonnées des résistances Rlm3 et Rlm7 via leur pyramidage dans des variétés de colza ou l'alternance de leur utilisation. Ce type d'interaction antagoniste entre deux effecteurs semble particulièrement prometteuse et, même si cela n'a été décrit, en dehors de *L. maculans*, que pour le pathosystème *Fusarium oxysporum* / tomate (Houterman *et al.*, 2008), ce type d'interaction pourrait être plus répandu, notamment chez *Blumeria sp.* chez qui l'existence d'effecteurs capables de supprimer la reconnaissance de protéines d'avirulence est suspectée (Bourras *et al.*, 2015, 2016).

Annexes

Tableau S1 : amorces utilisées au cours de cette thèse.

AvrLm10-1PS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCACTTCATGGTTC TCCCCCT	Clonage
AvrLm10-1noPS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGACTTGCACGAC TTCTGCGC	
AvrLm10-1stop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACCTAAGACAAATA ATAGAGCCG	
AvrLm10-1nostop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCTAAGACAAATAATA GAGCCG	
AvrLm10-2PS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCTTTGGTTTATAG CAATATTTA	
AvrLm10-2noPS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGCCACTCGAC AATCCATTTT	
AvrLm10-2stop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACATATTTTGCCAAT CTCCAATAAAGC	
AvrLm10-2nostop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATATTTTGCCAATCTC CAATAAAGC	
AvrLm4-7PS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCCACTATCCCTCG AGATAATC	
AvrLm4-7noPS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTGTAGAGAGGCC TCAATATC	
AvrLm4-7stop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGTCGCAACCACGA GTCCTTG	
AvrLm4-7nostop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGTCGCAACCACGAGTC CTTG	
MyAP-PS-P1-P2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCAACCACCTTC AGTTTAGC	
MyAP-noPS-P1-P2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCAAAATATTCCG GCGGTGGC	
MyAPstop-P1-P2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACATAGATTCACTGG CACTGA	
MyAPnostop-P1-P2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCATAGATTCACTGGCAC TGA	
PR1-PS-P1-P2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAAAGTCACTAAC TGTTCTCG	
PR1-noPS-P1-P2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCAAGACAGTCCA CAAGAC	
PR1stop-P1-P2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGTAAGGCTTCTCGT TCAC	
PR1nostop-P1-P2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGTAAGGCTTCTCGTTCA C	

Cath-PS-P1-P2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTGAACATCATCATCG	
Cath-noPS-P1-P2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGAATCTTTCCAGCAG	
Cathstop-P1-P2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAAATGAGGAACTAGAAC	
Cathnostop-P1-P2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAATGAGGAACTAGAAC	
ORMDL-P1-P2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTACGTGAGGGCGCTTCCG	
ORMDLstop-P1-P2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTGGTCTCCATTGATTCC	
ORMDLnostop-P1-P2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCTCCATTGATTCCTC	
ASNA1-P1-P2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGACTCTTTCGTCCTC	
ASNA1stop-P1-P2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATTTCCAAATGATATCTCCC	
ASNA1nostop-P1-P2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTTCCAAATGATATCTCCC	
Unk-P1-P2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGACCACACTTCATTG	
Unkstop-P1-P2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAGGCCATTTGGTGAATCTC	
Unknostop-P1-P2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGGCCATTTGGTGAATCTC	
AvrLm10_1seqU	CCTTTTCCTTAGACCATGG	Séquençage
AvrLm10_1seqL	GGTGAGGAAGTTAAGAGAAGC	
AvrLm10_2seqU	CCGTCTCCACATTACTTC	
AvrLm10_2seqL	CGTAGGAAAGGATATTCAAAGG	
pGBKT7AvrLm10-1noPS-EcoRIU	GAGAGAGAATTCGACTTGCACGACTTCTGCGC	Double-hybride
pGBKT7AvrLm10-1nostop-BamHIL	GAGAGAGGATCCCCCTAAGACAAATAATAGAGCCG	
pGBKT7AvrLm10-2noPS-EcoRIU	GAGAGAGAATTCGCGCCACTCGACAATCCATTTC	
pGBKT7AvrLm10-2nostop-BamHIL	GAGAGAGGATCCCCATATTTGCCAATCTCCAATAAAGC	
AvrLm10_1QF	ACAGGAGAACACTGACGGCT	qPCR
AvrLm10_1QR	GCATGGACTATCGTAGCGTTAT	

AvrLm10_2QF	ATGTAAATAACGTAGGAAAGGATATTCA	
AvrLm10_2QR	TTGACCCTGGCTTTCGTTTC	
NADH-q-F1	GAAGTTGTGCCAATGGAGGT	
NADH-q-R1	AGGATTCTTGCATTGGTGG	

Bilan d'activité

Articles scientifiques

Petit-Houdenot Y, and Fudal I. 2017. Complex Interactions between Fungal Avirulence Genes and Their Corresponding Plant Resistance Genes and Consequences for Disease Resistance Management. *Front. Plant Sci.* 8.

Petit-Houdenot Y, Degrave A, Meyer M, Blaise F, Ollivier B, Marais C, Jauneau A, Audran C, Rivas S, Brun H, Rouxel T, Fudal I, Balesdent M.H. 2017. A two genes – for – one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*. *New Phytol* (en cours de re-soumission)

Ferrari¹ R, Lacaze I, Le Faouder P, Bertrand-Michel J, Moularat S, Chan Ho Tong L, Boucher C, Kilani J, Petit Y, Vanparis O, Trannoy C, Brun S, Lalucque H, Malagnac¹ F,4 and Silar P. 2017. Oxylipin-derived volatile organic compounds are used by the fungus *Podospora anserina* to repel nematodes. *Environ. Microbiol* (submitted)

Communications

Présentations orales lors de congrès

A two genes – for – one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*

COST-workshop on Experimental approaches for the investigation of effectors' function (Tel Aviv University, 10-12 février 2015)

7th European Plant Science Retreat (Paris, 10-13 juillet 2015)

8th Effectome meeting (Lauret, France, 16-18 septembre 2015)

Journées Jean Chevaugeon (Aussois, France, 25-29 janvier 2016)

- Prix de la meilleure presentation orale

Dothideomycetes meeting (satellite meeting during the 29th Fungal Genetic Conference, Pacific Grove, California, 14-17 mars 2018).

Posters

A two genes – for – one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*

Yohann Petit-Houdenot, Alexandre Degrave, Michel Meyer, Françoise Blaise, Bénédicte Ollivier, Alain Jauneau, Corinne Audran, Susana Rivas, Thierry Rouxel, Isabelle Fudal, Marie-Hélène Balesdent

7th Effectome meeting (Lauret, France, 8-10 octobre 2014)

8th Effectome meeting (Lauret, France, 16-18 septembre 2015)

13th European Conference on Fungal Genetics (Paris, France, 3-6 avril 2016)

16th Congress of the International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions (Portland, Oregon, 17-21 juillet 2016).

Structural and functional characterization of *Leptosphaeria maculans* effectors: the example of AvrLm4-7

Yohann Petit-Houdenot, Françoise Blaise, Clémence Plissonneau, Claire-Line Marais, Thierry Rouxel, Marie-Hélène Balesdent, Karine Blondeau, Nouredine Lazar, Inès Gallay, Théo Le Moigne, Herman van Tilbeurgh and Isabelle Fudal,

29th Fungal Genetic Conference (Pacific Grove, California, 14-17 mars 2018).

Posters (Co-auteur)

The StructuraLEP project: structural and functional characterization of *Leptosphaeria maculans* effectors and of their interactants.

Fudal .I, Petit Y., Blaise F., Ollivier B., Plissonneau C., Meyer M., Gervais J., Rouxel T., Balesdent M.H., Blondeau K., Lazar N., Gallay .I and van Tilbeurgh H.

8th Effectome meeting, 16-18 septembre 2015, Lauret (France)

In planta localisation of *Leptosphaeria maculans* effectors and identification of their plant targets.

C. Marais, Y. Petit, F. Blaise, B. Ollivier, J. Gervais, T. Le Moigne, T. Rouxel, M.H. Balesdent, I. Gallay, K. Blondeau, N. Lazar, H. van TilBeurgh, I.Fudal

29th Fungal Genetic Conference (Pacific Grove, California, 14-17 mars 2018).

Autres communications

Target acquired: recherche de cibles végétales des effecteurs de *Leptosphaeria maculans*

Séminaire d'unité dans le cadre de l'axe transversal « Processus infectieux » (5 novembre 2015)

Expression transitoire dans le tabac via *Agrobacterium tumefaciens*

Séminaire d'unité dans le cadre de l'axe transversal « Processus infectieux » (10 décembre 2015)

Effecteurs de champignons phytopathogènes: questions, outils d'études et cas pratiques

Présentation aux étudiants du Master 2 « Infectiologie Microbiologie Virologie Immunologie, parcours Mycologie » (6 octobre 2015)

Effecteurs de *Leptosphaeria maculans*, champignon pathogène du colza

Présentation aux étudiants du Master 2 « Sciences du Végétal» (10 novembre 2015)

Functional and structural characterization of *Leptosphaeria maculans* effectors

Présentation à l'équipe « Nutrition azotée des plantes» de l'Institut Jean-Pierre Bourgin (Versailles, 7 avril 2017)

Functional and structural characterization of *Leptosphaeria maculans* effectors

Présentation au Sainsbury Laboratory (Norwich, UK, 3 juillet 2017)

Report of the IS-MPMI XVIII congress for the Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI) journal

Barff T., Cavdar M., Gervais J., Petit Y. *Molecular Plant-Microbe Interactions* (submitted)

Report of the IS-MPMI XVIII congress for the GCIRC (Groupe Consultatif International de Recherche sur le Colza)

Gervais J. et Petit Y. (2016)

Rapport de la « 29ème conférence mondiale de génétique fongique » pour l'académie d'agriculture

Gervais J. et Petit Y. (2017)

Rapport de la « 29ème conférence mondiale de génétique fongique » pour la Société Française de Phytopathologie

Lorrain C. et Petit Y. (2017)

Lorrain C., Gervais J., Petit Y., Plett JM. New insights into plant-microbe interactions through advances in fungal genetics. *New Phytologist* (submitted)

Small RNAs: a new weapon in the war between plants and phytopathogens?

Petit Y (2017) *BioMed Central*



Yohann Petit-Houdenet¹, Alexandre Degrave¹, Michel Meyer¹, Françoise Blaise¹, Bénédicte Ollivier¹, Alain Jauneau², Corinne Audran³, Susana Rivas³, Thierry Rouxel¹, Isabelle Fudal¹, Marie-Hélène Balesdent¹

¹INRA/AgroParisTech/Université Paris-Saclay, UMR 1290 BIOGER, Thiverval-Grignon, France.

²Fédération de Recherche 3450, Plateforme Imagerie, Pôle de Biotechnologie Végétale, Castanet-Tolosan, France.

³LIPM, Université de Toulouse, INRA, CNRS, Castanet-Tolosan, France

Leptosphaeria maculans / Brassica napus

Genetic control of *Leptosphaeria maculans*

Possible recognition by the host plant

- Genetic studies demonstrated gene-for-gene relationships between *Leptosphaeria maculans* and oilseed rape (*Brassica napus*) or other *Brassica* species.
- >11 genetic interactions between avirulence (*AvrLm*) and resistance (*R*) genes were identified:
 - *AvrLm1* to 11
 - *Rlm1* to 11
- To date, 6 *L. maculans* avirulence genes are cloned.

Identification of *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2*

Characteristics of *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2*

- AvrLm10* has recently been genetically identified as a single avirulence gene, recognized by the *Brassica nigra* resistance gene *Rlm10*.
- Further studies revealed the presence of two head-to-tail genes at the same locus, separated by an intergenic region, in a repeat-rich region.
- Those genes encode small secreted proteins of 120 and 178 amino acids respectively.

Complementation and silencing experiments

Mean disease score on resistant (FuEurol) and susceptible (Westar) cultivars after inoculation of *L. maculans* transformants complemented with *AvrLm10_1*, *AvrLm10_2* or both.

- Both genes (*AvrLm10_1* and *AvrLm10_2*) are necessary to induce recognition by *Rlm10*.

Effect of *AvrLm10* on fungal aggressiveness

➢ Silencing of *AvrLm10* increases symptoms size on susceptible cultivar

Silencing experiments showed that silencing of *AvrLm10_1* or *AvrLm10_2* prevents *Rlm10* recognition.

- Silencing of only one of those genes is sufficient to escape recognition by *Rlm10*

How does it work?

- Physical interaction between *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2*
- Common plant target for *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2*

Physical interaction between *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2*

Subcellular localisation

Transient expression of *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2*, fused to diverse fluorochromes, in *Nicotiana benthamiana* leaves.

