



HAL
open science

Identification et analyse fonctionnelle des effecteurs tardifs impliqués dans la colonisation systémique du colza par *Leptosphaeria maculans*

Julie Gervais

► **To cite this version:**

Julie Gervais. Identification et analyse fonctionnelle des effecteurs tardifs impliqués dans la colonisation systémique du colza par *Leptosphaeria maculans*. Phytopathologie et phytopharmacie. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS346 . tel-01900126

HAL Id: tel-01900126

<https://theses.hal.science/tel-01900126v1>

Submitted on 21 Oct 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 : 2017SACLS346

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

ÉCOLE DOCTORALE N° 567
Sciences du Végétal : du Gène à l'Ecosystème

Biologie

Par

Julie GERVAIS

Identification et analyse fonctionnelle des effecteurs tardifs impliqués
dans la colonisation systémique du colza par *Leptosphaeria maculans*

Thèse présentée et soutenue à « INRA BIOGER », le « 20 octobre 2017 » :

Composition du Jury :

Mme, VENAULT-FOURREY, Claire	INRA IAM	Rapporteuse
M., ROUX, Christophe	CNRS LRSV	Rapporteur
Mme, DELOURME, Régine	INRA IGEPP	Examinatrice
M., RATET, Pascal	CNRS IPS2	Président du jury
M., PINOCHET, Xavier	Terres Inovia	Examinateur
M., ROUXEL, Thierry	INRA BIOGER	Directeur de thèse
Mme, BALESSENT, Marie-Hélène	INRA BIOGER	Co-directrice de thèse



Remerciements

(ou la partie la plus lue du manuscrit de thèse)

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

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux formidables directeurs de thèse: **Mylène Balesdent** et **Thierry Rouxel**. Je leur suis reconnaissante pour leur accueil, leur qualités pédagogiques et scientifiques, leur disponibilité pendant toute la durée de cette thèse (même pendant les vacances!). Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir fait confiance. J'ai beaucoup appris à vos côtés. En grand grand merci!

Je tiens également à remercier l'INRA et Terres Inovia pour avoir financé mon projet de thèse. En espérant avoir répondu à toutes leurs attentes.

Merci à **Claire Veneault-Fourrey** et à **Christophe Roux** pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit de thèse. Je remercie également **Pascal Ratet** et **Xavier Pinochet** de leur participation à mon jury de thèse. Merci à **Régine Delourme** pour à la fois sa participation à mon jury de thèse, à mes comités de thèse et son aide très précieuse lors de mes criblages de variétés.

Je remercie également **Sébastien Duplessis** et **Martine Leflon** d'avoir participé à mes comités de thèse et pour leurs conseils avisés.

Je remercie tous les membres (présents et passés) de l'équipe Lepto pour leur accueil et leur disponibilité. Merci à **Isabelle** pour tous ses conseils, son aide et encouragements tout au long de cette thèse. **Bénédicte** pour ta précieuse et indispensable aide technique, pour nos discussions pas vraiment scientifiques, les quelques très nombreuses séances footing et tes efforts de "repas rencontre". **Claireline**, pour bien rigoler entre les manips et nos groupes "créatifs". Merci à **Yohann**, Ô grand manitou du groupe fromage, avec qui on a partagé les difficultés et joies de la thèse. Je remercie également tous les autres membres de l'équipe pour tous leur conseils et précieuses aides pendant ces trois et demi: **Jessica** (et encore désolée d'avoir tué malencontreusement ton cher bonsaï), **Michel** (qui a su me faire une place dans son bureau et à la paillasse), **Françoise**, **Juliette**, **Bertrand** et **Laurent**. Merci également à **Colin** et à **Elise** et bon courage pour la fin de votre thèse!

Merci à tous les collègues de BIOGER que j'ai rencontrés lors de ces trois années et demi et avec qui j'ai passé de très bon moments au labo, en congrès, à la cafétéria, aux meetings G.R.O.S (Groupement de Recherche sur l'Obésité chez les Scientifiques, vulgairement appelé repas fromage): **Cindy**,

Stéphanie, Anaïs, Orianne, Camille, Pascal, Ivan, Philippe, Annie, Bruno, Jean-Félix, Clémentine, Delphine, Guillaume et tous ceux que j'oublie.

Merci **Tiffany** pour avoir été là pour les baisses de morale et les coups de pompe.

Mon plus grand merci à mes parents qui n'ont jamais vraiment compris sur quoi je travaillais mais qui m'ont toujours soutenue et fortement encouragée malgré tout. Merci également à ma sœur, **Estelle** qui était là même de loin.

Sommaire

Introduction bibliographique	13
1. Les interactions plantes-microorganismes.....	15
1.1. Diversité des interactions plantes - microorganismes	15
1.2. Les épidémies causées par les agents phytopathogènes.....	15
1.3. Le contrôle des agents phytopathogènes filamenteux.....	16
2. Des agents pathogènes au mode de vie complexe	19
2.1. Les différents modes de vie des agents pathogènes.....	19
2.2. Des cycles infectieux complexes	19
3. L'immunité basale des plantes: la PTI	21
4. Les effecteurs	23
4.1. Définition des effecteurs	23
4.2. Mode d'action des effecteurs.....	27
4.1. Les vagues d'expression d'effecteurs.....	31
4.2. Le concept de génome à deux vitesses	35
5. La résistance spécifique.....	39
5.1. Le modèle gène-pour-gène	39
5.2. Les protéines de résistance	41
6. Evolution des interactions plantes-micro-organismes: le modèle zig-zag.....	43
7. Le pathosystème colza- <i>Leptosphaeria maculans</i>	47
7.1. Le colza (<i>Brassica napus</i>).....	47
7.2. <i>Leptosphaeria maculans</i>	51
7.3. Le cycle infectieux de <i>L. maculans</i> chez le colza	55
7.4. La résistance génétique du colza à <i>Leptosphaeria maculans</i>	59
8. Projet de thèse	69
Chapitre I:.....	73
Caractérisation du transcriptome tardif de <i>Leptosphaeria maculans</i>.....	73
1. Introduction.....	74
2. Article	76
3. Résultats complémentaires.....	95

Chapitre II:	99
Caractérisation des effecteurs tardifs de <i>Leptosphaeria maculans</i>	99
1. Introduction.....	100
2. Article	101
3. Résultats complémentaires.....	143
3.1. Un effecteur tardif candidat supplémentaire: LmSTEE11.....	143
3.2. Localisation subcellulaire des effecteurs LmSTEE	145
 Chapitre III:	 147
Identification de nouvelles sources de résistances spécifiques aux effecteurs tardifs de <i>Leptosphaeria maculans</i>, une nouvelle approche	147
1. Introduction.....	148
2. Article	149
 Discussion et perspectives	 183
1. Les vagues d'effecteurs de <i>L. maculans</i>	187
2. Les effecteurs tardifs de <i>L. maculans</i>	192
3. Les vagues d'expression géniques chez le colza.....	197
4. Le développement d'une nouvelle approche de criblage	199
5. Comment utiliser la résistance <i>RlmSTEE98</i> identifiée chez Yudal?.....	201
 Annexes	 205
Annexe 1 : Test cotylédonnaire sur colza en conditions contrôlées.....	206
Annexe 2 : Le projet de transcriptomique Leptolife	207
Annexe 3: Bilan d'activités	208
 Références bibliographiques	 213

Liste des figures

Introduction bibliographique

Figure 1: Exemples de symptômes causés par différents champignons pathogènes

Figure 2: Différents modes de colonisation de plantes par des champignons aux différents modes de vie

Figure 3: Exemples de modes d'action d'effecteurs fongiques

Figure 4: Représentation schématique des modes d'action des effecteurs

Figure 5: Vagues d'expression d'effecteurs candidats au cours de l'infection du blé par *Puccinia striiformis f. sp. tritici*

Figure 6: Vagues d'expression des effecteurs lors de l'infection d'*Arabidopsis thaliana* par *Colletotrichum higginsianum*.

Figure 7: Structure en isochores du génome de *Leptosphaeria maculans*

Figure 8: Localisation génomique des effecteurs

Figure 9: Schéma du modèle de Flor (1971)

Figure 10: Diversité des protéines de résistance

Figure 11: Modèle zig-zag : Coévolution entre plante et agent pathogène

Figure 12: Le triangle de U (1935)

Figure 13: Cycle simplifié de développement du colza d'hiver

Figure 14: Relations phylogénétiques chez les Dothidéomycètes

Figure 15: Symptômes causés par *Leptosphaeria maculans* sur colza

Figure 16: Cycle de vie de *Leptosphaeria maculans*

Figure 17: Représentation schématique du chemin d'infection de *Leptosphaeria maculans* dans le colza.

Figure 18: Echelle de notation utilisée pour évaluer la résistance au champ du colza à la nécrose du collet (note G2)

Chapitre I: Caractérisation du transcriptome tardif de *Leptosphaeria maculans*

Article

Figure 1: Samples used for the pilot RNA-seq project.

Figure 2: Heat map of *Leptosphaeria maculans* genes differentially expressed between early and late colonisation stages in the pilot RNA-seq project.

Figure 3: Heat map of *Leptosphaeria maculans* genes differentially expressed (p-value<0.05) *in vitro* (Myc) and during early (Cotyledon) and late (Stem) colonisation in the second (validation) RNA-seq experiment.

Figure 4: Comparison of expression values of « early » and « late » genes identified in the pilot RNA-seq (RNA-seq n°1) and in the validation RNA-seq project (RNA-seq n°2).

Figure 5: Gene ontology (GO) enrichment analysis of the *Leptosphaeria maculans* genes over-expressed in early (cotyledon) (A and C) and late (stem) colonisation (B and D) stages compared to the whole genome.

Figure 6: Validation of the RNA-seq experiment by qRT-PCR for 15 genes including 11 late effector candidates.

Figure S1: Comparison of *Leptosphaeria maculans* genes identified as over-expressed during cotyledon colonisation in different studies

Résultats complémentaires

Figure 1: Profil d'expression des gènes de *L. maculans* lors de la colonisation de la tige de colza 'Darmor-bzh' au champ

Figure 2: Profil d'expression des gènes de *L. maculans* lors de la colonisation de la tige de colza 'Bristol' au champ

Chapitre II: Caractérisation des effecteurs tardifs de *Leptosphaeria maculans*

Article

Figure 1: Silencing of the *LmSTEE1* gene induces smaller stem necrosis in oilseed rape

Figure 2: Growth of *LmSTEE1* silenced mutants along leaf petiole of oilseed rape

Figure 3: Suppression of BAX-induced cell death in *Nicotiana benthamiana* by LmSTEE effectors

Figure 4: Expression profile in RNA-seq of *LmSTEE* genes during stem colonization in field

Figure S1: Growth and pathogenicity phenotypes of *L. maculans* silenced mutants for late effector genes

Résultats complémentaires

Figure 1: Localisation cellulaire des effecteurs LmSTEE

Chapitre III: Identification de nouvelles sources de résistances spécifiques aux effecteurs tardifs de *Leptosphaeria maculans*, une nouvelle approche

Article

Figure 1: Expression value of of *LmSTEE* genes in over-expressing in cotyledons (OEC) mutants during cotyledon colonization

Figure 2: Hypersensitive response of the oilseed rape cultivars Yudal and Dariot towards the *LmSTEE98* and *LmSTEE1* gene, respectively.

Figure 3: Genetic mapping of the resistance gene *RlmSTEE98* of Yudal

Discussion et perspectives

Figure 1: Modèle simplifié des vagues d'expression d'effecteurs lors de la colonisation de la tige de colza par *Leptosphaeria maculans*

Figure 2: Représentation des profils d'expression des gènes différentiellement exprimés et les fonctions associées au cours de la cinétique d'infection des cotylédons par *L. maculans*

Figure 3: Vitesse de contournement de *Rlm1* en France

Liste des tableaux

Introduction bibliographique

Tableau 1: Pertes mondiales liées à des agents pathogènes filamenteux de cinq grandes cultures

Tableau 2: Les 10 premiers pays producteurs de colza en 2013

Tableau 3: Gènes d'avirulence clonés chez *Leptosphaeria maculans*

Tableau 4: Gènes de résistance de *Brassica napus* à *Leptosphaeria maculans*

Tableau 5: Récapitulatif des analyses QTL pour la résistance quantitative du colza à la nécrose du collet

Tableau 6: Niveau d'expression de trois gènes d'avirulence de *Leptosphaeria maculans*

Chapitre I: Caractérisation du transcriptome tardif de *Leptosphaeria maculans*

Article

Table 1: Mapping characteristics of RNA-seq reads to the reference genomes of *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans* in the pilot RNA-seq project.

Table 2: Mapping characteristics of RNA-seq reads to the reference genomes of *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans* in the validation RNA-seq experiment.

Table 3: Genomic location of *Leptosphaeria maculans* genes over-expressed at early (cotyledon infection) or late (stem infection) colonisation stages

Table 4: Percentage of *Leptosphaeria maculans* effector candidates up-regulated or down-regulated *in vitro* in a silenced-*LmHP1* or silenced-*LmDIM5* background, according to their genomic location.

Table S1: List of *Leptosphaeria maculans* genes showing more than 10 reads mapped in non-infected controls and excluded from subsequent analyses in the RNA-seq pilot project.

Table S2: 50 most expressed genes in early and late colonisation stages, identified in the validation RNA-seq project.

Table S3: Primers used for validation of RNA-seq data by qRT-PCR.

Chapitre II: Caractérisation des effecteurs tardifs de *Leptosphaeria maculans*

Article

Table 1: Characteristics of the late effector candidates studied here

Table 2: PCR amplification and HRM analysis of *LmSTEE* genes in *Leptosphaeria maculans* isolates

Table 3: Effector characteristics of the *LmSTEE* genes/protein products studied here

Table S1: List of primers used in this study

Table S2: Isolates used for polymorphism studies in *Leptosphaeria maculans* populations

Table S3: Differential expression of *LmSTEE1* in RNA-seq during stem colonization in field

Table S4: Differential expression of *LmSTEE30* in RNA-seq during stem colonization in field

Table S5: Differential expression of *LmSTEE35* in RNA-seq during stem colonization in field

Table S6: Differential expression of *LmSTEE98* in RNA-seq during stem colonization in field

Table S7: Differential expression of *LmSTEE78* in RNA-seq during stem colonization in field

Résultats complémentaires

Tableau 1: Caractéristiques de *LmSTEE11*

Chapitre III: Identification de nouvelles sources de résistances spécifiques aux effecteurs tardifs de *Leptosphaeria maculans*, une nouvelle approche

Article

Table 1: Cultivars with significantly different behaviours toward *LmSTEE* mutants compared to the wild type isolate

Table 2: co-segregation of resistance to *LmSTEE98* and two molecular markers in the Darmor-*bzh* x Yudal doubled haploid population

Table S1: List of *Brassica napus* genotypes screened for resistance

Table S2: Predicted genes of Darmor-*bzh* present in the region of *RlmSTEE98*

Table S3: List of primers used in this study

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
Avr	Avirulence
CC	Coiled-Coil
cM	centiMorgan
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
ET	Elément Transposable
ETS	Effector-Triggered Susceptibility
ETI	Effector-Triggered Immunity
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HRM	High Resolution Melting
jpi	jours post-inoculation
kb	Kilo base
LRR	Leucine Rich Repeat
NPS	Nucleotide Binding Site
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRR	Pattern Recognition Receptor
PPS	Petite Protéine Secrété
PTI	PAMP-Triggered Immunity
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
QTL	Quantitative Trait Locus
R	Résistance
RIP	Repeat Induced Point Mutation
RH	Réponse Hypersensible
RLK	Receptor-Like Kinase
RLP	Receptor Like-Protein
RNA-seq	RNA sequencing
ROS	Reactive Oxygene Species
RT	Reverse Transcriptase
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
"Silencing"	Extinction de l'expression des gènes

Introduction

bibliographique

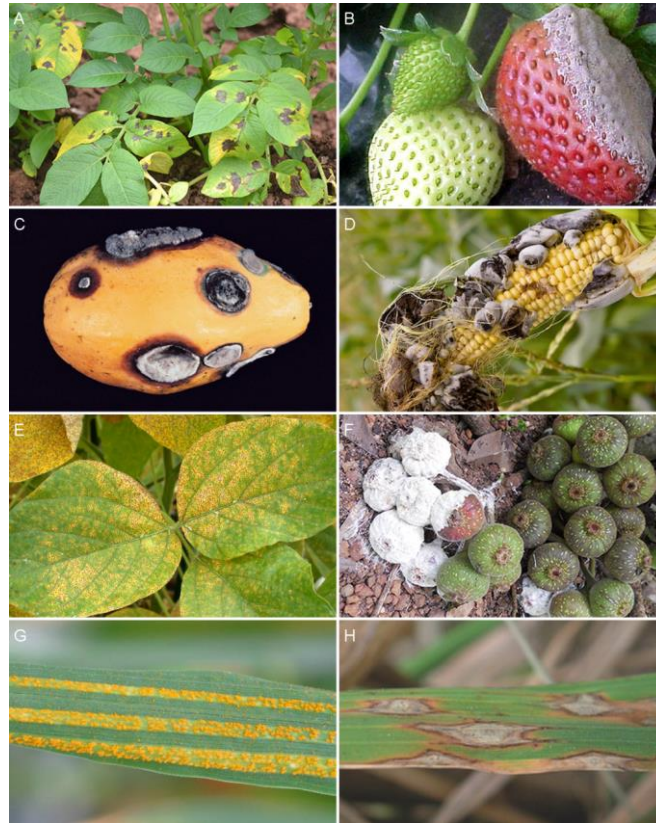


Figure 1: Exemples de symptômes causés par différents champignons pathogènes

(A) *Alternaria solani* sur pomme de terre (source APS); (B) *Botrytis cinerea* sur fraise (source APS); (C) *Stemphylium lycopersici* sur papaye (source APS); (D) *Ustilago maydis* sur maïs (source L. Berman); (E) *Phakospora pachyrhizi* sur soja (source APS); (F) *Sclerotium rolfsii* sur figue (source APS); (G) *Puccinia striiformis* sur blé (source F. Suffert); (H) *Magnaporthe oryzae* sur riz (source doi:10.1038/nrmicro2032).

Tableau 1: Pertes mondiales liées à des agents pathogènes filamenteux de cinq grandes cultures

Plante	Récolte 2009/2010 (Million de tonnes)	Maladie Agent pathogène	% de pertes
Riz (<i>Oryza sativa</i>)	701	Pyriculariose <i>Magnaporthe oryzae</i>	10-35%
Blé (<i>Triticum aestivum</i>)	679	Rouille noire <i>Puccinia graminis</i>	10-70%
Maïs (<i>Zea mays</i>)	820	Charbon du maïs <i>Ustilago maydis</i>	2-20%
Pomme de terre (<i>Solanum tuberosum</i>)	333	Mildiou de la pomme de terre <i>Phytophthora infestans</i>	5-78%
Soja (<i>Glycine max</i>)	232	Rouille du soja <i>Phakospora pachyrhizi</i>	10-80%

Adapté de (Fisher *et al.*, 2012).

1. Les interactions plantes-microorganismes

1.1. Diversité des interactions plantes - microorganismes

Au cours de son existence, une plante se trouve en contact avec un très grand nombre de microorganismes, tels que des champignons, des oomycètes, des nématodes, des virus, des bactéries. Cependant seule une très faible minorité de ces organismes va avoir un impact négatif sur la plante et engendrer des maladies. Les interactions entre plantes et microorganismes peuvent être bénéfiques, néfastes ou neutres pour la plante hôte. Les organismes dits saprophytes sont les organismes qui se développent sur la matière organique morte. Ils participent notamment à l'équilibre biologique du sol où ils transforment la matière organique en matière minérale, renouvelant ainsi l'humus. La grande majorité des champignons sont des saprophytes. Chez les organismes symbiotiques, l'interaction apporte des bénéfices aux deux organismes, avec par exemple un échange de nutriments. A l'inverse, chez les organismes phytopathogènes, les bénéfices apportés au microorganisme se font au détriment de la plante hôte. Les agents phytopathogènes ne représentent qu'un nombre très restreint de l'ensemble des microorganismes mais ils peuvent avoir des conséquences très importantes sur les cultures (Figure 1). La grande majorité des maladies des plantes sont causées par les organismes filamenteux, champignons et oomycètes. La suite de ce manuscrit sera donc centrée essentiellement sur ces organismes.

1.2. Les épidémies causées par les agents phytopathogènes

L'intensification des cultures a permis une augmentation des rendements mais également une fragilisation vis-à-vis des épidémies. L'estimation des pertes liées aux agents pathogènes reste difficile à réaliser mais Fisher *et al.* (2012) ont calculé que les épidémies en 2011 sur le riz, le blé, le maïs, la pomme de terre et le soja ont engendré des pertes pouvant aller jusqu'à 80% (Tableau 1). Les récoltes ainsi perdues auraient pu nourrir l'équivalent d'un million de personnes (Fisher *et al.* 2012). Les plantes infectées par des agents phytopathogènes peuvent également nuire à la santé humaine et animale, en cas de contamination par des mycotoxines. On peut citer par exemple l'ergotisme, aussi appelé mal des ardents, qui est une maladie résultant de l'intoxication par l'ingestion d'alcaloïdes produits par l'ergot du seigle (*Claviceps purpurea*) et qui peut engendrer convulsions, hallucinations ou gangrènes (Battin, 2010).

Il existe de nombreux exemples d'épidémies ayant eu des conséquences importantes sur les cultures ou ayant engendré des famines. Le plus connu est celui de *Phytophthora infestans*, agent pathogène

de la pomme de terre. Il est responsable de la Grande Famine en Irlande qui est à l'origine de plus de 600 000 morts entre 1845 et 1849 et de l'émigration de 1 300 000 personnes vers les Etats-Unis (Zadoks, 2008).

Il n'y a pas que les cultures vivrières qui sont impactées par les microorganismes phytopathogènes. Ainsi deux pandémies de graphiose de l'orme causée par le champignon ascomycète *Ophiostoma ulmi* et *O. novo-ulmi* se sont produites les années 1900 et 1970. Elles ont engendré dans le nord de l'Europe, aux Etats-Unis et au Canada une disparition massive de l'orme, avec plus de 30 millions d'ormes morts en Grande-Bretagne seulement (Brasier and Kirk, 2010).

1.3. Le contrôle des agents phytopathogènes filamenteux

1.3.1. L'utilisation de pesticides

Pour réduire l'impact des maladies des plantes causées par des agents phytopathogènes, plusieurs types d'approches sont employés. Le premier correspond à l'utilisation de pesticides/fongicides. Cependant, l'utilisation de ces produits reste couteuse et dommageable pour l'environnement et la santé publique. La culture de la vigne en France a, par exemple, nécessité 10 traitements par hectare en moyenne en 2010 (agriculture.gouv.fr).

De plus cette approche n'est pas efficace contre tous les agents pathogènes. Par exemple dans le cas du phoma du colza causé par *L. maculans*, les fongicides sont difficilement utilisables. Les ascospores étant continuellement produites à partir des résidus de cultures infectés, les fongicides peuvent aider à réduire très temporairement l'inoculum primaire en agissant pendant deux semaines sur les nouvelles contaminations par ascospores, mais ils ne sont plus efficaces pour agir contre le champignon une fois que celui-ci se trouve à l'intérieur de la plante hôte. Cela implique donc de devoir synchroniser les traitements antifongiques avec les pic d'émission d'ascospores (West *et al.*, 2001; West *et al.*, 2002). Plusieurs traitements peuvent être nécessaires en cas de forte pression de maladie et ce n'est pas forcément rentable par rapport au gain de production.

1.3.2. Les pratiques culturales

Certaines pratiques culturales sont connues pour limiter les maladies. Ainsi la tavelure du pommier induite par le champignon *Venturia inaequalis* peut être limitée par le ramassage des feuilles, limitant ainsi la production d'ascospores. La rotation des cultures permet aussi de limiter les maladies et éviter

par ailleurs un contournement trop rapide des résistances par les agents pathogènes. Cependant les pratiques culturales peuvent avoir des effets contradictoires selon les contraintes environnementales ou les agents pathogènes. Par exemple dans la culture du colza, l'enfouissement des résidus de cultures après récolte permet de limiter l'inoculum primaire de *L. maculans* et donc l'intensité des épidémies (West *et al.*, 2001). Par contre un labour trop profond du sol a un effet néfaste sur les populations de parasitoïdes des méligèthes qui provoquent des dégâts sur les boutons floraux des colzas (Rusch, 2010).

1.3.3. La lutte génétique

Dans un contexte actuel de limitation de l'usage de produits pesticides, l'alternative la plus développée à ce jour est la lutte génétique qui exploite la présence dans la plante cultivée de gènes contrôlant les mécanismes de défense naturelle de celle-ci contre le développement des agents pathogènes. Cette méthode est néanmoins limitée par le développement d'agents pathogènes pouvant outrepasser ces défenses. Les études visant à améliorer la compréhension de ces mécanismes de défense ont permis de rassembler de nombreuses données sur les interactions entre plantes et agents pathogènes. L'introduction que je propose ici a pour but d'aborder ces interactions, la compréhension du cycle de vie des agents pathogènes, de leur potentiel évolutif ainsi que les mécanismes sous-jacents à cette lutte génétique.

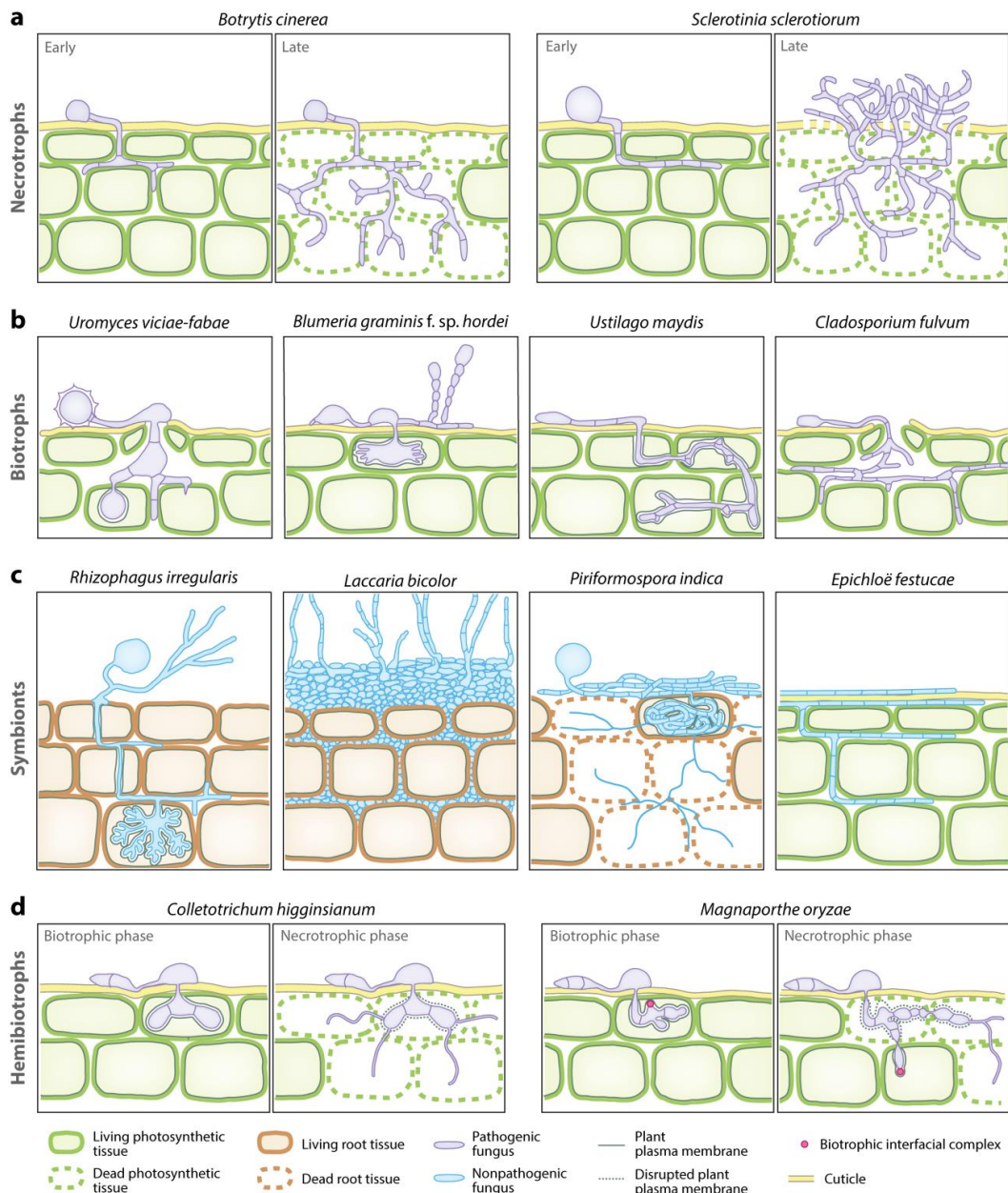


Figure 2: Différents modes de colonisation de plantes par des champignons aux différents modes de vie

(a) *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum* sont des nécrotrophes qui induisent la mort cellulaire des cellules épidermiques de la plante. Les stades d'infection précoces et tardifs sont ici représentés. (b) Les agents pathogènes biotrophes tels que *Uromyces viciae-fabae* et *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* forment une structure invaginante appelée haustorium qui permet aux champignons d'établir des échanges étroits avec la cellule végétale. Le champignon *Ustilago maydis* développe d'abord des hyphes qui traversent les cellules hôtes sans pour autant induire une mort cellulaire. En fin d'infection, le champignon induit la formation de larges tumeurs chez la plante. L'agent pathogène de la tomate, *Cladosporium fulvum* colonise l'espace intercellulaire des feuilles. En fin d'infection, le champignon produit des conidiophores qui bloquent les stomates et induisent de la chlorose ou de la mort cellulaire. (c) Le symbionte *Rhizophagus irregularis* colonise les cellules corticales des racines via des structures appelées arbuscules. Le champignon ectomycorhizien *Laccaria bicolor* se développe dans les racines de façon intercellulaire. Les endophytes peuvent coloniser les racines (*Piriformospora indica*) ou les organes aériens (*Epichloë festucae*). (d) Les champignons hémibiotrophes tels que *Colletotrichum spp* et *Magnaporthe oryzae* développent d'abord des hyphes biotrophes invaginants et par la suite des hyphes nécrotrophes. D'après Lo Presti *et al.*, (2015).

2. Des agents pathogènes au mode de vie complexe

2.1. Les différents modes de vie des agents pathogènes

Les agents pathogènes sont classés en trois catégories selon leur stratégie d'infection. Les organismes biotrophes maintiennent les cellules végétales en vie pour se fournir en nutriments et ainsi se développer et se reproduire. Les organismes nécrotrophes induisent activement la mort des cellules végétales pour en prélever les nutriments. Enfin les organismes hémibiotrophes sont les organismes qui alternent entre ces deux modes de vie. Les barrières entre ces trois catégories restent cependant floues et les classifications encore sujettes à débat. Par exemple, *P. infestans* a, selon les auteurs, été classé dans l'une ou l'autre des trois catégories (Oliver and Ipcho, 2004).

2.2. Des cycles infectieux complexes

Les organismes filamenteux pathogènes ou symbiotiques peuvent avoir des cycles infectieux complexes et très diversifiés. Certaines espèces peuvent différencier des structures spécialisées pour coloniser leur hôte, après leur germination sur la plante et développement du tube germinatif (Figure 2). Ainsi des champignons comme *Colletotrichum spp.*, *Magnaporthe spp.*, différencient une structure mélanisée appelée appressorium qui va exercer une pression de turgescence pour pouvoir pénétrer directement dans les cellules épidermiques de la plante hôte (Lo Presti *et al.*, 2015). D'autres espèces, comme *L. maculans* ou *Zymoseptoria tritici*, ne différencient pas de structures particulières et envahissent la plante via les ouvertures naturelles telles que les stomates ou par les blessures.

Une fois dans la plante, différentes structures peuvent être observées. Les organismes biotrophes comme *Blumeria graminis* ou *Uromyces viciae-fabae*, et les symbiontes tels que les glomeromycètes développent des structures invaginantes, appelées respectivement haustoria ou arbuscules, pour interagir avec les cellules de l'hôte (Lo Presti *et al.*, 2015; Young, 2015). Les hémibiotrophes *Colletotrichum spp.* et *Magnaporthe spp.* développent d'abord des hyphes primaires biotrophes qui invaginent les cellules vivantes de l'hôte, puis, peu après (48 à 72h après inoculation), les champignons forment des hyphes secondaires nécrotrophes, tuant les cellules pour obtenir leur nutriments (Berruyer *et al.*, 2006; Münch *et al.*, 2008). Enfin, d'autres champignons comme *Cladosporium fulvum* ou *L. maculans* ont un mode de vie strictement apoplastique, ne pénétrant jamais les cellules de l'hôte et ne différencient aucune structure d'infection spécialisée (Hammond *et al.*, 1985; de Wit *et al.*, 2012).

La complexité des cycles de vie des agents pathogènes se retrouve également dans la multiplication des différents hôtes et tissus infectés pour un même agent pathogène. Ce niveau de complexité est très bien illustré par les rouilles qui peuvent différencier jusqu'à cinq types différents de spores et qui peuvent aussi nécessiter deux espèces de plantes hôtes non apparentées pour compléter leur cycle de vie. Par exemple, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* réalise une partie de son cycle infectieux sur des herbacées, comme le blé, où il réalise sa multiplication asexuée. Sa multiplication sexuée a lieu sur une autre plante, *Berberis spp.* (Webb and Fellers, 2006). Un autre exemple bien documenté est celui de *Melampsora larici-populina*, une rouille qui réalise son cycle asexué sur *Populus spp.* et son cycle sexué sur le mélèze, *Larix spp.* (Duplessis et al., 2011).

3. L'immunité basale des plantes: la PTI

Face aux attaques biotiques, les plantes ont développé différents mécanismes de défense. Lors du processus d'infection de la plante, les agents pathogènes sont confrontés à des barrières physiques: la cuticule foliaire, les cires, les trichomes ou la paroi des cellules végétales, et des barrières chimiques qui correspondent à des composés inhibiteurs préformés tels que des métabolites secondaires aux propriétés antimicrobiennes. Les agents pathogènes qui sont capables de contourner ces premières barrières sont soumis à deux types de défenses actives de la plante, l'immunité basale et la résistance spécifique.

L'immunité basale des plantes contre les microorganismes consiste en la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux microorganismes, appelés MAMPs/PAMPs (Micro-organisms/Pathogens Associated Molecular Patterns). Ces molécules sont très largement conservées chez les différents microorganismes, comme la flagelline chez les bactéries, la chitine pour les champignons, les glucanes pour les champignons et les oomycètes. La plante est également capable de détecter des molécules, appelées DAMPs (Damage-associated Molecular Patterns), provenant de sa propre dégradation (Bigeard *et al.*, 2015). Ces DAMPs peuvent être des monomères de cutine, provenant de la dégradation de cuticule, ou des fragments de dégradation des parois.

La détection de MAMPs et des DAMPs induit une immunité basale appelée PTI (PAMPs Triggered Immunity). Cette détection se fait grâce à des récepteurs spécifiques, généralement extracellulaires, appelés PRRs (Pattern Recognition Receptors). Ainsi les PRRs FLS2 et EFR, reconnaissent les PAMPs de flagelline et de facteur d'élongation Tu chez les bactéries, respectivement. Pour les champignons, le PRR CEBiP permet la détection de la chitine (Giraldo and Valent, 2013).

En cas de détection de MAMPs ou DAMPS par des PRR, plusieurs voies de défense sont alors activées avec des réponses très précoces (de l'ordre de la seconde à la minute) telles que des flux d'ions, la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) qui sont toxiques pour l'agent pathogène et agissent comme signal de stress. Des réponses intermédiaires interviennent ensuite (de l'ordre de la minute à l'heure) telles que le changement de l'état de phosphorylation de protéines qui agissent comme signal de stress, la production d'éthylène, la fermeture des stomates ou l'expression de gènes tels que ceux qui codent pour des PRR qui permettent d'accroître la capacité de la plante à détecter l'agent pathogène. Il y a enfin des réponses plus tardives (de quelques heures à plusieurs jours) telles que l'accumulation d'acide salicylique ou des dépôts de callose (Boller and Felix, 2009; Zipfel and Robatzek, 2010).

4. Les effecteurs

4.1. Définition des effecteurs

Pour qu'un microorganisme puisse infecter une plante, et ce quelles que soient les modalités de son processus infectieux, il doit éviter ou supprimer la PTI. Pour cela, l'agent pathogène produit des effecteurs, définis comme des molécules sécrétées par l'agent pathogène pour favoriser le processus infectieux. Les effecteurs ont été décrits chez les bactéries, les oomycètes, les champignons, les insectes, les nématodes. Il peut s'agir de protéines sécrétées qui vont masquer la présence du champignon, supprimer la réponse immunitaire de la plante ou manipuler la physiologie des cellules hôtes au profit du champignon. Les effecteurs peuvent aussi être des petits ARNs, des métabolites secondaires ou des protéines qui vont induire la mort des cellules de la plante hôte dans le cas de champignons nécrotrophes ou hémibiotrophes pendant leur phase de vie nécrotrophe (Lo Presti *et al.*, 2015).

Le rôle des petits ARNs dans la pathogénie a été démontré chez plusieurs pathosystèmes (Wang *et al.*, 2015). Chez *Botrytis cinerea* des petits ARNs interférants, qui sont produits à partir d'éléments répétés, piratent la machinerie de "silencing" d'une plante hôte, la tomate, et ainsi réduisent l'expression des gènes de la plante impliqués dans la défense (Weiberg *et al.*, 2013). Des petits ARNs produits par *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* impliqués dans l'infection du blé ont été aussi identifiés (Mueth *et al.*, 2015).

Les métabolites secondaires peuvent également participer au processus infectieux et donc être considérés comme des effecteurs. Ce sont des molécules à faible poids moléculaires et produites par des enzymes, telles que des polycétides synthases (PKS) et des peptides synthases non-ribosomiques (NRPS). Ainsi le botrydial (sesquiterpène) et l'acide botcinique (polycétide) sont des métabolites secondaires produits pendant l'infection par *B. cinerea* et qui ont un rôle redondant dans le pouvoir pathogène du champignon (Dalmais *et al.*, 2011). Les sidérophores extracellulaires sont aussi des métabolites secondaires impliqués dans le pouvoir pathogène de plusieurs champignons pathogènes, tels que *Cochliobolus heterostrophus*, *F. graminearum*, et *Alternaria brassicicola*. Ils permettent la tolérance aux ROS, un des mécanismes de défense de la plante (Lee *et al.*, 2005; Oide *et al.*, 2006).

Les effecteurs les plus étudiés depuis une dizaine d'années sont des petites protéines sécrétées (PPS). En général, ce sont des protéines de petite taille (inférieure à 300 acides aminés). Il existe cependant des exceptions à ce critère de taille, relativement rares toutefois. Par exemple l'effecteur Crinkler CRN8 identifié chez *Phytophthora infestans* et qui induit la mort cellulaire a une taille de 599 acides aminés (Schornack *et al.*, 2010).