- *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2* are localized in the same subcellular compartments (nucleus and cytoplasm).

Bimolecular Fluorescence Complementation

BIFC experiments: *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2*, each fused with a part of YFP, were transiently coexpressed in *Nicotiana benthamiana* leaves.

Yeast two-hybrid

	SDL (+187 selection)	SD-T (+2HG selection)	DDO (diploids selection)	DDO + Aureobasidin	DDO + Aureobasidin
Y2HG AvrLm10_2 + Y187 AvrLm10_1	+	+	+	+	+
Control +	-	-	-	-	-
Control -	-	-	-	-	-

Yeast two-hybrid experiments: yeasts transformed with *AvrLm10_1* or *AvrLm10_2* were crossed and grown on selective media.

- A physical interaction between *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2* is suggested.

FRET/FLIM

	2.94	0.014	64	17.8	7.6 x 10 ⁻²¹
GFP- <i>AvrLm10_1</i>	2.94	0.014	64	17.8	7.6 x 10 ⁻²¹
GFP- <i>AvrLm10_2</i>	2.94	0.014	64	17.8	7.6 x 10 ⁻²¹
GFP- <i>AvrLm10_1</i> + AvrLm10_2-RFP	2.94	0.014	64	17.8	7.6 x 10 ⁻²¹
GFP- <i>AvrLm10_2</i> + AvrLm10_1-RFP	2.94	0.014	64	17.8	7.6 x 10 ⁻²¹

FRET/FLIM measurements after transient expression of *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2*, respectively fused to GFP and RFP, in *Nicotiana benthamiana* leaves.

- *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2* interact physically.

Conclusion:

- Atypical genetic interaction between the avirulence genes *AvrLm10_1/AvrLm10_2* and the resistance gene *Rlm10*:
 - Both avirulence genes are necessary to induce recognition by *Rlm10*.
 - Silencing of only one of them is sufficient to escape recognition.
- Yeast two-hybrid, BIFC and FRET/FLIM showed a physical interaction between *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2*.
- Determination of *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2* structure is the lifetime of the donor in the presence of the acceptor
 - Identification of residues involved in *AvrLm10-1* and *AvrLm10-2* physical interaction
- Search for *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2* plant targets.
 - Search for *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2* plant targets.
 - Search for *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2* plant targets.
 - Search for *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2* plant targets.
- How *AvrLm10_1* and *AvrLm10_2* are recognized by *Rlm10*, and what is their role in virulence.

Structural and functional characterization of *Leptosphaeria maculans* effectors: the example of AvrLm4-7



Yohann Petit-Houdeon¹, Françoise Blaise¹, Clémence Plissonneau¹, Claire-Line Marais¹, Thierry Rouxel¹, Marie-Hélène Balesdent¹, Karine Blondeau², Noureddine Lazar², Inès Gally², Théo Le Moigne², Herman van Tilbeurgh² and Isabelle Fudal¹,
¹ UMR BIOGER, INRA/AgroParisTech/Université Paris-Saclay, Thiverval-Grignon, France.
² UMR I2BC Université Paris-Sud / CNRS / CEA, Orsay, France

Leptosphaeria maculans / Brassica napus

Possible recognition by the host plant

• Gene-for-gene relationships between *Leptosphaeria maculans* and oilseed rape (*Brassica napus*).
• 11 genetic interactions between avirulence (AvrLm) and resistance (Rlm) genes identified:
 > AvrLm1 to 11
 > Rlm1 to 11
• 9 *L. maculans* avirulence genes cloned.

AvrLm4-7

- Encodes a small (143 aa), cysteine-rich (8 Cys), potentially secreted protein
- Strongly induced during primary leaf infection of oilseed rape
- Located in a repeat-rich region

• AvrLm4-7 is recognized by two *B. napus* resistance genes:
 > Rlm4
 > Rlm7

• AvrLm4-7 is involved in fungal fitness [3]
 > Conserved in *L. maculans* strains

AvrLm4-7 3-D structures

General features of AvrLm4-7 3-D structure

• 3-D structure resolved at 2.3 Å after crystallization and X-ray diffraction

• Curved β-sheet covered by α-helix

• Protein surface mainly positively charged
 > Interaction assay with a bank of nucleic acids
 > Interaction detected with a dsDNA of 10bp
 > Validated by Isothermal Titration Calorimetry (ITC) and fluorescence intensity using nucleotides labelled with fluorescein.

Suppression of AvrLm3 recognition

AvrLm3 recognition is suppressed in presence of AvrLm4-7

AvrLm4-7 suppresses cell-death provoked by several inducers

Transient expression of AvrLm4-7 and several cell-death inducers in *Nicotiana benthamiana* leaf epidermal cells, and scoring of the necrosis.

Inducer	Strain	Mean necrosis score
AvrLm4-7	GV3101	~2.5
	Δ-1795	~0.5
BAX	GV3101	~4.0
	Δ-1795	~0.5
NEP1	GV3101	~3.0
	Δ-1795	~0.5

• AvrLm3 escapes recognition by Rlm3 in presence of AvrLm4-7
 > Strains expressing AvrLm4-7 (avirulent on Rlm7) are virulent on Rlm3 cultivars, even if they express AvrLm3
 > **Hypothesis:** AvrLm4-7 suppresses AvrLm3-mediated Effector-Triggered Immunity (ETI)

AvrLm4-7 is able to suppress cell-death induced by:
• BAX (mouse proapoptotic protein – general inducer)
• NEP1 (*Colletotrichum higginsianum* necrotrophic effector – general inducer)
• AvrPto (*Pseudomonas syringae* effector recognized by a tobacco resistance gene – inducer of ETI reaction)

Region involved in Rlm4 recognition

• AvrLm4-7 escapes Rlm4-recognition through a single amino acid change at position 120 (G → R)

• Escape from Rlm7-recognition is mediated by several single-nucleotide polymorphisms (SNP), among which 3 are unlikely to affect AvrLm4-7 stability:
 > R109P
 > E102S
 > S117R
 > Involvement of those SNPs in Rlm4 and Rlm7 recognition has been validated by targeted mutagenesis

Comparison of the two structures

Two 3D-structures are available:
 > An isoform recognized by Rlm4
 > An isoform recognized by both Rlm4 and Rlm7

The G^{120R} amino-acid change allowing to escape Rlm4-recognition is located on an external loop and do not change AvrLm4-7 overall structure

Conclusions and Perspectives

- AvrLm4-7 is a highly conserved effector, involved in fungal fitness and recognized by two oilseed rape resistance proteins
- AvrLm4-7 3D-structure revealed a mainly positively charged surface.
- SNP allowing to escape Rlm4 and Rlm7 recognition are unlikely to affect the overall protein structure.
- AvrLm3 escape recognition by Rlm3 in presence of AvrLm4-7
- AvrLm4-7 is able to suppress cell-death provoked by several inducers, including ETI markers.

Perspectives:

- Search for plant targets of AvrLm4-7 is in progress in order to better understand its role in virulence.
- *Arabidopsis thaliana* transgenic lines constitutively expressing AvrLm4-7 are available and phenotypic characterization is ongoing:
 > Search for morphological phenotype
 > Infection assays with diverse pathogens (*Botrytis cinerea*, *Colletotrichum higginsianum*...)
- *Pseudomonas syringae* infection assays in order to test AvrLm4-7-mediated ETI-suppression.

References

[1] Blondeau, K., Blaise, F., Graille, M., Kale, S.D., Linglin, J., Olivier, B., Labarre, 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 cells and recognition by resistance proteins. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 83, 610-624.

[2] Daverdin, G., Rouxel, T., Gout, L., Aubertot, L.-N., Fudal, I., Meyer, M., Parlange, F., Carpezat, J., and Balesdent, M.-H. (2012). Genome Structure and Reproductive Behavior Influence the Evolutionary Potential of a Fungal Phytopathogen. *PLoS Pathog.* 8, e1003020.

[3] Huang, Y.J., Li, Z.J., Evans, M., Rouxel, T., Fitt, B.D.L., Balesdent, M.-H. (2006). Fitness cost associated with loss of the AvrLm4 avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *Eur. J. Plant Pathol.* 114: 77-89.

[4] Parlange, F., Daverdin, G., Fudal, I., Kuhn, M.-L., Balesdent, M.-H., Blaise, F., Grezes-Basset, B., and 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. *Mol. Microbiol.* 71, 851-863.

[5] Plissonneau, C., Daverdin, G., Olivier, B., Blaise, F., Degraeve, A., Fudal, I., Rouxel, T., and Balesdent, M.-H. (2016). A game of hide and seek between avirulence genes AvrLm4-7 and AvrLm3 in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.*

Références bibliographiques

Alcázar R, Reymond M, Schmitz G, and de Meaux J. 2011. Genetic and evolutionary perspectives on the interplay between plant immunity and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 378–384.

Allender C.J, and King G.J. 2010. Origins of the amphiploid species *Brassica napus* investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biol.* 10, 54.

Andreasson E, Taipalensuu J, Rask L, and Meijer J. 1999. Age-dependent wound induction of a myrosinase-associated protein from oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Mol. Biol.* 41, 171–180.

Andreasson E, Wretblad S, Granér G, Wu X, Zhang J, Dixelius C, Rask L, and Meijer J. 2001. The myrosinase-glucosinolate system in the interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*. *Mol. Plant Pathol.* 2, 281–286.

Antonovics J, Bergmann J, Hempel S, Verbruggen E, Veresoglou S, and Rillig M. 2015. The evolution of mutualism from reciprocal parasitism: more ecological clothes for the Prisoner's Dilemma. *Evol. Ecol.* 29, 627–641.

Arnold A.E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.* 21, 51–66.

Ausubel F.M. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.* 6, 973–979.

Baek D, Nam J, Koo Y.D, Kim D.H, Lee J, Jeong J.C, Kwak S.-S, Chung W.S, Lim C.O, Bahk J.D, et al. 2004. Bax-induced cell death of *Arabidopsis* is mediated through reactive oxygen-dependent and -independent processes. *Plant Mol. Biol.* 56, 15–27.

Balesdent M.H, Attard,A, Kühn M.L, and Rouxel T. 2002. New Avirulence Genes in the Phytopathogenic Fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 92, 1122–1133.

Balesdent M.-H, Louvard K, Pinochet X, and 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.

Balesdent M.-H, Fudal I, Ollivier B, Bally P, Grandaubert J, Eber F, Chèvre A.-M, Leflon M, and Rouxel T. 2013. The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytol.* 198, 887–898.

Balesdent M.-H, Plissonneau C, Coudard L, Daverdin G, Meur L.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.

Beck M, Zhou J, Faulkner C, MacLean D, and Robatzek S. 2012. Spatio-Temporal Cellular Dynamics of the *Arabidopsis* Flagellin Receptor Reveal Activation Status-Dependent Endosomal Sorting. *Plant Cell Online* 24, 4205–4219.

Bednarek P. 2012. Chemical warfare or modulators of defence responses – the function of secondary metabolites in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 407–414.

Bednarek P, Piślewska-Bednarek M, Svatoš A, Schneider B, Doubský J, Mansurova M, Humphry M, Consonni C, Panstruga R, Sanchez-Vallet A, et al. (2009). A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense. *Science* 323, 101–106.

Bernoux M, Ve T, Williams S, Warren C, Hatters D, Valkov E, Zhang X, Ellis J.G, Kobe B, and Dodds P.N. 2011. Structural and Functional Analysis of a Plant Resistance Protein TIR

Domain Reveals Interfaces for Self-Association, Signaling, and Autoregulation. *Cell Host Microbe* 9, 200–211.

Block A, and Alfano J.R. 2011. Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 39–46.

Block A, Toruño T.Y, Elowsky C.G, Zhang C, Steinbrenner J, Beynon J, and Alfano J.R. 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 Phytol.* 201, 1358–1370.

Blondeau K, Blaise F, Graille M, Kale S.D, 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 cells and recognition by resistance proteins. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 83, 610–624.

Bogdanove A.J, Schornack S, and Lahaye T. 2010. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 394–401.

Bohman S, Staal J, Thomma B.P.H.J, Wang M, and Dixelius C. 2004. Characterisation of an *Arabidopsis–Leptosphaeria maculans* pathosystem: resistance partially requires camalexin biosynthesis and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant J.* 37, 9–20.

Boller T, and Felix G. 2009. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406.

Bones A.M, and Rossiter J.T. 1996. The myrosinase–glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol. Plant.* 97, 194–208.

Bos J.I.B, Armstrong, M.R, Gilroy, E.M, Boevink, P.C, Hein, I, Taylor, R.M, Zhendong, T, Engelhardt, S, Vetukuri, R.R, Harrower, B, et al. (2010). Phytophthora infestans effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proc. Natl. A* **Boutemy L.S, King S.R.F, Win J, Hughes R.K, Clarke T.A, Blumenschein T.M.A, Kamoun S, and Banfield M.J. 2011.** Structures of *Phytophthora* RXLR Effector Proteins: a conserved but adaptable fold underpins functional diversity. *J. Biol. Chem.* 286, 35834–35842. *cad. Sci.* 107, 9909–9914.

Bourras S, McNally K.E, Ben-David R, Parlange F, Roffler S, Praz C.R, Oberhaensli S, Menardo F, Stirnweis D, Frenkel Z, et al. 2015. Multiple Avirulence Loci and Allele-Specific Effector Recognition Control the *Pm3* Race-Specific Resistance of Wheat to Powdery Mildew. *Plant Cell Online* 27, 2991–3012.

Bourras S, McNally K.E, Müller M.C, Wicker T, and Keller B. 2016. Avirulence Genes in Cereal Powdery Mildews: The Gene-for-Gene Hypothesis 2.0. *Plant Biot. Interact.* 241.

Boutrot F, Segonzac C, Chang K.N, Qiao H, Ecker J.R, Zipfel C, and Rathjen J.P. 2010. Direct transcriptional control of the *Arabidopsis* immune receptor FLS2 by the ethylene-dependent transcription factors EIN3 and EIL1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 14502–14507.

Breen S, Williams S.J, Winterberg B, Kobe B, and Solomon P.S. 2016. Wheat PR-1 proteins are targeted by necrotrophic pathogen effector proteins. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 88, 13–25.

Breen S, Outram M, Kobe B, Williams S, and Solomon P. 2017a. Dissecting the role of the Tox3 effector in the *Parastagonospora nodorum*-wheat interaction.

Breen S, Williams S.J, Outram M, Kobe B, and Solomon P.S. 2017b. Emerging Insights into the Functions of Pathogenesis-Related Protein 1. *Trends Plant Sci.* 22, 871–879.

Brown J.K.M, and Tellier A. 2011. Plant-Parasite Coevolution: Bridging the Gap between Genetics and Ecology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 345–367.

Brun H, Chèvre A.-M, Fitt B.D, 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 Phytol.* 185, 285–299.

van den Burg H.A, Harrison S.J, Joosten M.H.A.J, Vervoort J, and de Wit P.J.G.M. 2006. *Cladosporium fulvum* Avr4 Protects Fungal Cell Walls Against Hydrolysis by Plant Chitinases Accumulating During Infection. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19, 1420–1430.

van den Burg H.A, Tsitsigiannis D.I, Rowland O, Lo J, Rallapalli G, MacLean D, Takken F.L.W, and Jones J.D.G. 2008. The F-Box Protein ACRE189/ACIF1 Regulates Cell Death and Defense Responses Activated during Pathogen Recognition in Tobacco and Tomato. *Plant Cell Online* 20, 697–719.

Buxdorf K, Yaffe H, Barda O, and Levy M. 2013. The Effects of Glucosinolates and Their Breakdown Products on Necrotrophic Fungi. *PLOS ONE* 8, e70771.

Cai X, Huang Y, Jiang D, Fitt B.D.L, Li G, and Yang L. 2017. Evaluation of oilseed rape seed yield losses caused by *Leptosphaeria biglobosa* in central China. *Eur. J. Plant Pathol.*

Catanzariti A.-M, Dodds P.N, Ve T, Kobe B, Ellis J.G, and Staskawicz B.J. 2010. The AvrM effector from flax rust has a structured C-terminal domain and interacts directly with the M resistance protein. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 23, 49–57.

Century K.S, Shapiro A.D, Repetti P.P, Dahlbeck D, Holub E, and Staskawicz B.J. 1997.

NDR1, a Pathogen-Induced Component Required for *Arabidopsis* Disease Resistance. *Science* 278, 1963–1965.

Cesari 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. *Plant Cell Online* tpc.112.107201.

Cesari S, Bernoux M, Moncuquet P, Kroj T, and Dodds P.N. 2014. A novel conserved

mechanism for plant NLR protein pairs: the “integrated decoy” hypothesis. *Front. Plant Sci.* 5.

Césari S, Kanzaki H, Fujiwara T, Bernoux M, Chalvon V, Kawano Y, Shimamoto K, Dodds

P, Terauchi R, and Kroj T. 2014. The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *EMBO J.* 33, 1941–1959.

Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, Parkin I.A.P, 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.

Chaudhry B, Müller-Uri F, Cameron-Mills V, Gough S, Simpson D, Skriver K, and Mundy

J. 1994. The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 6, 815–824.

Cheng B, Yu X, Ma Z, Dong S, Dou D, Wang Y, and Zheng X. 2012. *Phytophthora sojae*

effector Avh331 suppresses the plant defence response by disturbing the MAPK signalling pathway. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 77, 1–9.

Chevre A.M, Eber F, This P, Barret P, Tanguy X, Brun H, Delseny M, and Renard M. 1996. Characterization of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *B. napus*–*B. nigra* addition lines. *Plant Breed.* 115, 113–118.

Chevrel A, Urvoas A, de la Sierra-Gallay I.L, Aumont-Nicaise M, Moutel S, Desmadril M, Perez F, Gautreau A, van Tilbeurgh H, Minard P, et al. 2015. Specific GFP-binding artificial proteins (α Rep): a new tool for in vitro to live cell applications. *Biosci. Rep.* 35.

Chinchilla D, and Boller T. 2011. Innate Immunity: Pattern Recognition in Plants. In *Effectors in Plant–Microbe Interactions*, Francisrtin, and S. Kamoun, eds. (Wiley-Blackwell), pp. 1–32.

Clay N.K, Adio A.M, Denoux C, Jander G, and Ausubel F.M. 2008. Glucosinolate Metabolites Required for an *Arabidopsis* Innate Immune Response. *Science.*

Clough S.J, and Bent A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743.

Collemare J, and Lebrun M.-H. 2011. Fungal Secondary Metabolites: Ancient Toxins and Novel Effectors in Plant–Microbe Interactions. In *Effectors in Plant–Microbe Interactions*, Francisrtin, and S. Kamoun, eds. (Wiley-Blackwell), pp. 377–400.

Cook D.E, Mesarich C.H, and Thomma B.P.H.J. 2015. Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 541–563.

Cook G.M, Robson J.R, Frampton R.A, McKenzie J, Przybilski R, Fineran P.C, and Arcus V.L. 2013. Ribonucleases in bacterial toxin–antitoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1829, 523–531.

Cui H, Wang Y, Xue L, Chu J, Yan C, Fu J, Chen M, Innes R.W, and Zhou J.-M. 2010. *Pseudomonas syringae* Effector Protein AvrB Perturbs *Arabidopsis* Hormone Signaling by Activating MAP Kinase 4. *Cell Host Microbe* 7, 164–175.

Dangl J.L, and Jones J.D.G. 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, and Balesdent M.-H. 2012. Genome Structure and Reproductive Behaviour Influence the Evolutionary Potential of a Fungal Phytopathogen. *PLoS Pathog* 8, e1003020.

Deacon J, and Deacon J. 2005. Fungi as Plant Pathogens. In *Fungal Biology*, Blackwell Publishing Ltd., pp. 279–308.

Dean R, Van Kan J. a. L, Pretorius Z.A, Hammond-Kosack K.E, Di Pietro A, Spanu P.D, Rudd J.J, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, et al. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430.

Dechorgnat J, Patrit O, Krapp A, Fagard M, and Daniel-Vedele F. 2012. Characterization of the Nrt2.6 Gene in *Arabidopsis thaliana*: A Link with Plant Response to Biotic and Abiotic Stress. *PLOS ONE* 7, e42491.

Degrave A, Fagard M, Perino C, Brisset M.N, Gaubert S, Laroche S, Patrit O, and Barny M.-A. 2008. *Erwinia amylovora* Type Three–Secreted Proteins Trigger Cell Death and Defense Responses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 21, 1076–1086.

Degrave A, Moreau M, Launay A, Barny M.-A, Brisset M.-N, Patrit O, Tacconnat L, Vedel R, and Fagard M. 2013. The bacterial effector DspA/E is toxic in *Arabidopsis thaliana* and is required for multiplication and survival of fire blight pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 14, 506–517.

Derevnina L, Dagdas Y.F, De la Concepcion J.C, Bialas A, Kellner R, Petre B, Domazakis E, Du J, Wu C.-H, Lin X, et al. 2016. Nine things to know about elicitors. *New Phytol.* 212, 888–895.

DeYoung B.J, and Innes R.W. 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat. Immunol.* 7, 1243–1249.

Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orobitz M, Montanyola A, Chang J.-M, Taly J.-F, and Notredame C. 2011. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res.* 39, W13–17.

Dinesh-Kumar S.P, Tham W.-H, and Baker B.J. 2000. Structure–function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene N. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 14789–14794.

Dixon M.S, Golstein C, Thomas C.M, Biezen E.A. van der, and Jones J.D.G. 2000. Genetic complexity of pathogen perception by plants: The example of Rcr3, a tomato gene required specifically by Cf-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8807–8814.

Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V, Kahnt J, Osorio S, Tohge T, Fernie A.R, Feussner I, et al. 2011. Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 478, 395–398.

Dodds P.N, and Rathjen J.P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548.

Dodds P.N, Lawrence G.J, Catanzariti A.-M, Teh T, Wang C.-I.A, Ayliffe M.A, Kobe B, and Ellis J.G. 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8888–8893.

Dong X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 316–323.

Dou D, Kale S.D, Wang X, Jiang R.H.Y, Bruce N.A, Arredondo F.D, Zhang X, and Tyler B.M. 2008a. RXLR-Mediated Entry of *Phytophthora sojae* Effector Avr1b into Soybean Cells Does Not Require Pathogen-Encoded Machinery. *Plant Cell* 20, 1930–1947.

Dou D, Kale S.D, Wang X, Chen Y, Wang Q, Wang X, Jiang R.H.Y, Arredondo F.D, Anderson R.G, Thakur P.B, et al. 2008b. Conserved C-Terminal Motifs Required for Avirulence and Suppression of Cell Death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. *Plant Cell Online* 20, 1118–1133.

Duplessis S, Hacquard S, Delaruelle C, Tisserant E, Frey P, Martin F, and Kohler A. 2011. *Melampsora larici-populina* transcript profiling during germination and timecourse infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 808–818.

Duplessis S, Cuomo C.A, Lin Y.-C, Aerts A, Tisserant E, Veneault-Fourrey C, Joly D.L, Hacquard S, Amselem J, Cantarel B.L, et al. 2011. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 9166–9171.

Ellis J.G, Dodds P.N, and Lawrence G.J. 2007. Flax Rust Resistance Gene Specificity is Based on Direct Resistance-Avirulence Protein Interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 289–306.

Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, and von Heijne G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300, 1005–1016.

van Esse H.P, Bolton M.D, Stergiopoulos I, de Wit P.J.G.M, and Thomma B.P.H.J. 2007. The Chitin-Binding *Cladosporium fulvum* Effector Protein Avr4 Is a Virulence Factor. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 20, 1092–1101.

van Esse H.P, van't Klooster J.W, Bolton M.D, Yadeta K.A, van Baarlen P, Boeren S, Vervoort J, de Wit P.J.G.M, and Thomma B.P.H.J. 2008. The *Cladosporium fulvum* Virulence Protein Avr2 Inhibits Host Proteases Required for Basal Defense. *Plant Cell* 20, 1948–1963.

Eulgem T. 2005. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci.* 10, 71–78.

Evangelisti E, Govetto B, Minet-Kebdani N, Kuhn M.-L, Attard A, Ponchet M, Panabières F, and Gourgues M. 2013. The *Phytophthora parasitica* RXLR effector Penetration-Specific Effector 1 favours *Arabidopsis thaliana* infection by interfering with auxin physiology. *New Phytol.* 199, 476–489.

Eves-van den Akker S, and Birch P.R.J. 2016. Opening the Effector Protein Toolbox for Plant–Parasitic Cyst Nematode Interactions. *Mol. Plant* 9, 1451–1453.

Fagard M, Launay A, Clément G, Courtial J, Dellagi A, Farjad M, Krapp A, Soulié M.-C, and Masclaux-Daubresse C. 2014. Nitrogen metabolism meets phytopathology. *J. Exp. Bot.* 65, 5643–5656.

Fan W, and Dong X. 2002. In Vivo Interaction between NPR1 and Transcription Factor TGA2 Leads to Salicylic Acid–Mediated Gene Activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* 14, 1377–1389.

Fisher M.C, Henk D.A, Briggs C.J, Brownstein J.S, Madoff L.C, McCraw S.L, and Gurr S.J. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186–194.

Fitt B.D.L, Brun H, Barbetti M.J, and Rimmer S.R. 2006. World-Wide Importance of Phoma Stem Canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on Oilseed Rape (*Brassica napus*). *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 3–15.