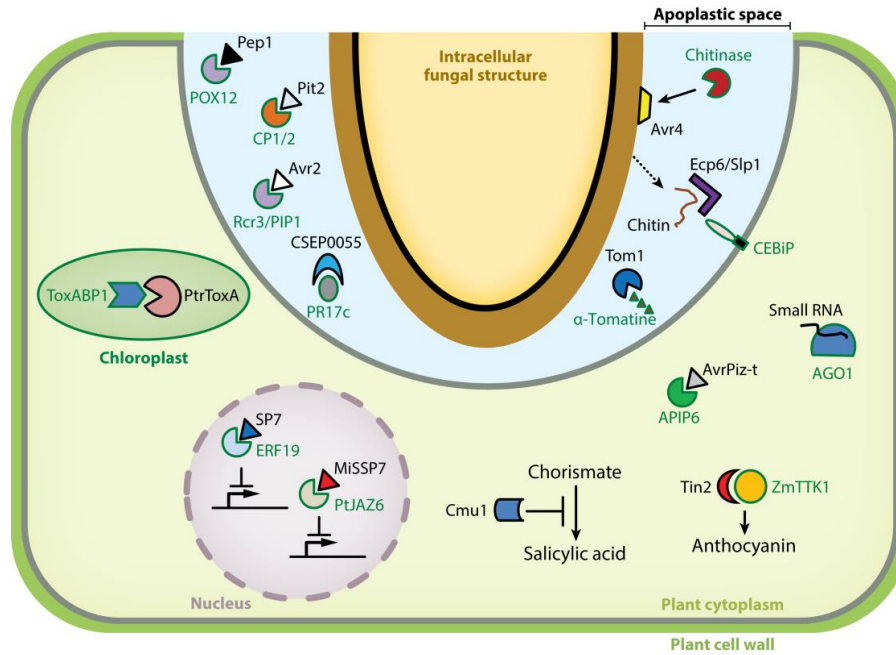


Figure 3: Exemples de modes d'action d'effecteurs fongiques

Une structure fongique (un hyphes biotrophe, une partie d'un haustorium ou d'un arbuscule) qui sécrète des effecteurs est représentée en jaune. La membrane plasmique et la paroi de la plante sont représentées respectivement en gris et en vert. La membrane plasmique et la paroi du champignon sont représentées respectivement en noir et en marron. L'espace apoplastique a été artificiellement agrandi. Les effecteurs fongiques entourés de noir, interviennent dans l'espace apoplastique, dans le cytoplasme de la plante ou dans des organites tels que noyau ou chloroplastes. Les protéines cibles de la plante sont entourées en vert (D'après Lo Presti *et al.*, 2015).

La séquence des PPS est souvent riche en cystéines. Leur structure tridimensionnelle serait ainsi stabilisée et compactée par des ponts disulfures ce qui faciliterait la préservation de la protéine effectrice, en particulier dans l'apoplaste, en la rendant par exemple plus résistante aux protéases de la plante hôte (Stergiopoulos *et al.*, 2013). Là encore il existe des exceptions. Par exemple la protéine d'avirulence AvrLm1 de *L. maculans* n'a qu'une seule cystéine dans sa séquence (Gout *et al.*, 2006).

Les gènes candidats codant potentiellement pour des effecteurs sont également choisis sur la base de leur profil d'expression. Les gènes uniquement induits *in planta* sont ainsi considérés comme des gènes pouvant potentiellement participer au processus infectieux. Ainsi, la comparaison du transcriptome de plusieurs agents pathogènes entre les conditions *in vitro* et *in planta* montre un fort enrichissement en gènes codant pour des PPS en condition d'infection (Duplessis *et al.*, 2011; Gan *et al.*, 2013; O'Connell *et al.*, 2012).

Un autre critère souvent utilisé pour définir des protéines effectrices est l'absence d'orthologue de la protéine chez d'autres espèces ou genres, en particulier chez les champignons ascomycètes. Cependant certains effecteurs font partie de grandes familles multigéniques et sont conservés ou ont des domaines conservés parmi les champignons. Par exemple, les effecteurs présentant un domaine LysM, d'abord identifié dans l'effecteur Ecp6 de *C. fulvum* (Figure 3), sont largement conservés chez les champignons. Ils sont retrouvés chez les agents pathogènes des plantes et mammifères comme chez des saprophytes. De tels effecteurs seraient, au moins pour certains d'entre eux, impliqués dans la séquestration des oligosaccharides de chitine pour empêcher le déclenchement des défenses de la plante par ces derniers (de Jonge and Thomma, 2009). De même l'effecteur Cmu1 d'abord identifié chez *U. maydis* (Figure 3) a été retrouvé chez bien d'autres champignons (Djamei *et al.*, 2011). Cmu1 est une chorismate mutase qui catalyse la réaction du chorismate libre en préphénate dans la cellule végétale. Le chorismate étant un précurseur de la voie de biosynthèse de l'acide salicylique, une hormone de défense des plantes, Cmu1 induit indirectement une baisse du niveau d'acide salicylique en influençant sur la quantité de chorismate libre disponible.

La définition d'effecteur reste sujette à discussion mais l'ensemble des données disponibles chez de nombreux pathosystèmes montre que la grande majorité des effecteurs correspondent à la définition canonique des PPS (petite taille, enrichissement en cystéines, surexpression lors de l'infection, absence de domaine ou d'orthologue). J'ai choisi de considérer comme effecteur toute protéine sécrétée et spécifiquement induite *in planta*, sans appliquer de critère de taille, de richesse en cystéines ni en terme de conservation, et nous verrons que l'absence d'application de ces cribles nous renvoie néanmoins majoritairement à des protéines de moins de 300 acides aminés, généralement enrichies en cystéines.

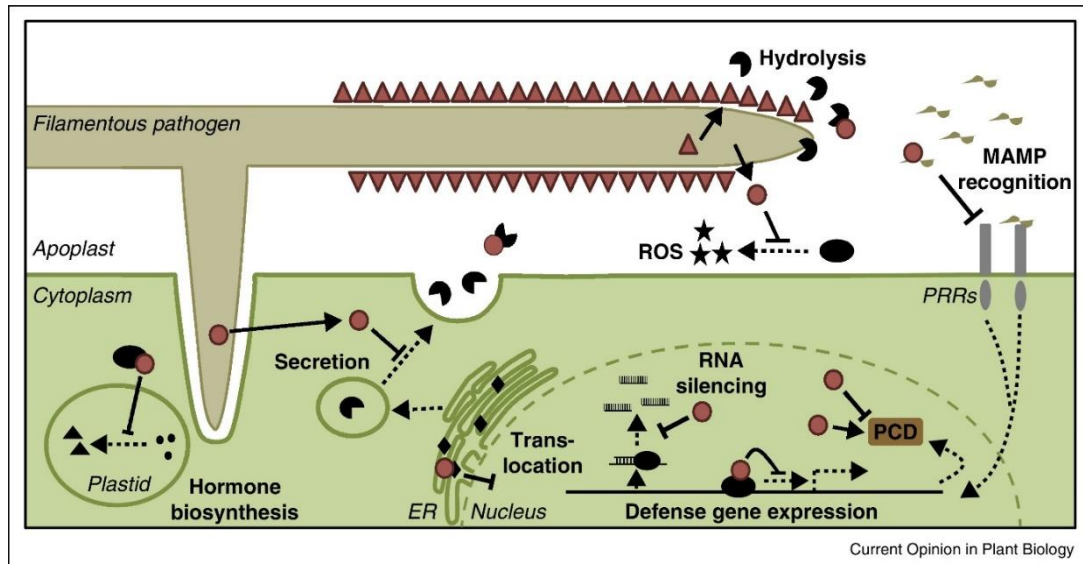


Figure 4: Représentation schématique des modes d'action des effecteurs

Les agents pathogènes sécrètent des effecteurs (symboles rouges) pour déréguler le système immunitaire de la plante. Un groupe d'effecteurs (cercles rouges) interagit avec des cibles végétales qui agissent dans l'immunité (symboles noirs), un autre groupe d'effecteurs (triangles rouges) protège l'agent pathogène des composés antimicrobien de la plante (D'après Rovenich *et al.*, 2014).

4.2. Mode d'action des effecteurs

L'étude de la fonction biologique des effecteurs est encore très récente et donc une quantité réduite d'information est pour l'instant disponible. Cependant avec l'avènement des technologies de séquençage de nouvelle génération permettant de globaliser l'étude des effecteurs d'une espèce, les données disponibles sur les effecteurs ne cessent de croître.

Pour infecter efficacement leur plante hôte, les agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes, lors de leur phase d'infection biotrophe, doivent inhiber les défenses de la plante. Pour cela, ils sécrètent des effecteurs qui vont agir à plusieurs niveaux dans l'interaction avec leur hôte (Figure 3 et Figure 4).

Certains effecteurs empêchent la reconnaissance des PAMPs par la plante et ainsi inactivent des défenses basales de la plante. Par exemple, l'effecteur Avr4 de *C. fulvum* protège la chitine des parois des champignons de chitinases produites par la plante hôte, la tomate, lors de l'infection (van den Burg *et al.*, 2006). L'effecteur Ecp6 de *C. fulvum* se lie, via son domaine LysM, aux fragments de chitine libre pour empêcher leur reconnaissance par les récepteurs de la plante (Rovenich *et al.*, 2014). L'effecteur Avr2 se lie aux protéases de la plante, comme Rcr3 et PiP1, ce qui provoque leur inhibition (Toruño *et al.*, 2016). *P. infestans* sécrète l'effecteur Avrblb2 qui interfère avec la sécrétion des protéases (Bozkurt *et al.*, 2011). L'effecteur Pep1 d'*U. maydis* induit l'expression de la protéine de la plante CC9 qui va à son tour inhiber les protéases. Pep1 agit par ailleurs directement sur les défenses de la plante en inhibant l'activité de la peroxydase POX12 (Rovenich *et al.*, 2014).

Les effecteurs peuvent aussi moduler l'expression des gènes de défense de la plante. L'effecteur PsAvh23 de *Phytophthora sojae* est capable d'agir sur une marque épigénétique des histones pour réguler l'expression des gènes de la plante hôte, le soja. Il inhibe l'acétylation de la lysine 9 des histones H3 ce qui induit une dérégulation de l'expression des gènes de défense de la plante (Kong *et al.*, 2017). Des effecteurs de *P. sojae*, appelés PSR (*Phytophthora* suppressor of RNA silencing), promeuvent l'infection dans la plante en inhibant la machinerie de "silencing" (Xiong *et al.*, 2014). Comme mentionné précédemment, des petits ARNs chez *B. cinerea* piratent la machinerie de "silencing" d'*A. thaliana* et la tomate, et réduisent l'expression des gènes de la plante impliqués dans la défense (Weiberg *et al.*, 2013).

Les effecteurs peuvent également agir sur les voies hormonales des plantes qui sont fondamentales pour l'induction des défenses. Ainsi L'oomycète *Hyaloperonospora arabidopsidis* sécrète un effecteur qui induit la dégradation du complexe MED19a, un régulateur positif de la voie de l'acide salicylique. La dégradation de MED19a empêche donc le déclenchement des défenses de la plante induites par l'acide salicylique (Caillaud *et al.*, 2013). Les organismes symbiotiques produisent aussi des effecteurs. L'effecteur SP7 du champignon mycorhizien *Glomus intraradices* (*Rhizophagus irregularis*) interagit

avec un facteur de transcription activé par l'éthylène et qui régule l'expression de plusieurs gènes de défense de *Medicago truncatula*. Cet effecteur induirait ainsi la suppression de la PTI et favoriserait la symbiose (Kloppholz *et al.*, 2011). Chez l'organisme symbiotique *Laccaria bicolor*, l'effecteur MISSP7 interagit avec les répresseurs de signalisation de l'acide jasmonique (JA) de la plante hôte, le peuplier, et favorise ainsi la symbiose (Plett *et al.*, 2014).

Les agents pathogènes nécrotrophes et les hémibiotrophes, pendant leur phase de vie nécrotrophe, induisent la mort des cellules de l'hôte pour obtenir leurs nutriments et se développer. Pour cela ils sécrètent majoritairement des métabolites secondaires, mais aussi des ROS et des effecteurs protéiques. Deux types de nécrotrophes sont différenciés, ceux qui présentent une très grande gamme d'hôtes, tels que *B. cinerea*, et qui sécrètent des toxines non-spécifiques (non-HST, non-Host-specific toxins), et ceux qui, à l'inverse, ne peuvent infecter que les hôtes possédant des gènes dominants de sensibilité. Ces derniers produisent des toxines spécifiques à l'hôte (HST, Host-specific toxins).

Par exemple, chez *Pyrenophora tritici-repentis* (*Ptr*) les gènes *ToxA*, *ToxB* et *ToxC* interagissent respectivement avec les gènes *Tsn1*, *Tsc2* et *Tsc1* du blé pour induire la mort cellulaire (Faris *et al.*, 2013). Chez *Parastagonospora nodorum*, *SnTox1* interagit avec le produit du gène de sensibilité *Snn1* de l'hôte induisant la mort cellulaire. Cet effecteur protège également le champignon des chitinases du blé en se liant aux molécules de chitine (Liu *et al.*, 2016).

Le peptide *Nep1* induisant la nécrose et la production d'éthylène est un inducteur de mort cellulaire non spécifique identifié d'abord chez *Fusarium oxysporum* (Bailey, 1995). Depuis des analogues à *Nep1*, appelés NLP (Nep1-Like Protein), ont été identifiés dans de très nombreux micro-organismes. Par exemple chez l'hémibiotrophe *C. higginsianum*, la protéine NLP1 spécifiquement exprimée pendant la transition vers la nécrotrophie du champignon, induit la mort cellulaire dans des feuilles de tabac (Lo Presti *et al.*, 2015).

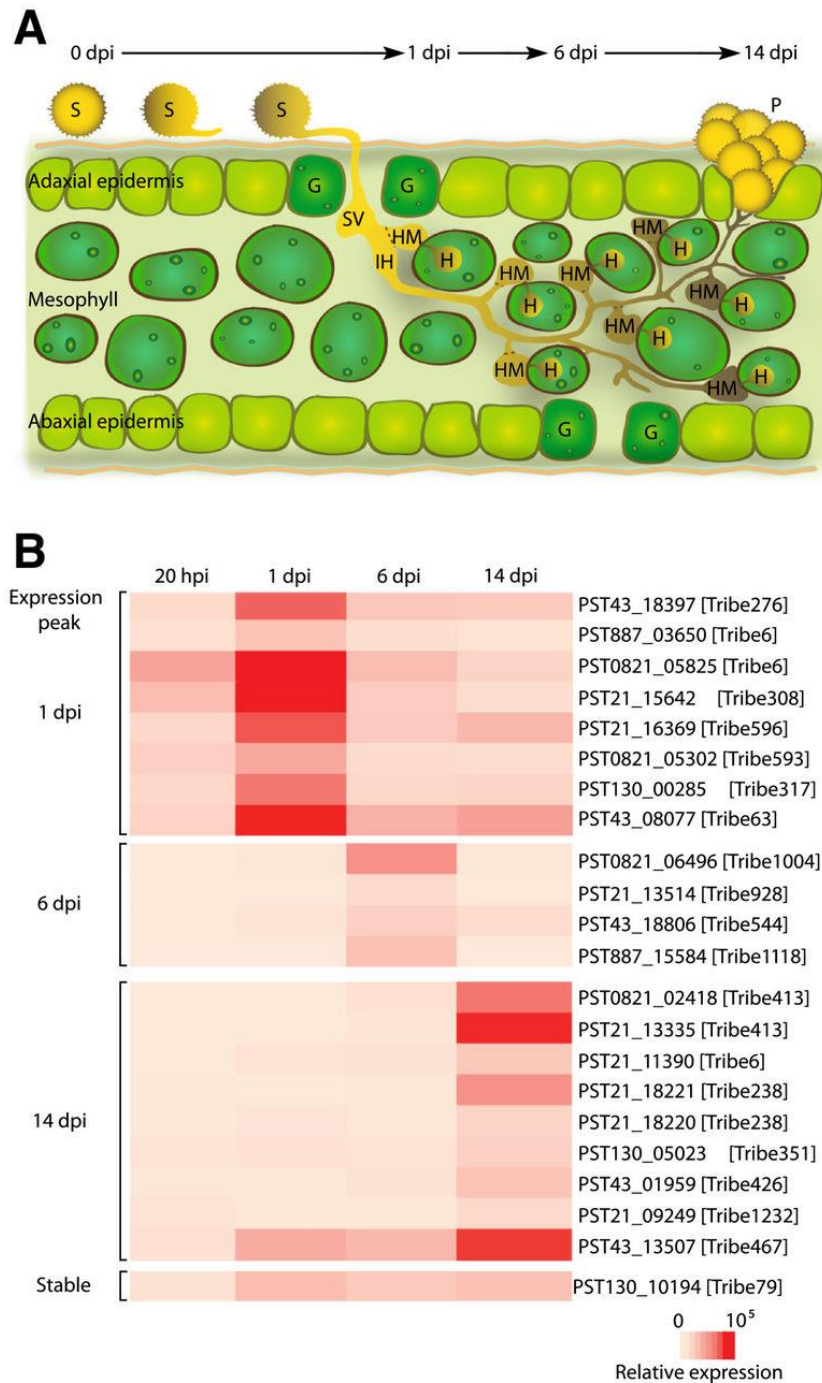


Figure 5: Vagues d'expression d'effecteurs candidats au cours de l'infection du blé par *Puccinia striiformis f. sp. tritici*

(A) Schéma des différents stades d'infection de la plante par le champignon. S, urédospore; SV, vésicule sous-stomatale; IH, hyphes; HM, cellule mère haustoriale; H, haustorium; P, pustule; G, cellule de garde. (B) Profil d'expression de 22 effecteurs candidats à quatre temps d'infection par qRT-PCR (Cantu *et al.*, 2013).

4.1. Les vagues d'expression d'effecteurs

Avec l'avènement des technologies "-omiques", de plus en plus de données transcriptomiques, en particulier issues de la technologie de RNAseq, concernant des interactions plantes-microorganismes sont disponibles. Ces données permettent de mieux comprendre les bases moléculaires de ces interactions et d'appréhender la complexité des cycles infectieux, et ce à la fois du côté plante et du côté microorganisme.

Avec les approches RNA-seq, des vagues successives d'expression d'effecteurs ont pu être décrites chez plusieurs agents phytopathogènes ou symbiotiques, à différents stades d'infection au cours de la colonisation de l'hôte, comme chez *Puccinia striiformis* (Figure 5), *Melampsora larici-populina*, *Z. tritici* et *M. oryzae* (Cantu *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2015; Hacquard *et al.*, 2012; Mirzadi Gohari *et al.*, 2015; Palma-Guerrero *et al.*, 2016). Chez *C. higginsianum*, des sets différents d'effecteurs sont exprimés dans l'appressorium, avant la pénétration de la plante, puis dans la phase biotrophe suivante et enfin dans la phase nécrotrophe finale (Figure 6). Par des approches d'expression transitoire dans le tabac, les auteurs ont pu observer que des effecteurs exprimés lors de la phase biotrophe supprimaient la mort cellulaire, et inversement, les effecteurs exprimés pendant la phase nécrotrophe induisaient la mort cellulaire (Kleemann *et al.*, 2012). De la même façon chez l'oomycète *P. sojae*, les deux vagues d'effecteurs observées ont des effets antagonistes: la première vague, exprimée avant même l'infection, est impliquée dans la suppression de la mort cellulaire. A l'inverse, la seconde vague d'effecteurs induit la mort cellulaire (Wang *et al.*, 2011). Ces résultats indiqueraient que les vagues successives d'effecteurs ont des rôles distincts et permettraient à l'agent pathogène de réaliser toutes les étapes clés de son cycle infectieux, de la colonisation biotrophe à la transition vers la nécrotrophie (Figure 5 et Figure 6).

Chez *C. higginsianum*, l'effecteur *ChNLP1* (Nep1-like Protein) est spécifiquement exprimé lors de la transition entre les phases de vie biotrophe et nécrotrophe. Exprimé dans le tabac cet effecteur induit la mort cellulaire, cependant co-exprimé avec d'autres effecteurs de *C. higginsianum* spécifiques de la phase biotrophe cette mort cellulaire est réprimée. Des observations identiques ont été faites chez *Colletotrichum orbiculare*. Ces résultats laissent à penser que l'équilibre entre effecteurs induisant la mort cellulaire et effecteurs la supprimant jouerait un rôle majeur dans la transition biotrophie-nécrotrophie chez les champignons hémibiotrophes (Yoshino *et al.*, 2012).

Par ailleurs, il y a aussi des vagues d'expression d'effecteurs spécifiques aux organes de la plante infectée. Chez *U. maydis*, lors de l'infection des plantules, des feuilles ou des panicules (inflorescences mâles), des sets distincts d'effecteurs sont exprimés (Schilling *et al.*, 2014). Par exemple le gène codant

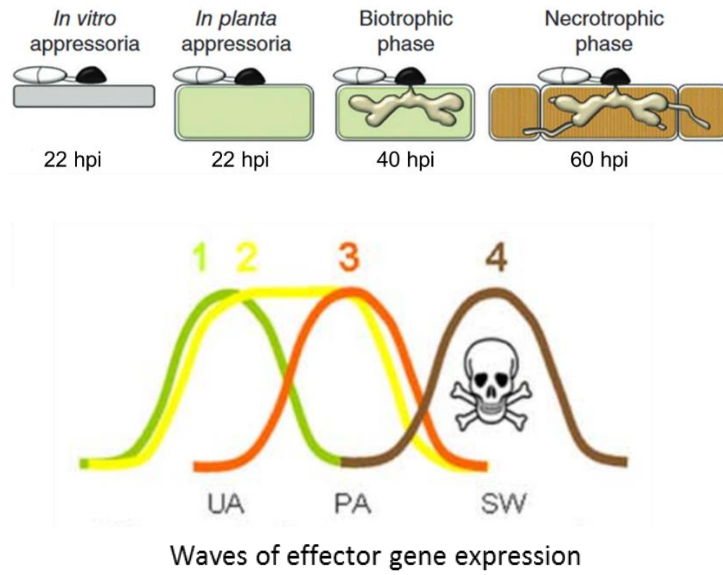


Figure 6: Vagues d'expression des effecteurs lors de l'infection d'*Arabidopsis thaliana* par *Colletotrichum higginsianum*.

Quatre vagues d'expression d'effecteurs sont identifiées au cours du processus infectieux, dans l'appressorium, avant la pénétration de la plante (UA), puis dans la phase biotrophe suivante (PA) et enfin dans la phase nécrotrophe finale (SW) (Kleemann *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012).

pour l'effecteur See1 est spécifiquement exprimé dans les feuilles et y induit une synthèse de l'ADN de plante pour le développement de tumeurs (Redkar *et al.*, 2015). Des sets distincts d'effecteurs sont aussi exprimés lors de la colonisation de différentes plantes hôtes. Par exemple lors de l'infection du mélèze et du peuplier par le champignon *M. larici-populina*, des vagues d'expression d'effecteurs différentes ont pu être identifiées (Duplessis *et al.*, 2016).

L'existence de telles vagues d'effecteurs renforce donc l'hypothèse de leur rôle essentiel dans le cycle infectieux. Ces vagues successives d'effecteurs permettent à l'agent pathogène de coloniser efficacement sa plante hôte et tout en évitant les défenses de la plante pendant toute la durée du processus infectieux. On peut même supposer qu'il existe des effecteurs spécifiques à un type cellulaire particulier, comme cela a pu être identifié chez *Yersinia pseudotuberculosis*, une bactérie pathogène de l'homme, chez laquelle des effecteurs ciblent spécifiquement les phagocytes (Fahlgren *et al.*, 2009).

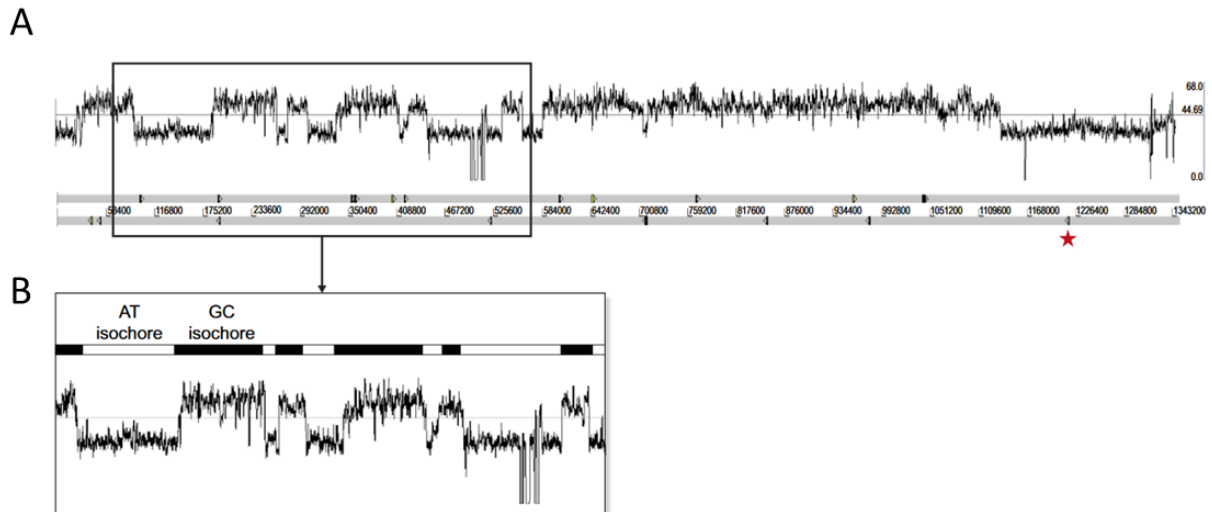


Figure 7: Structure en isochores du génome de *Leptosphaeria maculans*

Le génome de *L. maculans* est composé de régions avec un faible taux en GC, les isochores AT, et de régions avec un taux plus élevé en GC, les isochores GC. Les isochores AT sont enrichis en éléments transposables et en gènes associés à la pathogénie. L'étoile rouge indique un gène surexprimé pendant l'infection des cotylédons de colza et codant pour un effecteur. (A) représentation d'un chromosome entier. (B) Vue agrandie de 502 kb du chromosome (Rouxel et Balesdent, 2017).

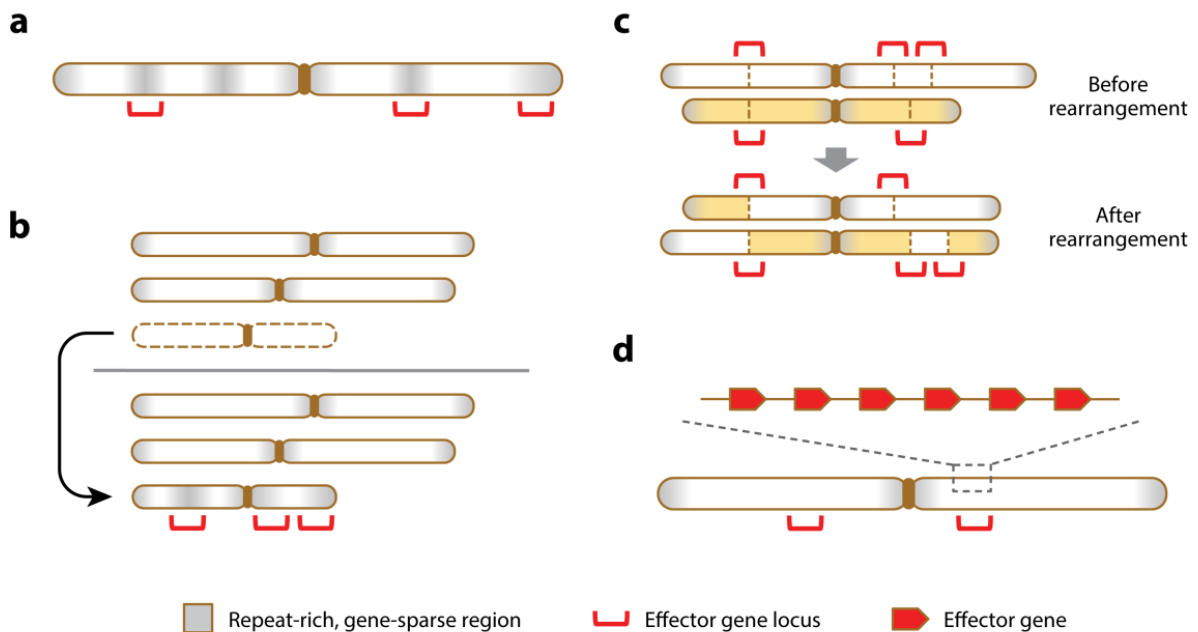


Figure 8: Localisation génomique des effecteurs

(a) Effecteurs localisés dans des régions riches en éléments répétés et pauvres en gènes comme chez *Leptosphaeria*, *Magnaporthe* et *Phytophthora spp.* (b) Effecteurs localisés dans des chromosomes dispensables, riches en éléments répétés, et qui peuvent facilement être transmis d'une souche à l'autre par transfert horizontal. (c) Effecteurs localisés dans des hot spots de réarrangements chromosomiques. (d) Effecteurs localisés en clusters, comme chez *Ustilago maydis* (Lo Presti et al., 2015).

4.2. Le concept de génome à deux vitesses

La capacité des agents pathogènes à s'adapter à leur hôte et à leur environnement est particulièrement importante surtout dans un contexte de "course à l'armement" vis-à-vis de leur plante hôte. Cette capacité à s'adapter est indissociable de la notion de "génome à deux vitesses" mise en évidence en particulier chez *L. maculans*.

Le séquençage du génome de *L. maculans* a révélé une structure bipartite du génome avec une alternance de blocs appelés isochores GC et AT (Rouxel *et al.*, 2011) (Figure 7). Les isochores GC font une taille moyenne de 70,4 kb avec un taux équilibré de GC de 51,0%. Ces isochores sont riches en gènes, avec 95% des gènes prédits, et pauvres en éléments transposables. Les isochores AT représentent des régions de 38,6 kb en moyenne avec un faible taux de GC (33,9%). Ces isochores contiennent peu de gènes prédits (148 gènes sur les 12469 gènes de *L. maculans*) mais ils sont riches en éléments répétés (Rouxel *et al.*, 2011). Ces isochores AT sont particulièrement enrichis en gènes intervenant dans la pathogénie (analyse GO), en PPS et en gènes d'avirulence.

Sans être toujours aussi tranchée que chez *L. maculans*, cette structure bipartite du génome avec un enrichissement en gènes impliqués dans la pathogénie dans les régions riches en éléments répétés et pauvres en gènes, a pu être observée chez d'autres organismes filamenteux tels que *Z. tritici* (Croll *et al.*, 2013). *P. infestans* (Haas *et al.*, 2009) *Verticillium dahliae* (Faino *et al.*, 2016), ou *Epichloë* spp. (Schardl *et al.*, 2013). Chez plusieurs agents pathogènes, les chromosomes dispensables sont également enrichis en de tels gènes (Balesdent *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2010; Mehrabi *et al.*, 2011). Enfin les régions télomériques enrichies en éléments répétés sont aussi souvent enrichies en effecteurs (Figure 8).

Les gènes codant des effecteurs ne sont donc pas localisés de manière aléatoire dans le génome mais ont tendance à être associés à des régions riches en éléments répétés et en éléments transposables. De ces observations est né le concept évolutif de génome à deux vitesses. Dans ce modèle le génome a une structure bipartite avec un génome essentiel ("core genome") et un génome plastique avec des régions pauvres en gènes, riches en éléments répétés qui sont soumises à une évolution plus rapide et/ou non conventionnelle, que le génome essentiel (Dong *et al.*, 2015).

Plusieurs mécanismes permettent une évolution rapide de ces régions riches en éléments répétés, tels que des événements de duplication, de délétion ou la recombinaison (**Figure 8**). Chez *L. maculans*, les isochores AT sont dégénérés par le mécanisme de RIP (Repeat Induced Point mutation). Ce mécanisme pré-méiotique est un système de défense chez les champignons qui permet de générer de nombreuses mutations (C>T et G>A) dans les séquences répétées, introduisant des codons STOP dans les séquences codantes, et ainsi limiter la propagation des éléments transposables. Le RIP peut aussi "déborder" sur

les gènes "copie unique" situés à proximité de ces éléments répétés, en particulier les gènes localisés dans les isochores AT (Idnurm and Howlett, 2003; Rouxel *et al.*, 2011). Chez *F. oxysporum*, les chromosomes dispensables riches en éléments transposables et en gènes impliqués dans la pathogénie peuvent être facilement acquis ou perdus, entre souches, par des transferts horizontaux (Ma *et al.*, 2010).

Les agents pathogènes ayant des gènes codant des effecteurs localisés dans ces régions hautement dynamiques auraient un avantage évolutif, avec une capacité à perdre ou modifier plus rapidement ces gènes et ainsi échapper à la reconnaissance par les défenses de la plante et contourner des gènes de résistance. La capacité à diversifier rapidement son répertoire d'effecteurs jouerait aussi un rôle important dans l'adaptation à de nouvelles plantes hôtes (Schulze-Lefert et Panstruga, 2011).

En plus de l'aspect évolutif, la localisation de gènes impliqués dans la pathogénie dans des régions riches en éléments répétés a un impact sur leur expression (Testa *et al.*, 2016). Dans le cas de *L. maculans*, les isochores AT, et donc les effecteurs qui s'y trouvent, sont maintenus en une structure condensée de type hétérochromatienne. Lors de l'infection de la plante par le champignon, le maintien sous forme hétérochromatienne serait aboli permettant une expression concertée des effecteurs localisés dans les isochores AT malgré leur absence de proximité physique (Soyer *et al.*, 2014). Le même mécanisme de régulation a été observé chez *Fusarium graminearum* qui possède également une structure de génome à deux vitesses. Les régions dynamiques du génome, enrichies en gènes impliqués dans la pathogénie, sont maintenues sous un contrôle hétérochromatinien *in vitro*, lequel est levé pendant l'infection (Wang *et al.*, 2017).

Plante Agent pathogène	RR ou Rr	rr
Avr	Interaction incompatible →Plante résistante	Interaction compatible →Plante sensible
avr	Interaction compatible →Plante sensible	Interaction compatible →Plante sensible

Figure 9: Schéma du modèle de Flor (1971).

Une protéine de la plante R reconnaît spécifiquement un effecteur sécrété par l'agent pathogène et qui est alors appelé protéine d'avirulence (Avr). Cette reconnaissance induit une réponse immunitaire de la plante la rendant résistante à l'agent pathogène, on parle d'interaction incompatible. En cas d'absence ou de mutation de la protéine de résistance (r) ou du gène d'avirulence correspondant (avr), l'agent pathogène n'est pas reconnu par le système de défense de la plante. La plante est sensible, il y a interaction compatible.

5. La résistance spécifique

5.1. Le modèle gène-pour-gène

Les effecteurs permettent aux agents pathogènes d'échapper à l'immunité basale de la plante, la PTI. Au cours de l'évolution, les plantes ont développé un second système de défense qui permet une reconnaissance spécifique de certains effecteurs sécrétés par les agents pathogènes. Cette relation dite gène-pour-gène a été mise en évidence pour la première fois dans les années 1940 grâce aux travaux de Flor sur la résistance du lin à *Melampsora lini* (Flor, 1971). Une protéine de résistance de la plante permet la reconnaissance spécifique d'un effecteur, alors appelé protéine d'avirulence (Figure 9). Dans ce cas il y a une réaction incompatible entre l'agent pathogène et la plante avec déclenchement du système de défense de la plante. En cas d'absence ou de mutation du gène de résistance et/ou du gène d'avirulence correspondant, l'interaction est dite compatible: l'agent pathogène n'est pas reconnu par les défenses de la plante et peut l'infecter. La résistance spécifique est, dans la grande majorité des cas, le résultat d'une interaction directe ou indirecte entre le produit d'un gène de résistance unique et dominant et le produit de l'allèle dominant du gène d'avirulence.

La résistance spécifique étant monogénique, elle est plus facilement manipulable par les sélectionneurs pour obtenir de nouvelles variétés que la résistance quantitative polygénique (p. 63). Elle permet de conférer un haut niveau de résistance aux plantes et donc d'éviter les maladies. La résistance spécifique est en général moins soumise à l'influence de l'environnement que la résistance quantitative. Il existe cependant des exemples de relations gène-pour-gène impactées par l'environnement. Par exemple le blé porteur du gène de résistance *Sr6* est résistant aux souches de *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* portant le gène d'avirulence *P6* à 18°C mais est sensible à 27°C (Moerschbacher *et al.*, 1989). De la même manière, le colza porteur du gène de résistance *Rlm6* est résistant aux souches de *L. maculans* portant le gène d'avirulence correspondant *AvrLm6* à 15°C mais est sensible à 25°C (Huang *et al.*, 2006).

La reconnaissance d'une protéine d'avirulence par une protéine de résistance permet l'induction de la résistance appelée ETI (Effector-triggered Immunity). Cette ETI est souvent associée à une mort cellulaire localisée au point d'infection appelée réponse hypersensible (HR) qui va permettre de stopper la croissance des organismes biotrophes et hémibiotrophes. Par ailleurs, l'ETI amplifie les programmes transcriptionnels de l'immunité basale et les défenses antimicrobiennes, avec des réponses de production de ROS, pic de calcium, activation de MAPKs (mitogen-activated protein kinases), dépôts de callose (Dodds and Rathjen, 2010). Ces réactions localisées au point d'infection

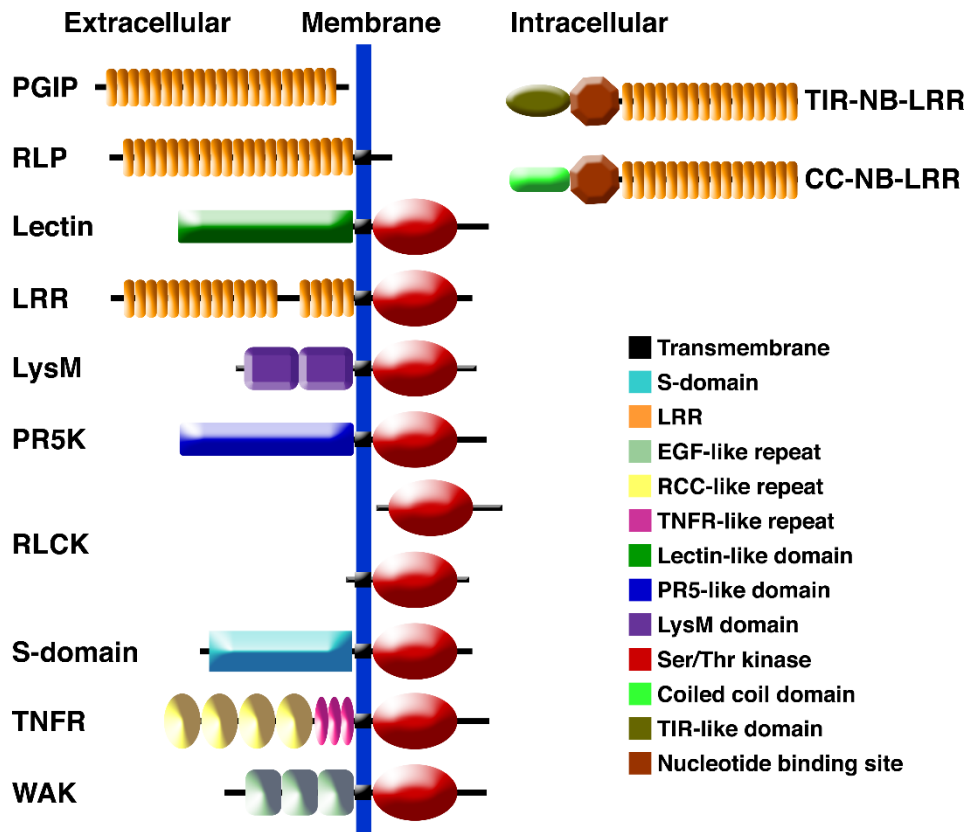


Figure 10: Diversité des protéines de résistance

Les récepteurs extracellulaires PGIP, RLP et RLK (classés selon leur domaine extracellulaire) reconnaissent MAMPS, DAMPs, protéines sécrétés, effecteurs ou peptides par des interactions directes ou indirectes. S'ensuivent des événements d'hétérodimérisation, de phosphorylation et d'éventuels changements de conformation favorisant les interactions avec des molécules régulatrices telles que les RLCK pour distribuer le message dans la cellule. Les récepteurs intracellulaires, les protéines NB-LRR, ont tendance à reconnaître les signaux spécifiques des agents pathogènes qui sont le plus souvent des effecteurs. Leur reconnaissance induit des cascades de signalisation et déclenchent une résistance à l'agent pathogène

Abréviations: PGIP, polygalacturonase inhibitor protein; RLP, receptor-like protein; RLK, receptor-like kinase; LRR, leucine-rich repeats; LysM, lysine motif; PR5K, pathogenesis related 5-like receptor kinase; RLCK, receptor-like cytoplasmic kinase; S-domain, self-incompatibility domain; TNFR, tumour necrosis factor receptor; WAK, wall associated kinase; NB, nucleotide binding; TIR, Toll and Interleukin 1 transmembrane receptor; CC, coiled-coil; EGF, epidermal growth factor; RCC, regulator of chromosome condensation; Ser/Thr, serine/threonine (Tör *et al.*, 2009).

peuvent aussi induire dans les autres tissus de la plante une résistance systémique (systemic acquired resistance ou SAR) pour prévenir de potentielles infections secondaires (Cui *et al.*, 2015).