Franco-Orozco B, Berepiki A, Ruiz O, Gamble L, Griffe L.L, Wang S, Birch P.R.J, Kanyuka K, and Avrova A. 2017. A new proteinaceous pathogen-associated molecular pattern (PAMP) identified in Ascomycete fungi induces cell death in Solanaceae. *New Phytol.* 214, 1657–1672.

Fudal I, Ross S, Gout L, Blaise F, Kuhn M.L, Eckert M.R, Cattolico L, Bernard-Samain S, Balesdent M.H, and Rouxel T. 2007. Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of *AvrLm6*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 20, 459–470.

Fudal I, Ross S, Brun H, Besnard A.-L, Ermel M, Kuhn M.-L, Balesdent M.-H, and Rouxel T. 2009. Repeat-Induced Point Mutation (RIP) as an Alternative Mechanism of Evolution Toward Virulence in *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 22, 932–941.

Gabriëls S.H.E.J, Takken F.L.W, Vossen J.H, de Jong C.F, Liu Q, Turk S.C.H.J, Wachowski L.K, Peters J, Witsenboer H.M.A, de Wit P.J.G.M, et al. 2006. cDNA-AFLP Combined with Functional Analysis Reveals Novel Genes Involved in the Hypersensitive Response. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19, 567–576.

Gabriëls S.H.E.J, Vossen J.H, Ekengren S.K, van Ooijen G, Abd-El-Hallem A.M, van den Berg G.C.M, Rainey D.Y, Martin G.B, Takken F.L.W, de Wit P.J.G.M., et al. 2007. An NB-LRR protein required for HR signalling mediated by both extra- and intracellular resistance proteins. *Plant J.* 50, 14–28.

Galagan J.E, and Selker E.U. 2004. RIP: the evolutionary cost of genome defense. *Trends Genet. TIG* 20, 417–423.

Galán J.E, and Collmer A. 1999. Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. *Science* 284, 1322–1328.

Gamir J, Darwiche R, van't Hof P, Choudhary V, Stumpe M, Schneiter R, and Mauch F. 2017. The sterol-binding activity of PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1 reveals the mode of action of an antimicrobial protein. *Plant J.* 89, 502–509.

Gascuel Q, Buendia L, Pecrix Y, Blanchet N, Muños S, Vear F, and Godiard L. 2016. RXLR and CRN Effectors from the Sunflower Downy Mildew Pathogen *Plasmopara halstedii* Induce Hypersensitive-Like Responses in Resistant Sunflower Lines. *Front. Plant Sci.* 7.

Gawehns F, Cornelissen B.J.C, and Takken F.L.W. 2013. The potential of effector-target genes in breeding for plant innate immunity. *Microb. Biotechnol.* 6, 223–229.

Germain H, Joly D.L, Mireault C, Plourde M.B, Letanneur C, Stewart D, Morency M-J, Petre B, Duplessis S, and Séguin A. 2018. Infection assays in *Arabidopsis* reveal candidate effectors from the poplar rust fungus that promote susceptibility to bacteria and oomycete pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 19, 191–200.

Gervais J. 2017. Identification et analyse fonctionnelle des effecteurs tardifs impliqués dans la colonisation systémique du colza par *Leptosphaeria maculans*. Thèse de doctorat en Sciences du Végétal (Université Paris-Saclay).

Gervais J, Plissonneau C, Linglin J, Meyer M, Labadie K, Cruaud C, Fudal I, Rouxel T, and Balesdent M.-H. 2016. Different waves of effector genes with contrasted genomic location are

expressed by *Leptosphaeria maculans* during cotyledon and stem colonization of oilseed rape. *Mol. Plant Pathol.*

Ghanbarnia K, Fudal I, Larkan N.J, Links M.G, Balesdent M.-H, Profotova B, Fernando W.G.D, Rouxel T, and Borhan M.H. 2015. Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm2* using an intraspecific comparative genomics approach. *Mol. Plant Pathol.* 16, 699–709.

Giamoustaris A., and Mithen R. 1997. Glucosinolates and disease resistance in oilseed rape (*Brassica napus ssp. oleifera*). *Plant Pathol.* 46, 271–275.

Giannakopoulou A, Steele J.F.C, Segretin M.E, Bozkurt T.O, Zhou J, Robatzek S, Banfield M.J, Pais M, and Kamoun S. 2015. Tomato I2 Immune Receptor Can Be Engineered to Confer Partial Resistance to the Oomycete *Phytophthora infestans* in Addition to the Fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 1316–1329.

Gilroy E.M, Hein I, van der Hoorn R, Boevink P.C, Venter E, McLellan H, Kaffarnik F, Hrubikova K, Shaw J, Holeva M, et al. 2007. Involvement of cathepsin B in the plant disease resistance hypersensitive response. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 52, 1–13.

Giraldo M.C, Dagdas Y.F, Gupta Y.K, Mentlak T.A, Yi M, Martinez-Rocha A.L, Saitoh H, Terauchi R, Talbot N.J, and Valent B. 2013. Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nat. Commun.* 4, ncomms2996.

Godfrey D, Böhlenius H, Pedersen C, Zhang Z, Emmersen J, and Thordal-Christensen H. 2010. Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics* 11, 317.

Gómez-Gómez L, and Boller T. 2002. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci.* 7, 251–256.

González-Lamothe R, Mitchell G, Gattuso M, Diarra M.S, Malouin F, and Bouarab K. 2009. Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3400–3419.

Goodwin S.B, M'Barek S.B, Dhillon B, Wittenberg A.H.J, Crane C.F, Hane J.K, Foster A.J, Lee T.A.J.V. der, Grimwood J, Aerts A, et al. 2011. Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis. *PLOS Genet.* 7, e1002070.

Gout L, Fudal I, Kuhn M.-L, Blaise F, Eckert M, Cattolico L, Balesdent M.-H, and Rouxel T. 2006. Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Microbiol.* 60, 67–80.

Gout L, Kuhn M.L, Vincenot L, Bernard-Samain S, Cattolico L, Barbetti M, Moreno-Rico O, Balesdent M.-H, and Rouxel T. 2007. Genome structure impacts molecular evolution at the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environ. Microbiol.* 9, 2978–2992.

Gürlebeck D, Szurek B, and Bonas U. 2005. Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 42, 175–187.

Guyon K, Balagué C, Roby D, and Raffaele S. 2014. Secretome analysis reveals effector candidates associated with broad host range necrotrophy in the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *BMC Genomics* 15, 336.

Halkier B.A, and Gershenzon J. 2006. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303–333.

Hawksworth D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited* *Paper presented at the Asian Mycological Congress 2000 (AMC 2000), incorporating the 2nd Asia-Pacific Mycological Congress on Biodiversity and Biotechnology, and held at the University of Hong Kong on 9-13 July 2000. *Mycol. Res.* 105, 1422–1432.

Heese A, Hann D.R, Gimenez-Ibanez S, Jones A.M.E, He K, Li J, Schroeder J.I, Peck S.C, and Rathjen J.P. 2007. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 12217–12222.

Hiruma K, Gerlach N, Sacristán S, Nakano R.T, Hacquard S, Kracher B, Neumann U, Ramírez D, Bucher M, O’Connell R.J, et al. 2016. Root Endophyte *Colletotrichum tofieldiae* Confers Plant Fitness Benefits that Are Phosphate Status Dependent. *Cell* 165, 464–474.

Holt B.F, Belkhadir Y, and Dangl J.L. 2005. Antagonistic Control of Disease Resistance Protein Stability in the Plant Immune System. *Science* 309, 929–932.

van der Hoorn R.A, and Jones J.D. 2004. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 400–407.

van der Hoorn R.A.L, and Kamoun S. 2008. From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *Plant Cell* 20, 2009–2017.

Houterman P.M, Cornelissen B.J.C, and Rep M. 2008. Suppression of Plant Resistance Gene-Based Immunity by a Fungal Effector. *PLOS Pathog* 4, e1000061.

Houterman P.M, Ma L, Van Ooijen G, De Vroomen M.J, Cornelissen B.J.C, Takken F.L.W, and Rep M. 2009. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *Plant J.* 58, 970–978.

Huang Y.-J, Evans N, Fitt B.D.L, Li Z.-Q, Rouxel T, and Balesdent M.-H. 2006. Fitness cost associated with loss of the *AvrLm4* avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). In *Sustainable Strategies for Managing Brassica Napus (Oilseed Rape) Resistance to Leptosphaeria Maculans (Phoma Stem Canker)*, B.D.L. Fitt, N. Evans, B.J. Howlett, and B.M. Cooke, eds. (Springer Netherlands), pp. 77–89.

Huang Y.-J, Balesdent M.-H, Li Z.-Q, Evans N, Rouxel T, and Fitt B.D.L. 2010. Fitness cost of virulence differs between the *AvrLm1* and *AvrLm4* loci in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *Eur. J. Plant Pathol.* 126, 279.

Hubert D.A, Tornero P, Belkhadir Y, Krishna P, Takahashi A, Shirasu K, and Dangl J.L. 2003. Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *EMBO J.* 22, 5679–5689.

Inami K, Yoshioka-Akiyama C, Morita Y, Yamasaki M, Teraoka T, and 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.

Jacob F, Vernaldi S, and Maekawa T. 2013. Evolution and Conservation of Plant NLR Functions. *Front. Immunol.* 4.

Jarosch B, Kogel K.-H, and Schaffrath U. 1999. The Ambivalence of the Barley *Mlo* Locus: Mutations Conferring Resistance Against Powdery Mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)

Enhance Susceptibility to the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 12, 508–514.

Jia M, Chen L, Xin H.-L, Zheng C.-J, Rahman K, Han T, and Qin L.-P. 2016. A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. *Front. Microbiol.* 7.

Jia Y, McAdams S.A, Bryan G.T, Hershey H.P, and Valent B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19, 4004–4014.

Jiang R.H.Y, Tripathy S, Govers F, and Tyler B.M. 2008. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 4874–4879.

Jin H, Axtell M.J, Dahlbeck D, Ekwenna O, Zhang S, Staskawicz B, and Baker B. 2002. NPK1, an MEKK1-like Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase, Regulates Innate Immunity and Development in Plants. *Dev. Cell* 3, 291–297.

Johnson R, and Jellis G.J. 2013. Breeding for Disease Resistance (*Springer Science & Business Media*).

Jones J.D.G, and Dangl J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.

de Jonge R, and Thomma B.P.H.J. 2009. Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol.* 17, 151–157.

de Jonge R, van Esse H.P, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, van der Krol S, Shibuya N, Joosten M.H.A.J, and Thomma B.P.H.J. 2010. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* 329, 953–955.

Joosten M.H, Vogelsang R, Cozijnsen T.J, Verberne M.C, and Wit P.J.D. 1997. The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. *Plant Cell Online* 9, 367–379.

K. Saikkonen S. H. Faeth, M. Helander, and Sullivan T.J. 1998. FUNGAL ENDOPHYTES: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29, 319–343.

Kachroo A, and Robin G.P. 2013. Systemic signaling during plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16, 527–533.

Kalde M, Nühse T.S, Findlay K, and Peck S.C. 2007. The syntaxin SYP132 contributes to plant resistance against bacteria and secretion of pathogenesis-related protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11850–11855.

Kale S.D, Gu B, Capelluto D.G.S, Dou D, Feldman E, Rumore A, Arredondo F.D, 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.

Kamoun S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 41–60.

Kamoun S, Lindqvist H, and Govers F. 1997. A Novel Class of Elicitor-like Genes from *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 10, 1028–1030.

Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma L.-J, Brefort T, Saville B.J, Banuett F, Kronstad J.W, Gold S.E, Müller O, et al. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444, 97–101.

Kanneganti T.-D, Huitema E, Cakir C, and Kamoun S. 2006. Synergistic Interactions of the Plant Cell Death Pathways Induced by *Phytophthora infestans* Nep1-Like Protein PiNPP1.1 and INF1 Elicitin. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19, 854–863.

Kanzaki H, Yoshida K, Saitoh H, Fujisaki K, Hirabuchi A, Alaux L, Fournier E, Tharreau D, and Terauchi R. 2012. Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice *Pik* genes driven by their physical interactions. *Plant J.* 72, 894–907.

Kaschani F, Shabab M, Bozkurt T, Shindo T, Schornack S, Gu C, Ilyas M, Win J, Kamoun S, and van der Hoorn R.A.L 2010. An Effector-Targeted Protease Contributes to Defense against *Phytophthora infestans* and Is under Diversifying Selection in Natural Hosts. *Plant Physiol.* 154, 1794–1804.

Kasuga T, and Gijzen M. 2013. Epigenetics and the evolution of virulence. *Trends Microbiol.* 21, 575–582.

Keen N.T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 24, 447–463.