5.2. Les protéines de résistance

Le clonage des gènes de résistance a mené à l'identification de deux classes fonctionnelles de protéines qui permettent la détection de l'agent pathogène et l'induction des défenses (Figure 10). La première classe de protéines de résistance correspond majoritairement à des protéines avec un domaine extracellulaire et qui agissent comme récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR, Pattern Recognition Receptor) associés à des micro-organismes, soit les PAMPs ou les DAMPs, pour déclencher la PTI. Certaines PRR sont aussi impliquées dans la reconnaissance spécifique d'effecteurs d'agents pathogènes apoplastiques et ainsi déclencher aussi une ETI (Stotz *et al.*, 2014). Il existe plusieurs types de PRR tels que des RLK (receptor-like kinases) ou des RLP (receptor-like protein) (Figure 10). La deuxième classe de protéines de résistance correspond à des protéines essentiellement cytoplasmiques, appelées NBS-LRR, avec un site de liaison aux nucléotides (Nucleotide Binding Site – NBS) et des domaines répétés riches en leucine (Leucine-Rich repeat – LRR). Ces NBS-LRR permettent la détection directe ou indirecte des effecteurs produits par l'agent pathogène et le déclenchement de l'ETI.

Les NBS-LRR constituent une famille multigénique très variable mais deux groupes majoritaires peuvent y être distingués: (i) les protéines avec un domaine Toll-Interleukin 1 Receptor (TIR) et appelées TNLs, (ii) les protéines avec un domaine coiled-coil (CC) et appelées CNLs (Gururani *et al.*, 2012).

Comme pour les effecteurs, le profil d'expression des gènes de résistance peut être différentiel selon les tissus, le stade de développement ou le génotype de la plante. Une analyse globale du profil d'expression de 162 gènes codant pour des NBS-LRR chez *A. thaliana* a montré que certains gènes étaient préférentiellement exprimés dans les organes aériens alors que d'autres étaient spécifiquement exprimés dans les racines (Tan *et al.*, 2007). Dans l'ensemble, ces NBS-LRR avaient un niveau d'expression relativement faible mais constitutif en absence d'agent pathogène. Ce niveau basal d'expression des gènes de résistance permettrait une reconnaissance rapide de la présence d'un agent pathogène, mais sans déclencher les voies des défenses de manière ectopique, ce qui induirait un coût de fitness (Michelmore *et al.*, 2013).

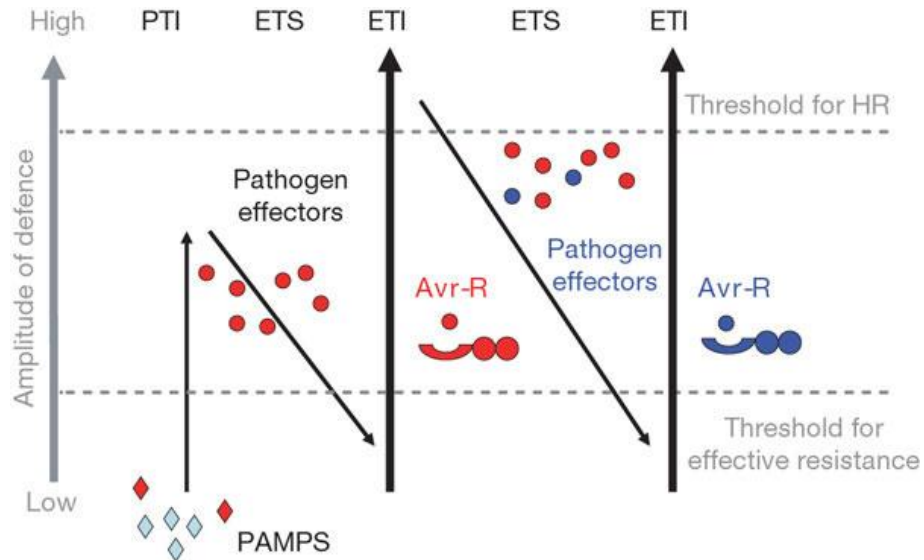


Figure 11: Modèle zig-zag : Coévolution entre plante et agent pathogène

Les plantes détectent les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) via leur Pathogen Recognition Receptors (PRR) et déclenchent la PTI (PAMPs-Triggered Immunity). Les organismes pathogènes possédant des effecteurs interférant avec la PTI peuvent efficacement coloniser la plante hôte et déclencher l'ETS (Effector-Triggered Susceptibility). Des génotypes végétaux peuvent émerger qui sont capables de reconnaître spécifiquement un effecteur du champignon. Cette reconnaissance entraîne l'activation de voies de défense, i.e. l'ETI (Effector-Triggered Immunity). Lors du processus évolutif, les organismes pathogènes peuvent perdre ou modifier leurs effecteurs pour éviter l'ETI. Du côté de la plante, de nouveaux NB-LRR peuvent émerger pour reconnaître les nouveaux effecteurs et induire l'ETI. Ces zig-zag se perpétuent tout au long de la coévolution née de l'interaction entre la plante et l'agent pathogène (Jones and Dangl, 2006).

6. Evolution des interactions plantes-micro-organismes: le modèle zig-zag

Les plantes et les agents pathogènes ont coévolué depuis des millions d'années. De ces interactions se sont développés différents systèmes de défense et d'attaque, de reconnaissance et de camouflage. Les agents pathogènes doivent pouvoir infecter leur plante hôte pour se développer et se multiplier, et à l'inverse, les plantes doivent pouvoir résister à l'attaque de ces derniers. Ce cycle coévolutif, appelé "course à l'armement", a été illustré dans le modèle zig-zag (Jones and Dangl, 2006) (Figure 11). Une première phase de résistance (PTI) est activée lorsque les récepteurs PRR de la plante détectent les PAMPs des microorganismes. Les plantes alors résistantes exercent une forte pression de sélection sur la population de l'agent pathogène. Cette pression aura pour conséquence de sélectionner et donc de favoriser la multiplication des agents pathogènes sécrétant des effecteurs leur permettant d'échapper aux mécanismes de défense de la plante. Ces agents pathogènes entraîneront un phénotype de sensibilité appelé ETS (Effector Triggered susceptibility). La pression de sélection se décale alors sur la population hôte. Les plantes possédant des protéines de résistance capables de détecter les effecteurs vont déclencher une forte réaction immunitaire, l'ETI. En réponse à ces mécanismes de défense, les agents pathogènes capables de contourner cette réponse vont à leur tour être sélectionnés et entrer dans une nouvelle boucle de cette course à l'armement (Jones and Dangl, 2006).

Dans un contexte agricole, le modèle zig-zag a une incidence particulière. Les variétés déployées au champ et qui ont été sélectionnées pour leurs caractéristiques agronomiques, dont la résistance aux agents pathogènes, sont cultivées sur de grandes surfaces et la plupart du temps en monoculture. Les résistances monogéniques déployées exercent donc une très forte pression de sélection sur les populations de l'agent pathogène. Cela entraîne une sélection des souches virulentes vis-à-vis du gène de résistance. La vitesse de contournement et donc la durabilité d'efficacité du gène de résistance est hautement variable en fonction du pathosystème considéré, dépendant notamment des capacités de dispersion et des capacités évolutives du champignon (mode de reproduction, taille de la population) (McDonald and Linde, 2002). Ces cycles dit d'explosion de l'utilisation d'une résistance ("boom") puis de l'effondrement de son efficacité ("bust") ont été ainsi observés dans les pathosystèmes blé-*P.triticina*, soja-*P. sojae*, orge-*B. graminis* (McDonald and Linde, 2002) ou encore colza-*L. maculans* (Rouxel and Balesdent, 2017). Dans un contexte agricole, en cas de contournement des résistances, les variétés déployées ne vont pas évoluer pour acquérir de nouvelles résistances, comme dans le modèle zig-zag classique. Il revient aux sélectionneurs de construire des génotypes intégrant de nouvelles sources de résistance, et à l'interprofession et/ou à l'agriculteur de déployer de façon

raisonnée les variétés afin de préserver le plus longtemps possible leur efficacité. La caractérisation des gènes de résistance et des mécanismes de reconnaissance et de contournement est donc essentielle pour contribuer à une gestion raisonnée des résistances.

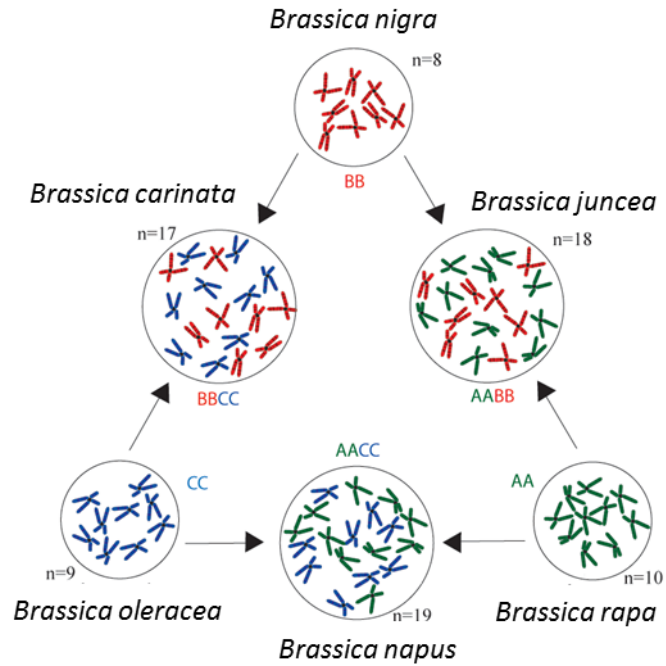


Figure 12: Le triangle de U (1935)

Ce schéma représente les liens de parenté entre les différentes espèces de *Brassica* cultivées. Les chromosomes des génomes A, B et C sont respectivement représentés en vert, rouge et bleu.

Tableau 2: Les 10 premiers pays producteurs de colza en 2013

Pays	Production (en millions de tonnes)
Canada	17,95
Chine	14,46
Allemagne	5,78
France	4,37
Australie	4,14
Pologne	2,68
Ukraine	2,13
Royaume-Uni	2,35
République Tchèque	1,44
Russie	1,26
Monde	72,68

Source: www.fao.org/faostat/en/#search/oilseed%20rape

7. Le pathosystème colza-*Leptosphaeria maculans*

7.1. Le colza (*Brassica napus*)

Le colza, *B. napus*, appartient à la famille des Brassicaceae et est issu d'un croisement inter-spécifique entre deux espèces diploïdes: le chou, *B. oleracea* ($2n = CC$) et la navette, *B. rapa* ($2n = AA$), ayant eu lieu entre 7 000 et 12 500 ans (Chalhoub *et al.*, 2014). Le colza est donc un allotétraploïde (AACC) (Figure 12).

7.1.1. L'histoire du colza

La culture du colza remonte à l'Antiquité notamment en Chine, elle aurait été introduite en Europe vers le XIII^{ème} siècle (Hebinger, 2013). Son huile servait à la fois à l'alimentation et à d'autres usages comme l'éclairage ou la savonnerie. La culture du colza commence à véritablement prendre de l'essor en France dans la deuxième moitié du 20^{ème} siècle, après plusieurs programmes d'amélioration génétique visant à améliorer la qualité de l'huile ou des tourteaux (Bonneuil and Thomas, 2012). En 1970, des études montrent que l'acide érucique entraîne des lésions cardiaques et des retards de croissance chez les rats. Or, l'huile de colza contient plus de 40% d'acide érucique. Son image est donc très fortement impactée et sa consommation diminue (<5%). La filière colza se mobilise alors pour trouver des mutants naturels présentant une teneur réduite en acide érucique. En 1971, la première variété française avec une faible teneur en acide érucique, Primor, est créée. Presque toutes les variétés cultivées actuellement en sont issues, réduisant la diversité génétique. Dans les années 1980, un deuxième programme de sélection est mis en place pour sélectionner des variétés à faible teneur en glucosinolates. En effet, la haute teneur en glucosinolates des tourteaux de colza diminue l'appétence, particulièrement chez les bovins, et induit des troubles thyroïdiens chez les animaux monogastriques (Bonneuil and Thomas, 2012).

Le développement de ces variétés de colza dites double zéro (faible teneur en acide érucique et en glucosinolates) a permis l'essor de la culture du colza. Aujourd'hui le colza est la deuxième plante oléagineuse la plus cultivée au monde, mais loin derrière le soja (source: www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Oilcrops/Documents/Food_outlook_oilseeds/NOVEMBER_2013.pdf). Il est cultivé dans de très nombreux pays (Tableau 2), en Europe, en Amérique du Nord, en Australie et en Asie, sous deux formes (colza de printemps au Canada et en Australie et colza d'hiver en Europe). Le colza est utilisé dans de multiples domaines, principalement dans l'alimentation humaine et animale, mais aussi dans des usages industriels tels que

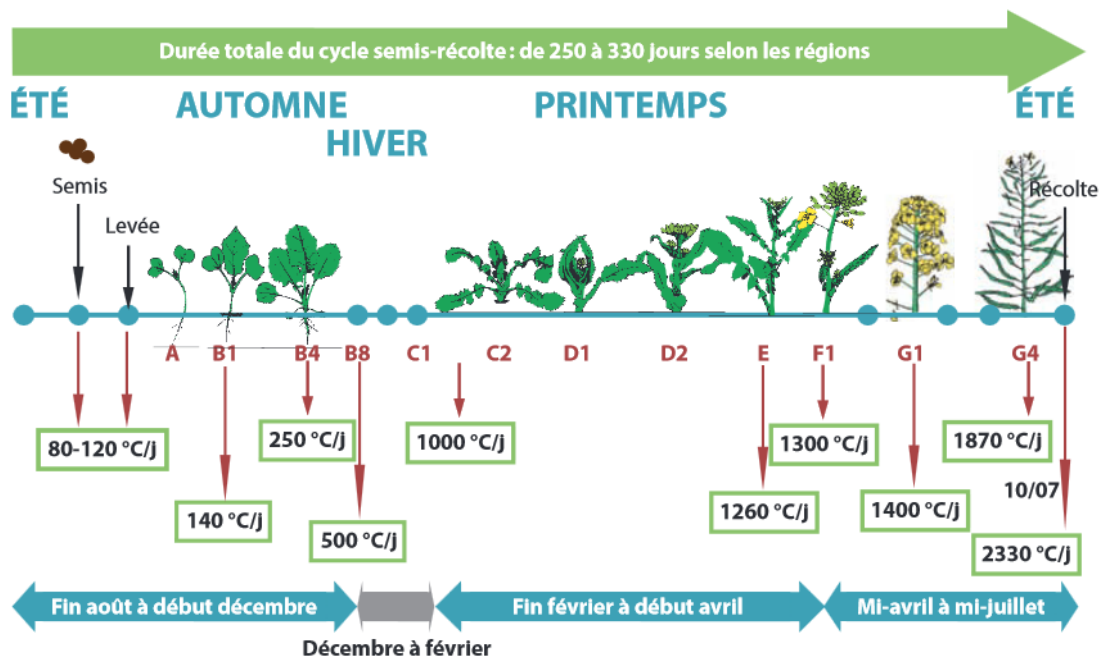


Figure 13: Cycle simplifié de développement du colza d'hiver

La culture du colza en Europe nécessite une phase de vernalisation en hiver. Les valeurs dans les encadrés verts correspondent aux sommes des températures requises pour atteindre les principaux stades (Hebinger, 2013).

la fabrication de films plastiques, de détergents et de biocarburants, avec des programmes de sélection spécifiques.

7.1.2. *La culture du colza*

Le colza d'hiver est une plante annuelle. Semé de la mi-août à la fin septembre en Europe de l'ouest, le colza connaît d'abord une première phase de levée puis reste végétatif jusqu'à fin novembre/décembre où il rentre dans une phase vernalisante. La croissance reprend à la sortie de l'hiver (février à mars), quand les températures augmentent. La tige s'allonge rapidement et de nouvelles feuilles se mettent en place ainsi que de nouvelles racines. La maturation des graines se termine en juillet (Hebinger, 2013) (Figure 13). Dans les régions où l'hiver est trop froid comme en Amérique du Nord ou en Europe de l'Est, un autre type de colza est cultivé. Ce colza dit de printemps ne requiert pas de période vernalisante, par opposition au colza d'hiver qui est cultivé en Europe.

7.1.3. *Les maladies du colza*

Les pertes de récoltes dues à des bioagresseurs sont surtout causées par des champignons et des insectes ravageurs. Parmi les principaux agresseurs fongiques on retrouve *Sclerotinia sclerotiorum* et *L. maculans* (agent causal de la nécrose du collet, ou phoma). D'autres champignons comme *Cylindrosporium concentricum* (agent causal de la cylindrosporiose), *Erysiphe cruciferarum* (agent causal de l'oïdium), *Plasmodiophora brassicae* (responsable de la hernie des crucifères) ou *Alternaria brassicae* sont aussi des bioagresseurs du colza mais avec une incidence moindre ou une répartition locale (Source: www.terresinovia.fr/colza/cultiver-du-colza/maladies). Le sclérotinia est une maladie relativement bien contrôlée par les fongicides à l'inverse de la nécrose du collet qui nécessite l'utilisation de variétés génétiquement résistantes pour éviter des pertes pouvant aller jusqu'à 50% de la récolte.

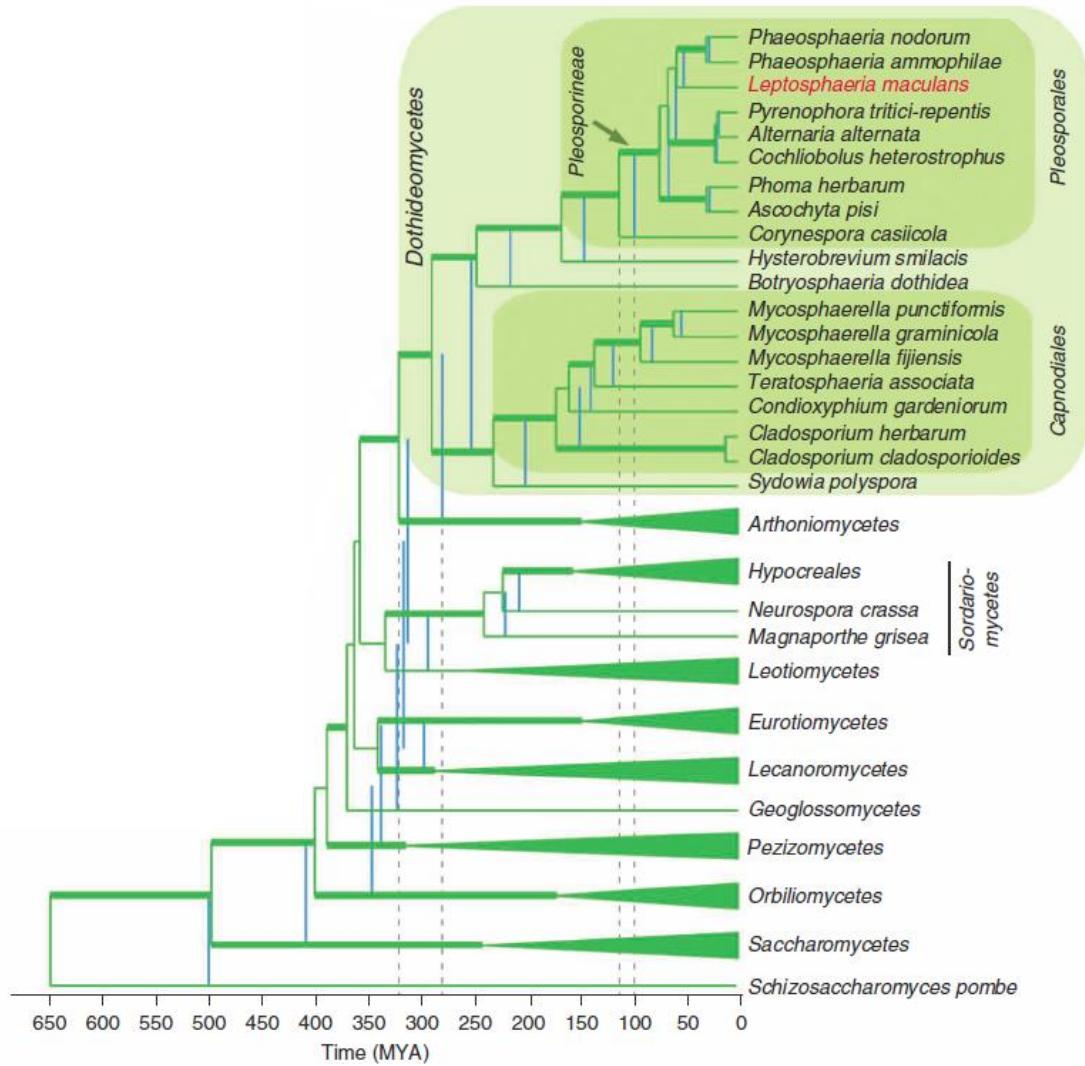


Figure 14: Relations phylogénétiques chez les Dothidéomycètes

Arbre phylogénétique et temps de divergence estimé (en millions d'années) chez les Ascomycètes. *Phaeosphaeria nodorum*: *Parastagonospora nodorum*, *Mycosphaerella graminicola*: *Zymoseptoria tritici*, *Mycosphaerella fijiensis*: *Pseudocercospora fijiensis* (Rouxel et al., 2011)

7.2. *Leptosphaeria maculans*

7.2.1. Phylogénie de L. maculans

L. maculans est un champignon ascomycète de la classe des dothithéomycètes et de l'ordre des pléosporales (Figure 14). Il est responsable de la nécrose du collet, aussi appelée phoma.

Les ascomycètes représentent environ 75 % des champignons. La classe la plus importante et la plus diverse est celle des dothideomycètes avec plus de 19000 espèces actuellement identifiées (Schoch *et al.*, 2009). Les dothideomycètes représentent un groupe extrêmement diversifié où tous les modes de vie (saprotrophes, biotrophes, nécrotrophes, symbiontes) ainsi que toutes les niches écologiques possibles sont représentées. Parmi toutes ces espèces, les plus étudiées correspondent aux champignons phytopathogènes. On peut citer par exemple les genres *Cochliobolus*, *Didymella*, *Phaeosphaeria*, *Zymoseptoria*, *Pyrenophora*, *Venturia* et *Mycosphaerella* qui comprennent des agents pathogènes du maïs, du melon, du blé, de l'orge, du pommier ou du bananier (Schoch *et al.*, 2009) (Figure 14).

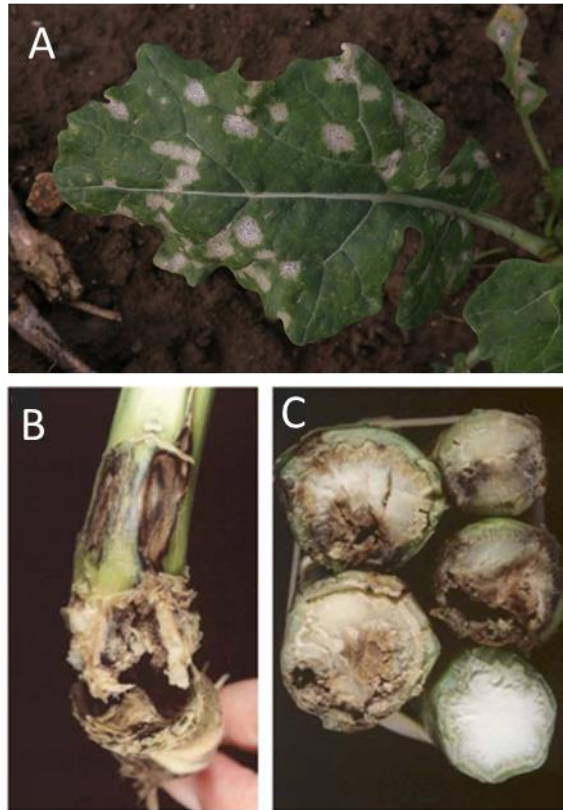


Figure 15: Symptômes causés par *Leptosphaeria maculans* sur colza

(A) Macules sur feuilles; (B) et (C) Nécrose au collet pouvant induire une verse des plantes (source: Sun *et al.*, 2001).

7.2.2. Répartition géographique et importance économique

En se basant sur des marqueurs minisatellites, Dilmaghani *et al.* (2012) supposent que *L. maculans* serait originaire du continent américain. D'ailleurs les premières épidémies de la maladie attribuées à *L. maculans* ont été enregistrées dans les années 1900, sur le chou aux Etats-Unis (Henderson, 1918). Le champignon se serait ensuite dispersé au Canada, en Europe et en Australie. En parallèle de l'essor de la culture du colza dans les années 1970, *L. maculans* devient un problème économique très important (Alabouvette *et al.*, 1974).

L. maculans peut infecter un certain nombre de crucifères tels que la moutarde brune (*B. juncea*), la moutarde noire (*B. nigra*), la moutarde blanche (*Sinapis alba*) ou le radis (*Raphanus sativus*) (Li *et al.*, 2005). Par contre ce champignon n'est pas capable d'infecter l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*. Les pertes sont cependant essentiellement observées sur colza. Il peut faire d'importants dégâts sur les plantules mais surtout provoquer sur les plantes adultes une nécrose à la base du collet pouvant induire une verse des plantes dans les cas de nécrose les plus graves (Figure 15). Dans les années 1970, il a notamment pratiquement enrayé la culture du colza en Australie. Ce champignon est aussi responsable d'épidémies en Europe et en Amérique, seule la Chine reste pour l'instant épargnée. Les pertes mondiales annuelles liées à la nécrose du collet sont estimées à plus de 900 millions de dollars (Fitt *et al.*, 2008). En année de forte pression de sélection, la maladie peut provoquer des pertes de rendement dépassant 50% sur les variétés sensibles (www.terresinovia.fr/colza/cultiver-du-colza/maladies/phoma/lutte/).

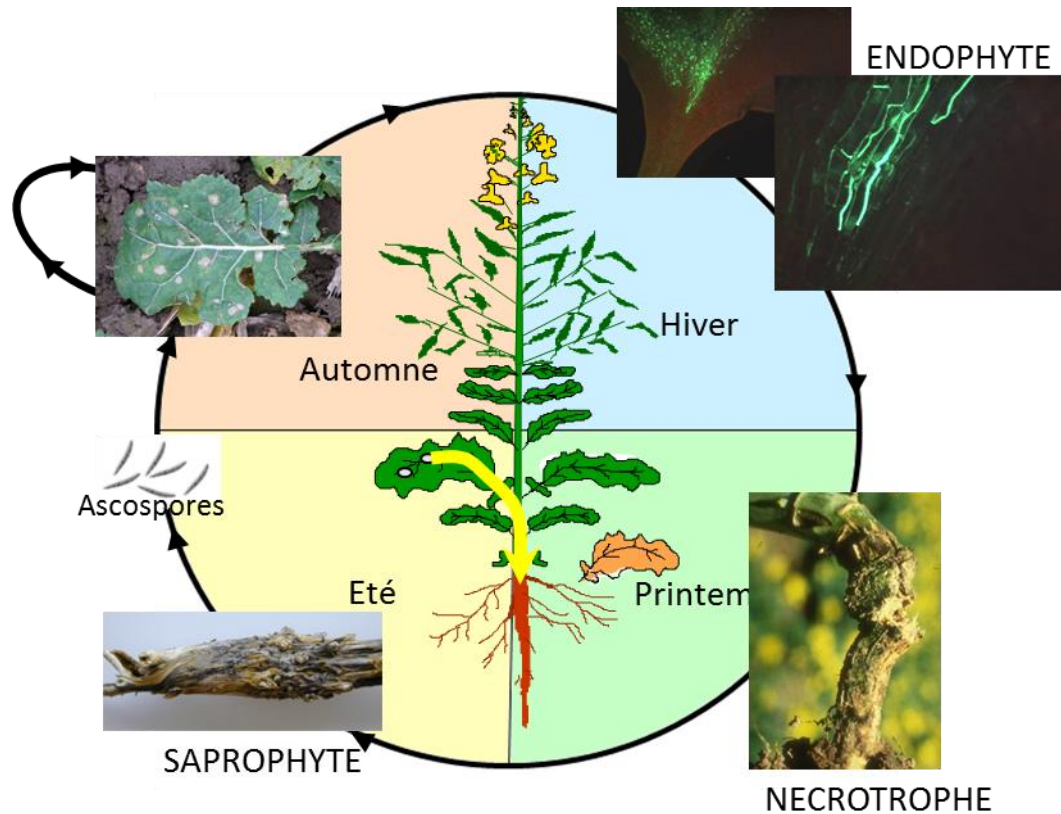


Figure 16: Cycle de vie de *Leptosphaeria maculans*

L. maculans effectue sa reproduction sexuée sur les résidus de culture de colza, les ascospores y sont produites au sein de périthèces durant toute la saison culturale dès la fin de l'été. A l'automne, les ascospores sont libérées et disséminées sur de grandes distances par le vent. Elles vont pouvoir infecter feuilles et cotylédons de colza. Après pénétration via les stomates, le champignon a une courte phase biotrophe, suivie d'une phase nécrotrophe induisant des macules sur les feuilles. Après cette première phase de colonisation du colza, *L. maculans* progresse, au cours de l'hiver, dans le pétiole puis la tige de colza jusqu'au collet, de façon totalement asymptotique. En fin de saison de culture *L. maculans* devient nécrotrophe et peut causer une verse parasitaire (Adapté de Rouxel et Balesdent 2005).

7.3. Le cycle infectieux de *L. maculans* chez le colza

L. maculans est un hémibiotrophe avec un cycle de vie calqué sur le développement du colza (Figure 13) et qui est particulièrement complexe puisqu'il change cinq fois de mode de vie au cours de son cycle infectieux (Figure 16). Pendant sa phase saprophytique, le champignon survit sur des résidus de culture, et ce pendant potentiellement plusieurs années (Petrie, 1995). Il y effectue sa reproduction sexuée produisant des ascospores qui constituent l'inoculum primaire. Les ascospores sont libérées suite à une baisse de température associée à des précipitations et elles sont dispersées par le vent sur de très longues distances. Ces ascospores peuvent infecter les feuilles et cotylédons de colza dès l'automne quand le colza est encore au stade rosette. L'ascospore germe sur les feuilles et les hyphes résultants pénètrent dans la plante hôte par les stomates, sans former d'appressorium. Une fois dans la plante, le champignon colonise l'espace intercellulaire. A ce stade *L. maculans* reste biotrophe entre 5 et 15 jours. Puis le champignon devient nécrotrophe induisant l'apparition de macules sur les feuilles. Par reproduction asexuée, il forme des pycnides qui libéreront des pycnidiospores dispersées à courte distance par "splashing" et pouvant secondairement infecter d'autres feuilles (West *et al.*, 2001). Après cette première phase de colonisation des feuilles, le champignon progresse dans le pétiole, le long du xylème et du cortex (Hammond *et al.*, 1985), pour atteindre la tige. Dans la tige, l'hyphe se développe du xylème au cortex lors d'une colonisation descendante vers le collet (Figure 17). Cette colonisation reste complètement asymptomatique et dure pendant toute la période hivernale dans le colza d'hiver. A la fin du printemps et au début de l'été, après reprise de l'élongation du colza, au moment de la maturation des graines, le champignon redevient nécrotrophe, induisant une nécrose au collet, pouvant causer une verse parasitaire.

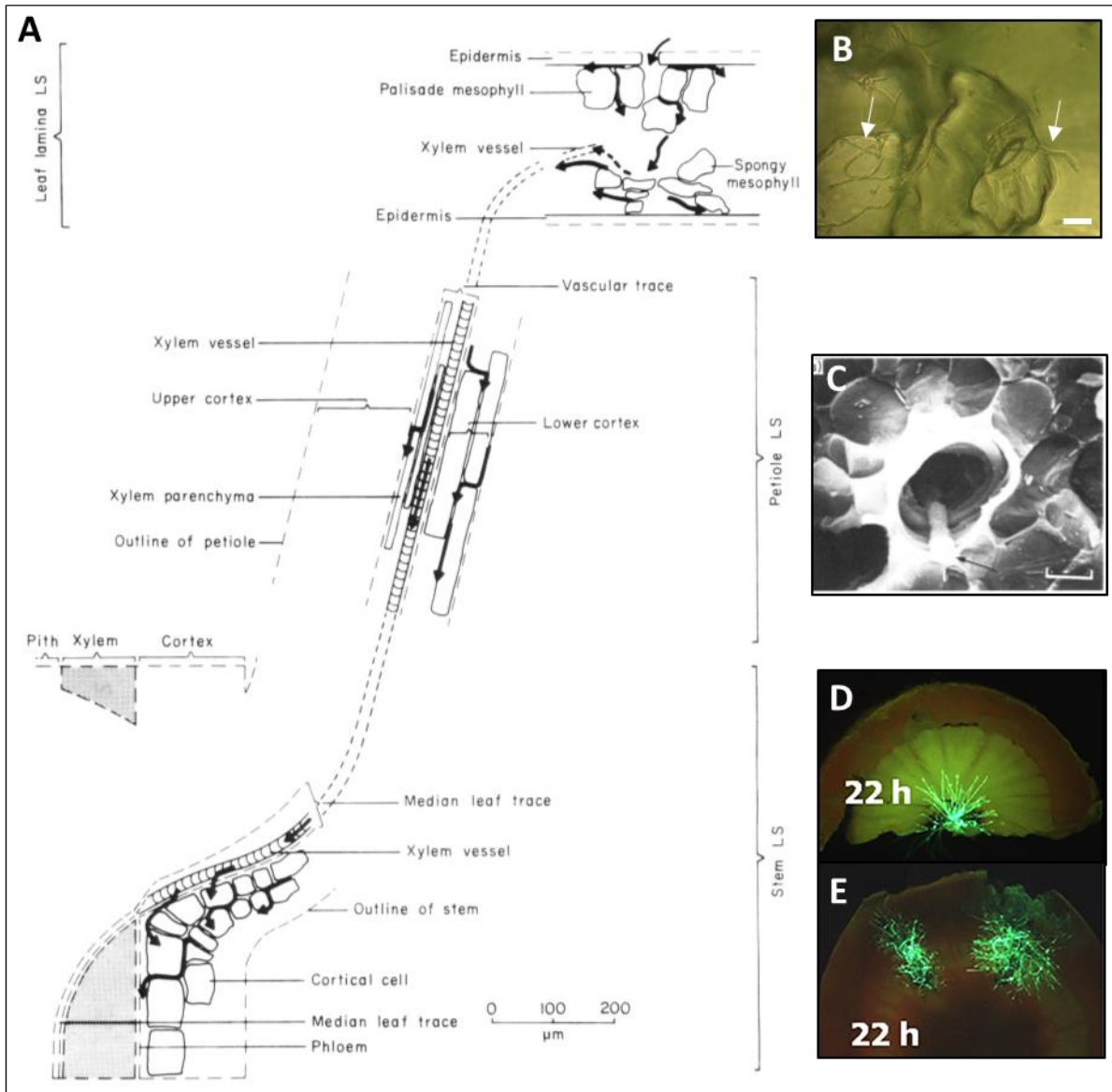


Figure 17: Représentation schématique du chemin d'infection de *Leptosphaeria maculans* dans le colza.

(A) Image issue de Hammond *et al.* (1985). Les flèches représentent les hyphes fongiques avec leur localisation principale et leur direction de croissance. LS: Longitudinal Section. (B) Surface d'un cotylédon 48h après infection par des pycnidiospores. Les flèches indiquent les hyphes fongiques (échelle = 40 μm) (C) Photo au microscope électronique d'un pétiole infecté (Hammond *et al.*, 1985). La flèche indique un hyphe fongique dans le xylème (échelle = 10 μm). (D) et (E) Rondelles de tige infectées par *L. maculans* marqué à la GFP à 47 jours après inoculation sur feuilles. Elles sont observées 22h après prélèvement des tissus (Huang *et al.*, 2009).

L. maculans constitue avec l'espèce proche *L. biglobosa* un complexe d'espèces. Ces deux espèces ont un cycle infectieux similaire. Cependant, contrairement à *L. maculans* qui provoque des nécroses au collet, *L. biglobosa* induit une nécrose beaucoup plus en amont sur les tiges et qui impacte très peu le rendement.

Tableau 3: Gènes d'avirulence clonés chez *Leptosphaeria maculans*

Gène	Taille de la protéine (aa)	Nombre de cystéines	Prédiction d'un signal de sécrétion	Localisation génomique du gène	Référence
<i>AvrLm1</i>	205	1	oui	Isochore AT	Gout <i>et al.</i> , 2006
<i>AvrLm2</i>	233	8	oui	Isochore AT	Ghanbarnia <i>et al.</i> , 2014
<i>AvrLm3</i>	160	10	oui	Isochore AT, télomère	Plissonneau <i>et al.</i> , 2015
<i>AvrLm4-7</i>	143	8	oui	Isochore AT	Parlange <i>et al.</i> , 2009
<i>AvrLmJ1</i> (<i>AvrLm5</i>)	141	7	oui	Isochore AT	Van de Wouw <i>et al.</i> , 2014 (Plissonneau <i>et al.</i> , 2017)
<i>AvrLm6</i>	144	6	oui	Isochore AT	Fudal <i>et al.</i> , 2007
<i>AvrLm10-1</i>	120	7	oui	Isochore AT, télomère	Petit- Houdenot <i>et al.</i> , soumis
<i>AvrLm10-2</i>	180	1	oui	Isochore AT, télomère	Petit- Houdenot <i>et al.</i> , soumis
<i>AvrLm11</i>	95	8	oui	Isochore AT, chromosome dispensable	Balesdent <i>et al.</i> , 2013
<i>AvrLm13</i>	134	5	oui	Isochore AT	Degrave <i>et al.</i> , en préparation

7.4. La résistance génétique du colza à *Leptosphaeria maculans*

Comme mentionné précédemment (p. 16), les fongicides sont peu utilisés, du moins en France, pour réduire l'incidence de la maladie. La principale méthode de lutte est basée sur l'utilisation de variétés présentant une résistance génétique, qu'elle soit spécifique ou quantitative.

7.4.1. La résistance spécifique à *Leptosphaeria maculans*

La résistance spécifique exprimée dès le stade cotylédonnaire permet une résistance totale aux isolats portant le gène d'avirulence correspondant. Les spores germées ne peuvent se développer dans les cotylédons et feuilles, une réaction de type HR est observée et la colonisation de la plante par le champignon est stoppée (Ansan-Melayah *et al.*, 1998).

A ce jour, 13 gènes d'avirulence ont été génétiquement caractérisés chez *L. maculans* et 10 ont été clonés (Tableau 3). Ces gènes sont tous localisés dans des isochores AT du génome et codent pour des petites protéines riches en cystéine et avec un signal de sécrétion prédit, à l'exception d'AvrLm1. Ces gènes peu ou pas exprimés durant la phase végétative, sont spécifiquement surexprimés lors de l'infection des cotylédons et feuilles, 5 à 7 jours après inoculation en conditions contrôlées (Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009).

Les gènes de résistance nommés *Rlm* ou *LepR* ont été identifiés au sein de *B. napus* et d'espèces apparentées (*B. juncea*, *B. rapa*, *B. nigra*) (Tableau 4). Actuellement 12 gènes de résistance ont été génétiquement caractérisés et deux gènes de résistance ont été clonés. Le premier gène cloné est *LepR3/Rlm1*, identifié dans la variété de printemps Surpass 400 (Larkan *et al.*, 2013; Rouxel et Balesdent, 2013). Ce gène qui est un équivalent fonctionnel de *Rlm1* (si ce n'est *Rlm1*) code pour une RLP (Receptor Like Protein) qui permet la reconnaissance de la protéine d'avirulence AvrLm1. Le deuxième gène de résistance identifié est *Rlm2* (Larkan *et al.*, 2015). Il a été cloné dans la variété d'hiver Glacier DH24287 et induit une résistance face aux isolats porteurs d'AvrLm2. *Rlm2* est un variant allélique de *LepR3/Rlm1*.

Les relations gène-pour-gène peuvent être facilement identifiées en conditions contrôlées par tests cotylédonnaires (Annexe 1), facilitant ainsi l'identification et la sélection de lignées possédant potentiellement des gènes de résistance correspondant.