Kemen E, Kemen A.C, Rafiqi M, Hempel U, Mendgen K, Hahn M, and Voegelé R.T. 2005. Identification of a Protein from Rust Fungi Transferred from Haustoria into Infected Plant Cells. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 18, 1130–1139.

Kemen E, and Jones J.D.G. 2012. Obligate biotroph parasitism: can we link genomes to lifestyles? *Trends Plant Sci.* 17, 448–457.

Kemen E, Kemen A, Ehlers A, Voegelé R, and Mendgen K. 2013. A novel structural effector from rust fungi is capable of fibril formation. *Plant J.* 75, 767–780.

Kettles G.J, Bayon C, Sparks C, Canning G, Kanyuka K, and Rudd J.J. 2017. Characterisation of an antimicrobial and phytotoxic ribonuclease secreted by the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. bioRxiv 130393.

Khang C.H, Berruyer R, Giraldo M.C, Kankanala P, Park S.-Y, Czymmek K, Kang S, and Valent B. 2010. Translocation of *Magnaporthe oryzae* Effectors into Rice Cells and Their Subsequent Cell-to-Cell Movement. *Plant Cell Online* 22, 1388–1403.

Khatib M, Lafitte C, Esquerré-Tugayé M.-T, Bottin A, and Rickauer M. 2004. The CBEL elicitor of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* activates defence in *Arabidopsis thaliana* via three different signalling pathways. *New Phytol.* 162, 501–510.

Kim M.C, Panstruga R, Elliott C, Müller J, Devoto A, Yoon H.W, Park H.C, Cho M.J, and Schulze-Lefert P. 2002a. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* 416, 447–451.

Kim Y.J, Lin N.-C, and Martin G.B. 2002b. Two Distinct *Pseudomonas* Effector Proteins Interact with the Pto Kinase and Activate Plant Immunity. *Cell* 109, 589–598.

Kinealy C. 1994. This Great Calamity: The Irish Famine, 1845-52 (*Gill & Macmillan*).

King S.R.F, McLellan H, Boevink P.C, Armstrong M.R, Bukharova T, Sukarta O, Win J, Kamoun S, Birch P.R.J, and Banfield M.J. 2014. *Phytophthora infestans* RXLR Effector

PexRD2 Interacts with Host MAPKKK ϵ to Suppress Plant Immune Signaling. *Plant Cell Online* 26, 1345–1359.

Kloppholz S, Kuhn H, and Requena N. 2011. A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Curr. Biol. CB* 21, 1204–1209.

Knepper C, Savory E.A, and Day B. 2011. *Arabidopsis* NDR1 Is an Integrin-Like Protein with a Role in Fluid Loss and Plasma Membrane-Cell Wall Adhesion. *Plant Physiol.* 156, 286–300.

Kroj T, Chanclud E, Michel-Romiti C, Grand X, and Morel J.-B. 2016. Integration of decoy domains derived from protein targets of pathogen effectors into plant immune receptors is widespread. *New Phytol.* 210, 618–626.

Kudla, J, Batistič, O, and Hashimoto, K. (2010). Calcium Signals: The Lead Currency of Plant Information Processing. *Plant Cell* 22, 541–563.

Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, and Felix G. 2004. The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in *Arabidopsis* Plants. *Plant Cell* 16, 3496–3507.

Kutcher H.R, Balesdent M.H, Rimmer S.R, Rouxel T, Chèvre A.M, Delourme R, and Brun H. 2010. Frequency of avirulence genes in *Leptosphaeria maculans* in western Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 32, 77–85.

Lacomme C, and Santa Cruz S. 1999. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7956–7961.

Laluk K, and Mengiste T. 2010. Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion? *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* 8.

- Lambert K, and Bekal S. 2002.** Introduction to Plant-Parasitic Nematodes. *Plant Health Instr.*
- Lawrence G.J, Dodds P.N, and Ellis J.G. 2010.** Transformation of the flax rust fungus, *Melampsora lini*: selection via silencing of an avirulence gene. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 61, 364–369.
- Lee S.C, Ristaino J.B, and Heitman J. 2012.** Parallels in Intercellular Communication in Oomycete and Fungal Pathogens of Plants and Humans. *PLOS Pathog.* 8, e1003028.
- Leflon M, Brun H, Eber F, Delourme R, Lucas M.O, Vallée P, Ermel M, Balesdent M.H, and Chèvre A.M. 2007.** Detection, introgression and localization of genes conferring specific resistance to *Leptosphaeria maculans* from *Brassica rapa* into *B. napus*. *Theor. Appl. Genet.* 115, 897–906.
- Lewis J.D, Wan J, Ford R, Gong Y, Fung P, Nahal H, Wang P.W, Desveaux D, and Guttman D.S. 2012.** Quantitative Interactor Screening with next-generation Sequencing (QIS-Seq) identifies *Arabidopsis thaliana* MLO2 as a target of the *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ2. *BMC Genomics* 13, 8.
- Li Q, Zhang M, Shen D, Liu T, Chen Y, Zhou J.-M, and Dou D. 2016.** A *Phytophthora sojae* effector PsCRN63 forms homo-/hetero-dimers to suppress plant immunity via an inverted association manner. *Sci. Rep.* 6, 26951.
- Liao J.C, Mi L, Pontrelli S, and Luo S. 2016.** Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 288–304.
- Lin W.-C, Lu C.-F, Wu J.-W, Cheng M.-L, Lin Y.-M, Yang N.-S, Black L, Green S.K, Wang J.-F, and Cheng C.-P. 2004.** Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis NPR1* gene

display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Res.* 13, 567–581.

Liu T, Song T, Zhang X, Yuan H, Su L, Li W, Xu J, Liu S, Chen L, Chen T, et al. 2014. Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nat. Commun.* 5, ncomms5686.

Liu Y, Ren D, Pike S, Pallardy S, Gassmann W, and Zhang S. 2007. Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant J.* 51, 941–954.

Liu Z, Gao Y, Kim Y.M, Faris J.D, Shelver W.L, de Wit P.J.G.M, Xu S.S, and Friesen T.L. 2016. SnTox1, a *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effector, is a dual-function protein that facilitates infection while protecting from wheat-produced chitinases. *New Phytol.* 211, 1052–1064.

Lo Presti L, and Kahmann R. 2017. How filamentous plant pathogen effectors are translocated to host cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38, 19–24.

Lo Presti L, Zechmann B, Kumlehn J, Liang L, Lanver D, Tanaka S, Bock R, and Kahmann R. 2017. An assay for entry of secreted fungal effectors into plant cells. *New Phytol.* 213, 956–964.

Loh Y.-T, Zhou J, and Martin G.B. 1998. The Myristylation Motif of Pto Is Not Required for Disease Resistance. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 11, 572–576.

Loon L.C. van Rep M, and Pieterse C.M.J. 2006. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162.

Lozano-Torres J.L, Wilbers R.H.P, Warmerdam S, Finkers-Tomczak A, Diaz-Granados A, van Schaik C.C, Helder J, Bakker J, Govere A, Schots A, et al. 2014. Apoplastic venom allergen-like proteins of cyst nematodes modulate the activation of basal plant innate immunity by cell surface receptors. *PLoS Pathog.* 10, e1004569.

Lu R, Malcuit I, Moffett P, Ruiz M.T, Peart J, Wu A.-J, Rathjen J.P, Bendahmane A, Day L, and Baulcombe D.C. 2003. High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J.* 22, 5690–5699.

Lu S, Faris J.D, Sherwood R, Friesen T.L, and Edwards M.C. 2014. A dimeric PR-1-type pathogenesis-related protein interacts with ToxA and potentially mediates ToxA-induced necrosis in sensitive wheat. *Mol. Plant Pathol.* 15, 650–663.

Luderer R, Takken F.L.W, de Wit P.J.G.M, and Joosten M.H.A.J. 2002. *Cladosporium fulvum* overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins. *Mol. Microbiol.* 45, 875–884.

Ludwig N, Liang L, Schipper S, Reißmann D, Aßmann T, Glatter J, Altmüller R, and Kahmann R. 2017. Functional characterization of a protein complex formed by four *Ustilago maydis* effectors essential for virulence. Poster presented during the 29th Fungal Genetic Conference (14-19 mars 2017, Pacific Grove, USA).

Luna E, Pastor V, Robert J, Flors V, Mauch-Mani B, and Ton J. 2010. Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24, 183–193.

Ma L, Houterman P.M, Gawehns F, Cao L, Sillo F, Richter H, Clavijo-Ortiz M.J, Schmidt S.M, Boeren S, Vervoort J, et al. 2015. The AVR2–SIX5 gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato. *New Phytol.* 208, 507–518.

Mackey D, Belkhadir Y, Alonso J.M, Ecker J.R, and Dangl J.L. 2003. *Arabidopsis* RIN4 Is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance. *Cell* 112, 379–389.

Maekawa T, Cheng W, Spiridon L.N, Töller A, Lukasik E, Saijo Y, Liu P, Shen Q.-H, Micluta M.A, Somssich I.E, et al. 2011. Coiled-Coil Domain-Dependent Homodimerization of Intracellular Barley Immune Receptors Defines a Minimal Functional Module for Triggering Cell Death. *Cell Host Microbe* 9, 187–199.

Mäkelä M.R, Donofrio N, and de Vries R.P. 2014. Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genet. Biol.* 72, 2–9.

Malinovsky F.G, Fangel J.U, and Willats W.G.T. 2014. The role of the cell wall in plant immunity. *Front. Plant Sci.* 5.

Maqbool A, Saitoh H, Franceschetti M, Stevenson C, Uemura A, Kanzaki H, Kamoun S, Terauchi R, and Banfield M. 2015. Structural basis of pathogen recognition by an integrated HMA domain in a plant NLR immune receptor. *eLife* 4.

Marshall R, Kombrink A, Motteram J, Loza-Reyes E, Lucas J, Hammond-Kosack K.E, Thomma B.P.H.J, and Rudd J.J. 2011. Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. *Plant Physiol.* 156, 756–769.

Martin F, Kohler A, Murat C, Veneault-Fourrey C, and Hibbett D.S. 2016. Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 760–773.

McLellan H, Gilroy E.M, Yun B.-W, Birch P.R.J, and Loake G.J. 2009. Functional redundancy in the Arabidopsis Cathepsin B gene family contributes to basal defence, the hypersensitive response and senescence. *New Phytol.* 183, 408–418.

Melech-Bonfil S, and Sessa G. 2010. Tomato MAPKKK ϵ is a positive regulator of cell-death signaling networks associated with plant immunity. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 64, 379–391.

Mentlak T.A, Kombrink A, Shinya T, Ryder L.S, Otomo I, Saitoh H, Terauchi R, Nishizawa Y, Shibuya N, Thomma B.P.H.J, et al. 2012. Effector-Mediated Suppression of Chitin-Triggered Immunity by *Magnaporthe oryzae* Is Necessary for Rice Blast Disease. *Plant Cell Online* 24, 322–335.

Mesarich C.H, Okmen B, Rovenich H, Griffiths S.A, Wang C, Jashni M.K, Mihajlovski A, Collemare J, Hunziker L, Deng C.H, et al. 2017. Specific hypersensitive response-associated recognition of new apoplastic effectors from *Cladosporium fulvum* in wild tomato. bioRxiv 127746.

Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, and Shibuya N. 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 19613–19618.

Monaghan J, and Zipfel C. 2012. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 349–357.

Mueller A.N, Ziemann S, Treitschke S, Aßmann D, and 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.

Mukhtar M.S, Carvunis A.-R, Dreze M, Epple P, Steinbrenner J, Moore J, Tasan M, Galli M, Hao T, Nishimura M.T, et al. 2011. Independently Evolved Virulence Effectors Converge onto Hubs in a Plant Immune System Network. *Science* 333, 596–601.

Naito K, Taguchi F, Suzuki T, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi T, and Ichinose Y. 2008. Amino Acid Sequence of Bacterial Microbe-Associated Molecular Pattern flg22 Is Required for Virulence. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 21, 1165–1174.

Narusaka M, Shirasu K, Noutoshi Y, Kubo Y, Shiraishi T, Iwabuchi M, and Narusaka Y. 2009. RRS1 and RPS4 provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *Plant J.* 60, 218–226.

Nekrasov V, Wang C, Win J, Lanz C, Weigel D, and Kamoun S. 2017. Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Sci. Rep.* 7, 482.

Nemri A, Saunders D.G.O, Anderson C, Upadhyaya N.M, Win J, Lawrence G, Jones D, Kamoun S, Ellis J, and Dodds P. 2014. The genome sequence and effector complement of the flax rust pathogen *Melampsora lini*. *Front. Plant Sci.* 5.

O’Connell R.J, Thon M.R, Hacquard S, Amyotte S.G, Kleemann J, Torres M.F, Damm U, Buiate E.A, Epstein L, Alkan N, et al. 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Genet.* 44, 1060–1065.

Oh C.-S, and Martin G.B. 2011. Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. *Trends Plant Sci.* 16, 132–140.

Ohm R.A, Feau N, Henrissat B, Schoch C.L, Horwitz B.A, Barry K.W, Condon B.J, Copeland A.C, Dhillon B, Glaser F, et al. 2012. Diverse Lifestyles and Strategies of Plant Pathogenesis Encoded in the Genomes of Eighteen Dothideomycetes Fungi. *PLOS Pathog.* 8, e1003037.

Ökmen B, and Doehlemann G. 2014. Inside plant: biotrophic strategies to modulate host immunity and metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20, 19–25.

Okuyama Y, Kanzaki H, Abe A, Yoshida K, Tamiru M, Saitoh H, Fujibe T, Matsumura H, Shenton M, Galam D.C, et al. 2011. A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice Pia-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 66, 467–479.

Oliva R, Win J, Raffaele S, Boutemy L, Bozkurt T.O, Chaparro-Garcia A, Segretin M.E, Stam R, Schornack S, Cano L.M, et al. 2010. Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell. Microbiol.* 12, 705–715.

Oliveira Garcia E, and Valent B. 2017. Towards understanding the mechanism of cytoplasmic effector translocation during biotrophic development of *Magnaporthe oryzae*. Presentation during the 29th Fungal Genetic Conference (14-19 mars 2017, Pacific Grove, USA).

Olombrada M, Lázaro-Gorines R, López-Rodríguez J.C, Martínez-del-Pozo Á, Oñaderra M, Maestro-López M, Lacadena J, Gavilanes J.G, and García-Ortega L. 2017. Fungal Ribotoxins: A Review of Potential Biotechnological Applications. *Toxins* 9, 71.

Ortiz D, Guillen K.D, Cesari S, Chalvon V, Gracy J, Padilla A, and Kroj T. 2017. Recognition of the *Magnaporthe oryzae* effector AVR-Pia by the decoy domain of the rice NLR immune receptor RGA5. *Plant Cell* tpc.00435.2016.

Ortiz R, Nurminiemi M, Madsen S, Rognli O.A, and Bjørnstad Å. 2002. Genetic gains in Nordic spring barley breeding over sixty years. *Euphytica* 126, 283–289.

Ovide Fastes, livre IV.

Page A.-L, and Parsot C. 2002. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol. Microbiol.* 46, 1–11.

Park C.-J, and Seo Y.-S. 2015. Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *Plant Pathol. J.* 31, 323–333.

Park C.-H, Chen S, Shirsekar G, Zhou B, Khang C.H, Songkumarn P, Afzal A.J, Ning Y, Wang R, Bellizzi M, et al. 2012. The *Magnaporthe oryzae* Effector AvrPiz-t Targets the RING E3 Ubiquitin Ligase APIP6 to Suppress Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Rice. *Plant Cell Online* 24, 4748–4762.

Parker J.E, Holub E.B, Frost L.N, Falk A, Gunn N.D, and Daniels M.J. 1996. Characterization of eds1, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *Plant Cell Online* 8, 2033–2046.

Parlange F, Daverdin G, Fudal I, Kuhn M.-L, Balesdent M.-H, Blaise F, Grezes-Besset B, and 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. *Mol. Microbiol.* 71, 851–863.

Parlange F, Roffler S, Menardo F, Ben-David R, Bourras S, McNally K.E, Oberhaensli S, Stirnweis D, Buchmann G, Wicker T, et al. 2015. Genetic and molecular characterization of a locus involved in avirulence of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* on wheat *Pm3* resistance alleles. *Fungal Genet. Biol.* 82, 181–192.

Pedersen C, van Themaat E.V.L, McGuffin L.J, Abbott J.C, Burgis T.A, Barton G, Bindschedler L.V, Lu X, Maekawa T, Weßling R, et al. 2012. Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates. *BMC Genomics* 13, 694.

Pel M.J.C, Wintermans P.C.A, Cabral A, Robroek B.J.M, Seidl M.F, Bautor J, Parker J.E, Ackerveken G.V. den, and Pieterse C.M.J. 2014. Functional Analysis of *Hyaloperonospora arabidopsidis* RXLR Effectors. *PLOS ONE* 9, e110624.

Pennington H.G, Gheorghe D.M, Damerum A, Pliego C, Spanu P.D, Cramer R, and Bindschedler L.V. 2016. Interactions between the Powdery Mildew Effector BEC1054 and Barley Proteins Identify Candidate Host Targets. *J. Proteome Res.* 15, 826–839.

Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen H.B, Lacy M, Austin M.J, Parker J.E, et al. 2000. *Arabidopsis* MAP Kinase 4 Negatively Regulates Systemic Acquired Resistance. *Cell* 103, 1111–1120.

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

Petit-Houdenot Y, and Fudal I. 2017. Complex Interactions between Fungal Avirulence Genes and Their Corresponding Plant Resistance Genes and Consequences for Disease Resistance Management. *Front. Plant Sci.* 8.

Petre B, and Kamoun S. 2014. How Do Filamentous Pathogens Deliver Effector Proteins into Plant Cells? *PLoS Biol* 12, e1001801.

Petre B, Saunders D.G.O, Sklenar J, Lorrain C, Win J, Duplessis S, and Kamoun S. 2015. Candidate Effector Proteins of the Rust Pathogen *Melampsora larici-populina* Target Diverse Plant Cell Compartments. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 28, 689–700.

Petre B, Saunders D.G.O, Sklenar J, Lorrain C, Krasileva K.V, Win J, Duplessis S, and Kamoun S. 2016. Heterologous Expression Screens in *Nicotiana benthamiana* Identify a Candidate Effector of the Wheat Yellow Rust Pathogen that Associates with Processing Bodies. *PLOS ONE* 11, e0149035.

Pieterse C.M.J, Does D.V. der, Zamioudis C, Leon-Reyes A, and Wees S.C.M.V. 2012. Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 489–521.

Plett J.M, and Martin F. (2015). Reconsidering mutualistic plant–fungal interactions through the lens of effector biology. *Curr. Opin. Plant Biol.* 26, 45–50.

Plett J.M, Kempainen M, Kale S.D, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler B.M, Pardo A.G, and Martin F. 2011. A Secreted Effector Protein of *Laccaria bicolor* Is Required for Symbiosis Development. *Curr. Biol.* 21, 1197–1203.

Plett J.M, Daguette Y, Wittulsky S, Vayssières A, Deveau A, Melton S.J, Kohler A, Morrell-Falvey J.L, 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 8299–8304.

Plissonneau C. (2015). Quand un gène d'avirulence en cache un autre : analyse de l'interaction entre *AvrLm3* et *AvrLm4-7* chez *Leptosphaeria maculans*. Thèse de doctorat en Sciences du Végétal (Université Paris Saclay).

Plissonneau C, Daverdin G, Ollivier B, Blaise F, Degrave A, Fudal I, Rouxel T, and Balesdent M.-H. 2016. A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.* 209, 1613–1624.

- Plissonneau C, Blaise F, Ollivier B, Leflon M, Carpezat J, Rouxel T, and Balesdent M.-H. 2017.** Unusual evolutionary mechanisms to escape effector-triggered immunity in the fungal phytopathogen *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Ecol.*
- del Pozo O, Pedley K.F, and Martin G.B. 2004.** MAPKKK α is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *EMBO J.* 23, 3072–3082.
- Presti L.L, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, Zuccaro A, Reissmann S, and Kahmann R. 2015.** Fungal Effectors and Plant Susceptibility. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 513–545.
- Pretsch K, Kemen A, Kemen E, Geiger M, Mendgen K, and Voegelé R. 2013.** The rust transferred proteins—a new family of effector proteins exhibiting protease inhibitor function. *Mol. Plant Pathol.* 14, 96–107.
- Qiao Y, Shi J, Zhai Y, Hou Y, and Ma W. 2015.** *Phytophthora* effector targets a novel component of small RNA pathway in plants to promote infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 5850–5855.
- Qi M, Grayczyk J.P, Seitz J.M, Lee Y, Link T.I, Choi D, Pedley K.F, Voegelé R.T, Baum T.J, and Whitham S.A. 2017.** Suppression or Activation of Immune Responses by Predicted Secreted Proteins of the Soybean Rust Pathogen *Phakopsora pachyrhizi*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 31, 163–174.
- Qutob D, Kemmerling B, Brunner F, Kufner I, Engelhardt S, Gust A.A, Luberacki B, Seitz H.U, Stahl D, Rauhut T, et al. 2006.** Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins. *Plant Cell* 18, 3721–3744.
- Qutob D, Chapman B.P, and Gijzen M. 2013.** Transgenerational gene silencing causes gain of virulence in a plant pathogen. *Nat. Commun.*

Raffaele S, Farrer R.A, Cano L.M, Studholme D.J, MacLean D, Thines M, Jiang R.H.Y, Zody M.C, Kunjeti S.G, Donofrio N.M, et al. 2010. Genome Evolution Following Host Jumps in the Irish Potato Famine Pathogen Lineage. *Science* 330, 1540–1543.

Rafiqi M, Gan P.H.P, Ravensdale M, Lawrence G.J, Ellis J.G, Jones D.A, Hardham A.R, and Dodds P.N. 2010. Internalization of Flax Rust Avirulence Proteins into Flax and Tobacco Cells Can Occur in the Absence of the Pathogen. *Plant Cell Online* 22, 2017–2032.

Rairdan G.J, Collier S.M, Sacco M.A, Baldwin T.T, Boettrich T, and Moffett P. 2008. The Coiled-Coil and Nucleotide Binding Domains of the Potato Rx Disease Resistance Protein Function in Pathogen Recognition and Signaling. *Plant Cell Online* 20, 739–751.

Rajput N.A, Zhang M, Ru Y, Liu T, Xu J, Liu L, Mafurah J.J, and Dou D. 2014. *Phytophthora sojae* Effector PsCRN70 Suppresses Plant Defenses in *Nicotiana benthamiana*. *PLOS ONE* 9, e98114.

Rasmussen M.W, Roux M, Petersen M, and Mundy J. 2012. MAP Kinase Cascades in *Arabidopsis* Innate Immunity. *Front. Plant Sci.* 3.

Rep M, Meijer M, Houterman P.M, van der Does H.C, and Cornelissen B.J.C. 2005. *Fusarium oxysporum* Evades I-3-Mediated Resistance Without Altering the Matching Avirulence Gene. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 18, 15–23.

Rey T, and Schornack S. 2013. Interactions of beneficial and detrimental root-colonizing filamentous microbes with plant hosts. *Genome Biol.* 14, 121.

Ricci P, and Bui S. 2011. Repenser la protection des cultures : innovations et transitions. *Editions Quae.*

Rietz S, Stamm A, Malonek S, Wagner S, Becker D, Medina-Escobar N, Corina Vlot A, Feys B.J, Niefind K, and Parker J.E. 2011. Different roles of Enhanced Disease Susceptibility1 (EDS1) bound to and dissociated from Phytoalexin Deficient4 (PAD4) in *Arabidopsis* immunity. *New Phytol.* 191, 107–119.

Ritter C, and Dangl J.L. 1996. Interference between Two Specific Pathogen Recognition Events Mediated by Distinct Plant Disease Resistance Genes. *Plant Cell Online* 8, 251–257.

Robatzek S. 2007. Vesicle trafficking in plant immune responses. *Cell. Microbiol.* 9, 1–8.

Robin A.H.K, Yi G.-E, Laila R, Hossain M.R, Park J.-I, Kim H.R, and Nou I.-S. 2017. *Leptosphaeria maculans* Alters Glucosinolate Profiles in Blackleg Disease–Resistant and -Susceptible Cabbage Lines. *Front. Plant Sci.* 8.

Rodriguez P.A, and Bos J.I.B. 2012. Toward Understanding the Role of Aphid Effectors in Plant Infestation. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 26, 25–30.

Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig D.F, Hirt H, and Jones J.D. 1999. Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11, 273–287.

Rouxel T, and Balesdent M.H. 2005. The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Mol. Plant Pathol.* 6, 225–241.

Rouxel T, and Balesdent M.-H. 2017. Life, death and rebirth of avirulence effectors in a fungal pathogen of *Brassica* crops, *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.*

Rouxel T, Penaud, A, Pinochet, X, Brun, H, Gout, L, Delourme, R, Schmit, J, and 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. *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 diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nat. Commun.* 2, 202.

Russell A.R, Ashfield T, and Innes R.W. 2015. *Pseudomonas syringae* Effector AvrPphB Suppresses AvrB-Induced Activation of RPM1 but Not AvrRpm1-Induced Activation. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 727–735.

Sánchez-Vallet A, McDonald M.C, Solomon P.S, and McDonald B.A. 2015. Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genet. Biol.* 79, 29–32.