Les gènes de résistance sont largement utilisés pour lutter contre la nécrose du collet, mais ils peuvent être rapidement contournés (Rouxel and Balesdent, 2017) (Tableau 4). Par exemple, l'utilisation massive de *Rlm1* a induit une forte pression de sélection sur les souches françaises avec une chute de 83 à 13% de souches possédant l'allèle virulent d'AvrLm1 (Rouxel *et al.*, 2003). Le contournement de

Tableau 4: Gènes de résistance de *Brassica napus* à *Leptosphaeria maculans*

Gène Rlm	Source des gènes Rlm	Gène d'avirulence correspondant	Année de déploiement	Date estimée de contournement en France	Référence
Rlm1 (LepR3)	<i>Brassica napus</i>	AvrLm1	1992	1999	Ansan-Melayah <i>et al.</i> , 1998
	<i>Brassica rapa</i>		1995		Larkan <i>et al.</i> , 2013
Rlm2	<i>Brassica napus</i>	AvrLm2	1970	1972	Ansan-Melayah <i>et al.</i> , 1998
	<i>Brassica rapa</i>				Larkan <i>et al.</i> , 2015
Rlm3	<i>Brassica napus</i>	AvrLm3	1992?	?	Balesdent <i>et al.</i> , 2002
Rlm4	<i>Brassica napus</i>	AvrLm4-7	1971	1999?	Balesdent <i>et al.</i> , 2001
	<i>Brassica rapa</i>		1977		
Rlm5	<i>Brassica juncea</i>	AvrLmJ1 (AvrLm5)	na	na	Balesdent <i>et al.</i> , 2002
Rlm6	<i>Brassica juncea</i>	AvrLm6	na	na	Balesdent <i>et al.</i> , 2002
Rlm7	<i>Brassica napus</i>	AvrLm4-7	2002	En cours	Parlange <i>et al.</i> , 2009
	<i>Brassica rapa</i>		2005		
Rlm8	<i>Brassica rapa</i>	AvrLm8	na	na	Balesdent <i>et al.</i> , 2002
Rlm9	<i>Brassica napus</i>	AvrLm9	na	na	Balesdent <i>et al.</i> , 2005
Rlm10	<i>Brassica nigra</i>	AvrLm10-1 et AvrLm10-2	na	na	Eber <i>et al.</i> , 2011
Rlm11	<i>Brassica rapa</i>	AvrLm11	na	na	Balesdent <i>et al.</i> , 2013
RlmS	<i>Brassica rapa</i>	AvrLmS	na	na	Van de Wouw <i>et al.</i> , 2009
LepR1	<i>Brassica rapa</i>	AvrLm1	na	na	Yu <i>et al.</i> , 2005
LepR2	<i>Brassica rapa</i>	AvrLepR2	na	na	Yu <i>et al.</i> , 2005
LepR3	<i>Brassica rapa</i>	AvrLepR3	na	na	Yu <i>et al.</i> , 2008
LepR4	<i>Brassica rapa</i>	AvrLepR4	na	na	Yu <i>et al.</i> , 2013

na: données manquantes
(Adapté de Rouxel and Balesdent, 2017).

ces gènes majeurs de résistance est facilité par le fort potentiel adaptatif de *L. maculans* avec une phase de reproduction sexuée, une grande taille de population, une dissémination des ascospores sur de grandes distances et une localisation des gènes d'avirulence dans les isochores-AT du génome de *L. maculans* (Rouxel and Balesdent, 2017).

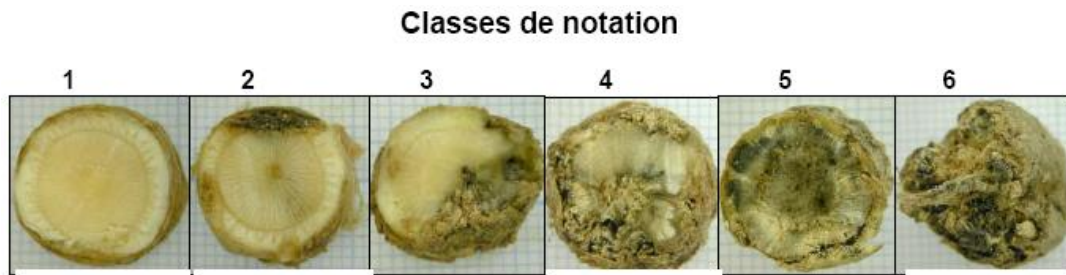


Figure 18: Echelle de notation utilisée pour évaluer la résistance au champ du colza à la nécrose du collet (note G2)

(Aubertot *et al.*, 2004)

7.4.2. La résistance quantitative à *Leptosphaeria maculans*

La résistance quantitative du colza à *L. maculans*, ou résistance au stade adulte, est une résistance partielle et polygénique. Elle est basée sur l'effet conjoint de plusieurs gènes, chacun contribuant quantitativement au niveau de défense de la plante (Delourme *et al.*, 2006). Les loci impliqués dans la variation du caractère quantitatif sont appelés QTL (Quantitative Trait Locus). En général, il n'y a pas de différence dans le développement des macules foliaires entre des variétés présentant ou non une résistance quantitative. La résistance quantitative est évaluée en fin de saison culturale sur des plantes adultes en se basant sur les tailles de nécroses observées au collet (Figure 18). Son déterminisme et les gènes sous-jacents restent cependant difficiles à identifier de par ses caractéristiques polygénique, partielle et subissant l'influence de l'environnement biotique et abiotique sur une très longue période de temps. La mesure au champ du niveau de résistance quantitative nécessite par ailleurs l'absence de gène de résistance spécifique efficace qui masquerait l'expression d'une résistance quantitative. Ces dernières années, l'INRA, en lien avec la profession de la sélection, a fortement investi dans la cartographie de QTL de résistance quantitative et le développement de marqueurs associés utilisables pour les sélectionneurs. Néanmoins ce travail n'a pas apporté d'information sur les mécanismes sous-jacents et leur diversité (Delourme *et al.*, 2006).

Les analyses de résistance quantitative à *L. maculans* ont, pour beaucoup, porté sur la variété Jet Neuf, puis Darmor qui possède un bon niveau de résistance adulte à *L. maculans*. Par des croisements avec des variétés plus sensibles telles que Yudal ou Samouraï, plusieurs QTL ont été ainsi identifiés (Tableau 5). L'estimation de la sévérité de la maladie est basée sur un index de gravité de la nécrose du collet, appelé indice G2. Sur deux années successives, Pilet *et al.* (1998) ont pu ainsi identifier 13 QTL dans le croisement "Darmor-bzh x Yudal", dont quatre étaient stables d'une année à l'autre. La comparaison de différentes études (Jestin *et al.*, 2011; Pilet *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2001) a montré qu'il existe à la fois des QTL de 'Darmor' relativement stables selon les croisements ('Darmor-bzh' x 'Yudal'; 'Darmor' x 'Samourai' ; 'Darmor' x 'Bristol') et des QTL de résistance spécifiques aux différentes populations étudiées. Les QTL de résistance proviennent majoritairement du parent résistant, Darmor, mais dans quelques cas ils peuvent également provenir des parents sensibles (Jestin *et al.*, 2012; Pilet *et al.*, 2001).

Tableau 5: Récapitulatif des analyses QTL pour la résistance quantitative du colza à la nécrose du collet

Localisation QTL (d)	Pilet et al. (1998, 2001) + Détection QTL Thèse (a)						Kaur et al. (2009) (b)		Généétique d'association (c)		
	DY	DS	AB	CB	DB	GB	Consensus	Position connue	Position inconnue	Colocalisation	Autre position
A1.1	oui							SW		non	oui
A1.2									CnW	non	
A2.1										oui (limite)	non
A2.2									SW	non	oui
A3										non	non
A4										non	non
A5.1										non	non
A5.2										non	non
A6.1										oui	
A6.2										non	non
A6.3										non	oui
A6.4										non	non
A7										non	oui
A8										oui	oui
A9.1										oui (limite)	
A9.2									RS	non	non
A9.3										non	non
A10									CbW - CnW	non	non
C1.1								SW		non	non
C1.2										oui	non
C1.3										non	non
C2.1										oui	non
C2.2										oui	non
C3.1										non	non
C3.2										oui (limite)	non
C4.1										non	non
C4.2										oui	non
C4.3										oui	non
C5.1										oui	non
C5.2										non	non
C6										oui	non
C7								CmW		non	oui
C8.1									CbW	non	non
C8.2										non	non
C9										non	oui

QTL commun à plusieurs fonds génétiques

QTL spécifique d'un fonds génétique détecté une seule année

QTL spécifique d'un fonds génétique détecté sur plusieurs années

Région génétique partielle ou absente du croisement - Cette comparaison n'a pas été réalisée pour Kaur et al. (2009).

- (a) Nom des populations de cartographie: 'Darmor-bzh' x 'Yudal'(DY); 'Darmor' x 'Samourai' (DS); 'Aviso' x 'Bristol' (AB); 'Canberra' x 'Bristol' (CB); 'Darmor' x 'Bristol' (DB); 'Grizzly' x 'Bristol' (GB);
- (b) Etude de Kaur *et al.* (2009) avec 'Sapphire' x 'Westar' (SW); 'Canberra' x 'Westar' (CbW); 'Caiman' x 'Westar' (CnW); 'Rainbow' x 'Sapphire' (RS). Les marqueurs communs avec les cartes génétiques obtenus par Jestin *et al.* (2011) et Pilet *et al.* (1998 et 2001) ont permis de localiser certains QTL sur la carte DY; la localisation de certains QTL était impossible sur certains groupes de liaisons et notée "Position inconnue".
- (c) Les marqueurs associés à la résistance à la nécrose du collet qui sont localisés dans ou à la limite de l'intervalle de confiance des QTL sont indiqués par "oui" ou "limite", respectivement.
- (d) Régions génomiques où au moins un QTL de résistance a été identifié par génétique d'association ou analyse de liaison. (Tiré de la thèse C. Jestin, 2010)

Différentes analyses ont montré que la résistance quantitative à *L. maculans* avait un haut degré d'héritabilité (Huang *et al.*, 2016; Jestin *et al.*, 2011; Pilet *et al.*, 2001). L'environnement peut cependant avoir une influence sur la détection des QTL. Une autre analyse du croisement "Darmor-bzh x Yudal" sur 5 années et sur 5 sites distincts (3 au Rheu, France, et 2 à Rothamsted, UK) a permis d'identifier des QTL distincts selon les différents environnements (Huang *et al.*, 2016). La température en particulier a une grande influence sur leur détection. Sur les 17 QTL identifiés, 6 seulement sont stables dans les différentes conditions.

D'après ces données, les différentes composantes de la résistance quantitative semblent variables et fortement dépendantes de l'environnement, même pour des expériences indépendantes sur les descendances des mêmes croisements. Il est par ailleurs probable que la résistance quantitative soit multiple dans son expression et dans la manière dont elle agit pour limiter le développement de la nécrose du collet, et que différents génotypes de colza peuvent apporter différents éléments de résistance ne fonctionnant pas de la même façon et/ou n'ayant pas les mêmes effets. Ainsi, elle agirait à différents stades du processus de colonisation du champignon dans la plante. En comparant deux variétés de colza avec résistance quantitative (Darmor) et sans (Eurol), Huang *et al.* (2009) ont constaté que la résistance quantitative n'avait pas d'impact sur le nombre et la vitesse d'apparition des macules foliaires, ni dans la vitesse de progression de *L. maculans* dans le pétiole. Cependant le champignon colonisait de façon moins importante la tige de Darmor que celle d'Eurol, en conditions contrôlées, confirmant le comportement au champ avec une nécrose au collet beaucoup moins importante. Dans ce cas, les différences de résistance quantitative entre Darmor et Eurol ne concerneraient que la colonisation des tiges. Mais en comparant deux descendants du croisement 'Darmor-bzh' x 'Yudal', ayant respectivement un haut ou faible niveau résistance quantitative, Huang *et al.* (2014) ont observé que la résistance quantitative agissait à plusieurs stades d'infection. Dans le génotype avec un bon niveau de résistance quantitative, la vitesse de progression de *L. maculans* était impactée à la fois dans le pétiole et dans la tige, résultant dans une apparition retardée et moins importante de la nécrose du collet. Cet exemple illustre l'hypothèse que différents QTL de résistance à *L. maculans* peuvent donc agir à différents stades de développement du champignon et de son cycle parasitaire dans différents génotypes de colza. Cependant les mécanismes et déterminismes sous-jacents à cette résistance restent encore inconnus.

7.4.3. Durabilité de la résistance quantitative

Chez plusieurs pathosystèmes, des observations au champ ont montré que la résistance quantitative serait plus durable que la résistance spécifique (Niks *et al.*, 2015). Cette différence de durabilité serait liée à plusieurs facteurs. La résistance quantitative étant une résistance partielle, la pression de sélection exercée par cette dernière sur les populations de l'agent pathogène serait moins importante que celle exercée par une résistance spécifique. Par ailleurs, le caractère polygénique de la résistance quantitative compliquerait la faculté de l'agent pathogène à contourner les résistances. Ainsi une variété d'orge possédant un haut niveau de résistance quantitative à *Puccinia hordei*, est restée résistante pendant plusieurs dizaines d'années (Niks *et al.*, 2000). Cependant, plusieurs études ont également montré que, dans certains cas, des isolats pouvaient évoluer et devenir capables de contourner des résistances quantitatives. Par exemple, une étude sur le pathosystème *P. infestans*/pomme de terre a permis d'identifier des isolats devenus spécifiquement plus agressifs sur les variétés locales (Andrivon *et al.*, 2007). Le contournement de résistances quantitatives par des isolats spécifiques a été observé chez d'autres agents pathogènes tels que *Pyrenophora graminea* (Arru *et al.*, 2003) ou *M. oryzae* (Bonman, 1989). Ainsi certains auteurs suggèrent que certaines résistances quantitatives pourraient résulter de l'effet partiel ou résiduel de gènes majeurs de résistance plus ou moins contournés par les populations pathogènes. Cette hypothèse selon laquelle une résistance partielle peut être due, au moins en partie, à des relations de type gène-pour-gène a été formulée par Parlevliet and Zadoks (1977).

Par ailleurs, la combinaison de résistance quantitative et résistance spécifique permet d'augmenter la durabilité de cette dernière. Ainsi, une expérience au champ a montré que la résistance quantitative permet de prolonger la durabilité du gène de résistance *Rlm6* à *L. maculans* (Brun *et al.*, 2010). Cette découverte présente un intérêt opérationnel majeur dans un contexte de faible disponibilité de ressources génétiques diversifiées en termes de gènes *Rlm*.

La sélection de variétés combinant ces deux résistances est donc prioritaire pour assurer une durabilité optimale des gènes majeurs de résistance et cela demande de poursuivre les investigations à la fois sur les résistances spécifiques et quantitatives, notamment chez le colza pour la résistance à *L. maculans*. Il s'agit en particulier d'augmenter le "portefeuille" de gènes *Rlm* non contournés et de mieux comprendre les résistances quantitatives pour identifier celles qui seraient les moins soumises à érosion, comprendre leur déterminisme génétique et leur mode d'action et comprendre la façon dont elle agissent durant la colonisation systémique.

Tableau 6: Niveau d'expression de trois gènes d'avirulence de *Leptosphaeria maculans*

Conditions	<i>AvrLm1</i>	<i>AvrLm6</i>	<i>AvrLm4-7</i>
Germinating conidia	0.03%	0.02%	0.02%
Mycelial growth	0.49%	0.02%	0.88%
Infected cotyledons 3dpi	0.11%	0.04%	0.34%
Infected cotyledons 5dpi	1.20%	1.67%	37.11%
Infected cotyledons 7 dpi	58.26%	222.23%	274.07%
Infected cotyledons 12dpi	5.09%	27.43%	29.51%
Stem necrosis 60 dpi	0.92%	1.78%	3.56%

Expression relative par rapport au niveau d'expression de la tubuline

(Adapté de Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009)

8. Projet de thèse

Jusqu'ici la phase de colonisation du colza par *L. maculans* la plus étudiée et la plus connue était la première phase de colonisation, au stade cotylédon. Les gènes d'avirulence actuellement identifiés ne semblent être exprimés que lors de cette phase entre 5 et 9 jours après inoculation (Tableau 6). A l'inverse très peu d'informations sont disponibles concernant la phase de colonisation de la tige que ce soit du côté champignon ou du côté de la plante. La résistance au stade adulte, en particulier, est encore très mal comprise.

L'objectif de mon projet de thèse est d'explorer le dialogue moléculaire établi entre *L. maculans* et sa plante hôte *B. napus* pendant les phases tardives de l'infection, c'est-à-dire lors de la phase systémique biotrophe et endophyte, puis de la nécrose finale. La question posée est de savoir si, quand, et comment, un (des) programme(s) spécifique(s) d'expression génique et de sécrétion d'effecteurs du champignon est (sont) mis en œuvre pour permettre au champignon cette colonisation asymptomatique et l'expression tardive d'un symptôme nécrotique.

Une première hypothèse explorée au cours de ma thèse est que des effecteurs, différents de ceux exprimés lors de la colonisation des cotylédons, seraient spécifiquement exprimés lors de la colonisation de la tige de colza. Ces effecteurs permettraient au champignon de coloniser la plante de façon systémique et ainsi poursuivre son cycle infectieux jusqu'à la nécrose finale au collet. Il y aurait donc au moins deux vagues d'expression d'effecteurs lors de la colonisation du colza, comme cela a pu être observé chez d'autres agents phytopathogènes (p. 31): une première vague d'effecteurs, appelés "précoces", lors de la colonisation des cotylédons et une deuxième vague d'effecteurs dits "tardifs" lors de la colonisation de la tige.

Pour analyser en détail le dialogue moléculaire entre la plante et le champignon lors de la colonisation de la tige et pour identifier de potentiels effecteurs tardifs, j'ai réalisé des études transcriptomiques à différentes étapes clés du processus infectieux de *L. maculans*.

Une seconde hypothèse que j'ai étudiée est que les bases moléculaires de la résistance adulte pourraient s'expliquer en partie par des relations de type gène-pour-gène avec des effecteurs tardifs. Un des enjeux de cette thèse serait donc de mieux comprendre cette résistance adulte et d'identifier de nouvelles sources de résistance à *L. maculans* par l'analyse d'effecteurs tardifs.

Après l'introduction générale retraçant le contexte de cette étude et ses enjeux, ce manuscrit de thèse est constitué de trois chapitres écrits sous forme d'article dont je suis premier auteur:

Chapitre 1: Caractérisation du transcriptome tardif de *L. maculans*

Ce chapitre porte sur la caractérisation du transcriptome tardif de *L. maculans* issu d'analyses RNA-seq et démontre l'existence d'effecteurs spécifiquement exprimés lors de la colonisation de la tige et dont les caractéristiques sont décrites. Cette partie correspond à un article accepté et en prépublication dans *Molecular Plant Pathology* (Gervais *et al.*, 2016). Il est complété de données non publiées sur le transcriptome au champ, en condition d'infection naturelle et qui seront intégrées à une publication plus importante de métatranscriptomique.

Chapitre 2: Caractérisation des effecteurs tardifs

Cette partie porte sur la caractérisation fonctionnelle de cinq des effecteurs tardifs de *L. maculans*, identifiés dans le Chapitre 1, par des approches de "silencing" et d'expression transitoire dans le tabac. Ces résultats associés à l'analyse de leur profil d'expression, pendant toute une saison culturale, permet de mettre en évidence un lien entre les vagues d'effecteurs exprimé par le champignon et la transition de la phase biotrophe à nécrotrophe lors de la colonisation de la tige. L'influence de la résistance quantitative de la plante sur le profil d'expression des effecteurs est aussi suggérée dans ce chapitre. Cette partie est présentée sous la forme d'un article en cours de finalisation qui pourrait être soumis dans *New Phytologist*. Il est complété de données préliminaires concernant l'analyse d'un sixième effecteur tardif et de la recherche de cibles végétales des effecteurs tardifs.

Chapitre 3: Identification de nouvelles sources de résistances spécifiques aux effecteurs tardifs de *L. maculans*, une nouvelle approche

Pour pouvoir identifier à haut débit de potentielles relations gène-pour-gène avec ces effecteurs, j'ai réalisé des souches mutantes de *L. maculans* exprimant dès l'infection des cotylédons des effecteurs tardifs candidats. J'ai ensuite utilisé ces souches pour pouvoir cribler une large collection de génotypes de colza par test cotylédonnaire. Les résultats de cette approche sont présentés dans le chapitre 3, avec notamment l'identification d'une relation de type gène-pour-gène entre un effecteur tardif de *L. maculans* et un gène de colza. Cette partie est présentée sous forme d'un article préliminaire qui pourrait être publié dans *Plant Biotechnology*.

Ce manuscrit se clôt par une discussion générale focalisée sur cinq questionnements: (i) Le rôle des vagues d'expression génique, en particulier celles des effecteurs, de *L. maculans* dans la réalisation de

son cycle infectieux, (ii) la régulation des gènes codant des effecteurs tardifs et leur évolution, (iii) les bases de la résistance quantitative chez le colza, (iv) l'utilisation d'une nouvelle approche de criblage pour identifier de nouvelles sources de résistance et (v) l'utilisation de ces résistances pour lutter contre *L. maculans*.

Chapitre I:

Caractérisation du

transcriptome tardif

de *Leptosphaeria*

maculans

1. Introduction

Il a été montré chez de nombreux pathosystèmes que l'agent pathogène exprimait par vagues des sets de gènes codant pour des effecteurs candidats au cours de son cycle infectieux. Chez le pathosystème colza/*L. maculans*, très peu d'informations étaient disponibles concernant la phase de colonisation systémique, la majorité des études portant sur la phase de colonisation des cotylédons et sur les effecteurs exprimés à ce stade.

Nous avons émis l'hypothèse que durant la phase de colonisation systémique du colza par le champignon, ce dernier exprimerait des effecteurs, distincts de ceux de la phase de colonisation des cotylédons, qui lui permettraient de coloniser la tige de colza pendant plusieurs mois sans induire les défenses de la plante. Afin de tester cette hypothèse et de mieux comprendre la colonisation systémique, nous avons utilisé une approche transcriptomique, comparant des données d'expression fongiques entre la colonisation des cotylédons et de la tige.

Au début de ma thèse, un projet pilote de RNAseq avait déjà été lancé afin de valider notamment la faisabilité de cette approche et notre capacité à détecter suffisamment de transcrits fongiques par rapport à la quantité de transcrits végétaux dans les tissus de tige sans symptôme. Face à cette incertitude, le choix a été fait, dans ce projet pilote, d'étudier plusieurs type de tissus de tige infectées (la tige sans symptôme, les tissus sans symptôme des tiges nécrosées et les tissus nécrosés) afin de s'assurer de pouvoir détecter des transcrits fongiques, au détriment de réels répliquas biologiques qui ont été rassemblés au moment du séquençage.

Lors de ma première année de thèse, j'ai analysé de façon exhaustive le jeu de données RNA-seq issu de ce projet pilote et ainsi valider l'approche. J'ai pu identifier des sets d'effecteurs spécifiquement surexprimés lors de la colonisation des cotylédons, les effecteurs "précoces" et lors de la colonisation de la tige, les effecteurs "tardifs", et dont pour certains, le profil d'expression a été validé par qPCR.

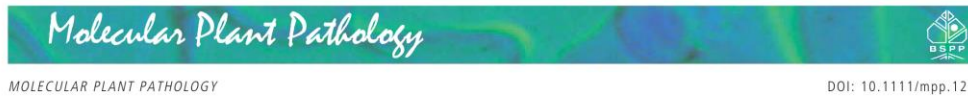
Par la suite, un plus vaste projet de transcriptomique (projet Leptolife) en collaboration avec le Genoscope et l'UMR INRA IGEPP a été lancé et qui incluait notamment des données de transcriptomiques avec plusieurs répliquas biologiques aux stades *in vitro*, cotylédonnaire et de tiges infectées sans symptômes. Ces résultats ont permis de compléter et de valider le projet pilote de RNAseq.

Les résultats issus de ces analyses transcriptomiques sont ici présentés sous la forme de l'article "Different waves of effector genes with contrasted genomic location are expressed by *Leptosphaeria maculans* during cotyledon and stem colonization of oilseed rape" qui a été publié dans la revue "Molecular Plant Pathology" en 2016.

Des analyses transcriptomiques complémentaires issues du projet Leptolife sur l'analyse du transcriptome tardif en condition d'infection naturelle et au champ sont présentées à la fin de ce chapitre.

Dans cette partie, j'ai réalisé les analyses transcriptomiques, l'identification des gènes candidats codant pour des effecteurs tardifs et les expériences de qRT-PCR afin de vérifier le profil d'expression obtenus par RNA-seq.

2. Article



Different waves of effector genes with contrasted genomic location are expressed by *Leptosphaeria maculans* during cotyledon and stem colonization of oilseed rape

JULIE GERVAIS¹, CLÉMENCE PLISSONNEAU¹, JULIETTE LINGLIN¹, MICHEL MEYER¹, KARINE LABADIE², CORINNE CRUAUD², ISABELLE FUDAL¹, THIERRY ROUXEL¹ AND MARIE-HÉLÈNE BALESSENT^{1,*}

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

²CEA-Institut de Génomique, GENOSCOPE, Centre National de Séquençage, Evry Cedex, France

SUMMARY

Leptosphaeria maculans, the causal agent of stem canker disease, colonizes oilseed rape (*Brassica napus*) in two stages: a short and early colonization stage corresponding to cotyledon or leaf colonization, and a late colonization stage during which the fungus colonizes systemically and symptomlessly the plant during several months before stem canker appears. To date, the determinants of the late colonization stage are poorly understood; *L. maculans* may either successfully escape plant defences, leading to stem canker development, or the plant may develop an 'adult-stage' resistance reducing canker incidence. To obtain an insight into these determinants, we performed an RNA-sequencing (RNA-seq) pilot project comparing fungal gene expression in infected cotyledons and in symptomless or necrotic stems. Despite the low fraction of fungal material in infected stems, sufficient fungal transcripts were detected and a large number of fungal genes were expressed, thus validating the feasibility of the approach. Our analysis showed that all avirulence genes previously identified are under-expressed during stem colonization compared with cotyledon colonization. A validation RNA-seq experiment was then performed to investigate the expression of candidate effector genes during systemic colonization. Three hundred and seven 'late' effector candidates, under-expressed in the early colonization stage and over-expressed in the infected stems, were identified. Finally, our analysis revealed a link between the regulation of expression of effectors and their genomic location: the 'late' effector candidates, putatively involved in systemic colonization, are located in gene-rich genomic regions, whereas the 'early' effector genes, over-expressed in the early colonization stage, are located in gene-poor regions of the genome.

Keywords: *Brassica napus*, effector waves, isochores, *Leptosphaeria maculans*, RNA sequencing, transcriptomics.

*Correspondence: Email: mhb@versailles.inra.fr

INTRODUCTION

The understanding of plant pathogens and their infection cycle is critical to the efficient control of plant diseases. However, this is a great challenge as phytopathogens, especially fungal pathogens, may have complex life cycles, different host plants or different feeding strategies. The high diversity of fungal life cycles and of the interactions of fungi with their host plants, but also with their environment, necessitates a large transcriptional plasticity and the ability to set up in time different unrelated pathogenic programmes.

During infection, plant pathogens produce an arsenal of molecules to favour the infection process and to successfully colonize the host. Among these, effectors are able to prevent the recognition by the host plant, to interfere with plant defence pathways or to modify the host cell physiology (Lo Presti *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Secreted proteins, often small (<300 amino acids) and cysteine-rich, secondary metabolites or small RNAs, have been identified to act as effectors (de Jonge *et al.*, 2011; Lo Presti *et al.*, 2015). During an infection cycle, distinct expression patterns of effectors have been observed, depending on the infection stage and the infection structure. In *Colletotrichum higginsianum*, specific sets of effectors are expressed in appressoria prior to penetration, in the subsequent biotrophic phase and in the final necrotrophic stage (Kleemann *et al.*, 2012). Waves of effectors at different infection stages and in different tissues have also been observed in other fungi, such as *Puccinia striiformis*, *Melampsora larici-populina*, *Zymoseptoria tritici* and *Magnaporthe oryzae* (Cantu *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2015; Hacquard *et al.*, 2012; Mirzadi Gohari *et al.*, 2015). In the oomycete *Phytophthora sojae*, the two observed waves of effectors have antagonistic effects: the first wave, expressed even before infection, is involved in cell death suppression, whereas the second wave triggers cell death (Wang *et al.*, 2011).

Leptosphaeria maculans is a fungal pathogen of Brassicaceae, responsible for the most important disease of oilseed rape (*Brassica napus*): phoma stem canker disease, also termed blackleg.

This fungus is spread across Europe, America and Australia (Fitt *et al.*, 2006), causing over US\$900 million losses per year (Fitt *et al.*, 2008). *Leptosphaeria maculans* has an especially complex life and pathogenic cycle which makes it a relevant model to study the setting up of developmental programmes. Its life cycle encompasses a saprophytic stage, two biotrophic stages, including an endophytic life cycle in tissues, and two necrotrophic stages. Surviving on stem residues during its saprophytic stage, the fungus produces sexual spores (ascospores). The resulting spores that land on the aerial organs of plants germinate and the hyphae penetrate leaves and cotyledons through stomata. Once in the leaves, the fungus has a short biotrophic stage of 5–15 days during which it colonizes the apoplast of plant tissues (Fitt *et al.*, 2006). Then, the fungus switches to necrotrophy and causes leaf spots (Rouxel and Balesdent, 2005). Following this primary leaf infection, *L. maculans* progresses in the stem tissues from the leaves to the crown during a long endophytic systemic colonization (Hammond *et al.*, 1985; Huang *et al.*, 2014; Rouxel and Balesdent, 2005). The colonization is completely symptomless and may last up to 9 months in winter oilseed rape (West *et al.*, 2001). Following this stage, *L. maculans* shifts to necrotrophy again, leading to the damaging stem canker responsible for plant lodging. To date, we have virtually no information on the *L. maculans* and *B. napus* determinants operating during this exceptionally long symptomless colonization of the stem.

The *L. maculans* genome is structured into equilibrated and low GC-content blocks, called GC-isochores (51.0% GC; average size, 70.4 kb) and AT-isochores (33.9% GC; average size, 38.6 kb), respectively (Rouxel *et al.*, 2011). GC-isochores are rich in housekeeping genes and poor in transposable elements, whereas AT-isochores have heterochromatin characteristics, being gene poor, enriched in transposable elements and showing a low rate of recombination. AT-isochores were found to be enriched in genes encoding effector candidates, i.e. genes coding for small secreted proteins and with low expression *in vitro* and high expression *in planta* at 7 and 14 days post-inoculation (dpi) in cotyledons (Rouxel *et al.*, 2011; Soyer *et al.*, 2014). The expression of these effector candidates is under a chromatin-based control: the silencing of two genes involved in heterochromatin assembly and maintenance, *LmHP1* and *LmDIM5*, leads to de-repression *in vitro* of effectors located in AT-isochores (Soyer *et al.*, 2014). It has been hypothesized that, during leaf infection, AT-isochores switch from a heterochromatin status to a euchromatin status, enabling a concerted expression of effector genes present in AT-isochores.

The seven cloned avirulence genes of *L. maculans* (*AvrLm1*, *AvrLm2*, *AvrLm3*, *AvrLm4-7*, *AvrLmJ1*, *AvrLm6* and *AvrLm11*) (Balesdent *et al.*, 2013; Fudal *et al.*, 2007; Ghanbarnia *et al.*, 2014; Gout *et al.*, 2006; Parlange *et al.*, 2009; Plissonneau *et al.*, 2015; Van de Wouw *et al.*, 2014) and the candidate effector gene

LmCys2 (Fudal *et al.*, 2007) are part of this set of genes strongly expressed in the first stages of plant infection and located in AT-isochores. *AvrLm1*, *AvrLm6* and *AvrLm4-7* show reduced expression at the stem necrosis stage (Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009). In addition to the effector candidate genes located in AT-isochores, numerous effector candidates (529) are predicted to be located in GC-isochores and are not differentially expressed in the early infection stage, questioning their effector function (Rouxel *et al.*, 2011). These data also question which effectors, if any, are produced during the long endophytic life and stem canker development and what can be their regulation. In particular, we postulate that effectors are also necessary for the endophytic stage, allowing the fungus to remain unnoticed during many months within plant tissues.

With both *L. maculans* (Rouxel *et al.*, 2011) and *B. napus* (Chalhoub *et al.*, 2014) genomes being available, the objective of our study was to test this hypothesis by deciphering the fungal molecular determinants mobilized during systemic colonization and by identifying candidate effectors specific to this infection stage. For this purpose, we first performed an RNA sequencing (RNA-seq) pilot project to characterize the expression profile of *L. maculans* genes during interaction with *B. napus* at the infection stages corresponding to endophytic stem colonization and the development of stem necrosis. Following the validation of this approach, we explored, through a validation RNA-seq experiment and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR), the genes over-expressed during the systemic colonization stage, mainly focusing on effector candidates.

RESULTS

A pilot RNA-seq project demonstrates that fungal transcripts can be detected in symptomless infected stems

The first question to be raised was whether or not we would be able to detect sufficient fungal transcripts in infected stems to conduct an RNA-seq analysis. For this purpose, we performed an RNA-seq pilot project at two key steps of the infection cycle: the early and late colonization stages (Fig. 1). The early colonization stage corresponded to primary infection following inoculation of cotyledons with three isolates (NzT4, G06-E107 and the reference isolate JN3). Samples, termed infected cotyledons (ICs), were collected at 7 dpi for RNA extraction. The late colonization stage corresponded to stems submitted to systemic colonization following petiole inoculation with JN3. Stem samples were collected at 24 dpi. Not knowing whether we would be able to detect fungal transcript in symptomless stem tissues, we extracted RNA from three different types of infected stem tissue: infected but symptomless stem tissue (S), necrotic stem tissue (N) and tissues located in advance of necrosis, below necrosis stem tissue (BN) (Fig. 1).

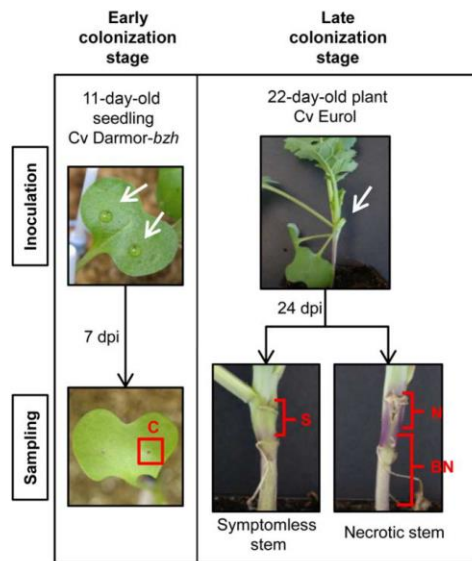


Fig. 1 Samples used for the pilot RNA-sequencing (RNA-seq) project. Inoculations were performed on wounded cotyledons to analyse the transcriptome of the early colonization stage. The tissues of infected cotyledons (C) around the wounds were sampled at 7 days post-inoculation (dpi). Samples corresponding to the late infection stage were obtained as follows: inoculations were performed on the wounded petiole of the second leaf and three different tissues were sampled: (i) 1 cm of stem starting from the inoculated petiole insertion for symptomless stem tissue (S); (ii) the necrotic stem tissue (N) for necrotic stems; and (iii) the tissue in advance of necrosis, the below necrosis stem tissue (BN), in which visible symptoms were not expressed. Controls consisted of tissue samples from plants inoculated with water. The white arrows indicate inoculation sites.

RNA-seq produced between 64 and 189 million reads per library (Table 1), more than 83% of which mapped to the *B. napus* genome. Whatever the infection conditions and tissues, almost one-half of the 101 040 predicted genes of *B. napus* were expressed (Table 1). In ICs, between 5% and 15% of the reads mapped to the *L. maculans* genome, with a similar number of genes (approximately 9000 genes) expressed by each of the three isolates. In necrotic stem tissues, 8.13% of the reads mapped to the *L. maculans* genome (Table 1). The proportion of reads corresponding to fungal genes was much lower in symptomless tissues of stems, with only 0.66% and 0.86% of reads mapping to *L. maculans* in S stems and BN stem tissues, respectively. Despite this low percentage of fungal transcripts, more than 5000 fungal genes were found to be expressed in these tissues (39.6% of the 12 613 predicted genes).

The expression levels of fungal genes across the different colonization stages were visualized in the form of a heat map (Fig. 2).

When focusing on genes showing differential patterns in the different infection conditions, two main categories of expression pattern were discriminated (Fig. 2). The first pool encompassed genes over-expressed in cotyledons and repressed in all stem tissues. The second pool of genes contained genes with no or low expression in ICs, but with high expression in stem tissues. Most (60%) of the genes over-expressed in stems were over-expressed in all three different infected stem tissues (Fig. 2). Among the genes differentially expressed in the different conditions, we also searched for effector candidates, i.e. secreted proteins, and identified 66 'early' (including the seven cloned avirulence genes, Fig. 2B) and 175 'late' effector candidates produced in the early and late colonization stages, respectively.

The RNA-seq approach was thus feasible and informative, even in the symptomless stem tissues. Furthermore, different effector candidates were expressed during cotyledon and stem colonization.

Different waves of effector expression take place in early and late colonization stages

To validate these data, we conducted an independent RNA-seq project focused on the symptomless stem colonization. In this validation RNA-seq project, three conditions were compared: symptomless ICs (at 7 dpi), early symptomless stem colonization (at 14 dpi) and an *in vitro* growth condition. Two independent biological replicates were sequenced per condition. For this project, we chose the closely related sister isolate of JN3, JN2 (also termed v23.1.2), showing a consistently higher level of aggressiveness on oilseed rape compared with JN3 (M. H. Balesdent, unpublished data). Most of the *L. maculans* predicted genes (approximately 10 800) were expressed in axenic culture (Table 2). The numbers of reads in inoculated cotyledons and stems were comparable with those of the pilot project. The percentages of reads mapping to the *L. maculans* genome in inoculated symptomless stems were also very low (0.52% and 0.31%), but more than 3000 fungal genes were expressed. This was slightly lower than the RNA-seq pilot project, as the validation RNA-seq analysis was performed at an earlier stem colonization stage (14 dpi) compared with the pilot project (24 dpi) to exclude genes involved in the development of stem necrosis.

The heat map (Fig. 3) showed more complex patterns of gene expression because of the inclusion of the axenic growth condition, with a high reproducibility in gene expression patterns between the two biological replicates of each tested condition. Four main patterns were observed: the first encompassed genes specifically over-expressed during the early colonization stages, i.e. over-expressed in cotyledons compared with stem and *in vitro* conditions (pattern B in Fig. 3). This group of 725 differentially expressed genes ($P < 0.05$) comprised all known avirulence genes. In the pilot RNA-seq project, known avirulence genes were

Table 1 Mapping characteristics of RNA-sequencing (RNA-seq) reads to the reference genomes of *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans* in the pilot RNA-seq project.

Condition	Total no. of reads	Reads mapped on the <i>B. napus</i> genome (no./%)		Reads mapped on the <i>L. maculans</i> genome (no./%)		No. of <i>B. napus</i> expressed genes*	No. of <i>L. maculans</i> expressed genes*
Non-inoculated cotyledons	8.40E+07	8.25E+07	(98%)	6.72E+03	(0.01%)	54 825	9
Non-inoculated stems	8.15E+07	7.97E+07	(98%)	8.51E+03	(0.01%)	58 655	20
Inoculated cotyledons with NzT4 isolate	8.05E+07	6.75E+07	(84%)	1.16E+07	(14.37%)	54 598	9175
Inoculated cotyledons with G06-E107 isolate	1.07E+08	8.85E+07	(83%)	1.62E+07	(15.18%)	57 303	9395
Inoculated cotyledons with JN3 isolate	1.89E+08	1.76E+08	(93%)	1.03E+07	(5.42%)	59 849	9185
Symptomless ST†	9.08E+07	8.78E+07	(97%)	5.98E+05	(0.66%)	59 688	5875
Below necrosis ST†	6.42E+07	6.22E+07	(97%)	5.55E+05	(0.86%)	57 943	5611
Necrotic ST†	7.72E+07	6.93E+07	(90%)	6.28E+06	(8.13%)	57 483	9211

*Genes were considered to be expressed when more than 10 unique gene reads were mapped on a reference genome.

†ST, stem tissue inoculated with JN3 isolate at 24 days post-inoculation.

not only under-expressed in symptomless stems, but also in necrotic stem tissues and BN tissues (Fig. 2B), thus confirming that *L. maculans* avirulence genes are over-expressed only at the onset of cotyledon colonization, but under-expressed during systemic colonization of the stem and during the stem necrosis stage. The second pattern encompassed genes over-expressed during the late colonization stages, i.e. over-expressed in stems compared with cotyledon and *in vitro* conditions (pattern C in Fig. 3); 1050 genes were found in this group ($P < 0.05$). Despite the use of different isolates in the two projects, the expression levels of the 'early' and 'late' genes observed in this validation RNA-seq project correlated at 79.5% with those observed in the pilot RNA-seq project ($P < 2.2E-16$) (Fig. 4). In addition to these two patterns, we also identified genes specifically under-expressed in stems (pattern A in Fig. 3) or cotyledons (pattern D in Fig. 3) compared with axenic growth. Being especially focused on the identification of effectors involved in late oilseed rape colonization, the genes whose expression is repressed during plant infection were not investigated further here. The top 50 most expressed genes in early and late colonization stages are listed in Table S2 (see Supporting Information).

Effector candidates were then searched for in these pools of 'early' and 'late' genes. Compared with previously published analyses (Rouxel *et al.*, 2011), the criteria for the selection of effector gene candidates were slightly modified. Here, the effector genes were selected based on their ability to be secreted, i.e. with a predicted signal peptide, without glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor or additional transmembrane domain, but no additional filter according to the protein size or cysteine content was applied.

According to these criteria, the genome of *L. maculans* contained 1741 genes (13.8%) predicted to be secreted. In the set of 725 genes over-expressed in cotyledons and under-expressed in stem tissues, we identified 139 early effector candidates (19%). Of the 1050 genes putatively involved in the late colonization stages, 307 secreted proteins (29%) were considered as late effector candidates. The transcriptome was thus strongly enriched in genes encoding for secreted proteins during both the early and late colonization stages of oilseed rape ($P < 1.28E-04$). Among the early and late effector candidates identified in the RNA-seq pilot project, 79% and 65%, respectively, were common to this validation RNA-seq experiment.

Characterization of the early and late colonization stages

Using BLAST2GO, we searched for gene ontologies (GO) characteristic of the early and late colonization stages. Only 23% of 'early' genes and 10% of 'late' genes had a predicted GO with a significant enrichment ($P < 0.05$) compared with the whole genome (Fig. 5). Comparison of the two stages, however, indicated the set-up of distinct strategies during the early and late colonization stages. In early colonization, we observed significant enrichments in translation processes and trafficking towards the membrane (Fig. 5A). Twenty-one of the top 50 genes over-expressed in early colonization were associated with translation processes (Table S2). Twenty-five hypothetical or predicted genes were among the top 50 genes, as well as five avirulence genes, *AvrLm3*, *AvrLm4-7*, *AvrLmJ1*, *AvrLm6* and *AvrLm11*. Similar to early expressed genes,

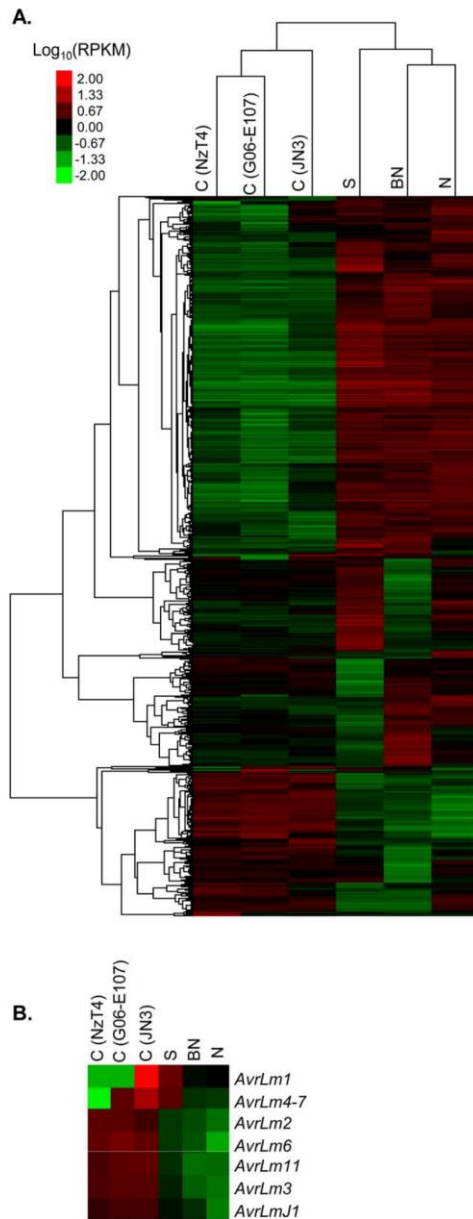


Fig. 2 Heat map of *Leptosphaeria maculans* genes differentially expressed between early and late colonization stages in the pilot RNA-sequencing (RNA-seq) project. (A) Expression values were measured in infected cotyledons (IC, denoted as 'C') inoculated with three different *L. maculans* isolates (NzT4, G06-E107 or JN3) and stems inoculated with JN3. Following stem inoculation, three types of tissue were collected: symptomless stem tissue (S), below necrosis stem tissue (BN) and necrotic stem tissue (N). (B) Focus on known avirulence genes of *L. maculans*. Note that *AvrLm1* and *AvrLm4-7* are absent or inactivated in the genomes of the isolates NzT4 and G06-E107. The differential expression patterns were based on the \log_{10} (RPKM) measured across all six conditions. The heat map was obtained with GeneCluster3.0 and visualized with TreeView. RPKM, reads per kilobase per million mapped reads.

colonization (Fig. 5B). Secreted proteins involved in the extracellular region were also significantly enriched during late colonization. Twenty-nine of the top 50 genes were associated with these GO categories (Table S2).

Despite the absence of filtering based on protein size and cysteine content, the secreted proteins expressed during early or late colonization stages shared common characteristics with previously described early effectors expressed during cotyledon colonization. (i) Their size was significantly smaller than those of all predicted proteins of *L. maculans*: the mean sizes for early and late effector candidates were 372 amino acids ($P = 5.5E-06$) and 384 amino acids ($P = 3.1E-10$), respectively, vs. 479 amino acids for all predicted proteins of *L. maculans*. (ii) They were also richer in cysteines: 2.4% ($P = 3.9E-07$) and 2.0% ($P = 3.3E-03$) for early and late candidates, respectively, vs. 1.7% in the whole proteome. (iii) There was no predicted function for 61% and 50% of the early and late effector candidates, respectively; 19% early and 17% late candidates displayed no significant homology (E-value < $1E-10$) with other species. In the top 50 genes over-expressed during the early colonization stage, 56% of the genes without predicted function showed no significant homology with other organisms, whereas, in the late colonization stage, only 29% of the genes without predicted function showed no significant homology with other organisms (Table S2).

qRT-PCR validation of late effector expression patterns

The RNA-seq experiments enabled us to identify candidate effector genes specifically over-expressed during stem colonization (Fig. 4). We validated the expression profiles for 11 selected late effectors by qRT-PCR. These genes were chosen from the most highly expressed genes during stem colonization (Fig. 4, Table S2). Two genes encoding for avirulence effectors involved in early colonization (*AvrLm3* and *AvrLm4-7*) and two genes whose expression varied little in the RNA-seq experiment (ribosomal protein S30A and H^+ /ATPase) were also included as controls. The expression of ribosomal protein S30A and H^+ /ATPase genes did not differ by more than factors of 7 and 2, respectively, across the

around 50% of the top 50 most highly over-expressed genes in late colonization were classified as hypothetical or predicted genes. However, the GO enrichment analysis showed a significant enrichment in oxidoreductase and hydrolase activities during late

Table 2 Mapping characteristics of RNA-sequencing (RNA-seq) reads to the reference genomes of *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans* in the validation RNA-seq experiment.

Condition*	Replicate	Total no. of reads	Reads mapped on the <i>B. napus</i> genome (no./%)		Reads mapped on the <i>L. maculans</i> genome (no./%)		No. of <i>B. napus</i> expressed genes†	No. of <i>L. maculans</i> expressed genes†
Mycelium <i>in vitro</i>	1	4.11E+07	4.29E+03	(0.01%)	4.00E+07	(97.35%)	4	10 775
Mycelium <i>in vitro</i>	2	4.57E+07	4.74E+03	(0.01%)	4.45E+07	(97.36%)	3	10 944
Non-inoculated cotyledons	1	1.40E+08	1.27E+08	(90.98%)	1.52E+03	(0.00%)	52 288	0
Non-inoculated cotyledons	2	1.77E+08	1.62E+08	(91.31%)	1.78E+04	(0.01%)	54 441	52
Inoculated cotyledons	1	1.56E+08	1.30E+08	(83.36%)	1.28E+07	(8.16%)	54 391	9315
Inoculated cotyledons	2	1.77E+08	1.38E+08	(78.29%)	2.41E+07	(13.67%)	54 591	9683
Non-inoculated stems	1	1.88E+08	1.41E+08	(75.23%)	2.08E+03	(0.00%)	57 982	1
Non-inoculated stems	2	1.38E+08	1.26E+08	(91.68%)	1.32E+03	(0.00%)	57 177	0
Inoculated stems	1	1.69E+08	1.55E+08	(91.85%)	8.72E+05	(0.52%)	58 997	5209
Inoculated stems	2	1.35E+08	1.23E+08	(91.47%)	4.21E+05	(0.31%)	58 259	3059

*Isolate JN2 was used in both *in planta* and *in vitro* conditions. *In planta* conditions correspond to cotyledons and stem tissue at 7 and 14 days post-inoculation, respectively.

†Genes were considered to be expressed when more than 10 unique gene reads were mapped on a reference genome.

different infected tissues (Fig. 6). The low level of expression in cotyledons and the over-expression in infected stems at 24 dpi was confirmed for all the 11 late effector candidates tested. Conversely, the known avirulence genes, *AvrLm3* and *AvrLm4-7*, were found to be highly expressed in cotyledons and expressed at a low level in stems (Fig. 6). RNA-seq data were thus validated by qRT-PCR experiments for the 15 genes investigated.

Late effector and early effector candidates do not share the same genomic location and regulation of expression

We analysed the genomic location of the 307 late effector candidate genes compared with the 139 early effector candidate genes (Table 3). As described previously (Rouxel *et al.*, 2011), AT-isochores were significantly enriched in early effector candidate genes (χ^2 test, $P=9.6E-11$) (Table 3). In contrast, nearly all late effector candidate genes were located in GC-isochores and there was no enrichment of late effector candidates in AT-isochores. In contrast, only three late effector candidate genes were found in AT-isochores, and they were not the most highly expressed compared with other late effector candidates [mean RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) in infected stems <200]. In addition, late and early candidate effector genes displayed the same GC content as their genomic environment: late effectors located in GC-isochores were GC-equilibrated (>51% GC), whereas the early effectors located in AT-isochores were impoverished in GC (<45% GC) (Rouxel *et al.*, 2011).

To further explore the impact of the different genomic locations of early and late effector genes, we investigated the impact of chromatin structure modification on the expression of effector candidates. AT-isochores are heterochromatin-like regions, whereas GC-isochores are postulated to mostly correspond to

euchromatin. *Leptosphaeria maculans* transformants in which *LmHP1* and *LmDIM5* expression was silenced have been generated previously, and gene expression in the transformants compared with that in the wild-type was analysed with oligo-arrays (Soyer *et al.*, 2014). From this data, we evaluated the impact of the silencing of *LmHP1* and *LmDIM5* on the expression of early and late effector candidates (Table 4). In axenic culture, the silencing of *LmHP1* and *LmDIM5* had no impact on the expression of most of the late effector candidates (Table 4). In contrast, 38% and 19% of the early effector genes localized in the AT-isochore were de-repressed in siLmHP1 and siLmDIM5, respectively.

DISCUSSION

Transcriptomic analyses of microorganism–plant interactions are usually performed on infected leaves (Garnica *et al.*, 2013; Haquard *et al.*, 2012, 2013; de Jonge *et al.*, 2012; Kawahara *et al.*, 2012; Kleemann *et al.*, 2012; Mirzadi Gohari *et al.*, 2015), root knobs (Haegeman *et al.*, 2013) or nodules (Boscari *et al.*, 2013). In such tissues, transcripts of the microorganism are usually sufficient for detection and analysis. However, in the infected stem and, in particular, in the symptomless stem of oilseed rape plants, the host biomass is much more important than that of *L. maculans* and we were unsure whether or not it would be possible to detect significant levels of fungal transcripts. In other pathosystems, the difficulty of obtaining sufficient pathogen reads has been overcome through the use of different strategies. For example, transcriptomic analyses of *Candida albicans*, a pathogen of mammals, were achieved with specific amplification of fungal reads after whole RNA extraction (Thewes *et al.*, 2007), or additional extraction of fungal RNAs from infected hosts (Amorim-Vaz *et al.*, 2015). During *Arabidopsis thaliana* infection by *Dickeya dadantii*, transcriptomic analyses required the purification of bacterial cells

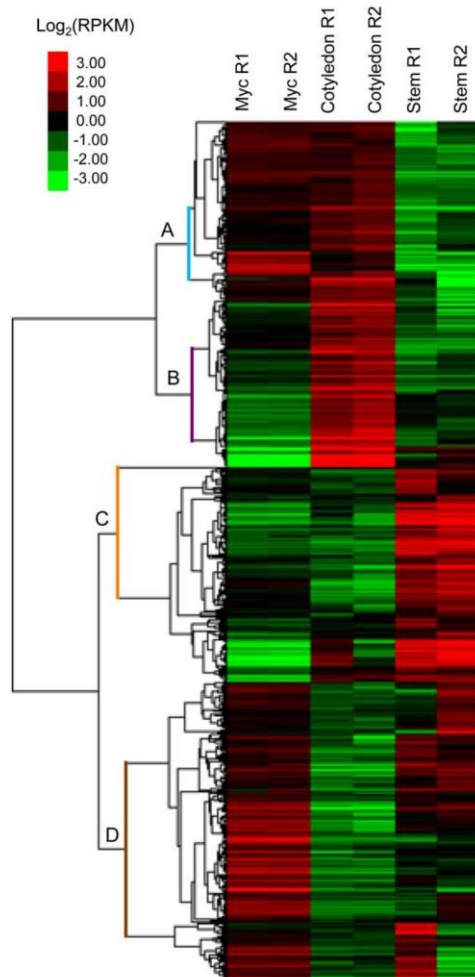


Fig. 3 Heat map of *Leptosphaeria maculans* genes differentially expressed ($P < 0.05$) *in vitro* (Myc) and during early (Cotyledon) and late (Stem) colonization in the second (validation) RNA-sequencing (RNA-seq) experiment. The differential expression patterns were based on the $\log_2(\text{RPKM})$ measured across all six conditions. The heat map was obtained with GeneCluster3.0 and visualized with TreeView. Two independent biological replicates (R1 and R2) are displayed for each condition. RPKM, reads per kilobase per million mapped reads.

from infected leaf tissues (Chapelle *et al.*, 2015). In the pilot RNA-seq experiment reported here, we managed to detect the expression of up to 47% of *L. maculans* predicted genes during stages of tissue colonization, even when only 0.66% of reads corresponded to the fungus; no specific enrichment strategy had to be

applied to detect more fungal transcripts. The validation RNA-seq experiment performed at an even earlier stage of systemic colonization (14 dpi) also confirmed that this approach is achievable and reliable in infected plant tissues, such as stems, even without visible symptoms. Last, the sensitivity and accuracy of RNA-seq analysis were confirmed by qRT-PCR analysis for 15 selected genes. This opens up the possibility for a better understanding of the determinants of systemic colonization of oilseed rape by *L. maculans* and of the molecular dialogue taking place between the plant and the fungus during the lengthy colonization of plant tissues.

Without being exhaustive, as it only focused on two discrete stages of plant colonization, our analysis identified one main general feature of the *L. maculans* pathogenic cycle: early effectors (some of which act as avirulence determinants) are expressed in the early stage of cotyledon infection, whereas different candidate effectors, with structural features similar to those of early effectors, are specifically produced during stem colonization and show kinetics of expression, genomic location and mode of regulation distinct from that of early effectors. We thus identified at least two main waves of effector expression in early colonization and during systemic colonization with novel putative effectors for functional studies. In addition to these two waves, the RNA-seq pilot project also hinted at the existence of late effector candidates specifically expressed in necrotic stems or in advance of necrotic stem tissues. Of the 1739 predicted secreted proteins of the *L. maculans* genome, some may also be involved in particular infection stages not studied here, such as the progression of the fungus in the petiole. We also identified genes specifically under-expressed during either cotyledon or stem colonization compared with axenic growth. This indicates that there is now a need for more extensive RNA-seq analysis of the pathogen life cycle to obtain a more detailed knowledge of the genes mobilized throughout the *L. maculans* life cycle and their regulation.

One of the particularities of the *L. maculans* life cycle is the length of its systemic colonization during which no symptoms are visible and which can last for several months. In other hemibiotrophic or biotrophic fungal pathogens of annual crops, such as *Z. tritici*, *Cladosporium fulvum*, *Colletotrichum* spp. or *M. oryzae*, the asymptomatic biotrophic phase does not exceed 2 weeks (McDonald *et al.*, 2015; Münch *et al.*, 2008; Wilson and Talbot, 2009; de Wit *et al.*, 2012). In other examples, *Monilophthora roreri* and *Monilophthora perniciosa*, the biotrophic stage can last 3–6 weeks after infection, during which the fungi manage to avoid plant defences (Meinhardt *et al.*, 2014). The systemic colonization of *L. maculans* is one of the longest observed in fungal pathogens of annual crops, and resembles the lifestyle of some endophytes, such as *Epichloë* species. The RNA-seq approach allowed us to identify 307 candidate effectors specific to the late colonization stages, expressed during stem infection. These effectors, like early

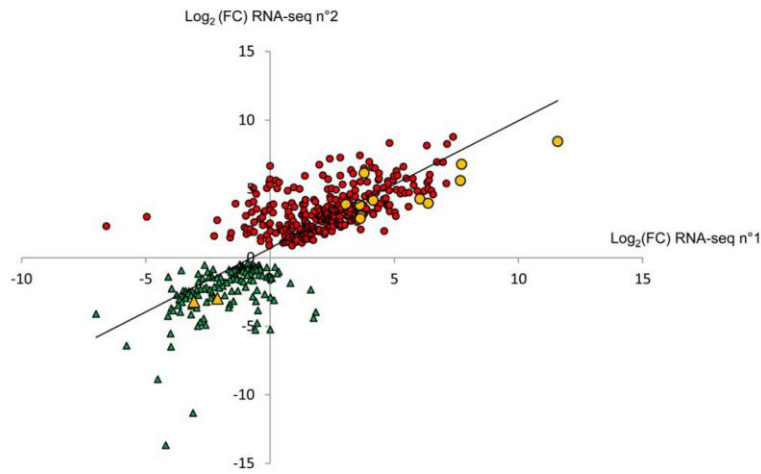


Fig. 4 Comparison of expression values of 'early' and 'late' genes identified in the pilot RNA-sequencing (RNA-seq n°1) and in the validation RNA-sequencing (RNA-seq n°2) project. The fold change (FC) corresponds to the ratio between the expression value in symptomless stem tissues and that in infected cotyledons in each of the RNA-seq experiments. The circles and triangles represent the genes over-expressed in stems and under-expressed in cotyledons, and the genes over-expressed in cotyledons and under-expressed in stems, respectively. The yellow symbols correspond to genes selected for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) validation.

effectors (Rouxel *et al.*, 2011), are small cysteine-rich secreted proteins, although no filter based on size or cysteine content was applied to identify them. Their expression pattern is clearly different from that of early effectors. The first waves of effector expression during the early colonization stages have been described by Haddadi *et al.* (2015) and Lowe *et al.* (2014). Our data are consistent with these findings, as approximately 70% of the genes or effectors found to be over-expressed in cotyledons in these studies were also found here to be over-expressed during cotyledon colonization (Fig. S1, see Supporting Information). The remaining 30% of genes not found in common could be expressed at one of the other stages of cotyledon colonization studied by Haddadi *et al.* (2015) or be isolate specific: for example, isolate IBCN18 used by Lowe *et al.* (2014) differs from isolate JN2 by the presence/absence of at least six of the currently known avirulence genes (Balesdent *et al.*, 2002, 2005).

Comparing the few genes with GO annotation, we identified distinct GO enrichments between cotyledon and stem infection. In the early colonization stages, *L. maculans* had a high transcriptional activity related to trafficking towards membranes, indicating strong interactions with its host. Increased expression of genes involved in membrane trafficking at very early stages of plant infection have been described in other models, such as *M. oryzae* (Oh *et al.*, 2008). We can speculate that, after germination on cotyledons, the fungus redirects transcriptional reprogramming towards the expression of the secreted proteins necessary for the first steps of pathogenicity. Lowe *et al.* (2014) also identified three genes encoding cytochrome P450 among the 20 most up-regulated genes during early cotyledon colonization, which were not found in our study. During systemic colonization, we observed GO enrichments corresponding to plant cell wall degradation or

modification. As also observed by Lowe *et al.* (2014), the enrichment in the expression of CAZy genes is not found in the early colonization step and could be specific to the systemic colonization stage. It is likely to allow the fungus to take up nutrients or to facilitate progression into the stem. We also observed GO enrichment corresponding to secreted proteins and chitin binding, which probably contribute to the evasion of plant defence responses (de Jonge *et al.*, 2011). The oxido-reduction GO group was also enriched during systemic colonization and may contribute to avoid the accumulation of reactive oxygen species produced by the plant, as has been suggested during symptomless leaf colonization of wheat by *Z. tritici* (Yang *et al.*, 2015).

The duration of *B. napus* colonization by *L. maculans*, from cotyledon colonization to the appearance of necrosis in the stem, suggests a tight regulation of effector expression. One main result of our RNA-seq analysis is that effector genes involved in early cotyledon colonization and in symptomless stem colonization do not share the same genomic compartment. The AT-isochores act as a niche for *L. maculans* early effector genes expressed in cotyledons at 7 and 14 dpi (Haddadi *et al.*, 2015; Rouxel *et al.*, 2011; this study), whereas late effectors expressed during symptomless stem colonization are mainly located in GC-isochores. Soyer *et al.* (2014) hypothesized that the environmental shift induced on leaf infection causes, through an as yet unknown signalling mechanism, a modification in the epigenetic status of AT-isochores towards euchromatin status, thus enabling the concerted expression of the early effector genes located in AT-isochores. Contrary to its effect on early effector gene expression, the silencing of *HP1* or *DIM5*, two genes involved in heterochromatin maintenance, has no effect on the de-repression of late effector candidate genes *in vitro*, which is consistent with their location in GC-isochores.

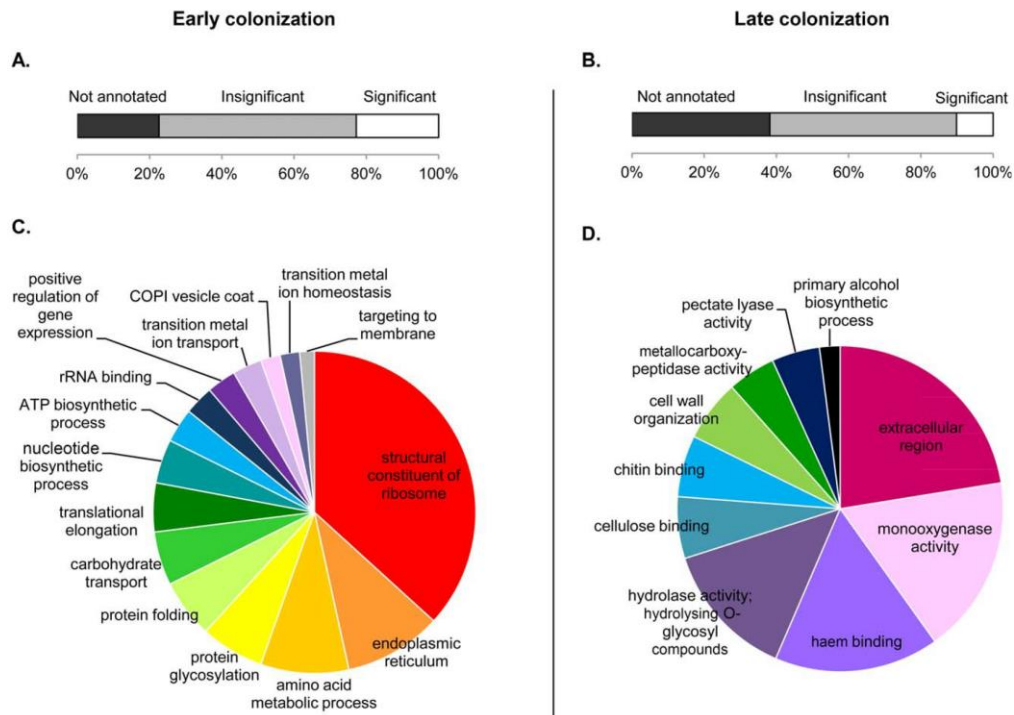


Fig. 5 Gene ontology (GO) enrichment analysis of the *Leptosphaeria maculans* genes over-expressed in early (cotyledon) (A, C) and late (stem) (B, D) colonization stages compared with the whole genome. Genes were separated into three classes (A, B): genes with no annotated GO (in black), those with insignificant enrichment GO compared with the whole genome (in grey) and those with significant enrichment (in white). Only significantly enriched GO categories are represented [false discovery rate (FDR) < 0.05] (C, D). This analysis was performed with Blast2GO.

The specific location of late effectors in GC-isochores is thus also consistent with their absence of contribution to the primary wave of effector gene expression. However, it also suggests (an)other regulatory system(s) to control the expression of late effectors, several weeks or months after primary infection.

The avirulence genes *AvrLm1*, *AvrLm6* and *AvrLm4-7* are over-expressed in the early infection stage and under-expressed during the expression of stem necrosis (Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009) and during systemic colonization (this study). The same expression pattern is found here for all other cloned avirulence genes. With the identification of new effector genes probably involved in systemic colonization, we hypothesize that major resistance genes may exist and may be involved in the recognition of the pathogen and subsequent effector-triggered immunity (ETI) in the late colonization stages, without interfering with the first steps of fungal colonization and with leaf spot development. The next hypothesis to address will be as follows: that adult resistance may not be based only on the quantitative effect of several plant

genes, but may also involve resistance genes operating according to the gene-for-gene model at a later stage of infection. If they exist, they are putative targets of interest for a better understanding of adult-stage resistance, the identification of novel resistance genes and the initiation of novel breeding strategies based on marker development or cloning of these new *R* genes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Fungal and plant materials

RNA-seq analyses of infected plants were performed using mostly the reference cultivar *Darmor-bzh* (Chalhoub *et al.*, 2014). In addition, for the RNA-seq pilot project, the cultivar *Eurol* was used for late colonization conditions.

In the RNA-seq pilot project, three different strains were used: G06-E107, NzT4 and JN3. In the validation RNA-seq experiment, the isolate JN2 was used. The isolate G06-E107 is a field isolate obtained from leaf lesions in 2006 on cv. *Exagone* (Daverdin *et al.*, 2012). The isolate NzT4 is

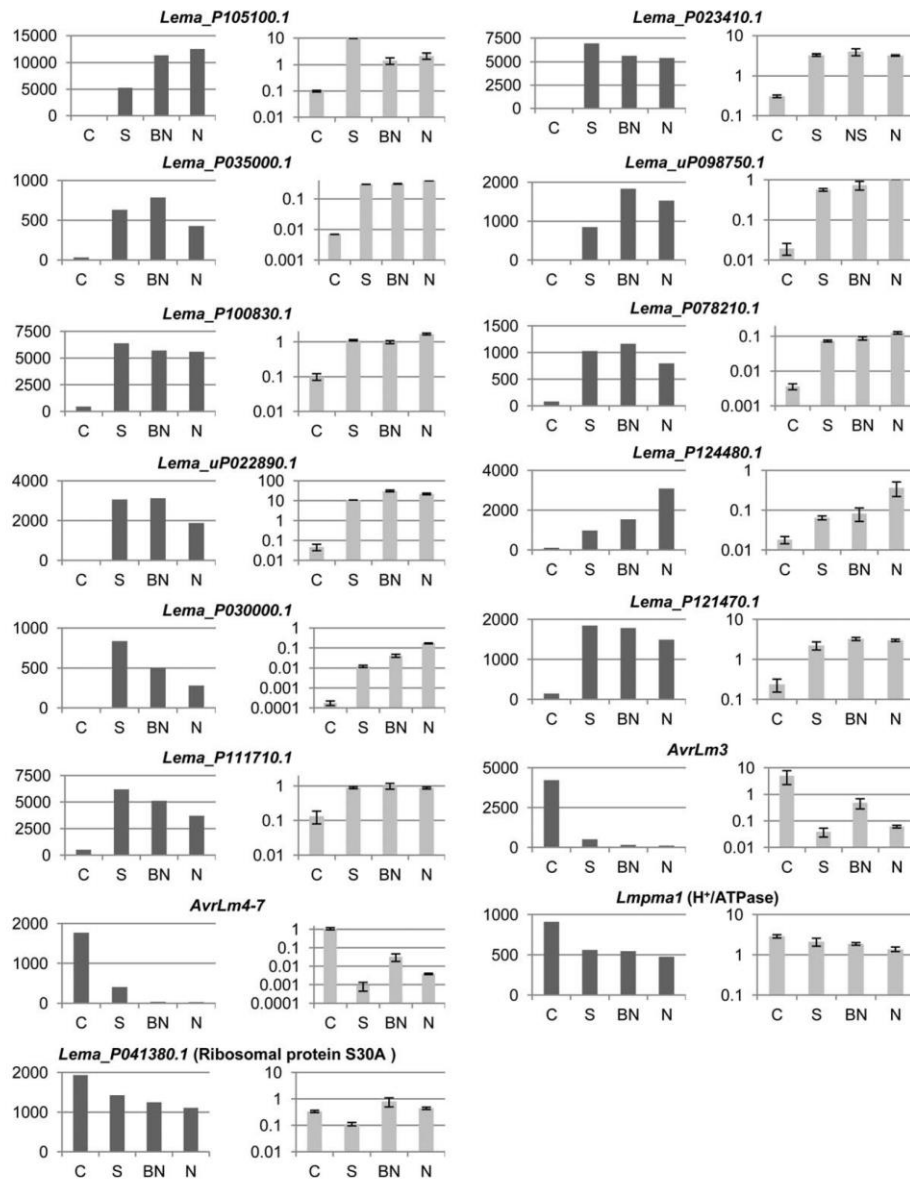


Fig. 6 Validation of the RNA-sequencing (RNA-seq) experiment by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) for 15 genes, including 11 late effector candidates. The expression level in RNA-seq data is represented by the RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) value indicated in dark grey. In qRT-PCR experiments, the mean expression normalized with actin is represented in light grey. The expression levels were measured in infected cotyledons (C, denoted as 'C'), in infected symptomless stem (S), in below necrosis stem tissue (BN) and in necrotic tissue (N) of infected stem. Error bars represent the standard error for two biological and three technical replicates.

Table 3 Genomic location of *Leptosphaeria maculans* genes over-expressed at early (cotyledon infection) or late (stem infection) colonization stages.

	Secreted proteins*				Non-secreted proteins			
	Total number	GC-isochores† (%)	Borders‡ (%)	AT-isochores§ (%)	Total number	GC-isochores† (%)	Borders‡ (%)	AT-isochores§ (%)
All predicted genes	1741	90.1	6.4	3.6	10 944	95.9	3.3	0.8
Genes over-expressed during early colonization	139	77.0	7.9	15.1	586	94.7	3.6	1.7
Genes over-expressed during late colonization	307	92.8	6.2	1.0	743	96.2	3.4	0.4

*Proteins with no predicted transmembrane signal, no glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and with a secretion signal were considered as secreted proteins.

†GC isochores: genomic blocks with equilibrated GC content (Rouxel *et al.*, 2011).

‡Borders: transition regions (859 ± 385 bp) between AT- and GC-isochores.

§AT-isochores: genomic blocks with low GC content.

a field isolate originating from New Zealand and obtained from a *B. napus rapifera* cultivar (Balesdent *et al.*, 2005). The sequenced isolate JN3 (v23.1.3) (Rouxel *et al.*, 2011) and the isolate JN2 (v23.1.2) are sister isolates from *in vitro* crosses between European field isolates (Balesdent *et al.*, 2001). All four isolates are virulent towards Darmor-*bzh* and Eurol. Fungal cultures were maintained, and sporulating cultures and conidia production were obtained, as described previously (Ansan-Melayah *et al.*, 1995). For transcriptomic analysis on axenic cultures of JN2, minimal medium MMII was inoculated with 1 mL of a conidial suspension at 10⁸ spores/mL. It was grown for 3 days at 28°C with shaking at 100 rpm.

Plant inoculations

Cotyledons of 10-day-old seedlings of Darmor-*bzh* were puncture inoculated with 10 µL of inoculum (10⁷ pycnidiospores/mL), as described by

Balesdent *et al.* (2001). Inoculations were performed with isolates G06-E107, NzT4, JN3 or JN2. Seven days after inoculation, at a time of intense tissue colonization without expression of macroscopic symptoms, a 0.25-cm² area centred on the puncture was cut, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction.

For the analysis of stem colonization, plants were inoculated at the three-leaf developmental stage, 22 days after sowing. The petiole of the second leaf was cut at 1 cm from the leaf insertion (pilot RNA-seq experiment) or just under the leaf blade (validation RNA-seq experiment), and 10 µL of inoculum (10⁷ pycnidiospores/mL) were placed over the wound. Inoculated plants were incubated in the dark for 48 h at room temperature under saturated humidity, and then transferred to a growth chamber at 16°C (night) and 24°C (day) with a 12-h photoperiod.

In the pilot RNA-seq project, 24 days after inoculation, plants were divided into two groups, depending on whether or not symptoms (stem

Table 4 Percentage of *Leptosphaeria maculans* effector candidates up-regulated or down-regulated *in vitro* in a silenced-*LmHP1* or silenced-*LmDIM5* background, according to their genomic location.

Effector category	Genomic location	Total no. of genes	Over-expressed in siLmHP1‡ (%)	Repressed in siLmHP1‡ (%)	Over-expressed in siLmDIM5‡ (%)	Repressed in siLmDIM5‡ (%)
Early effector candidates*	GC-isochores§	107	4	2	3	6
	Borders¶	11	18	9	9	27
	AT-isochores**	21	38	5	14	5
Late effector candidates†	GC-isochores§	285	2	5	4	7
	Borders¶	19	5	21	0	32
	AT-isochores**	3	0	0	0	0

*Early effectors refer to effector genes showing a peak of expression during cotyledon infection (7 days post inoculation) and no or low expression during stem colonization and *in vitro*.

†Late effectors refer to effector genes showing no or low expression during cotyledon infection and *in vitro*, and peaks of expression during stem colonization.

‡The expression level is measured in *in vitro* conditions and compared with that of the wild-type isolate. Both *LmHP1* and *LmDIM5* silencing have been shown previously to impact on the heterochromatic structure of AT-isochores in *L. maculans* (Soyer *et al.*, 2014).

§GC-isochores, genomic blocks with equilibrated GC content (Rouxel *et al.*, 2011).

¶Border, transition regions (859 ± 385 bp) between AT- and GC-isochores.

**AT-isochores, genomic blocks with low GC content (Rouxel *et al.*, 2011).

necrosis) were visible. For stems without visible symptoms, 1 cm of the stem was sampled at the inoculated petiole insertion (Fig. 1). For stems with necrotic symptoms, the necrotic tissues and tissues in advance of necrosis, i.e. between the necrosis and stem base, were sampled separately. In the validation RNA-seq experiment, 14 days after inoculation, 1 cm of the stem was sampled at the inoculated petiole insertion, before symptoms were visible. Eight different stem slices were pooled before extraction. Two independent replicates (corresponding to two distinct inoculation assays with different batches of spore suspension) were performed, extracted and sequenced separately. In both projects, plants inoculated with water were used as a negative control.

RNA manipulation and qRT-PCR

Total RNA extraction and qRT-PCR were performed as described by Fudal *et al.* (2007).

For the qRT-PCR experiments, all RNA samples were adjusted to 3 µg of RNA and single-strand cDNA was generated using oligo-dT primed reverse transcription with PowerScript Reverse Transcriptase (Clontech, Palo Alto, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Water and uninfected plants were used as negative controls. For each condition, three technical replicates from two biological repeats were performed. The qRT-PCR primers used are indicated in Table S3 (see Supporting Information). Ct values were analysed as described by Muller *et al.* (2002). Actin was used as a constitutive reference gene and EF1- α expression relative to actin was used as a control.

RNA sequencing

In the pilot RNA-seq project, RNAs from two biological replicates with five plants per replicate were pooled for each condition. The cDNA libraries and 50-bp single read sequencing were performed by the Beijing Genomics Institute (BGI, Shenzhen, China) using Illumina HiSeq2000.

In the validation RNA-seq experiment, RNAs from two independent biological replicates were prepared for each tested condition (early symptomless cotyledon infection, symptomless stem infection or *in vitro* growth). cDNA libraries and 100-bp paired-read sequencing were performed by Genoscope (Evry, France) using Illumina HiSeq2500.

RNA analysis

RNA-seq analyses were performed with the CLC Genomics Workbench v7.5.1 (Qiagen, Venlo, the Netherlands). Reads were mapped on the reference genomes of *B. napus* (Chalhoub *et al.*, 2014) and *L. maculans* (JN3) (Rouxel *et al.*, 2011).

Gene expression was measured using RPKM values (Mortazavi *et al.*, 2008), which were used to cluster the fungal genes based on their expression level across the different infection stages. The data were visualized in the form of a heat map. Gene expression was normalized and differentially expressed genes were detected ($P < 0.05$) using DESeq2 (Love *et al.*, 2014).

Gene ontology predictions were performed with BLAST2GO v3.0.9. Annotation enrichment analyses were performed with Fisher's exact test, using a false discovery rate (FDR) < 0.05 as a filter.

Genes were clustered based on their expression level with Gene Cluster 3.0 by average linkage (de Hoon *et al.*, 2004). Only genes with

differential expression ($\log_{10}(\text{RPKM} + 1) \geq 1$ in at least one condition, and $\text{Max}[\log_{10}(\text{RPKM} + 1)] - \text{Min}[\log_{10}(\text{RPKM} + 1)] \geq 1$ across the different conditions) were clustered. Clusters were visualized with Java Treeview (Saldanha, 2004).

The presence of a secretion signal was predicted with SignalP 4.1 and TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2007). Transmembrane helix predictions in proteins were performed with TMHMM 2.0. GPI anchor predictions were performed with PredGPI (Pierleoni *et al.*, 2008) and with big-PI Predictor. Statistical analyses were performed with R (R Core Team, 2015).

Accession number of RNA-seq data

GSE81756 (in Gene Expression Omnibus database).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Bertrand Auclair (INRA BIOGER) for plant management and Régine Delourme (INRA, UMR IGEPP) for *Brassica napus* Darmor-bzh seeds. J.G. was funded by a joint grant from the Santé des Plantes et Environnement (SPE) INRA department and the Institute Terres Inovia (formerly CETIOM). Cotyledon RNA-seq experiments were funded by grants from the ONEMA-CTPS ('ICOSCOP' project) and the INRA-SMaCh Metaprogram 'K-Masstec'. The validation RNA-seq experiment was funded by France Génomique ('LEPTOLIFE' project).