Sarris P.F, Cevik V, Dagdas G, Jones J.D.G, and Krasileva K.V. 2016. Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. *BMC Biol.* 14, 8.

Šašek V, Nováková M, Jindřichová B, Bóka K, Valentová O, and Burketová L. 2012. Recognition of Avirulence Gene *AvrLml* from Hemibiotrophic Ascomycete *Leptosphaeria maculans* Triggers Salicylic Acid and Ethylene Signaling in *Brassica napus*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 25, 1238–1250.

Schoch C.L, Crous P.W, Groenewald J.Z, Boehm E.W.A, Burgess T.I, de Gruyter J, de Hoog G.S, Dixon L.J, Grube M, Gueidan C, et al. 2009. A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Stud. Mycol.* 64, 1-15-S10.

Schulz B, and Boyle C. 2005. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* 109, 661–686.

Schwessinger B, and Ronald P.C. 2012. Plant Innate Immunity: Perception of Conserved Microbial Signatures. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 451–482.

Scott B, and Schardl C. 1993. Fungal symbionts of grasses: evolutionary insights and agricultural potential. *Trends Microbiol.* 1, 196–200.

Segonzac C, and Zipfel C. 2011. Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 54–61.

Segretin M.E, Pais M, Franceschetti M, Chaparro-Garcia A, Bos J.I.B, Banfield M.J, and Kamoun S. 2014. Single Amino Acid Mutations in the Potato Immune Receptor R3a Expand Response to *Phytophthora* Effectors. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 27, 624–637.

Selosse M.-A. (2000). La symbiose: structures et fonctions, rôle écologique et évolutif (Vuibert).

Seong S.-Y, and Matzinger P. 2004. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 469–478.

Shabab M, Shindo T, Gu C, Kaschani F, Pansuriya T, Chintha R, Harzen A, Colby T, Kamoun S, and van der Hoorn R.A.L. 2008. Fungal Effector Protein AVR2 Targets Diversifying Defense-Related Cys Proteases of Tomato. *Plant Cell* 20, 1169–1183.

Shen Q.-H, Saijo Y, Mauch S, Biskup C, Bieri S, Keller B, Seki H, Ülker B, Somssich I.E, and Schulze-Lefert P. 2007. Nuclear Activity of MLA Immune Receptors Links Isolate-Specific and Basal Disease-Resistance Responses. *Science* 315, 1098–1103.

Shiller J, van de Wouw A, Taranto A.P, Bowen J.K, Dubois D, Robinson A, Deng C.H, and Plummer K.M. 2015. A Large Family of *AvrLm6*-like Genes in the Apple and Pear Scab Pathogens, *Venturia inaequalis* and *Venturia pirina*. *Front. Plant Sci.* 6.

Shimizu T, Nakano T, Takamizawa D, Desaki Y, Ishii-Minami N, Nishizawa Y, Minami E, Okada K, Yamane H, Kaku H, et al. 2010. Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *Plant J.* 64, 204–214.

Shirasu K. 2009. The HSP90-SGT1 Chaperone Complex for NLR Immune Sensors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 139–164.

Silar P. 2013. La mycologie au début du 21^{ème} siècle : crise et renouveau. *Biol. Aujourd'hui* 207, 269–275.

Silar P, and Malagnac F. (2013). Les champignons redécouverts (Belin).

Silar P, Dairou J, Cocaign A, Busi F, Rodrigues-Lima F, and Dupret J.-M. 2011. Fungi as a promising tool for bioremediation of soils contaminated with aromatic amines, a major class of pollutants. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 477–477.

Sinapidou E, Williams K, Nott L, Bahkt S, Tör M, Crute I, Bittner-Eddy P, and Beynon J. 2004. Two TIR:NB:LRR genes are required to specify resistance to *Peronospora parasitica* isolate Cala2 in *Arabidopsis*. *Plant J.* 38, 898–909.

Singer A.U, Desveaux D, Betts L, Chang J.H, Nimchuk Z, Grant S.R, Dangl J.L, and Sondek J. 2004. Crystal Structures of the Type III Effector Protein AvrPphF and Its Chaperone Reveal Residues Required for Plant Pathogenesis. *Structure* 12, 1669–1681.

Song J, Win J, Tian M, Schornack S, Kaschani F, Ilyas M, van der Hoorn R.A.L, and Kamoun S. 2009. Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1654–1659.

Spanu P.D. 2015. RNA–protein interactions in plant disease: hackers at the dinner table. *New Phytol.* 207, 991–995.

Spanu P, Li L, Przydacz M, Zhang S, Pennington H, Davis L, and Dry I. 2017. The mode of action and origin of RNase-like effectors in powdery mildew fungi. Poster presented during the 29th Fungal Genetic Conference (14-19 mars 2017, Pacific Grove, USA).

Sperschneider J, Dodds P.N, Gardiner D.M, Manners J.M, Singh K.B, and Taylor J.M. 2015. Advances and Challenges in Computational Prediction of Effectors from Plant Pathogenic Fungi. *PLOS Pathog* 11, e1004806.

Sperschneider J, Catanzariti A.-M, DeBoer K, Petre B, Gardiner D.M, Singh K.B, Dodds P.N, and Taylor J.M. 2017. LOCALIZER: subcellular localization prediction of both plant and effector proteins in the plant cell. *Sci. Rep.* 7, 44598.

Sprague S.J, Marcroft S.J, Hayden H.L, and Howlett B.J. 2006. Major Gene Resistance to Blackleg in *Brassica napus* Overcome Within Three Years of Commercial Production in Southeastern Australia. *Plant Dis.* 90, 190–198.

Stachowiak A, Olechnowicz J, Jedryczka M, Rouxel T, Balesdent M.-H, Happstadius I, Gladders P, Latunde-Dada A, and Evans N. 2006. Frequency of Avirulence Alleles in Field Populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 67–75.

Stam R, Jupe J, Howden A.J.M, Morris J.A, Boevink P.C, Hedley P.E, and Huitema E. 2013. Identification and Characterisation CRN Effectors in *Phytophthora capsici* Shows Modularity and Functional Diversity. *PLOS ONE* 8, e59517.

Steinbrenner A.D, Goritschnig S, and Staskawicz B.J. 2015. Recognition and activation domains contribute to allele-specific responses of an Arabidopsis NLR receptor to an oomycete effector protein. *PLoS Pathog.* 11, e1004665.

Stotz H.U, Sawada Y, Shimada Y, Hirai M.Y, Sasaki E, Krischke M, Brown P.D, Saito K, and Kamiya Y. 2011. Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of *Arabidopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 67, 81–93.

Stotz H.U, Mitrousis G.K, de Wit P.J.G., and Fitt B.D.L. 2014. Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends Plant Sci.* 19, 491–500.

Stuiver M.H, and Custers J.H.H.V. 2001. Engineering disease resistance in plants. *Nature* 411, 865–868.

Sueldo D.J, Shimels M, Spiridon L.N, Caldararu O, Petrescu A.-J, Joosten, M.H.A.J, and Tameling, W.I.L. (2015). Random mutagenesis of the nucleotide-binding domain of NRC1 (NB-LRR Required for Hypersensitive Response-Associated Cell Death-1), a downstream signalling nucleotide-binding, leucine-rich repeat (NB-LRR) protein, identifies gain-of-function mutations in the nucleotide-binding pocket. *New Phytol.* 208, 210–223.

Suty L. 2010. La lutte biologique: Vers de nouveaux équilibres écologiques (*Editions Quae*).

Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres M.A, and Mittler R. 2011. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 691–699.

Swiderski M.R, Birker D, and Jones J.D.G. 2009. The TIR Domain of TIR-NB-LRR Resistance Proteins Is a Signaling Domain Involved in Cell Death Induction. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 22, 157–165.

Taipalensuu J, Andreasson E, Eriksson S, and Rask L. 1997. Regulation of the Wound-Induced Myrosinase-Associated Protein Transcript in *Brassica Napus* Plants. *Eur. J. Biochem.* 247, 963–971.

Takken F.L, and Govere A. 2012. How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 375–384.

Tanaka S, Brefort T, Neidig N, Djamei A, Kahnt J, Vermerris W, Koenig S, Feussner K, Feussner I, and Kahmann R. (2014). A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. *eLife* 3.

Tang X, Xie M, Kim Y.J, Zhou J, Klessig D.F, and Martin G.B. 1999. Overexpression of Pto Activates Defense Responses and Confers Broad Resistance. *Plant Cell Online* 11, 15–29.

Thomma B.P.H.J, Nürnberger T, and Joosten M.H.A.J. 2011. Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *Plant Cell* 23, 4–15.

Tian M, Huitema E, Da Cunha L, Torto-Alalibo T, and Kamoun S. 2004. A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J. Biol. Chem.* 279, 26370–26377.

Tian M, Benedetti B, and Kamoun S. 2005. A Second Kazal-Like Protease Inhibitor from *Phytophthora infestans* Inhibits and Interacts with the Apoplastic Pathogenesis-Related Protease P69B of Tomato. *Plant Physiol.* 138, 1785–1793.

Tian M, Win J, Song J, van der Hoorn R, van der Knaap E, and Kamoun S. 2007. A *Phytophthora infestans* Cystatin-Like Protein Targets a Novel Tomato Papain-Like Apoplastic Protease. *Plant Physiol.* 143, 364–377.

Tierens K.F.M.-J, Thomma B.P.H.J, Brouwer M, Schmidt J, Kistner K, Porzel A, Mauch-Mani B, Cammue B.P.A, and Broekaert W.F. 2001. Study of the Role of Antimicrobial Glucosinolate-Derived Isothiocyanates in Resistance of *Arabidopsis* to Microbial Pathogens. *Plant Physiol.* 125, 1688–1699.

Tör M, Lotze M.T, and Holton N. 2009. Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *J. Exp. Bot.* 60, 3645–3654.

Torres M.A, Jones J.D.G, and Dangl J.L. 2006. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiol.* 141, 373–378.

Tsiamis G, Mansfield J.W, Hockenhull R, Jackson R.W, Sesma A, Athanassopoulos E, Bennett M.A, Stevens C, Vivian A, Taylor J.D, et al. 2000. Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to avrPphF in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J.* 19, 3204–3214.

Tsuda K, and Katagiri,F. 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 459–465.

Tsuda K, Sato M, Stoddard T, Glazebrook J, and Katagiri F. 2009. Network Properties of Robust Immunity in Plants. *PLOS Genet.* 5, e1000772.

Üstün S, Sheikh A, Gimenez-Ibanez S, Jones A, Ntoukakis V, and Börnke F. 2016. The Proteasome Acts as a Hub for Plant Immunity and Is Targeted by *Pseudomonas* Type III Effectors. *Plant Physiol.* 172, 1941–1958.

Van de Wouw A.P, Lowe R.G.T, Elliott C.E, Dubois D.J, and Howlett B.J. 2014. An avirulence gene, *AvrLmJ1*, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Mol. Plant Pathol.* 15, 523–530.

Van Loon L.C, and Van Kammen A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. “Samsun” and “Samsun NN.” *Virology* 40, 199–211.

Van Ooijen G, Lukasik E, Van Den Burg H.A, Vossen J.H, Cornelissen B.J.C, and Takken F.L.W. 2010. The small heat shock protein 20 RSI2 interacts with and is required for stability and function of tomato resistance protein I-2. *Plant J.* 63, 563–572.

Ve T, Williams S.J, Catanzariti A.-M, Rafiqi M, Rahman M, Ellis J.G, Hardham A.R, Jones D.A, Anderson P.A, Dodds P.N, et al. 2013. Structures of the flax-rust effector AvrM reveal insights into the molecular basis of plant-cell entry and effector-triggered immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 17594–17599.

Veneault-Fourrey C, and Martin F. 2011. Mutualistic interactions on a knife-edge between saprotrophy and pathogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 444–450.

Vierstra R.D. 2009. The ubiquitin–26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 385–397.

Vleeshouwers V.G.A.A, and Oliver R.P. 2014. Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 27, 196–206.

Vogel J, and Somerville S. 2000. Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 1897–1902.

de Vries J.S, Andriotis V.M.E, Wu A.-J, and Rathjen J.P. 2006. Tomato Pto encodes a functional N-myristoylation motif that is required for signal transduction in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 45, 31–45.

Walsh M.J, Dodd J.E, and Hautbergue G.M. 2013. Ribosome-inactivating proteins. *Virulence* 4, 774–784.

Wang Q, Han C, Ferreira A.O, Yu X, Ye W, Tripathy S, Kale S.D, Gu B, Sheng Y, Sui Y, et al. 2011. Transcriptional Programming and Functional Interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR Effector Repertoire. *Plant Cell Online* tpc.111.086082.