REFERENCES

- Amorim-Vaz, S., Tran, V.D.T., Pradervand, S., Pagni, M., Coste, A.T. and Sanglard, D. (2015) RNA enrichment method for quantitative transcriptional analysis of pathogens *in vivo* applied to the fungus *Candida albicans*. *mBio*, 6, e00942–e00915.
- Ansan-Melayah, D., Balesdent, M.H., Buée, M. and Rouxel, T. (1995) Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*, 85, 1525–1529.
- Balesdent, M.H., Attard, A., Ansan-Melayah, D., Delourme, R., Renard, M. and Rouxel, T. (2001) Genetic control and host range of avirulence toward *Brassica napus* cultivars Quinta and Jet Neuf in *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*, 91, 70–76.
- 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., Barbetti, M.J., Li, H., Sivasithamparam, K., Gout, L. and Rouxel, T. (2005) Analysis of *Leptosphaeria maculans* race structure in a worldwide collection of isolates. *Phytopathology*, 95, 1061–1071.
- Balesdent, M.H., Fudal, I., Ollivier, B., Bally, P., Grandaubert, J., Eber, F., Chèvre, A.M., Leflon, M. and Rouxel, T. (2013) The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytol.* 198, 887–898.
- Boscardi, A., del Giudice, J., Ferrarini, A., Venturini, L., Zaffini, A.L., Delledonne, M. and Puppo, A. (2013) Expression dynamics of the *Medicago truncatula* transcriptome during the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*: which role for nitric oxide? *Plant Physiol.* 161, 425–439.
- Cantu, D., Segovia, V., MacLean, D., Bayles, R., Chen, X., Kamoun, S., Dubcovsky, J., Saunders, D.G. and Uauy, C. (2013) Genome analyses of the wheat yellow (stripe) rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* reveal polymorphic and haustorial expressed secreted proteins as candidate effectors. *BMC Genomics*, 14, 270.
- Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I.A.P., Tang, H., Wang, X., Chiquet, J., Belcram, H., Tong, C., Samans, B., Corrêa, M., Silva, C.D., Just, J., Falentin, C., Koh, C.S., Clainche, I.L., Bernard, M., Bento, P., Noel, B., Labadie, K., Alberti, A., Charles, M., Arnaud, D., Guo, H., Daviaud, C., Alamery, S., Jabbari, K., Zhao, M., Edger, P.P., Chelaifa, H., Tack, D., Lassalle, G., Mestiri, I., Schnel, N., Paslier, M.C.L., Fan, G., Renault, V., Bayer, P.E., Golitz, A.A., Manoli, S., Lee, T.H., Thi, V.H.D., Chalabi, S., Hu, Q., Fan, C., Tollenaere, R., Lu, Y., Battail, C., Shen, J., Sidebottom, C.H.D.,

- Wang, X., Canaguier, A., Chauveau, A., Bérard, A., Deniot, G., Guan, M., Liu, Z., Sun, F., Lim, Y.P., Lyons, E., Town, C.D., Bancroft, I., Wang, X., Meng, J., Ma, J., Pires, J.C., King, G.J., Brunel, D., Delourme, R., Renard, M., Aury, J.M., Adams, K.L., Batley, J., Snowdon, R.J., Tost, J., Edwards, D., Zhou, Y., Hua, W., Sharpe, A.G., Paterson, A.H., Guan, C. and Wincker, P. (2014) Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science*, **345**, 950–953.
- Chapelle, E., Alunni, B., Malfatti, P., Solier, L., Pédrón, J., Kraepiel, Y. and Van Gijsegem, F. (2015) A straightforward and reliable method for bacterial in planta transcriptomics: application to the *Dickeya dadantii* / *Arabidopsis thaliana* pathosystem. *Plant J.* **82**, 352–362.
- 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.
- Dong, Y., Li, Y., Zhao, M., Jing, M., Liu, X., Liu, M., Guo, X., Zhang, X., Chen, Y., Liu, Y., Liu, Y., Ye, W., Zhang, H., Wang, Y., Zheng, X., Wang, P. and Zhang, Z. (2015) Global genome and transcriptome analyses of *Magnaporthe oryzae* epidemic isolate 98-06 uncover novel effectors and pathogenicity-related genes, revealing gene gain and loss dynamics in genome evolution. *PLoS Pathog.* **11**, e1004801.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., Heijne, G. and von Nielsen, H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* **2**, 953–971.
- 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.
- Fitt, B.D.L., Hu, B.C., Li, Z.Q., Liu, S.Y., Lange, R.M., Kharbanda, P.D., Butterworth, M.H. and White, R.P. (2008) Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China; costs and benefits. *Plant Pathol.* **57**, 652–664.
- 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.* **20**, 459–470.
- Garnica, D.P., Upadhyaya, N.M., Dodds, P.N. and Rathjen, J.P. (2013) Strategies for wheat stripe rust pathogenicity identified by transcriptome sequencing. *PLoS One*, **8**, e67150.
- Ghanbaria, K., Fudal, I., Larkan, N.J., Links, M.G., Balesdent, M.H., Profotova, B., Fernando, W.G.D., Rouxel, T. and Borhan, M.H. (2014) 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, 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.
- Hacquard, S., Joly, D.L., Lin, Y.C., Tisserant, E., Feau, N., Delaruelle, C., Legué, V., Kohler, A., Tanguay, P., Petre, B., Frey, P., Van de Peer, Y., Rouzé, P., Martin, F., Hamelin, R.C. and Duplessis, S. (2012) A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (Poplar Leaf Rust). *Mol. Plant–Microbe Interact.* **25**, 279–293.
- Hacquard, S., Kracher, B., Maekawa, T., Vernaldi, S., Schulze-Lefert, P. and van Themaat, E.V.L. (2013) Mosaic genome structure of the barley powdery mildew pathogen and conservation of transcriptional programs in divergent hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, E2219–E2228.
- Haddadi, P., Ma, L., Wang, H. and Borhan, M.H. (2015) Genome-wide transcriptome analyses provide insights into the lifestyle transition and effector repertoire of *Leptosphaeria maculans* during colonization of *B. napus* seedlings. *Mol. Plant Pathol.* DOI: 10.1111/mpp.12356.
- Haegeman, A., Bauters, L., Kyndt, T., Rahman, M.M. and Gheysen, G. (2013) Identification of candidate effector genes in the transcriptome of the rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *Mol. Plant Pathol.* **14**, 379–390.
- Hammond, K.E., Lewis, B.G. and Musa, T.M. (1985) A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathol.* **34**, 557–565.
- de Hoon, M.J.L., Imoto, S., Nolan, J. and Miyano, S. (2004) Open source clustering software. *Bioinformatics*, **20**, 1453–1454.
- Huang, Y.J., Qi, A., King, G.J. and Fitt, B.D.L. (2014) Assessing quantitative resistance against *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) in young plants. *PLoS One*, **9**, e84924.
- Kawahara, Y., Oono, Y., Kanamori, H., Matsumoto, T., Itoh, T. and Minami, E. (2012) Simultaneous RNA-seq analysis of a mixed transcriptome of rice and blast fungus interaction. *PLoS One*, **7**, e49423.
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L.J., Takahara, H., Neumann, U., van Themaat, E.V.L., van der Does, H.C., Hacquard, S., Stüber, K., Will, I., Schmalenbach, W., Schmelzer, E. and O'Connell, R.J. (2012) Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathog.* **8**, e1002643.
- de Jonge, R., Bolton, M.D. and Thomma, B.P. (2011) How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 400–406.
- de Jonge, R., Esse, H.P., van Maruthachalam, K., Bolton, M.D., Santhanam, P., Saber, M.K., Zhang, Z., Usami, T., Lievens, B., Subbarao, K.V. and Thomma, B.P.H.J. (2012) Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 5110–5115.
- Lo Presti, 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.
- Love, M.I., Huber, W. and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550.
- Lowe, R.G.T., Cassin, A., Grandaubert, J., Clark, B.L., Van de Wouw, A.P., Rouxel, T. and Howlett, B.J. (2014) Genomes and transcriptomes of partners in plant–fungal-interactions between canola (*Brassica napus*) and two *Leptosphaeria* species. *PLoS One*, **9**, e103098.
- McDonald, M.C., McDonald, B.A. and Solomon, P.S. (2015) Recent advances in the *Zymoseptoria tritici*–wheat interaction: insights from pathogenomics. *Front. Plant Sci.* **6**, 102.
- Meinhardt, L.W., Costa, G.G.L., Thomazella, D.P., Teixeira, P.J.P., Carazzolle, M.F., Schuster, S.C., Carlson, J.E., Gultinan, M.J., Mieczkowski, P., Farmer, A., Ramaraj, T., Crozier, J., Davis, R.E., Shao, J., Melnick, R.L., Pereira, G.A. and Bailey, B.A. (2014) Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Monilophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. *BMC Genomics*, **15**, 164.
- Mirzadi Gohari, A., Ware, S.B., Wittenberg, A.H.J., Mehrabi, R., Ben M'barek, S., Verstappen, E.C.P., van der Lee, T.A.J., Robert, O., Schouten, H.J., de Wit, P.P.J.G.M. and Kema, G.H.J. (2015) Effector discovery in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 931–945.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L. and Wold, B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods*, **5**, 621–628.
- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R. and Dobbie, Z. (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques*, **32**, 1372–1374. 1376, 1378–1379.
- Münch, S., Lingner, U., Floss, D.S., Ludwig, N., Sauer, N. and Deising, H.B. (2008) The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *J. Plant Physiol.* **165**, 41–51.
- Oh, Y., Donofrio, N., Pan, H., Coughlan, S., Brown, D.E., Meng, S., Mitchell, T. and Dean, R.A. (2008) Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Genome Biol.* **9**, R85.
- Parlange, F., Daverdin, G., Fudal, I., Kuhn, M.L., Balesdent, M.H., Blaise, F., Grezes-Beset, 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.
- Pierleoni, A., Martelli, P.L. and Casadio, R. (2008) PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics*, **9**, 392.
- Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I., Rouxel, T. and Balesdent, M.H. (2015) 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
- R Core Team (2015) *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>.
- 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., Grandaubert, J., Hane, J.K., Hoede, C., van de Wouw, A.P., Couloux, A., Dominguez, V., Anthouard, V., Bally, P., Bourras, S., Cozijnsen, A.J., Ciuffetti, L.M., Degrave, A., Dilmaghani, A., Duret, L., Fudal, I.,

- Goodwin, S.B., Gout, L., Glaser, N., Linglin, J., Kema, G.H.J., Lapalu, N., Lawrence, C.B., May, K., Meyer, M., Ollivier, B., Poulain, J., Schoch, C.L., Simon, A., Spatafora, J.W., Stachowiak, A., Turgeon, B.G., Tyler, B.M., Vincent, D., Weissenbach, J., Amselem, J., Quesneville, H., Oliver, R.P., Wincker, P., Balesdent, M.H. and Howlett, B.J. (2011) Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by repeat-induced point mutations. *Nat. Commun.* **2**, 202.
- Saldanha, A.J. (2004) Java Treeview—extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*, **20**, 3246–3248.
- Soyer, J.L., El Ghali, M., Glaser, N., Ollivier, B., Linglin, J., Grandaubert, J., Balesdent, M.H., Connolly, L.R., Freitag, M., Rouxel, T. and Fudal, I. (2014) Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genet.* **10**, e1004227.
- Thewes, S., Kretschmar, M., Park, H., Schaller, M., Filler, S.G. and Hube, B. (2007) *In vivo* and *ex vivo* comparative transcriptional profiling of invasive and non-invasive *Candida albicans* isolates identifies genes associated with tissue invasion. *Mol. Microbiol.* **63**, 1606–1628.
- Van de Wouw, A.P., Lowe, R.G.T., Elliott, C.E., Dubois, D.J. and Howlett, B.J. (2014) An avirulence gene, *AvrLm11*, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Mol. Plant Pathol.* **15**, 523–530.
- Wang, M., Weiberg, A. and Jin, H. (2015) Pathogen small RNAs: a new class of effectors for pathogen attacks. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 219–223.
- Wang, Q., Han, C., Ferreira, A.O., Yu, X., Ye, W., Tripathy, S., Kale, S.D., Gu, B., Sheng, Y., Sui, Y., Wang, X., Zhang, Z., Cheng, B., Dong, S., Shan, W., Zheng, X., Dou, D., Tyler, B.M. and Wang, Y. (2011) Transcriptional programming and functional interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR effector repertoire. *Plant Cell*, **23**, 2064–2086.
- 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.
- Wilson, R.A. and Talbot, N.J. (2009) Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 185–195.
- de Wit, P.J.G.M., van der Burgt, A., Ökmen, B., Stergiopoulos, I., Abd-El Salam, K.A., Aerts, A.L., Bahkali, A.H., Beenen, H.G., Chettri, P., Cox, M.P., Datema, E., de Vries, R.P., Dhillon, B., Ganley, A.R., Griffiths, S.A., Guo, Y., Hamelin, R.C., Henrissat, B., Kabir, M.S., Jashni, M.K., Kema, G., Klaubauf, S., Lapidus, A., Levasseur, A., Lindquist, E., Mehrabi, R., Ohm, R.A., Owen, T.J., Salamov, A., Schwelm, A., Schijlen, E., Sun, H., van den Burg, H.A., van Ham, R.C.H.J., Zhang, S., Goodwin, S.B., Grigoriev, I.V., Collemare, J. and Bradshaw, R.E. (2012) The genomes of the fungal plant pathogens *Cladosporium fulvum* and *Dothistroma septosporum* reveal adaptation to different hosts and lifestyles but also signatures of common ancestry. *PLoS Genet.* **8**, e1003088.
- Yang, F., Li, W., Derbyshire, M., Larsen, M.R., Rudd, J.J. and Palmisano, G. (2015) Unraveling incompatibility between wheat and the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici* through apoplastic proteomics. *BMC Genomics*, **16**, 362.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website:

Fig. S1 Comparison of *Leptosphaeria maculans* genes identified as over-expressed during cotyledon colonization in different studies (Haddadi *et al.*, 2015; Lowe *et al.*, 2014) with the 'early' gene pool identified here. The early gene pool corresponds to genes up-regulated in cotyledons [at 7 days post-inoculation (dpi)] compared with stem colonization and *in vitro* conditions. Lowe *et al.* (2014) identified the 100 genes most highly up-regulated in cotyledons at 7 dpi compared with *in vitro* conditions. Haddadi *et al.* (2015) identified 80 small secreted protein (SSP) encoding genes differentially expressed during cotyledon colonization at 2, 4, 6 and 8 dpi compared with *in vitro* conditions.

Table S1 List of *Leptosphaeria maculans* genes showing more than 10 reads mapped in non-infected controls and excluded from subsequent analyses in the RNA-sequencing pilot project.

Table S2 Top 50 most expressed genes in early and late colonization stages, identified in the validation RNA-sequencing project.

Table S3 Primers used for validation of RNA-sequencing data by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR).

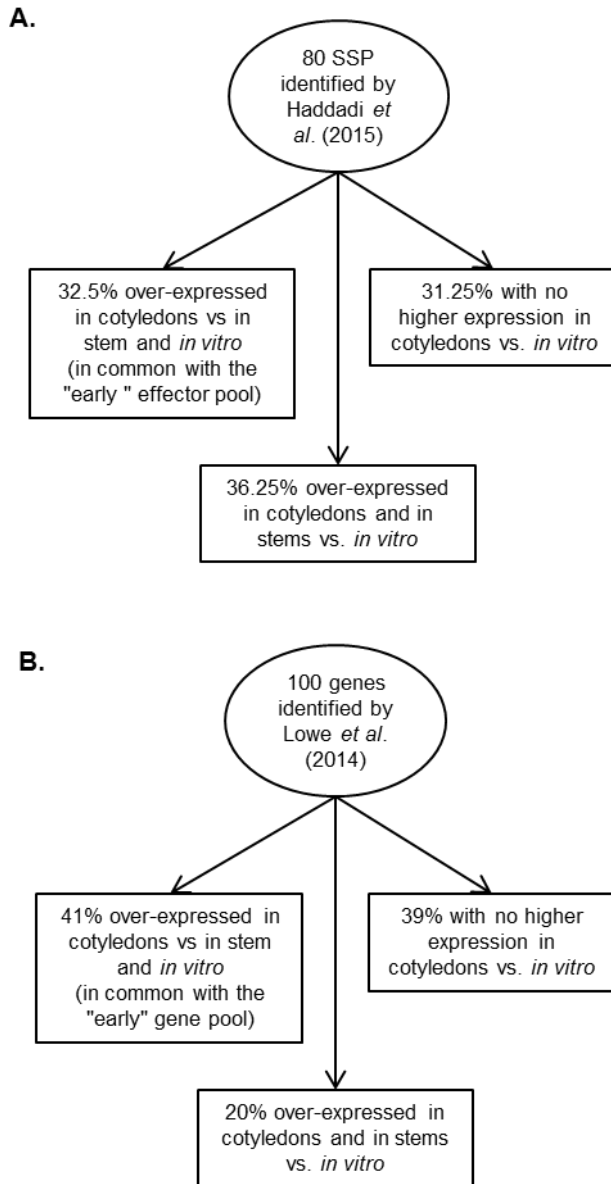


Fig. S1 Comparison of *Leptosphaeria maculans* genes identified as over-expressed during cotyledon colonisation in different studies (Haddadi et al., 2015; Lowe et al., 2014) with the “early” gene pool identified here. The early gene pool corresponds to genes up-regulated in cotyledons (at 7 dpi) compared to stem colonisation and *in vitro* conditions. Lowe et al. (2014) identified the 100 genes most highly up-regulated in cotyledons at 7 dpi, compared to *in vitro* conditions. Haddadi et al. (2015) identified 80 small secreted-protein encoding genes (SSP) differentially expressed during cotyledon colonisation, at 2, 4, 6 and 8 dpi compared to *in vitro* conditions.

Table S1 List of *Leptosphaeria maculans* genes showing more than 10 reads mapped in non infected controls and excluded from subsequent analyses.

Gene identity	Lenght (bp)	NIC ^(a)		NIS ^(b)		Blast against <i>B. napus</i> genome		
		No. of reads	Mean coverage	No. of reads	Mean coverage	No. of hits	Lowest E-value	<i>B. napus</i> accession no.
<i>Lema_P014660.1</i>	1705	664	6.78	1026	10.83	210	1.24E-117	<i>GSBRNA2T00083816001</i>
<i>Lema_P113130.1</i>	309	64	4.62	42	3.13	6	9.71E-01	<i>GSBRNA2T00107453001</i>
<i>Lema_P113110.1</i>	348	9	0.49	23	1.30	9	7.36E-04	<i>GSBRNA2T00039453001</i>
<i>Lema_P099810.1</i>	966	24	0.39	0	0.00	16	6.31E-43	<i>GSBRNA2T00115232001</i>
<i>Lema_P105290.1</i>	829	22	0.36	0	0.00	8	1.41E+00	<i>GSBRNA2T00091273001</i>
<i>Lema_P010510.1</i>	1231	19	0.30	7	0.12	24	1.97E-49	<i>GSBRNA2T00103102001</i>
<i>Lema_P030740.1</i>	564	9	0.23	19	0.51	52	1.26E-112	<i>GSBRNA2T00138906001</i>
<i>Lema_P072760.1</i>	1857	20	0.18	33	0.30	70	0.00E+00	<i>GSBRNA2T00100644001</i>
<i>Lema_P049570.1</i>	1150	13	0.15	8	0.09	94	5.09E-08	<i>GSBRNA2T00121990001</i>
<i>Lema_P007440.1</i>	658	4	0.12	12	0.37	69	1.35E-92	<i>GSBRNA2T00072771001</i>
<i>Lema_P036820.1</i>	761	3	0.10	44	1.45	27	9.01E-06	<i>GSBRNA2T00022936001</i>
<i>Lema_P090620.1</i>	1542	11	0.09	0	0.00	4	2.95E+00	<i>GSBRNA2T00063105001</i>
<i>Lema_P083280.1</i>	541	2	0.06	25	0.81	77	7.01E-96	<i>GSBRNA2T00117100001</i>
<i>Lema_P114520.1</i>	3221	10	0.05	39	0.19	24	4.09E-01	<i>GSBRNA2T00080937001</i>
<i>Lema_P077370.1</i>	2479	7	0.04	13	0.07	35	8.23E-03	<i>GSBRNA2T00006539001</i>
<i>Lema_P067570.1</i>	9063	22	0.03	28	0.04	67	0.00E+00	<i>GSBRNA2T00004464001</i>
<i>Lema_P093680.1</i>	853	2	0.03	12	0.19	26	1.23E-01	<i>GSBRNA2T00067643001</i>
<i>Lema_P094430.1</i>	1898	1	0.01	164	1.35	11	2.10E-08	<i>GSBRNA2T00098561001</i>
<i>Lema_P052070.1</i>	1740	0	0.00	11	0.09	61	1.21E-36	<i>GSBRNA2T00034004001</i>
<i>Lema_P072190.1</i>	4935	0	0.00	15	0.04	44	1.42E-35	<i>GSBRNA2T00121116001</i>
<i>Lema_P083590.1</i>	1493	0	0.00	12	0.17	14	3.90E-02	<i>GSBRNA2T00158070001</i>
<i>Lema_P085680.1</i>	2379	0	0.00	12	0.06	8	1.31E+00	<i>GSBRNA2T00143099001</i>
<i>Lema_P086440.1</i>	2114	0	0.00	36	0.38	63	2.40E-06	<i>GSBRNA2T00060251001</i>
<i>Lema_P122390.1</i>	4020	0	0.00	18	0.06	17	5.67E-01	<i>GSBRNA2T00128850001</i>
<i>Lema_uP011920.1</i>	282	0	0.00	54	2.40	67	1.98E-12	<i>GSBRNA2T00026627001</i>

^(a)Non Infected Cotyledons

^(b)Non Infected Stem (NIS)

Table S3 Primers used for validation of RNAseq data by qRT-PCR.

Gene annotation	Forward primer (5' >3')	Reverse primer (5' >3')
<i>Actin</i>	AGTGCGATGTCGATGTCAG	AAGAGCGGTGATTCCTTCT
<i>EF1α</i>	ACAAATTGAAGGCCGAGCGTGAAC	TACCGGCGGCAATGATGAGGATA
<i>Lema_P105100.1</i>	GGTGGTCTCTCAGGCATT	TGAGTTCGTTTCATTGCTGT
<i>Lema_P035000.1</i>	TGCAAACTGTTATCGTCCCTTT	TGCAGGTACGTTAATAGGTCC
<i>Lema_P100830.1</i>	ACCTTCCCACACGAAACC	CAGCCAGCTCCGCTTTTA
<i>Lema_uP022890.1</i>	ATTTTCCACACAGTCCCA	AGCTGCTCTTCTTACCC
<i>AvrLm3</i>	AAGCAGTGGCGTGAACAGA	CTGCCAAGGGGATGATGGA
40S ribosomal protein S30 (<i>Lema_P041380.1</i>)	GTGCCGAAAGGTCAAGT	GTTGGGGTTCATCTTGCG
<i>Lema_P023410.1</i>	ATTGCAAACCTCACCTCGTC	TCCATTCTGGTGGCCTT
<i>Lema_uP098750.1</i>	TACTGGCTGTCTTTGCTGC	CCGCCACAGTGAACATAAT
<i>Lema_P078210.1</i>	GGTGGCAAGGGCGTTAAGA	AGTCTGGAATTGGATCTGGT
<i>Lema_P124480.1</i>	ACAATGTGGAGGACAAGAAG	AGTAGTTGGGAAGAGTGACAG
<i>AvrLm4-7</i>	GCCCTGCATAACTACCGAC	TCCTGGCCAAATATAACTCC
<i>Lmpma1(H⁺/ATPase)</i>	AGCAATCATGTTCTCAATC	GTTGTTATCTGGGCTTACTC
<i>Lema_P030000.1</i>	TCTCCCCTGCATATCCTCC	ATACCACAGTTGCCAATCAC
<i>Lema_P121470.1</i>	CCGTCGGGGTTGCTTGTA	TCGCTTCAGTCCACGGTT
<i>Lema_P111710.1</i>	CAGCGATGTGGAGTTGA	TGAGGGCGTTGTAGCAAT

3. Résultats complémentaires

Le transcriptome tardif de *L. maculans* au champ

Afin d'évaluer le transcriptome tardif de *L. maculans* pendant toute une saison culturale et dans le cadre d'une infection naturelle, nous avons mis en place une expérience au champ. Nous avons collecté mensuellement, entre novembre 2013 et juillet 2014, des échantillons de tige pour faire une analyse RNAseq (projet Leptolife). Deux variétés ont été semées, Darmor-*bzh* (avec un haut niveau de résistance quantitative à *L. maculans*) et Bristol (sans résistance quantitative). Pour chaque date et chaque variété, trois réplicas biologiques ont été séquencés. J'ai identifié les gènes de *L. maculans* différentiellement exprimés lors de la colonisation de la tige avec EdgeR et analysé leur profil d'expression des gènes entre les deux variétés (Figures 1 et 2). J'ai également réalisé une analyse des GO (Gene Ontology) significativement enrichis suivant les profils d'expression.

La comparaison des cartes de chaleur des gènes fongiques exprimés dans Darmor-*bzh* et dans Bristol montre des profils d'expression bien distincts entre les deux variétés. Ainsi pour Darmor-*bzh*, on observe une importante modification transcriptionnelle des gènes fongiques entre le mois de mai et juillet, marquant sous doute la transition entre un stade de vie biotrophe et un stade de vie nécrotrophe du champignon. Pour Bristol, on observe une modification transcriptionnelle plus précoce au mois de mars/avril.

Des gènes distincts codant pour des petites protéines sécrétés sont successivement exprimés lors de la colonisation systémique, avec des gènes exprimés pendant la période hivernale (Cluster 4 chez Darmor-*bzh* et Cluster 4 chez Bristol), au printemps à la reprise de la croissance végétative mais avant l'apparition de la nécrose au collet (Cluster1 chez Darmor-*bzh* et Cluster 1 chez Bristol) et à la fin de la saison culturale lorsque la nécrose au collet se développe (Cluster 2 chez Darmor-*bzh* et Cluster 9 chez Bristol).

A la fin de la saison culturale avec l'établissement de la nécrose, le transcriptome est fortement enrichi en enzymes à activité catalytique, d'hydrolase, d'oxydoréductase (Clusters 3, 4 et 9 chez Darmor-*bzh* et Clusters 2, 3, 6, 8 et 9 chez Bristol), marquant le stade de vie nécrotrophe du champignon.

Cette expérience est plus amplement exploitée dans le Chapitre III mais elle suggère qu'il existe une plus grande complexité dans l'expression des effecteurs lors de la colonisation de la tige que ce qui est observé en conditions contrôlées dans l'article de ce chapitre. Il y aurait ainsi trois vagues d'expression d'effecteurs au cours de la colonisation de la tige.

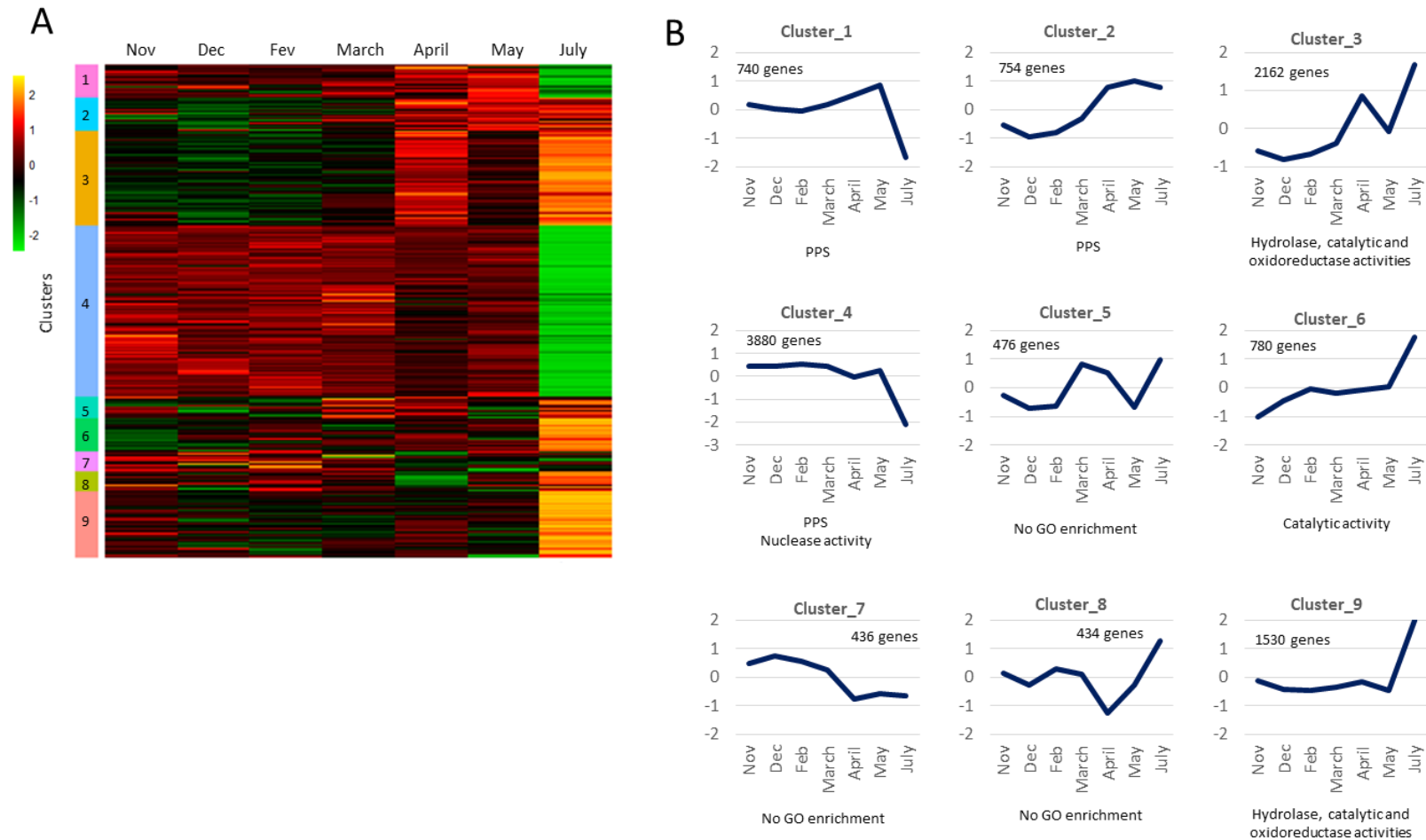


Figure 1: Profil d'expression des gènes de *L. maculans* lors de la colonisation de la tige de colza 'Darmor-bzh' au champ

(A) Niveau d'expression des gènes différentiellement exprimés obtenus par RNA-seq (CPM- Count Per Millions of mapped reads) qui ont été transformés en \log_2 -puis centrés réduits. Trois répliques biologiques ont été utilisés par date. Les clusters ont été réalisés avec EdgeR. (B) Expression moyenne des différents clusters identifiés. Les GO (Gene ontology) significativement enrichis de chaque cluster et identifiés avec Cytoscape sont indiqués sous les graphes. PPS: Petite Protéine Sécrétée.

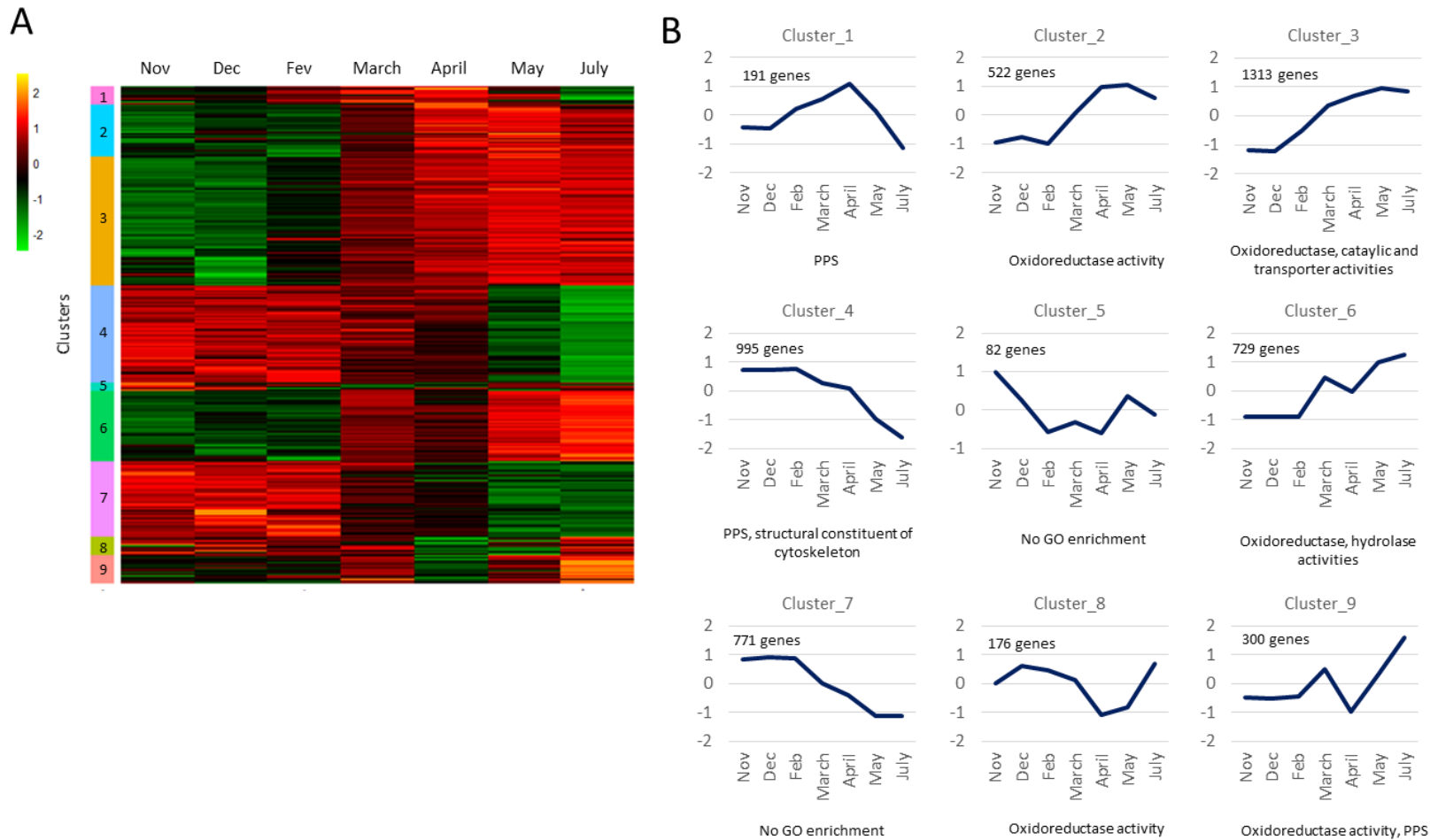


Figure 2: Profil d'expression des gènes de *L. maculans* lors de la colonisation de la tige de colza 'Bristol' au champ

(A) Niveau d'expression des gènes différentiellement exprimés obtenus par RNA-seq (CPM- Count Per Millions of mapped reads) qui ont été transformés en \log_2 -puis centrés réduits. Trois répliques biologiques ont été utilisées par date. Les clusters ont été réalisés avec EdgeR. (B) Expression moyenne des différents clusters identifiés. Les GO (Gene ontology) significativement enrichis de chaque cluster et identifiés avec Cytoscape sont indiqués sous les graphes. PPS: Petite Protéine Sécrétée.

Chapitre II:

**Caractérisation des
effecteurs tardifs de**

Leptosphaeria

maculans

1. Introduction

L'approche transcriptomique présentée dans le Chapitre I, nous a permis d'identifier des effecteurs candidats surexprimés spécifiquement lors de la colonisation de la tige de colza. La validité de ces candidats en tant qu'effecteur n'a cependant pas été démontrée. L'objectif était donc de confirmer le rôle d'effecteur de cinq de ces gènes candidats et d'identifier leur implication dans la colonisation de la tige par *L. maculans*.

Pour cela, j'ai choisi cinq effecteurs tardifs codant pour des petites protéines sécrétées, enrichies en cystéines, parmi les candidats les plus surexprimés lors de la colonisation systémique en comparaison à la phase d'infection précoce.

Plusieurs stratégies ont été mises en place pour confirmer le rôle de ces gènes en tant qu'effecteurs:

- L'analyse du polymorphisme des effecteurs candidats dans la population naturelle de *L. maculans*
- La mesure de l'impact du "silencing" des effecteurs candidats sur le développement de la nécrose du collet du colza
- La mesure de l'impact de chaque effecteur sur l'induction et/ou la suppression de la mort cellulaire végétale par expression transitoire des effecteurs dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana*
- Le suivi du profil d'expression par RNA-seq des gènes au cours d'une saison culturale sur des échantillons de tige issus du champ, et ce sur deux variétés de colza avec et sans résistance quantitative.

Ces résultats sont ici présentés sous la forme de l'article " Late effector candidates of *Leptosphaeria maculans* are involved in the nine-month long stem colonization of oilseed rape" qui est en préparation.

Dans cette partie, j'ai réalisé les analyses de conservation des effecteurs (PCR et HRM), les constructions des mutants pour "silencer" les effecteurs candidats et leur analyse (phénotype, profil d'expression des gènes). J'ai également réalisé les tests d'induction et de suppression de la mort cellulaire végétale dans des feuilles de tabac par expression transitoire des effecteurs, et enfin les analyses transcriptomiques des échantillons issus du champ.

2. Article

Late effector candidates of *Leptosphaeria maculans* are involved in the nine-month long stem colonization of oilseed rape

Authors

Julie Gervais¹, Elise J. Gay¹, Juliette Linglin¹, Bénédicte Ollivier¹, Fabien Dutreux¹, Karine Labadie², Corinne Cruaud², Isabelle Fudal¹, Thierry Rouxel¹ and Marie-Hélène Balesdent^{1*}

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

²CEA-Institut de Génomique, GENOSCOPE, Centre National de Séquençage, Evry Cedex, France

*Corresponding author: Tel: + 33(0)1 30 81 45 73, Fax: +33(0)1 30 81 53 06, marie-helene.balesdent@inra.fr

Word count

Summary: 277

Introduction: 635

Results: 1402

Discussion: 1320

Materials and methods: 1319

Acknowledgements: 100

Table and figure legends: 666

Total: 5719

SUMMARY

The stem canker disease, caused by the fungus *Leptosphaeria maculans*, is one of the most devastating diseases of oilseed rape. The fungus colonizes the plant in two stages: an early colonisation stage corresponding to cotyledon or leaf colonisation, and a late colonisation stage during which the fungus colonises the plant stem during several months before stem canker appears. By transcriptomic approaches, we previously identified two distinct waves of effector candidate expression during the early and late colonisation stages.

Here, we selected five *LmSTEE* (STem Expressed Effector) genes to validate their function as effectors during stem colonization. Contrasting with usual avirulence effectors; these five effectors were conserved in field population of *L. maculans*. RNAi silencing of the genes showed that *LmSTEE1* was involved in stem colonization which impacted stem necrosis development: its silencing level negatively correlated with the speed of growth in petioles and the size of the stem necrosis. Using transitory expression of the *LmSTEE* genes in tobacco leaves, we showed that four out of the five candidates suppressed BAX-induced cell death. RNAseq analysis was performed on samples of two varieties of oilseed rape (with and without quantitative resistance) under natural conditions of infection in the field. The expression of the five *LmSTEE* genes was monitored in the stems between November and July. The results strongly suggest that waves of effectors with antagonistic effect are produced over many months during the systemic colonization of oilseed rape. Several effectors involved in the suppression of programmed cell death and the host plant defenses are produced firstly and sequentially. At the transition between the biotrophic and necrotrophic stages, the expression of these genes decreases allowing development of stem canker necrosis.

INTRODUCTION

During plant colonization, pathogens secrete an arsenal of molecules, called effectors, that facilitates infection and modulates the host innate immunity (de Jonge *et al.*, 2011; Oliva *et al.*, 2010). The largest and most diversified class of effectors corresponds to small secreted proteins (<300 amino acids), often cystein-rich, with few homologies in other genera and highly expressed during host infection (Lo Presti *et al.*, 2015). Based on these characteristics, many effector candidates have been identified in the ever expanding transcriptomic analyses of plant-pathogen interactions (Gervais *et al.*, 2016; Hacquard *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011). The analysis of effector expression patterns has brought to light the existence of waves of effector expression during the infection cycle. Depending on the infection stage, the infected plant tissue or the host plant, different effector-encoding genes are expressed, enabling the pathogen to achieve the entirety of its infection cycle (Cantu *et al.*, 2013;

Kleemann *et al.*, 2012; Schilling *et al.*, 2014). However very few of the effector candidates have been validated as genuine effectors and information on their role in the infectious process remain scarce.