Wang, S, Boevink, P.C, Welsh, L, Zhang, R, Whisson, S.C, and Birch, P.R.J. 2017. Delivery of cytoplasmic and apoplastic effectors from *Phytophthora infestans* haustoria by distinct secretion pathways. *New Phytol.*

Wawra S, Trusch F, Matena A, Apostolakis K, Linne U, Zhukov I, Stanek J, Koźmiński W, Davidson I, Secombes C.J, et al. 2017. The RxLR Motif of the Host Targeting Effector AVR3a of *Phytophthora infestans* Is Cleaved Before Secretion. *Plant Cell Online* tpc.00552.2016.

Wei L, Jian H, Lu K, Filardo F, Yin N, Liu L, Qu C, Li W, Du H, and Li J. 2016. Genome-wide association analysis and differential expression analysis of resistance to *Sclerotinia* stem rot in *Brassica napus*. *Plant Biotechnol. J.* 14, 1368–1380.

Weiberg A, Wang M, Lin F.-M, Zhao H, Zhang Z, Kaloshian I, Huang H.-D, and Jin H. 2013. Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. *Science* 342, 118–123.

West J.S, Kharbanda P.D, Barbetti M.J, and Fitt B.D.L. 2001. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathol.* 50, 10–27.

West J.S, Fitt B.D.L, Leech P.K, Biddulph J.E, Huang Y.-J, and 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 Pathol.* 51, 454–463.

Wezel A, Bellon S, Doré T, Francis C, Vallod D, and David C. 2009. Agroecology as a science, a movement and a practice. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 29, 503–515.

Williams S.J, Sohn K.H, Wan L, Bernoux M, Sarris P.F, Segonzac C, Ve T, Ma Y, Saucet S.B, Ericsson D.J, et al. 2014. Structural Basis for Assembly and Function of a Heterodimeric Plant Immune Receptor. *Science* 344, 299–303.

Wilton M, Subramaniam R, Elmore J, Felsensteiner C, Coaker G, and Desveaux D. 2010. The type III effector HopF2Pto targets Arabidopsis RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2349–2354.

Win J, Krasileva K.V, Kamoun S, Shirasu K, Staskawicz B.J, and Banfield M.J. 2012. Sequence Divergent RXLR Effectors Share a Structural Fold Conserved across Plant Pathogenic Oomycete Species. *PLOS Pathog.* 8, e1002400.

Wise R.P, Moscou M.J, Bogdanove A.J, and Whitham S.A. 2007. Transcript Profiling in Host–Pathogen Interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 329–369.

Wretblad S, and Dixelius C. 2000. B-genome derived resistance to *Leptosphaeria maculans* in near isogenic *Brassica napus* lines is independent of glucosinolate profile. *Physiol. Plant.* 110, 461–468.

Wu C.-H, Belhaj K, Bozkurt T.O, Birk M.S, and Kamoun S. 2016. Helper NLR proteins NRC2a/b and NRC3 but not NRC1 are required for Pto-mediated cell death and resistance in *Nicotiana benthamiana*. *New Phytol.* 209, 1344–1352.

Wu C.-H, Abd-El-Haliem A, Bozkurt T.O, Belhaj K, Terauchi R, Vossen J.H, and Kamoun S. 2017. NLR network mediates immunity to diverse plant pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201702041.

Xiong Q, Ye W, Choi D, Wong J, Qiao Y, Tao K, Wang Y, and Ma W. 2014. *Phytophthora* Suppressor of RNA Silencing 2 Is a Conserved RxLR Effector that Promotes Infection in Soybean and *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 27, 1379–1389.

Yeam I, Nguyen H.P, and Martin G.B. 2010. Phosphorylation of the *Pseudomonas syringae* effector AvrPto is required for FLS2/BAK1-independent virulence activity and recognition by tobacco. *Plant J.* 61, 16–24.

Yin Z, Chen J, Zeng L, Goh M, Leung H, Khush G.S, and Wang G.-L. 2000. Characterizing Rice Lesion Mimic Mutants and Identifying a Mutant with Broad-Spectrum Resistance to Rice Blast and Bacterial Blight. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 13, 869–876.

Zhang S, and Klessig D.F. 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* 6, 520–527.

Zhang M, Li Q, Liu T, Liu L, Shen D, Zhu Y, Liu P, Zhou J.-M, and Dou D. 2015. Two Cytoplasmic Effectors of *Phytophthora sojae* Regulate Plant Cell Death via Interactions with Plant Catalases. *Plant Physiol.* 167, 164–175.

Zhou B, Qu S, Liu G, Dolan M, Sakai H, Lu G, Bellizzi M, and Wang G.-L. 2006. The Eight Amino-Acid Differences Within Three Leucine-Rich Repeats Between Pi2 and Piz-t Resistance Proteins Determine the Resistance Specificity to *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19, 1216–1228.

Zhou E, Jia Y, Singh P, Correll J.C, and Lee F.N. 2007. Instability of the *Magnaporthe oryzae* avirulence gene AVR-Pita alters virulence. *Fungal Genet. Biol.* 44, 1024–1034.

Zhou N, Tootle T.L, Tsui F, Klessig D.F, and Glazebrook J. 1998. PAD4 Functions Upstream from Salicylic Acid to Control Defense Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* 10, 1021–1030.

Zipfel C, and Robatzek,S. 2010. Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity: Veni, Vidi...? *Plant Physiol.* 154, 551–554.

Title: Understanding the involvement of fungal effectors during infection: functional characterization of *Leptosphaeria maculans* effectors, a fungal pathogen of oilseed rape.

Key-words: Pathogenicity, effector, avirulence, molecular plant-microbe interactions, plant targets

During infection, plant pathogens secrete an arsenal of molecules collectively known as effectors that circumvent plant innate immunity and trigger infection. The phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* is the causal agent of stem canker of oilseed rape. More than 650 putative effector-encoding genes have been identified in its genome, 7 of them corresponding to avirulence genes. Fungal effectors mainly correspond to small secreted proteins (SSP) with no known homologs and no predicted functions. Their biological function is therefore difficult to predict, and very little is known about the mode of action of *L. maculans* effectors during infection.

The objective of my thesis was to elucidate the role of *L. maculans* effectors during infection through their functional characterization which included: i) the determination of their subcellular localization in *Nicotiana benthamiana* et *Arabidopsis thaliana*; ii) a search for their plant targets; and iii) the determination of the cellular processes targeted by those effectors through their stable expression in *A. thaliana* and by testing their ability to suppress cell-death in *N. benthamiana*. We investigated four effectors in that study: AvrLm10-1, AvrLm10-2, AvrLm4-7 and AvrLm3.

AvrLm10-1 and *AvrLm10-2* are both necessary to trigger recognition by the *Rlm10* resistance gene. We have identified orthologs for AvrLm10-1 and AvrLm10-2 in Dothideomycetes and Sordariomycetes phytopathogens, and several paralogs in *L. maculans* which are expressed specifically during oilseed rape infection. AvrLm10-1 and AvrLm10-2 both have a nucleo-cytoplasmic localization. AvrLm10-1 and AvrLm10-2 physically interact, and may also interact

with a PR1 (Pathogenesis-related 1) protein and a secreted cysteine-protease.

AvrLm4-7 is recognized by two resistance genes, *Rlm4* and *Rlm7*, and suppresses recognition of AvrLm3 by Rlm3. AvrLm4-7 suppresses cell-death triggered by general inducers, PAMP-Triggered Immunity (PTI) and Effector-Triggered Immunity (ETI). AvrLm4-7 has a nucleo-cytoplasmic localization, whether expressed with or without its signal peptide, suggesting an intracellular mode of action. One of the potential plant targets for AvrLm4-7 is a ribosomal protein, just like a *Blumeria graminis* effector with structural analogy to AvrLm4-7. Transgenic lines of *A. thaliana* constitutively expressing *AvrLm4-7* do not show any morphological phenotypes or any difference in their susceptibility to diverse fungal pathogens.

AvrLm3 is an avirulence gene strongly conserved in *L. maculans* populations. Recognition of *AvrLm3* by *Rlm3* is suppressed by the presence of *AvrLm4-7*. AvrLm3 suppresses cell-death triggered by several inducers of PTI and ETI. AvrLm3 is localized in plant apoplast when expressed with its signal peptide, suggesting an extracellular localization. AvrLm3 potentially interacts with a secreted myrosinase-associated protein implicated in the myrosinase-glucosinolate system, suggesting that AvrLm3 could disturb glucosinolate production, which is a novel mode of action never described for a plant pathogen effector.

My thesis allowed us to improve our knowledge on fungal effector function during infection and to propose new strategies for plant diseases management.

Titre : Comprendre l'implication des effecteurs fongiques dans l'infection d'une plante hôte : caractérisation fonctionnelle d'effecteurs de *Leptosphaeria maculans*, un champignon pathogène du colza.

Mot-clés : Pathogénèse, effecteur, avirulence, interactions moléculaires plante-microorganisme, cibles végétales.

Pendant l'infection, les agents phytopathogènes sécrètent un arsenal de molécules, appelées effecteurs, éléments clés de la pathogénie qui modulent l'immunité innée de la plante et facilitent l'infection. *Leptosphaeria maculans* est le champignon responsable de la nécrose du collet du colza. Plus de 650 gènes codant des effecteurs potentiels ont été identifiés dans son génome, dont 7 ont un rôle reconnu dans l'avirulence du champignon. Les effecteurs fongiques correspondent principalement à de petites protéines potentiellement sécrétées (PPS), n'ayant pas d'homologues dans les bases de données et pas de motifs connus. Par conséquent, leur fonction biologique est difficile à prédire, et très peu de choses sont connues sur le mode d'action des effecteurs de *L. maculans* au cours de l'infection.

L'objectif de ma thèse était de caractériser fonctionnellement des effecteurs de *L. maculans* afin de mieux comprendre leur rôle au cours du processus infectieux. Cette caractérisation fonctionnelle a consisté en : i) la détermination de la localisation subcellulaire de ces effecteurs dans *Nicotiana benthamiana* et *Arabidopsis thaliana* ; ii) la recherche de cibles végétales ciblées par ces effecteurs ; et iii) la détermination des processus cellulaires impactés par ces effecteurs par expression stable dans *A. thaliana* et tests de suppression de mort cellulaire dans *N. benthamiana*. Quatre effecteurs ont été choisis pour cette étude : AvrLm10-1, AvrLm10-2, AvrLm4-7 et AvrLm3.

AvrLm10-1 et *AvrLm10-2* sont tous les deux nécessaires pour induire une reconnaissance par le gène de résistance *Rlm10*. Des orthologues d'*AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* ont été identifiés chez des Dothidiomycètes et des Sordariomycètes phytopathogènes ainsi que plusieurs paralogues exprimés spécifiquement pendant l'infection chez *L. maculans*. *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* présentent toutes les deux une localisation nucléo-cytoplasmique. Une interaction physique entre *AvrLm10-1* et *AvrLm10-2* a été mise en évidence, ainsi qu'une interaction potentielle de ces deux protéines avec une protéine PR1 (Pathogenesis-related 1) et une cystéine-protéase végétale.

AvrLm4-7 est reconnu par deux gènes de résistance, *Rlm4* et *Rlm7*, et sa présence empêche la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3*. *AvrLm4-7* est capable de supprimer la mort cellulaire provoquée aussi bien par des inducteurs généraux de la mort cellulaire que par des inducteurs de la PAMP-Triggered Immunity (PTI) et de l'Effector-Triggered Immunity (ETI). *AvrLm4-7* présente une localisation nucléo-cytoplasmique, qu'il soit exprimé avec ou sans son peptide signal, ce qui suggère un mode d'action intracellulaire. *AvrLm4-7* interagit potentiellement avec une protéine ribosomale végétale, de la même manière qu'un effecteur de *Blumeria graminis* avec lequel il partage des analogies structurales. Cependant, des lignées d'*A. thaliana* exprimant *AvrLm4-7* de façon constitutive ne présentent aucune différence morphologique ou de sensibilité aux maladies comparativement à l'écotype sauvage Col0.

AvrLm3 est un gène d'avirulence très conservé dans les populations de *L. maculans* dont la reconnaissance par le gène de résistance *Rlm3* est supprimée en présence d'*AvrLm4-7*. *AvrLm3* est capable de supprimer la mort cellulaire associée à la PTI et à l'ETI. Cet effecteur est localisé dans l'apoplasme des cellules foliaires lorsqu'il est exprimé avec son peptide-signal, suggérant un mode d'action extracellulaire. *AvrLm3* interagit potentiellement avec une myrosinase-associated protéine sécrétée impliquée dans le système myrosinase-glucosinolate, suggérant qu'*AvrLm3* perturberait la synthèse des glucosinolates, ce qui est un mode d'action inédit pour un effecteur d'agent phytopathogène.

Cette thèse a permis de mieux comprendre le mode d'action des effecteurs de *L. maculans* et de proposer de nouvelles stratégies de contrôle des maladies fongiques.