The Dothideomycete *Leptosphaeria maculans* is responsible for one of the most important disease of oilseed rape (*Brassica napus*), the stem canker disease. The worldwide losses were estimated over US\$900M per growing season (Fitt *et al.*, 2008). *L. maculans* has a complex life cycle which involves several transitions between different lifestyles and colonization of different plant organs. The first colonization stage corresponds to leaf and cotyledon colonization. The ascospores produced on stem residues land on the aerial organs of plants, germinate, and the hyphae penetrate leaves and cotyledons through stomata. Once in the plant, the fungus has a short biotrophic stage (5–15 days) during which it colonizes the apoplast of plant tissues, and then the fungus switches to necrotrophy causing leaf spots (Fitt *et al.*, 2006; Rouxel and Balesdent, 2005). Following this primary leaf infection, *L. maculans* progresses into the petiole and in the stem tissues from the leaves to the crown during a long endophytic and symptomless colonization that may last up to 9 months in winter oilseed rape (Hammond *et al.*, 1985; Huang *et al.*, 2014; Rouxel and Balesdent, 2005; West *et al.*, 2001). Following this stage, *L. maculans* shifts to necrotrophy again, leading to the damaging stem canker responsible for plant lodging.

The underlying mechanisms of the systemic colonization of oilseed rape by *L. maculans* and the understanding of how the fungus can remain inside the stem for several months without activating the host defenses are little understood. At definite time points (7 days post inoculation (dpi) for cotyledon infection and 14-24 dpi for stem infection), we have previously shown that *L. maculans* expressed at least two waves of effectors during its colonization of oilseed rape: one during cotyledon colonization with 139 effector candidates expressed, including already known avirulence effectors, and a second wave of distinct effector genes, during the symptomless colonization of the stems with 307 effector candidates expressed (Gervais *et al.*, 2016). We postulated that the effectors specifically expressed in the stem could contribute to this symptomless colonization, before *L. maculans* switches to necrotrophy leading to the stem canker disease.

The objective of our study was to validate that five candidate effectors produced during stem colonization of oilseed rape, and which were called LmSTEE for *L. maculans* STEm Expressed Effector, were genuine effectors. We investigated their polymorphism in the field population of *L. maculans*, the impact of their silencing on stem necrosis development and finally their ability to induce and

Table 1: Characteristics of the late effector candidates studied here

Name	Accession Nr	Size (aa)	Cysteins	Expression rank ^a	Closest blast hit	E-value (Identities)	Blast hit coverage
LmSTEE1	<i>Lema_uP022890.1</i>	80	10	2	<i>Aspergillus bombycis</i> hypothetical protein	2.00E-20 (56%)	98%
LmSTEE30	<i>Lema_P030000.1</i>	107	10	12	<i>Epicoccum nigrum</i> hypothetical protein	3.00E-36 (68%)	99%
LmSTEE35	<i>Lema_P035000.1</i>	123	7	93	<i>Colletotrichum salicis</i> hypothetical protein	2.00E-18 (39%)	100%
LmSTEE78	<i>Lema_P078210.1</i>	291	2	114	<i>Stagonospora sp.</i> <i>SRC1/SM3a</i> hypothetical protein	4.00E-158 (74%)	100%
LmSTEE98	<i>Lema_uP098750.1</i>	55	6	101	none	none	none

^aFold change rank between stems and cotyledons of *L. maculans* effectors from RNA-seq data (Gervais *et al.*, 2016).

suppress cell death in *Nicotiana benthamiana* leaves. These results, obtained in controlled conditions, were then confronted to the expression profile of these *LmSTEE* genes in the stem base sampled over nine months (November to July) in oilseed rape submitted to natural infection by *L. maculans*.

RESULTS

Selection of five late effector candidates

We selected five genes of the 307 effector candidates over-expressed in the stem (Gervais *et al.*, 2016) for functional validation of their effector status. Their annotation was validated using RNA-seq data (Gervais *et al.*, 2016) and cDNA sequencing (data not shown). The criteria of choice firstly encompassed the level of differential expression in stems at 14-24 dpi compared to cotyledons at 7 dpi. The five chosen *LmSTEE* genes were among the most differentially expressed in stems compared to cotyledon colonization. For example, *LmSTEE1* and *LmSTEE30* were the second and twelfth most differentially expressed effectors, respectively (Table 1) (Gervais *et al.*, 2016). The five *LmSTEE* genes encoded for small predicted secreted proteins with size ranging from 55 to 291 amino acids (Table 1). Some of them were also particularly enriched in cysteines, like *LmSTEE1* with 10 cysteines for 80 amino acids (12.5%) and *LmSTEE98* with 6 cysteines in 55 amino acids (11%).

We could find homologies to four of the *LmSTEE* proteins in the database but all closest hits corresponded to hypothetical proteins (Table 1). No homologue of *LmSTEE1* was found in the Dothideomycetes, but only in the larger phylum of the Ascomycetes. *LmSTEE78*, *LmSTEE30* and *LmSTEE35* had however homologies to proteins found in Dothideomycetes and other Ascomycetes. Three paralogous proteins of *LmSTEE35* were also found in *L. maculans* (39% identity for the best hit) but not in the related species belonging to the same species complex, *L. biglobosa*. For each of the other *LmSTEE* proteins, one homologue was found in *Leptosphaeria biglobosa* (data not shown). *LmSTEE78* presented homologies to glycoside hydrolase family 131 protein (*Bipolaris oryzae*) (69% identity and 100% coverage of blast hit). *LmSTEE30* displayed a CFEM (Cystein-rich Fungal Effector Motif) domain corresponding to a specific cysteine rich domain with unknown function but which has been found in proteins with proposed roles in fungal pathogenesis (Kulkarni *et al.*, 2003).

Table 2: PCR amplification and HRM analysis of *LmSTEE* genes in *Leptosphaeria maculans* isolates

Origin of isolates ^a	<i>LmSTEE1</i>			<i>LmSTEE30</i>			<i>LmSTEE35</i>			<i>LmSTEE98</i>			<i>LmSTEE78</i>		
	Presence	Absence ^b	Mutation ^c (Nb isolates)	Presence	Absence ^b	Mutation ^c (Nb isolates)	Presence	Absence ^b	Mutation ^c (Nb isolates)	Presence	Absence ^b	Mutation ^c (Nb isolates)	Presence	Absence ^b	Mutation ^c (Nb isolates)
Europe	267	0	na	267	0	na	91	2	na	265	2	na	93	0	na
Oceania	20	0	0/18	20	0	2/20 ^d	20	0	0/20	20	0	0/18	20	0	0/20
Canada	17	0	0/14	17	0	11/17 ^d	17	0	0/17	17	0	0/17	16	0	0/16
USA	10	0	0/9	10	0	1/10 ^d	10	0	0/9	10	0	0/10	10	0	0/10
Mexico	41	0	0/37	41	0	0/37	41	0	0/40	41	0	7/41 ^e	41	0	0/37
Chile	5	0	0/5	5	0	3/5 ^d	5	0	0/5	5	0	0/5	5	0	0/5
Total	360	0	0/83	360	0	17/89 ^d	184	2	0/91	358	2	7/91 ^e	185	0	0/88

^a Isolates are described in Table S2.

^b Lack of PCR amplification.

^c Number of isolates with SNP compared to the reference sequence JN3, based on HRM results coupled with sequencing.

^d All mutations for *LmSTEE30* corresponded to one single silent mutation.

^e Observed mutations for *LmSTEE98* corresponded to two SNPs impacting the protein sequence: A>I(17) and I>P(27).

na: missing value

Conservation of late effector candidates in field population of *L. maculans*

We used a collection of isolates of worldwide origins, isolated in Europe, Oceania, Canada, USA, Chile or Mexico (Dilmaghani *et al.*, 2009; Dilmaghani *et al.*, 2012; Stachowiak *et al.*, 2006), to study the conservation of the LmSTEE genes in field population of *L. maculans* (Table S2). The strains were isolated from *B. napus* except for Mexican isolates which were obtained from broccoli (*B. oleracea*).

In general, the five tested *LmSTEE* genes were present in all isolates and did not show any presence/absence polymorphism (Table 2). Sequence polymorphism was also rare with two invariant sequences (*LmSTEE1*, *LmSTEE35* and *LmSTEE78*) and one silent mutation with no impact on the protein sequence (*LmSTEE30*). Only *LmSTEE98* showed non-synonymous mutations in the protein sequence and they were only found in 17% of the Mexican isolates.

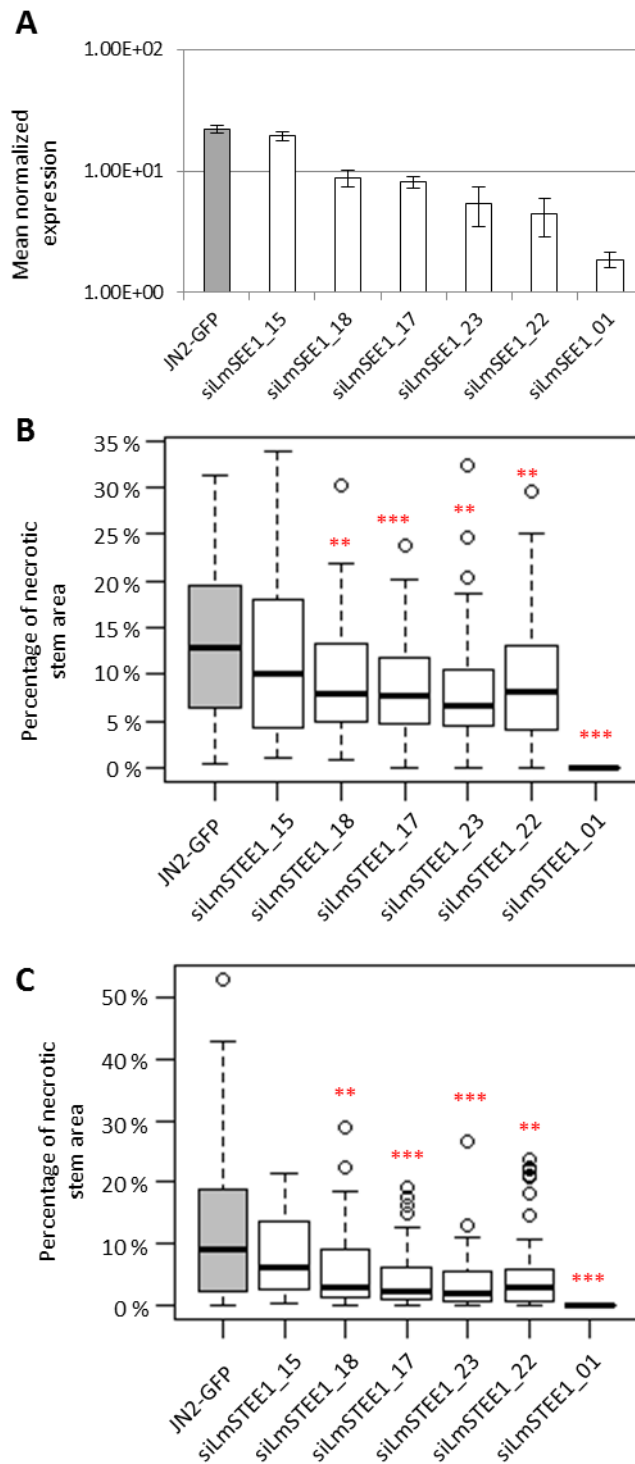


Figure 1: Silencing of the *LmSTEE1* gene induces smaller stem necrosis in oilseed rape

(A) Expression levels of *LmSTEE1*-silenced mutants and the control isolate, JN2-GFP, in infected stem, 14 days after inoculation. qRT-PCR : the mean expression is normalized with actin. Error bars represent the standard error for two biological and three technical replicates. (B) and (C) Percentage of necrotic stem area for the *LmSTEE1*-silenced mutants at 4 weeks after inoculation on wounded petiole. The petiole of the second true leaf was inoculated and the percentage of stem necrosis was measured at the insertion point of the inoculated petiole on the stem (B), and at the insertion point of cotyledons on the stem (C). Error bars represent the standard error for three biological replicates with approximately 15 plants per replicate. Stars indicate significant difference with the control isolate, JN2-GFP (Wilcoxon test : ** : p-value < 5% and *** : p-value < 1%).

LmSTEE1 is involved in stem necrosis development

To investigate the role of the late effector candidates in pathogenicity, we used a RNAi silencing approach. We generated *L. maculans* transformants in which the expression of *LmSTEE1*, *LmSTEE30*, *LmSTEE35*, *LmSTEE78* or *LmSTEE98* was decreased and we analyzed the impact of silencing on *in vitro* growth, cotyledon infection and stem infection.

Silenced transformants showed no defect of *in vitro* growth (Figure S1) or sporulation. They were also as virulent as the control isolate during cotyledon infection on a susceptible cultivar (Figure S1). These data are consistent with the absence of expression of *LmSTEE* genes during axenic growth or primary cotyledon infection. Also the silencing of most of the *LmSTEE* genes (*LmSTEE30*, *LmSTEE35*, *LmSTEE78* and *LmSTEE98*) had no significant impact on the stem necrosis (Figure S1).

In contrast, silencing of *LmSTEE1* significantly impaired stem necrosis development (Figure 1). siLmSTEE1_15 which had no differential expression of *LmSTEE1* compared to the control isolate, was used as a control. This transformant showed no significant difference in the percentage of stem necrotic area compared to the control isolate, JN2-GFP. In the transformants siLmSTEE1_17, siLmSTEE1_18, siLmSTEE1_22 and siLmSTEE1_23, the residual expression of *LmSTEE1* amounted to 39% to 20% of the wild type. All these transformants caused significantly smaller necrotic lesions in stems. More importantly, siLmSTEE1_1 which corresponded to the most silenced transformant with a residual expression of 8% that of JN2-GFP, did not induce any necrosis on all the stems observed (Figure 1). The less this gene is expressed and the less the fungus is able to induce stem necrosis.

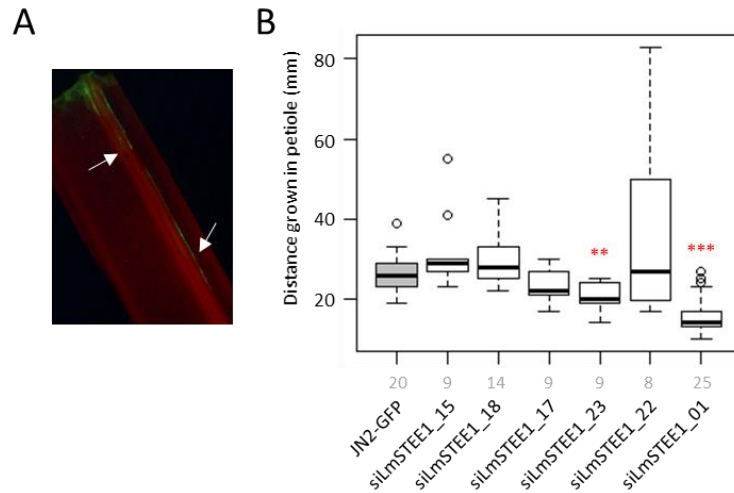


Figure 2: Growth of *LmSTEE1* silenced mutants along leaf petiole of oilseed rape

(A) Petiole inoculated by JN2-GFP viewed with GFP filter at 7 days after inoculation on wounded petiole of the susceptible cultivar Eurol. White arrows indicate the fungal hyphae expressing GFP. (B) Distance grown within leaf petiole by the *LmSTEE1* silenced mutants and the control isolate, JN2-GFP (in grey), at 14 days after inoculation. Stars indicate significant differences with the control isolate (Wilcoxon test: **: p-value < 1% and ***: p-value < 1%). Numbers under the bars are the number of observations made for each strain.

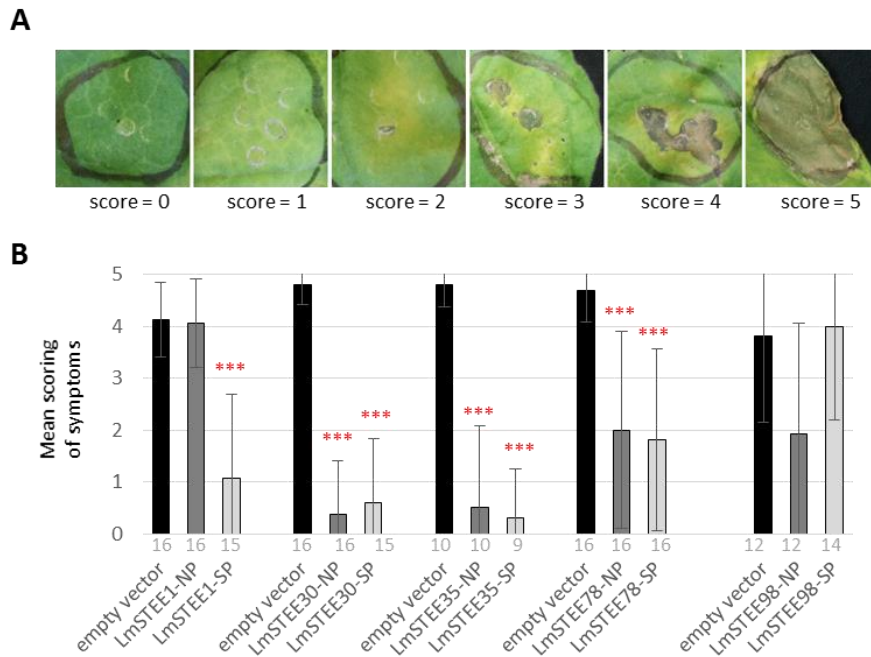


Figure 3: Suppression of BAX-induced cell death in *Nicotiana benthamiana* by *LmSTEE* effectors

N. benthamiana leaves were infiltrated with *Agrobacterium* carrying an empty vector, as a negative control or late effector genes (*LmSTEE1*, *LmSTEE30*, *LmSTEE38*, *LmSTEE78*, *LmSTEE98*) without their secretion peptide (NP) or with (SP). 24 h after infiltration, leaves were infiltrated with *Agrobacterium* carrying the mouse *Bax* gene to induce cell death. (A) Symptom rating scale. Scoring was made using the following scale: 0: no visible symptom, 1: discoloration of the infiltration spot, 2: chlorosis, 3: small necrotic spots, 4: extended necrosis on less than 50% of the infiltration spot, 5: necrosis on more than 50% of the infiltration spot. (B) Symptoms were evaluated at 15 days after infiltration in leaves. Stars indicate significant differences with the empty vector phenotype (Kruskal test: *** :p-value < 0.001). Numbers under the bars are the number of observations made in 3 to 4 biological replicates.

Systemic colonization of the plants is initiated by fungal growth in the leaf petiole prior to entering the stem. We thus evaluated whether transformants silenced for the expression of *LmSTEE1* were compromised in their growth speed and ability to colonize petioles (Figure 2). Two of the silenced transformants, siLmSTEE1_01 and siLmSTEE1_23, which were also two of the most compromised in necrosis development, were significantly slower than the control isolates, JN2-GFP and siLmSTEE1_15, indicating that a significant decrease of *LmSTEE1* expression could impact *L. maculans* growth speed in the petiole.

Some LmSTEE candidates suppress cell death in *Nicotiana benthamiana*

We generated plasmids constitutively expressing *LmSTEE* genes for transient expression in *N. benthamiana* tissues by agroinfiltration, to test whether the effector candidates could induce or suppress plant cell death (Figure 3).

None of the effector candidates induced cell death in tobacco leaves, but most of them could suppress at some extent programmed cell death induced by the BAX protein (Lacomme and Santa Cruz, 1999) in *N. benthamiana* leaves (Figure 3B). LmSTEE30 and LmSTEE35, with and without their secretion signal, were the most efficient suppressor of BAX-induced cell death, with infiltration spots remaining nearly symptomless compared to the empty vector control. LmSTEE78 also suppressed cell death but to a lesser extent. LmSTEE1 without its secretion signal did not suppress BAX-induced cell death. With its secretion signal we only observed discolorations in the infiltration spots and no necrosis development. These results may suggest that only the apoplastic activity of LmSTEE1 can suppress cell death in *N. benthamiana*. Last, LmSTEE98 had no significant effect on BAX-induced cell death observed (Figure 3B).

Consistent results for all of these effectors were obtained with other plant cell death inducers such as Nep1, AvrPto or InF1 (Figure S2).

Expression profile of *LmSTEE* genes during stem colonization in the field

To evaluate the "real-life" effect of *LmSTEE* genes during the pathogenicity cycle of *L. maculans*, we set up a field experiment: two varieties were sown in September 2013, Darmor-*bzh* (with quantitative resistance to *L. maculans*) and Bristol (without quantitative resistance), that were submitted to a natural inoculum pressure reinforced by the addition of stem residues from previous year's harvest.

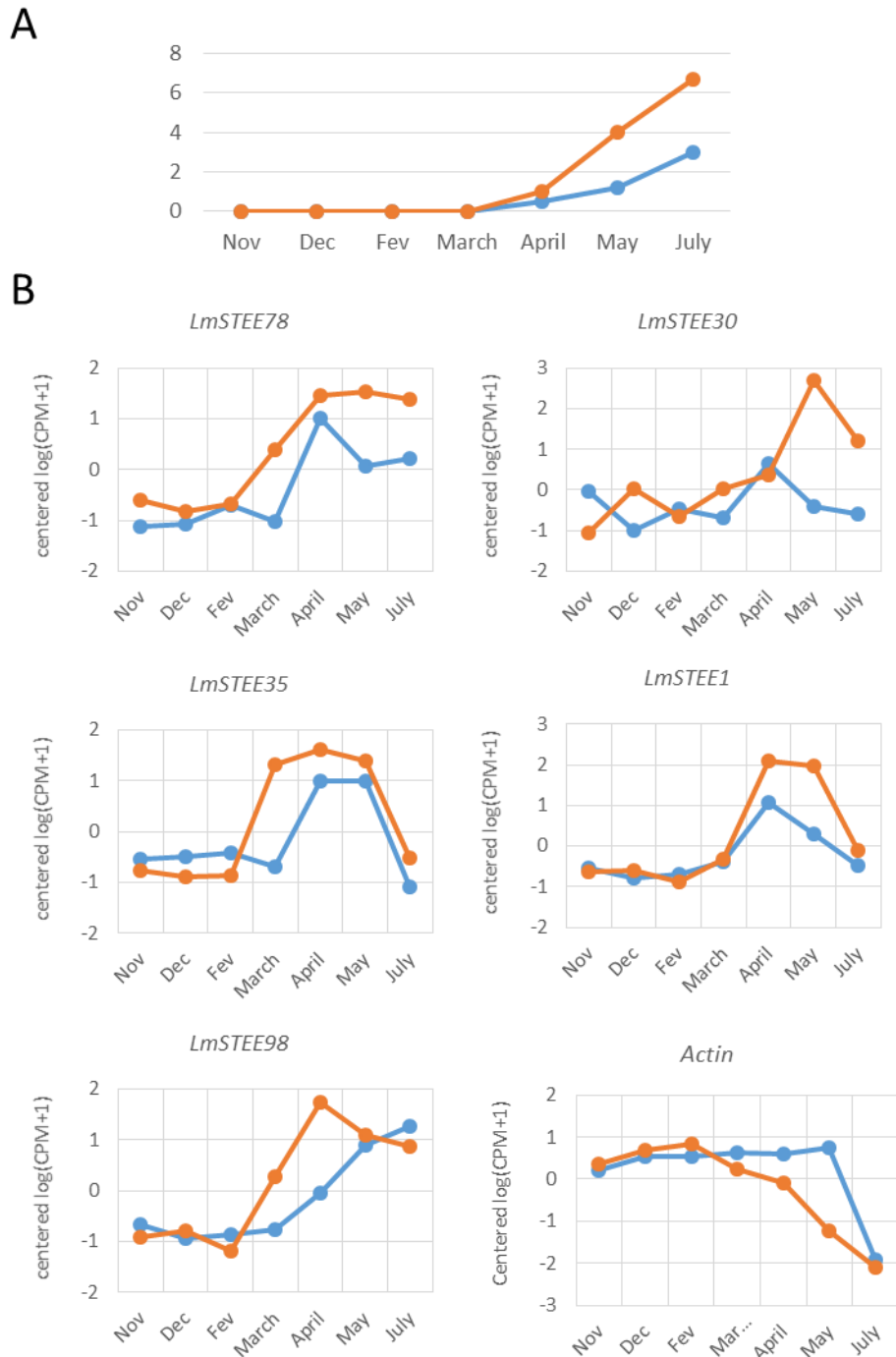


Figure 4: Stem necrosis development and expression profile in RNA-seq of *LmSTEE* genes during stem colonization in field (A) The G2 disease score measured in the varieties Darmor-*bzh* (with quantitative resistance to *L. maculans*) (in blue) and Bristol (without quantitative resistance) (in orange). It is a 0–9 rating, based on the internal area of necrosis at the stem-base cross section (Aubertot *et al.*, 2004). (B) Expression profiles in RNA-seq of *LmSTEE* genes and actin, as a control gene, in Bristol (in orange) and Darmor-*bzh* (in blue) stem base tissues during the 2013–2014 growing season in the field. Expression values (CPM - Count Per Millions of fungal mapped reads) were \log_2 -transformed and then mean-centered. Three independent biological replicates, each corresponding to pooling of two plant tissues with similar G2 scores, were used per date. Statistical analysis of differential expressions between dates and varieties are indicated Tables S3 to S7.

The high inoculum pressure was confirmed by scoring leaf symptoms in November 2013, with 92% and 99% disease incidence for Bristol and Darmor-*bzh* respectively, and an amount of more than eight leaf spots per plant. Plants were collected monthly between November 2013 and July 2014. The stem necrosis development was measured in the sampled plants (Figure 4A) and scored according to the G2 disease score (Aubertot *et al.*, 2004). Stem tissues were submitted to RNAseq analysis to quantify the expression of the *LmSTEE* genes.

Different patterns of expression of *LmSTEE* genes were discriminated along the growing season (Figure 4B), but all were characterized by a low level of expression during winter and peaks of expression that usually are seen in April but may occur earlier (for example *LmSTEE35* on Bristol in March) or later (*LmSTEE30* on Bristol in May). In many cases the peaks of expression were transient and could only last one month, but in some cases a plateau of high expression is maintained for two or three months (*LmSTEE1*, *LmSTEE35*, *LmSTEE78*). One main difference in the expression profiles regarded their behavior in the latest stages of the plant life cycle: one profile is characterized by maintenance of a high level of expression in July (*LmSTEE78* and *LmSTEE98*), while the three other genes showed a drastic reduction of expression in July.

Comparing Darmor-*bzh* and Bristol (Figure 4B), the expression profiles were similar but time-shifted and the expression level was often higher in Bristol than in Darmor-*bzh*. For *LmSTEE35*, *LmSTEE78* and *LmSTEE98*, the increased expression took place one month earlier for Bristol compared to Darmor-*bzh*. In addition the increased level of expression was maintained for two months in Bristol for *LmSTEE1* (versus one month in Darmor-*bzh*) and for three months in Bristol for *LmSTEE35* (versus two months in Darmor-*bzh*). These results highlighted a plant genotype-specific expression profile of *LmSTEE* genes that may reflect the efficiency of quantitative resistance to limit the growth of the fungus within the tissues.

DISCUSSION

The genome of *L. maculans* is known to be separated into two distinct compartments: AT-rich isochores, corresponding to the plastic genome, which encompass few genes but are enriched in genes encoding effectors, including all known avirulence effectors, and GC isochores corresponding to the core genome in which over 500 genes were predicted as encoding small secreted proteins (SSPs) with limited transcriptomic support (Rouxel *et al.*, 2011). In a recent study (Gervais *et al.*, 2016), however, we showed that some genes for effector candidates located in GC isochores indeed are expressed specifically *in planta* during colonization of stems of oilseed rape, at least under controlled conditions.

Table 3: Effector characteristics of the *LmSTEE* genes/protein products studied here

Name	Cystein %	Effect on growth speed in petiole	Effect on necrosis development	Suppression of BAX-induced cell death	Peak of expression in the field (Darmor- <i>bzh</i>)	Peak of expression in the field (Bristol)
LmSTEE1	12.5%	yes	yes	High (with SP) or none (without SP)	April	April-May
LmSTEE30	9.3%	na ^a	no	High	April (moderate)	May
LmSTEE35	5.7%	na ^a	no	High	April-May	March-May
LmSTEE78	0.7%	na ^a	no	Moderate	April	April-July
LmSTEE98	10.9%	na ^a	no	None	July	April

^ana: missing values

Effector candidates from AT and GC genome compartments are structurally similar since they correspond to SSPs generally enriched in cysteine residues, and mostly have no predicted function or recognizable domain. However, they differ by (i) their regulation of expression, since only early effector genes seem to be under an heterochromatin-based regulation of expression, (ii) their presence in related species that seem to be more common for late effector candidates than for early effector candidates, and (iii) their lack of polymorphism in field population since late effector genes did not show the typical presence-absence variation common for effector genes present in AT isochores (Rouxel and Balesdent, 2017), and they are monomorphic with only one non-synonymous mutation identified in *LmSTEE98*. This suggests that, contrasting with effector genes expressed at the onset of plant colonization, late effector genes are not submitted to plant-derived selection.

In this study we selected five effector candidates previously shown to be specifically over-expressed in stems of oilseed rape during the systemic colonization to investigate their function and their role as effectors (Table 3). Most of them were shown to be involved in plant cell death suppression in *N. benthamiana* with different levels of efficiency, and we showed, by silencing approaches, that *LmSTEE1* is involved in petiole and stem colonization and thus probably indirectly involved in stem necrosis development. These results are in agreement with the long systemic colonization of the tissues and suggest that *L. maculans* mostly expresses effectors aiming to manipulate the plant innate immunity, by suppressing the plant cell death, allowing it to efficiently colonize its host, leading ultimately to the stem necrosis development. These results are consistent with several studies reporting, during the primary colonization, secretion of effectors suppressing plant cell death and interfering with the plant defense system in symbiotic and biotrophic lifestyles like in *Glomus intraradices* (Kloppholz *et al.*, 2011) or *Ustilago maydis* (Hemetsberger *et al.*, 2012), or during the biotrophic stages of other hemibiotrophic pathogens such as *Colletotrichum higginsianum* (Kleemann *et al.*, 2012), *M. oryzae* (Li *et al.*, 2009) or *Phytophthora sojae* (Shen *et al.*, 2013).

One novelty of our work regards the comparison between controlled inoculation conditions and “real-life” analysis of the fungal colonization of plants in the field over nine months, from November to July, and under natural inoculum pressure, related to the monitoring of stem canker development. We validated that *LmSTEE* gene specific expression in stems, observed in controlled conditions (Gervais *et al.*, 2016), is also observed in the field during the systemic colonization by the fungus and during stem canker initiation. Studies of the systemic colonization in controlled conditions are thus relevant to gain a better understanding of this colonization stage. However, with more time points, expression patterns appear much more complex than previously established in growth chamber. The *LmSTEE* genes studied here have globally a low expression level during winter when the fungus is likely dormant in plant tissues, but in spring and in summer different expression profiles are distinguished. Interestingly, the

genes able to effectively suppress cell death in *N. benthamiana* (*LmSTEE1*, *LmSTEE30* and *LmSTEE35*), are over-expressed before stem canker development, and their expression decreases significantly when the necrosis develops, between May and July. In contrast, the two genes maintaining a high level of expression at the time of maximum stem canker development are also those which have no or low effect on cell death suppression in the *N. benthamiana* assays (*LmSTEE98* and *LmSTEE78*). This suggests the existence of a long-term balance between expression of genes allowing cryptic tissues colonisation and those involved in the necrotrophic stage. This reflects over many months what is known in other pathosystems over the few days allowing primary symptom development. For example, the hemibiotroph *Phytophthora infestans* expresses the effector SNE1 at the early infection stage of tomato leaves and is able to suppress cell death induced by other effectors to maintain the biotrophic stage. During the transition between the biotrophic stage and the necrotrophic stage, the balance of effectors suppressing (like SNE1) and inducing cell death weighted in favor of these latter, enabling the switch toward necrotrophy (Kelley *et al.*, 2010). Similarly in *Colletotrichum higginsianum*, the effector *ChNLP1* (Nep1-like Protein) is specifically expressed during the transition between the biotrophic and the necrotrophic stages. Transitory expressed in tobacco, this effector induced cell death, but co-expressed with other effector of *C. higginsianum* specific of the biotrophic stage, cell death was suppressed (Yoshino *et al.*, 2012). These results underline the importance of the balance between effectors suppressing or inducing cell death, and their expression profiles plays a major role in the transition between biotrophy and necrotrophy in hemibiotrophic fungi. During the stem colonization of oilseed rape by *L. maculans*, such a balance would be a central element in the transition between symptomless colonization and stem canker necrosis development. In this study, we have observed that several effectors were able to suppress cell death in *N. benthamiana* assays, however, except for *LmSTEE1*, silencing of these effectors had no impact on stem necrosis development in oilseed rape. This could be explained by a functional redundancy of these genes. However, a functional redundancy of the *LmSTEE* genes would appear to be in contradiction with their high level of conservation in field populations. This apparent contradiction can be explain by their distinct expression profile observed over the months of the stem colonization in field conditions. At different times of its systemic colonization, the fungus would express different effectors to suppress cell death. This is exemplified here by *LmSTEE30* and *LmSTEE35*, which are the most efficient cell death suppressors in our assay and show very distinct kinetics in cv. Bristol, with *LmSTEE30* expression peaking in May at a time *LmSTEE35* expression begins to decrease (Table 3). In controlled conditions, the systemic stem colonization is greatly shortened to a few weeks, likely preventing us to distinguish differential expression profiles of the *LMSTEE* genes and consequently to measure the impact of their silencing in the stem colonization.

In this study, we also showed that the host plant genotype could influence the expression profile of the *LmSTEE* genes. We saw in the field two varieties with contrasted behaviour, Bristol, a highly susceptible cultivar, and Darmor-bzh, a cultivar showing a high level of adult-stage resistance (Pilet *et al.*, 1998). This differential behaviour was confirmed in our field experiment conditions. While being genetically ascribed to the presence of multiple QTLs, adult-stage resistance is poorly understood in terms of effect on the fungus. Our work thus provides a first hint of the effect of adult-stage resistance of oilseed rape on the fungus, with a decreased and often delayed expression of fungal effector genes, compared to the expression in the host without such resistance. For example, *LmSTEE78* and *LmSTEE98*, which have low or no suppressive effect on BAX-induced cell death, show a peak of expression one month before the scorable stem necrosis appears in Bristol, and their expression is maintained at a high level from April to July, while the peak of expression of *LmSTEE78* is weaker and shorter in Darmor-bzh, and that of *LmSTEE98* only takes place in July at the time of harvest (Table 3). To better understand the influence of the host genotype on the lifestyle shifts and on the expression profiles of effectors, deeper analysis is now needed including all the predicted effectors and more stages of the life cycle of *L. maculans* within *B. napus*.

MATERIALS AND METHODS

Fungal materials

The sequenced isolate JN3 (v23.1.3) (Rouxel *et al.*, 2011) and its closely related sister isolate JN2 (v23.1.2) are progenies from an *in vitro* cross between European field isolates (Balesdent *et al.*, 2001). The JN2-GFP strain expressing the Green Fluorescent Protein was created by Šašek *et al.* (2012). A representative selection of worldwide collections and reference isolates from Australia, Canada, USA, Chile, France, Mexico, Germany, New-Zealand, Sweden and United-Kingdom, was also analyzed (Table S2) (Dilmaghani *et al.*, 2009; Dilmaghani *et al.*, 2012; Mendes-Pereira *et al.*, 2003; Stachowiak *et al.*, 2006).

Fungal cultures were maintained on V8 juice agar medium and sporulating cultures were obtained on V8 medium as previously described (Ansan-Melayah *et al.*, 1995).

Plant inoculations

The *B. napus* cultivars used in the field RNA-seq experiment were Darmor-bzh (with a high level of quantitative resistance) and Bristol (without quantitative resistance). For analysis in controlled

conditions we used the susceptible variety EuroI, as previously used (Gervais *et al.*, 2016). Cotyledon inoculations were performed on ten days-old seedlings that were punctured and inoculated with 10 μ l of inoculum (10^7 pycnidiospores ml^{-1}), as described in Balesdent *et al.* (2001). Symptoms were measured 11 to 16 days after inoculation using the IMASCORE rating scale (Balesdent *et al.*, 2001).

Adult plant inoculations were performed as described in Gervais *et al.* (2016). For analysis of stem colonization by *L. maculans*, the petiole of the second leaf was cut off at 1 cm from the leaf insertion. For monitoring petiole colonization by the fungus, the petiole was cut just under the leaf blade. Ten μ l of inoculum (10^7 pycnidiospores ml^{-1}) were placed over the wounds. Inoculated plants were incubated in darkness for 48 h at room temperature under saturated humidity, and then transferred to a growth chamber at 16 °C (night) and 24 °C (day), with a 12 h photoperiod. Petiole colonization by GFP-isolates was observed at 7 and 14 dpi under a fluorescence binocular magnifier. To measure the necrosis in infected stems, cross sections of the stem were realized, 4 weeks after inoculation, at the insertion point of the inoculated petiole on the stem and at the insertion point of cotyledons on the stem. The sections were scanned and interne necrosis area was measured with ImageJ.

Gene silencing and fungal transformation

RNA-mediated silencing of the genes *LmSTEE1*, *LmSTEE30*, *LmSTEE35*, *LmSTEE78* and *LmSTEE98* was performed as described by Fudal *et al.* (2007). The hairpin inverted repeat fragments were created starting from cDNA of stems infected with JN3 and extracted at 24 dpi and using the primers described in Table S1. The sense fragments (named F1) were digested with *EcoRI* and *NcoI*, and the antisense fragments (named F2) with *BamHI* and *NcoI*. Sense and antisense fragments were ligated into an *EcoRI*-*BamHI*-digested pJK11 plasmid. The different expression cassettes were excised by digestion with *BamHI* and *XhoI* and cloned into the *BamHI*-*XhoI* digested vector pPZPNat1. The plasmids were then introduced into *A. tumefaciens* C58 by electroporation at 2.5 kV, 200 ohm and 25 μ F. *L. maculans* transformation with the *Agrobacterium tumefaciens* strains was performed as described in Gout *et al.* (2006). Fungal transformants were selected on 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ nourseothricin (WERNER BioAgents, Jena, Germany) and 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ hygromycin (Invitrogen).

The fungal transformants silenced for the *LmSTEE* genes were tested for absence of growth default *in vitro*. A plug of mycelium was deposited in the center of a Petri dish containing V8 agar media and mycelia growth was measured every two days for seven days (four replicates).

Cell death suppression assays in *N. benthamiana*

For transient expression in *N. benthamiana*, the ORF of late effector candidates with (PS) and without (NP) their secretion signal were amplified using cDNA of stems infected with JN3 and extracted at 24 dpi, with the primers indicated Table S1. The PCR fragments were cloned into the donor vector pDONRTM221 and then into the destination vector pK2GW7 using gateway technology (Invitrogen). The plasmids carrying the different constructions (NP-LmSTEE1, PS-LmSTEE1, NP-LmSTEE30, PS-LmSTEE30, NP-LmSTEE35, PS-LmSTEE35, NP-LmSTEE78, PS-LmSTEE78, NP-LmSTEE98, PS-LmSTEE98) were transformed into *A. tumefaciens* GV3101 by electroporation at 2.5 kV, 200 Ohms and 25 μ F.

N. benthamiana plants used in cell death suppression experiments were grown in growth chambers at 25°C with 16 h of illumination per day. *A. tumefaciens*-mediated transient expression was performed as described in Ma *et al.* (2012). *Bacteria* were grown at 28°C in a shaking incubator at 200 rpm in LB medium containing rifampicin (50 μ g.ml⁻¹), gentamicin (20 μ g.ml⁻¹), spectinomycin (500 μ g.ml⁻¹) and streptomycin (100 μ g.ml⁻¹). After 18 h, bacterial cells were centrifuged at 5000 rpm for 10 min and resuspended in MES buffer (10 mM MgCl₂ and 10 mM MES, pH 5.6) with acetosyringone (final concentration of 200 μ m) to a final OD₆₀₀ of 0.8. The bacterial suspensions were incubated for 3 h, prior to agroinfection into *N. benthamiana* leaves. Leaves of 5-week-old *N. benthamiana* were infiltrated with a syringe. One day after infiltration, the infiltration sites were challenged with *A. tumefaciens* carrying *Bax*, *AvrPto*, *Nep1* or *Inf1* gene (OD₆₀₀ of 0.5). *A. tumefaciens* with empty vector served as the negative control. Induced lesions were observed at 9 to 14 days after infiltration.

DNA manipulation and HRM experiments

Genomic DNA was extracted from conidia suspensions using the Qiagen BioRobot 3000 or DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's recommendations.

High Resolution Melting (HRM) was performed as described in Plissonneau *et al.* (2015) to analyse polymorphic SNP in natural population of *L. maculans* for the different *LmSTEE* genes. The primers used are indicated in Table S1. In case of detected variations in HRM profiles, *LmSTEE* genes were sequenced by Eurofins Genomics (Eurofins, Ebersberg, Germany).

RNA manipulation and qRT-PCR

Total RNA extraction was performed as described in Fudal *et al.* (2007). For qRT-PCR, RNA samples were adjusted to 1 μ g of RNA and single-strand cDNA was generated using oligo-dT primed reverse

transcription with PowerScript Reverse Transcriptase (Clontech, Palo Alto, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Plants inoculated with water were used as negative controls. For each condition, three technical replicates from two biological repeats were performed. The qRT-PCR experiments were performed as described in Fudal *et al.* (2007). The qRT-PCR primers used are indicated in Table S1. Ct values were analysed as described in Muller *et al.* (2002). Actin was used as a constitutive reference gene and tubulin expression relative to actin was used as a control.

RNA sequencing and analysis

RNA-seq experiment was realized on stem bases from two varieties (Darmor-*bzh* and Bristol) grown in field and submitted to high and reinforced inoculum pressure. Plants were sown in September 2013 and samples were collected on 20th November 2013, 18th December 2013, 13th February 2014, 13th March 2014, 4th April 2014, 15th May 2014 and 8th July 2014. A stem section of around 0.5 cm in height was cut at the crown of each plant (*i.e.* at the site of the first leaf scars) and immediately frozen in liquid nitrogen. Crown sections were ground with a Retsch M300 Mixer Mill using Zirconium oxide jars and grinding balls for 40s at 30 oscillations/s. RNA was extracted as previously described (Fudal *et al.*, 2007). G2 disease scores were also measured in the collected stems as described by Aubertot *et al.* (2004). Three independent biological replicates, each corresponding to the pooling of two plant tissues with similar G2 scores, were used per date and variety.

cDNA library and 100 bp paired read sequencing were done by the Genoscope (Evry, France) using Illumina HiSeq2500. Reads were mapped on the reference genome of *L. maculans* (JN3) (Rouxel *et al.*, 2011) using the software STAR (Dobin *et al.*, 2013) with the following parameters: outFilterMultimapNmax: 100, alignSJoverhangMin: 15, alignIntronMin: 10, alignIntronMax: 10000, alignMatesGapMAX: 10000, seedSearchStartLmax: 12, outFilterMismatchNmax: 2, outFilterMAtchNminoverLread: 0.3, outFilterScoreMinOverLread: 0.3. RNA-seq analyses were performed with EdgeR (Robinson *et al.*, 2010). Differentially expressions were identified based on the following criteria: Log₂ (Fold change) > 2.0 and p-value < 0.05 (Tables S3 to S7). Expression profiles of the *LmSTEE* genes were realized based on their expression values (CPM - Count Per Millions of mapped reads) log₂-transformed and then mean-centered, at the different dates.

Statistical analyses were done with R (R Core Team, 2015).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Vladimir Matej Sasek (UEB) for the JN2-GFP strain, Bertrand Auclair and Annie Auger (INRA BIOGER) for plant management, and Régine Delourme (INRA, UMR IGEPP) for *Brassica napus* Darmor-bzh seeds. We thank Richard O'Connell for providing us the *Nep1* vector, Mathieu Gourgues for the *AvrPto* and the *Inf1* vectors. J.G. was funded by a joint grant from the Santé des Plantes et Environnement (SPE) INRA department and Terres Inovia (formerly CETIOM), and FB by Promosol (METAPHOR project). This work was supported in part by Promosol (METAPHOR Leptolife project), France Génomique (Leptolife project) and ANR (StructuralLEP project; ANR-14-CE19-0019).

REFERENCES

- Aubertot, J.-N., Schott, J.-J., Penaud, A., Brun, H. and Doré, T.** (2004) Methods for sampling and assessment in relation to the spatial pattern of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans*) in oilseed rape. *Eur. J. Plant Pathol.* **110**, 183–192.
- Balesdent, M.H., Attard, A., Ansan-Melayah, D., Delourme, R., Renard, M. and Rouxel, T.** (2001) Genetic control and host range of avirulence toward *Brassica napus* cultivars Quinta and Jet Neuf in *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **91**, 70–76.
- Cantu, D., Segovia, V., MacLean, D., Bayles, R., Chen, X., Kamoun, S., Dubcovsky, J., Saunders, D.G. and Uauy, C.** (2013) Genome analyses of the wheat yellow (stripe) rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* reveal polymorphic and haustorial expressed secreted proteins as candidate effectors. *BMC Genomics* **14**, 270.
- Dilmaghani, A., Balesdent, M.H., Didier, J.P., et al.** (2009) The *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathol.* **58**, 1044–1058.
- Dilmaghani, A., Gladieux, P., Gout, L., Giraud, T., Brunner, P.C., Stachowiak, A., Balesdent, M.-H. and Rouxel, T.** (2012) Migration patterns and changes in population biology associated with the worldwide spread of the oilseed rape pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Ecol.* **21**, 2519–2533.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M. and Gingeras, T.R.** (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **29**, 15–21.

- 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.
- Fitt, B.D.L., Hu, B.C., Li, Z.Q., Liu, S.Y., Lange, R.M., Kharbanda, P.D., Butterworth, M.H. and White, R.P.** (2008) Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China; costs and benefits. *Plant Pathol.* **57**, 652–664.
- Fudal, I., Ross, S., Gout, L., et al.** (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.
- 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.*
- 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.
- Hacquard, S., Joly, D.L., Lin, Y.-C., et al.** (2012) A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Mol. Plant. Microbe Interact.* **25**, 279–293.
- Hammond, K.E., Lewis, B.G. and Musa, T.M.** (1985) A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathol.* **34**, 557–565.
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M. and Doehlemann, G.** (2012) The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLOS Pathog.* **8**, e1002684.
- Huang, Y.-J., Qi, A., King, G.J. and Fitt, B.D.L.** (2014) Assessing quantitative resistance against *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) in young plants. *PLoS ONE* **9**, e84924.
- Jonge, R. de, Bolton, M.D. and Thomma, B.P.** (2011) How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 400–406.

- Kelley, B.S., Lee, S.-J., Damasceno, C.M.B., Chakravarthy, S., Kim, B.-D., Martin, G.B. and Rose, J.K.C.** (2010) A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death. *Plant J.* **62**, 357–366.
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L.J., Takahara, H., et al.** (2012) Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathog* **8**, e1002643.
- Kloppholz, S., Kuhn, H. and Requena, N.** (2011) A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Curr. Biol.* **21**, 1204–1209.
- Kulkarni, R.D., Kelkar, H.S. and Dean, R.A.** (2003) An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 118–121.
- 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.
- Li, W., Wang, B., Wu, J., et al.** (2009) The *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPiz-t* encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene *Piz-t*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **22**, 411–420.
- Lo Presti, 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.
- Ma, L., Lukasik, E., Gawehns, F. and Takken, F.L.W.** (2012) The use of agroinfiltration for transient expression of plant resistance and fungal effector proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **835**, 61–74.
- Mendes-Pereira, E., Balesdent, M.-H., Brun, H. and Rouxel, T.** (2003) Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*-*L. biglobosa* species complex. *Mycol. Res.* **107**, 1287–1304.
- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R. and Dobbie, Z.** (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* **32**, 1372–1374, 1376, 1378–1379.
- O’Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., et al.** (2012) Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Genet.* **44**, 1060–1065.
- Oliva, R., Win, J., Raffaele, S., et al.** (2010) Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell. Microbiol.* **12**, 705–715.

- Pilet, M.L., Delourme, R., Foisset, N. and Renard, M.** (1998) Identification of loci contributing to quantitative field resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not., in Winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **96**, 23–30.
- Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I., Rouxel, T. and Balesdent, M.-H.** (2015) A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.*
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J. and Smyth, G.K.** (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **26**, 139–140.
- 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. and Balesdent, M.H.** (2005) The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Mol. Plant Pathol.* **6**, 225–241.
- Rouxel, T., Grandaubert, J., Hane, J.K., et al.** (2011) Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nat. Commun.* **2**, 202.
- Šašek, V., Nováková, M., Dobrev, P.I., Valentová, O. and Burketová, L.** (2012) β -aminobutyric acid protects *Brassica napus* plants from infection by *Leptosphaeria maculans*. Resistance induction or a direct antifungal effect? *Eur. J. Plant Pathol.* **133**, 279–289.
- Schilling, L., Matei, A., Redkar, A., Walbot, V. and Doehlemann, G.** (2014) Virulence of the maize smut *Ustilago maydis* is shaped by organ-specific effectors. *Mol. Plant Pathol.* **15**, 780–789.
- Shen, D., Liu, T., Ye, W., Liu, L., Liu, P., Wu, Y., Wang, Y. and Dou, D.** (2013) Gene duplication and fragment recombination drive functional diversification of a superfamily of cytoplasmic effectors in *Phytophthora sojae*. *PLoS ONE* **8**.
- Soyer, J.L., El Ghalid, M., Glaser, N., et al.** (2014) Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genet.* **10**, e1004227.
- 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.
- Wang, Q., Han, C., Ferreira, A.O., et al.** (2011) Transcriptional programming and functional interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR effector repertoire. *Plant Cell Online*, tpc.111.086082.

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.

Yoshino, K., Irieda, H., Sugimoto, F., Yoshioka, H., Okuno, T. and Takano, Y. (2012) Cell death of *Nicotiana benthamiana* is induced by secreted protein NIS1 of *Colletotrichum orbiculare* and is suppressed by a homologue of CgDN3. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **25**, 625–636.

Supporting information

Figure S1: *In vitro* growth and pathogenicity phenotypes of *L. maculans* silenced mutants for late effector genes

Left, mean growth rate (mm/day) was assessed at 6 or 7 days on mycelium grown on V8 agar at 25°C. JN2-GFP is the control isolate (black bars). Error bars indicate the standard deviation of four replicates. Right, percentage of inoculated plants displaying a resistant (green) or susceptible (red) phenotype. Pathogenicity assays were performed on cotyledons of the susceptible cultivar EuroI. Phenotypes were scored based on the IMAScore rating scale (Balesdent 2006), 14 days after inoculation. Approximately ten plants were inoculated per construction. (A), (B), (C), (D) and (E) display results for the *LmSTEE1*, *LmSTEE30*, *LmSTEE35*, *LmSTEE78* and *LmSTEE98* genes, respectively.

Figure S2: Suppression of induced cell death in *Nicotiana benthamiana* by *LmSTEE* effectors

N. benthamiana leaves were infiltrated with *Agrobacterium* carrying an empty vector, as a negative control or late effector genes (*LmSTEE98*, *LmSTEE30*, *LmSTEE38*, *LmSTEE78*, *LmSTEE1*) without (NP) or with (SP) their secretion peptide. 24 h after infiltration, leaves were infiltrated with *Agrobacterium* carrying either *AvrPto* (A), *Nep1* (B) or *InF1* (C) to induce cell death. Symptoms were evaluated at 15 days after infiltration in leaves. Stars indicate significant difference with the empty vector phenotype (Kruskal test: *: p-value <0.05, **: p-value <0.01, ***: p-value < 0.001).

Table S1: List of primers used in this study

Table S2: Isolates used for polymorphism studies in *Leptosphaeria maculans* populations

Table S3: Differential expression of *LmSTEE1* in RNA-seq during stem colonization in field

Table S4: Differential expression of *LmSTEE30* in RNA-seq during stem colonization in field

Table S5: Differential expression of *LmSTEE35* in RNA-seq during stem colonization in field

Table S6: Differential expression of *LmSTEE98* in RNA-seq during stem colonization in field

Table S7: Differential expression of *LmSTEE78* in RNA-seq during stem colonization in field

Figure 1: Silencing of the *LmSTEE1* gene induces smaller stem necrosis in oilseed rape

(A) Expression levels of *LmSTEE1*-silenced mutants and the control isolate, JN2-GFP, in infected stem, 14 days after inoculation on wounded petiole. qRT-PCR: the mean expression is normalized with actin. Error bars represent the standard error for two biological and three technical replicates. (B) and (C) Percentage of necrotic stem area for the *LmSTEE1*-silenced mutants at 4 weeks after inoculation on wounded petiole. The petiole of the second true leaf was inoculated and the percentage of stem necrosis was measured at the insertion point of the inoculated petiole on the stem (B), and at the insertion point of cotyledons on the stem (C). Error bars represent the standard error for three biological replicates with approximately 15 plants per replicate. Stars indicate significant difference with the control isolate, JN2-GFP (Wilcoxon test: ** : p-value < 5% and *** : p-value < 1%).

Figure 2: Growth of *LmSTEE1* silenced mutants along leaf petiole of oilseed rape

(A) Petiole inoculated by JN2-GFP viewed with GFP filter at 7 days after inoculation on wounded petiole of the susceptible cultivar Eurol. White arrows indicate the fungal hyphae expressing GFP. (B) Distance grown within leaf petiole by the *LmSTEE1* silenced mutants and the control isolate, JN2-GFP (in grey), at 14 days after inoculation. Stars indicate significant differences with the control isolate (Wilcoxon test : ** : p-value < 1% and *** : p-value < 1‰). Numbers under the bars are the number of observations made for each strain.

Figure 3: Suppression of BAX-induced cell death in *Nicotiana benthamiana* by *LmSTEE* effectors

N. benthamiana leaves were infiltrated with *Agrobacterium* carrying an empty vector, as a negative control or late effector genes (*LmSTEE1*, *LmSTEE30*, *LmSTEE38*, *LmSTEE78*, *LmSTEE98*) without their secretion peptide (NP) or with (SP). 24 h after infiltration, leaves were infiltrated with *Agrobacterium* carrying the mouse *Bax* gene to induce cell death. (A) Symptom rating scale. Scoring was made using the following scale: 0: no visible symptom, 1: discoloration of the infiltration spot, 2: chlorosis, 3: small necrotic spots, 4: extended necrosis on less than 50% of the infiltration spot, 5: necrosis on more than 50% of the infiltration spot. (B) Symptoms were evaluated at 15 days after infiltration in leaves. Stars indicate significant differences with the empty vector phenotype (Kruskal test: ***: p-value < 0.001). Numbers under the bars are the number of observations made in 3 to 4 biological replicates.

Figure 4: Stem necrosis development and expression profile in RNA-seq of *LmSTEE* genes during stem colonization in field

(A) The G2 disease score measured in the varieties Darmor-*bzh* (with quantitative resistance to *L. maculans*) (in blue) and Bristol (without quantitative resistance) (in orange). It is a 0–9 rating, based on the internal area of necrosis at the stem-base cross section (Aubertot *et al.*, 2004). (B) Expression profiles in RNA-seq of *LmSTEE* genes in Bristol (in orange) and Darmor-*bzh* (in blue) stem base tissues during the 2013-2014 growing season in the field. Expression values (CPM - Count Per Millions of fungal mapped reads) were \log_2 -transformed and then mean-centered. Three independent biological replicates, each corresponding to pooling of two plant tissues with similar G2 scores, were used per date. Statistical analysis of differential expressions between dates and varieties are indicated Tables S3 to S7.

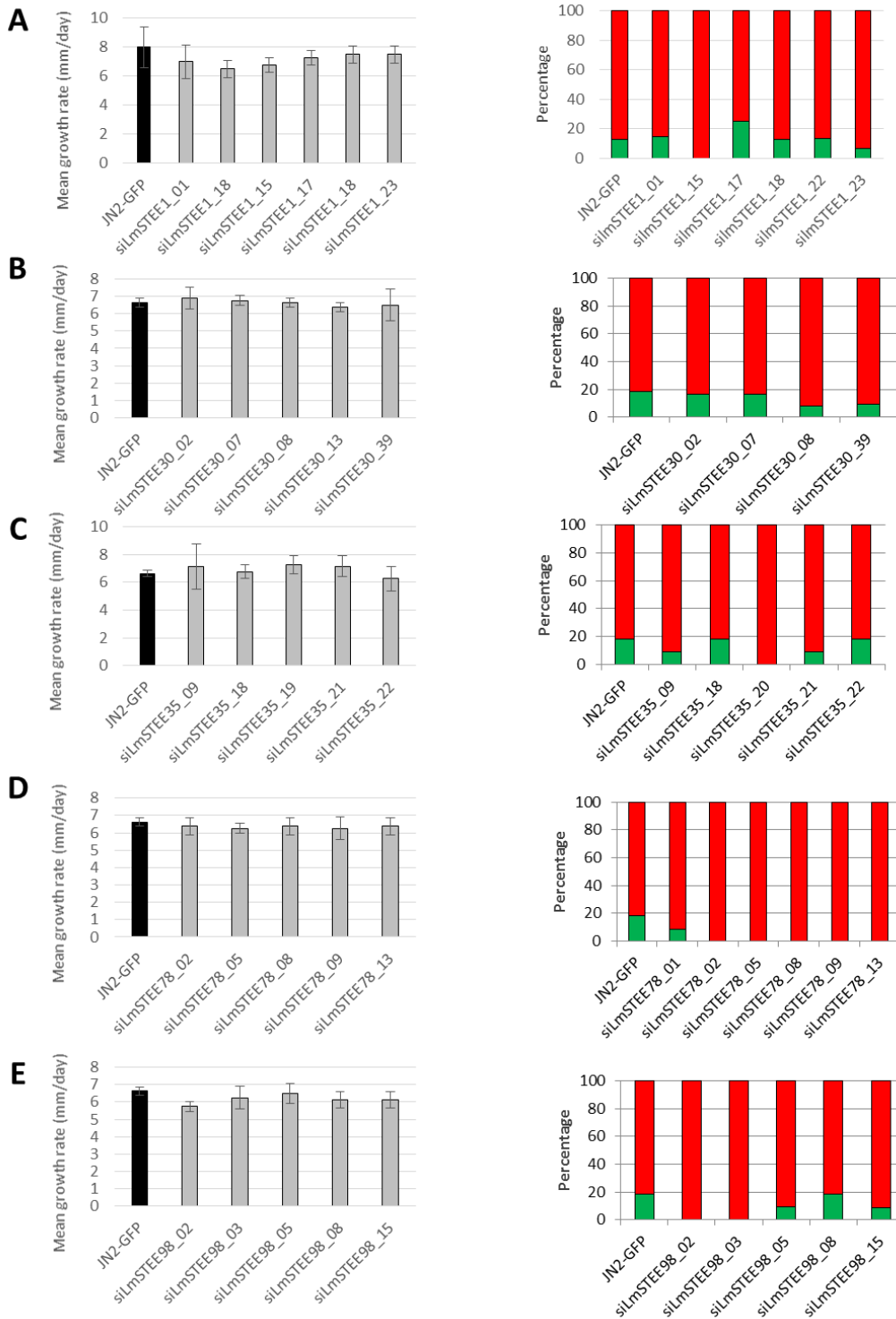


Figure S1: *In vitro* growth and pathogenicity phenotypes of *L. maculans* silenced mutants for late effector genes

Left, mean growth rate (mm/day) was assessed at 6 or 7 days on mycelium grown on V8 agar at 25°C. JN2-GFP is the control isolate (black bars). Error bars indicate the standard deviation of four replicates. Right, percentage of inoculated plants displaying a resistant (green) or susceptible (red) phenotype. Pathogenicity assays were performed on cotyledons of the susceptible cultivar EuroI. Phenotypes were scored based on the IMAScore rating scale (Balesdent 2006), 14 days after inoculation. Approximately ten plants were inoculated per construction. (A), (B), (C), (D) and (E) display results for the *LmSTEE1*, *LmSTEE30*, *LmSTEE35*, *LmSTEE78* and *LmSTEE98* genes, respectively.

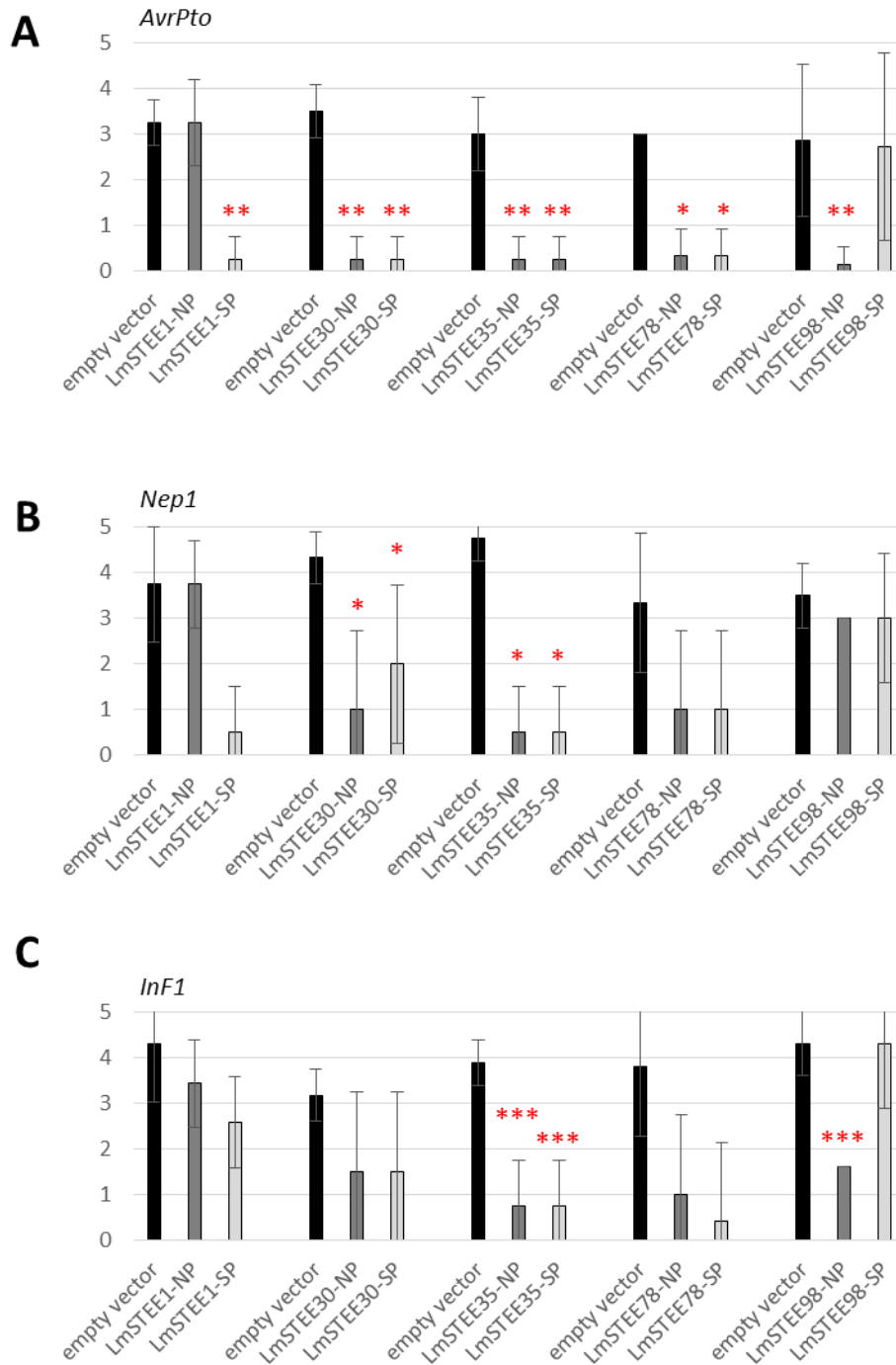


Figure S2: Suppression of induced cell death in *Nicotiana benthamiana* by LmSTEE effectors

N. benthamiana leaves were infiltrated with *Agrobacterium* carrying an empty vector, as a negative control or late effector genes (*LmSTEE98*, *LmSTEE30*, *LmSTEE38*, *LmSTEE78*, *LmSTEE1*) without (NP) or with (SP) their secretion peptide. 24 h after infiltration, leaves were infiltrated with *Agrobacterium* carrying either *AvrPto* (A), *Nep1* (B) or *InF1* (C) to induce cell death. Symptoms were evaluated at 15 days after infiltration in leaves. Stars indicate significant difference with the empty vector phenotype (Kruskal test: *: p-value <0.05, **: p-value <0.01, ***: p-value < 0.001).

Table S1: List of primers used in this study

Name	Sequence (5'-3')	Experiment
LmSTEE1_F1U_Ecol	GAGAGAGAATTCAGTGTAGTCCTTGCTTGC	Silencing
LmSTEE1_F1L_Ncol	GAGAGACCATGGTGGGGGTGAGATATCCGTAG	Silencing
LmSTEE1_F2U_BamHI	GAGAGAGGATCCAGTGTAGTCCTTGCTTGC	Silencing
LmSTEE1_F2L_Ncol	GAGAGACCATGGGGCCCTCTAGATGTTCAATTG	Silencing
LmSTEE1_qUp	AGCTGCTCTTCTTCTACCC	qPCR
LmSTEE1_qLow	ATTTTCCACACACGTCCCA	qPCR
LmSTEE1_Up_out	TCCCTTTGCCCTCATCAACA	Genotyping
LmSTEE1_Low_out	CTGATAGCAACGTTCCGCAA	Genotyping
LM19-2289-PS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCAATTCTCAACCATCTTT	Cell death
LM20-2289-NP-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTGCAACGGCATTGAACAGG	Cell death
LM21-2289-NoStop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAGGCACGCTCTGCCCCA	Cell death
LmSTEE30_F1U_Ecol	GAGAGAGAATTCGATCTCATACCATAATCAC	Silencing
LmSTEE30_F1L_Ncol	GAGAGACCATGGGGCAACACACGCACACAC	Silencing
LmSTEE30_F2U_BamHI	GAGAGAGGATCCCGATCTCATACCATAATCAC	Silencing
LmSTEE30_F2L_Ncol	GAGAGACCATGGGTAGTCGCCGTCTGTACAG	Silencing
LmSTEE30_qUp	GAACCGCCATAACCTTTGCA	qPCR
LmSTEE30_qLow	GCCATCCAGTCTTCAGCCAT	qPCR
LmSTEE30_Up_out	TCGCCTACCCTAACTCTGCACT	Genotyping
LmSTEE30_Low_out	AGCGAATGAGTCCACGATCT	Genotyping
LM22-3000-PS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAAGTTCACAAACACCATCAC	Cell death
LM23-3000-NP-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCAACAGCCTGTGACCCCG	Cell death
LM24-3000-NoStop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAACGCAGTAGGAACCGCCATAA	Cell death
LmSTEE35_F1U_Ecol	GAGAGAGAATTCCTGCGCTCTTGGTGCAG	Silencing
LmSTEE35_F1L_Ncol	GAGAGACCATGGTTCGCTTGATCCATTGAAAGCA	Silencing
LmSTEE35_F2U_BamHI	GAGAGAGGATCCTCTGGCGCTCTTGGTGCAG	Silencing
LmSTEE35_F2L_Ncol	GAGAGACCATGGCACCAAGCTCTTACATAGGT	Silencing
LmSTEE35_qUp	TGCAAACTGTTATCGTCCCTTT	qPCR
LmSTEE35_qLow	TGCAGGTACGTTAATAGGTCC	qPCR
LmSTEE35_Up_out	GAGAGAGAATTCATGTATCTCTGCAAACTG	Genotyping
LmSTEE35_Low_out	GAGAGACCATGGTTCGCTTGATCCATTGAAAGCA	Genotyping
LM25-3500-PS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTATCTCTCTGCAAACTGT	Cell death
LM26-3500-NP-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGACAAACACCATATTGTGCCCTG	Cell death
LM27-3500-NoStop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAGTTCAGACAGGATGCCTCCA	Cell death
LmSTEE78_F1U_Ecol	GAGAGAGAATTCACCTTTTCCCTTTTACGATTCGAG	Silencing
LmSTEE78_F1L_Ncol	GAGAGACCATGGCTGAAATCCGCGGCTTCATG	Silencing
LmSTEE78_F2U_BamHI	GAGAGAGGATCCACTTTTCCCTTTTACGATTCGAG	Silencing
LmSTEE78_F2L_Ncol	GAGAGACCATGGACCTCGACCGGCATAAACTT	Silencing
LmSTEE78_qUp	GGTGGCAAGGGCGTTAAGA	qPCR
LmSTEE78_qLow	AGTCTGGAATTGGATCTGCT	qPCR
LmSTEE78_Up_out	ACGATTCGAGATAGAGCTTCAA	Genotyping
LmSTEE78_Low_out	TCTTTTACAACCACGTCCACT	Genotyping
LM28-7821-PS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTTTACCAGCACATTCATTTT	Cell death
LM29-7821-NP-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCACCGCACAAAGTCCAAGCC	Cell death
LM30-7821-NoStop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAGGCTAATACAGCCATCAGCT	Cell death
LmSTEE98_F1U_Ecol	GAGAGAGAATTCCTACTGGCTGTCTTTGCTGC	Silencing
LmSTEE98_F1L_Ncol	GAGAGACCATGGAAGGTCCTCTACACATTGC	Silencing
LmSTEE98_F2U_BamHI	GAGAGAGGATCCTACTGGCTGTCTTTGCTGC	Silencing
LmSTEE98_F2L_Ncol	GAGAGACCATGGACAAGTGAATACCGCCGC	Silencing
LmSTEE98_qUp	ATGAAGACCTTTATCACCATTGC	qPCR
LmSTEE98_qLow	CCGCCACAGTGAACATAAT	qPCR
LmSTEE98_Up_out	CTCGATCAAGCACAAATACAACCTG	Genotyping
LmSTEE98_Low_out	GTTTTAAATACACACAGCCTCG	Genotyping
LM31-9875-PS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAAGACCTTTATCACCATTGC	Cell death
LM32-9875-NP-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGACTCCAGTTGAGCTGGTAGCT	Cell death
LM33-9875-NoStop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAGTGAATACCGC	Cell death
Tubulin_Up	AAGAACTVATCCTACTTCGT	qPCR
Tubulin_Low	TGAATAGCTCCTGAATGG	qPCR
Actin_Up	AGTGCGATGTCGATGTCAG	qPCR
Actin_Low	AAGAGCGGTGATTTCTTCT	qPCR

Table S3: Differential expression of *LmSTEE1* in RNA-seq during stem colonization in field

<i>LmSTEE1</i>	November (Darmor-bzh)	November (Bristol)	December (Darmor-bzh)	December (Bristol)	February (Darmor-bzh)	February (Bristol)	March (Darmor-bzh)	March (Bristol)	April (Darmor-bzh)	April (Bristol)	May (Darmor-bzh)	May (Bristol)	July (Darmor-bzh)	July (Bristol)
November (Darmor-bzh)		-0.12 (1)	-1.96 (1)	-0.06 (1)	-0.48 (1)	-2.1 (1)	0.88 (1)	2.12 (0.59)	<u>5.48 (0)</u>	<u>7.92 (0)</u>	3.54 (0.11)	<u>7.81 (0)</u>	2.03 (0.1)	<u>2.6 (0.04)</u>
November (Bristol)			-1.89 (1)	0.06 (1)	-0.36 (1)	-2.02 (1)	1.02 (1)	2.28 (0.57)	<u>5.63 (0)</u>	<u>8.07 (0)</u>	3.68 (0.06)	<u>7.98 (0)</u>	2.2 (0.07)	<u>2.76 (0.03)</u>
December (Darmor-bzh)				1.93 (1)	1.76 (1)	0 (1)	3.16 (1)	6.08 (0.17)	<u>7.77 (0)</u>	<u>11.08 (0)</u>	<u>5.72 (0.01)</u>	<u>13.77 (0)</u>	<u>10.88 (0)</u>	<u>10.63 (0)</u>
December (Bristol)					-0.42 (1)	-2.06 (1)	0.95 (1)	2.21 (0.57)	<u>5.56 (0)</u>	<u>8 (0)</u>	3.62 (0.08)	<u>7.9 (0)</u>	2.12 (0.09)	<u>2.69 (0.03)</u>
February (Darmor-bzh)						-1.86 (1)	1.42 (1)	2.74 (0.38)	<u>6.06 (0)</u>	<u>8.52 (0)</u>	<u>4.11 (0.03)</u>	<u>8.47 (0)</u>	<u>2.7 (0.04)</u>	<u>3.27 (0.01)</u>
February (Bristol)							3.28 (1)	6.11 (0.17)	<u>7.9 (0)</u>	<u>11.14 (0)</u>	<u>5.87 (0.02)</u>	<u>13.78 (0)</u>	<u>10.89 (0)</u>	<u>10.63 (0)</u>
March (Darmor-bzh)								1.14 (0.97)	<u>4.64 (0)</u>	<u>6.98 (0)</u>	2.71 (0.51)	<u>6.79 (0)</u>	1 (0.46)	1.57 (0.25)
March (Bristol)									<u>3.61 (0)</u>	<u>5.88 (0)</u>	1.69 (0.16)	<u>5.63 (0)</u>	-0.17 (0.92)	0.4 (0.57)
April (Darmor-bzh)										<u>2.26 (0.02)</u>	-1.92 (0.19)	<u>2 (0.01)</u>	<u>-3.8 (0)</u>	<u>-3.23 (0)</u>
April (Bristol)											<u>-4.19 (0)</u>	-0.26 (0.99)	<u>-6.06 (0)</u>	<u>-5.5 (0)</u>
May (Darmor-bzh)												<u>3.94 (0)</u>	-1.86 (0.03)	-1.3 (0.16)
May (Bristol)													<u>-5.8 (0)</u>	<u>-5.24 (0)</u>
July (Darmor-bzh)														0.57 (1)
July (Bristol)														

The differential expression of the *LmSTEE* gene between two conditions is indicated here with the p-value in brackets. Significant differential expressions, with Log(Fold Change)>2 and p-value<0.05, are underlined in red.

Table S4: Differential expression of *LmSTEE30* in RNA-seq during stem colonization in field

<i>LmSTEE30</i>	November (Darmor-bzh)	November (Bristol)	December (Darmor-bzh)	December (Bristol)	February (Darmor-bzh)	February (Bristol)	March (Darmor-bzh)	March (Bristol)	April (Darmor-bzh)	April (Bristol)	May (Darmor-bzh)	May (Bristol)	July (Darmor-bzh)	July (Bristol)
November (Darmor-bzh)		-1.73 (1)	-1.54 (1)	0.11 (1)	-0.81 (1)	-1.03 (1)	-1.35 (1)	0.05 (1)	0.96 (0.81)	0.2 (0.96)	-0.71 (1)	<u>3.22 (0)</u>	-0.5 (0.64)	1.43 (0.07)
November (Bristol)			0.19 (1)	1.84 (1)	0.94 (1)	0.72 (1)	0.4 (1)	1.88 (0.23)	<u>2.72 (0.05)</u>	2.01 (0.08)	1.04 (1)	<u>5.07 (0)</u>	1.36 (0.12)	<u>3.28 (0)</u>
December (Darmor-bzh)				1.65 (1)	0.75 (1)	0.52 (1)	0.2 (1)	1.66 (0.18)	<u>2.52 (0.05)</u>	1.8 (0.08)	0.84 (1)	<u>4.85 (0)</u>	1.13 (0.1)	<u>3.06 (0)</u>
December (Bristol)					-0.92 (1)	-1.14 (1)	-1.46 (1)	-0.06 (1)	0.85 (0.9)	0.09 (1)	-0.82 (1)	<u>3.11 (0)</u>	-0.61 (0.49)	1.32 (0.12)
February (Darmor-bzh)						-0.22 (1)	-0.55 (1)	0.89 (0.66)	1.78 (0.19)	1.03 (0.34)	0.1 (1)	<u>4.06 (0)</u>	0.35 (0.78)	<u>2.28 (0)</u>
February (Bristol)							-0.32 (1)	1.11 (0.6)	2 (0.17)	1.26 (0.25)	0.32 (1)	<u>4.3 (0)</u>	0.58 (0.59)	<u>2.51 (0)</u>
March (Darmor-bzh)								1.45 (0.5)	2.33 (0.15)	1.59 (0.24)	0.65 (1)	<u>4.64 (0)</u>	0.92 (0.48)	<u>2.85 (0)</u>
March (Bristol)									0.93 (0.7)	0.15 (1)	-0.78 (0.88)	<u>3.17 (0)</u>	-0.55 (0.63)	1.38 (0.07)
April (Darmor-bzh)										-0.77 (0.96)	-1.68 (0.54)	<u>2.24 (0)</u>	-1.48 (0.07)	0.45 (0.52)
April (Bristol)											-0.93 (0.59)	<u>3.02 (0)</u>	-0.7 (0.44)	1.23 (0.2)
May (Darmor-bzh)												<u>3.96 (0)</u>	0.24 (0.89)	<u>2.17 (0.01)</u>
May (Bristol)													<u>-3.72 (0)</u>	-1.79 (0.02)
July (Darmor-bzh)														1.93 (0.01)
July (Bristol)														

The differential expression of the *LmSTEE* gene between two conditions is indicated here with the p-value in brackets. Significant differential expressions, with Log(Fold Change)>2 and p-value<0.05, are underlined in red.

Table S5: Differential expression of *LmSTEE35* in RNA-seq during stem colonization in field

<i>LmSTEE35</i>	November (Darmor-bzh)	November (Bristol)	December (Darmor-bzh)	December (Bristol)	February (Darmor-bzh)	February (Bristol)	March (Darmor-bzh)	March (Bristol)	April (Darmor-bzh)	April (Bristol)	May (Darmor-bzh)	May (Bristol)	July (Darmor-bzh)	July (Bristol)
November (Darmor-bzh)		-0.17 (1)	0.58 (1)	-0.89 (1)	0.57 (1)	-0.51 (1)	0.06 (1)	<u>3.93 (0)</u>	<u>3.47 (0.02)</u>	<u>4.38 (0)</u>	<u>3.56 (0.02)</u>	<u>4.05 (0)</u>	0.37 (0.83)	1.02 (0.54)
November (Bristol)			0.75 (1)	-0.73 (1)	0.74 (1)	-0.34 (1)	0.23 (1)	<u>4.11 (0)</u>	<u>3.65 (0)</u>	<u>4.56 (0)</u>	<u>3.74 (0)</u>	<u>4.24 (0)</u>	0.57 (0.65)	1.21 (0.35)
December (Darmor-bzh)				-1.49 (1)	-0.03 (1)	-1.11 (1)	-0.54 (1)	<u>3.28 (0)</u>	<u>2.89 (0.01)</u>	<u>3.75 (0)</u>	<u>2.98 (0.02)</u>	<u>3.39 (0)</u>	-0.29 (1)	0.35 (0.68)
December (Bristol)					1.5 (1)	0.41 (1)	1 (1)	<u>5 (0)</u>	<u>4.42 (0)</u>	<u>5.41 (0)</u>	<u>4.49 (0)</u>	<u>5.16 (0)</u>	1.5 (0.21)	2.13 (0.09)
February (Darmor-bzh)						-1.1 (1)	-0.51 (1)	<u>3.32 (0)</u>	<u>2.93 (0.02)</u>	<u>3.79 (0)</u>	<u>3.03 (0.02)</u>	<u>3.43 (0)</u>	-0.25 (0.79)	0.39 (0.87)
February (Bristol)							0.59 (1)	<u>4.51 (0)</u>	<u>4.03 (0)</u>	<u>4.95 (0)</u>	<u>4.12 (0)</u>	<u>4.64 (0)</u>	0.97 (0.45)	1.61 (0.18)
March (Darmor-bzh)								<u>3.85 (0)</u>	<u>3.44 (0)</u>	<u>4.32 (0)</u>	<u>3.54 (0)</u>	<u>3.97 (0)</u>	0.29 (0.35)	0.93 (0.14)
March (Bristol)									-0.33 (1)	0.49 (0.97)	-0.22 (0.98)	0.09 (1)	<u>-3.6 (0)</u>	<u>-2.96 (0)</u>
April (Darmor-bzh)										0.82 (0.62)	0.11 (1)	0.41 (0.67)	<u>-3.27 (0)</u>	<u>-2.63 (0)</u>
April (Bristol)											-0.71 (0.51)	-0.41 (0.91)	<u>-4.09 (0)</u>	<u>-3.45 (0)</u>
May (Darmor-bzh)												0.3 (0.73)	<u>-3.38 (0)</u>	<u>-2.74 (0)</u>
May (Bristol)													<u>-3.68 (0)</u>	<u>-3.04 (0)</u>
July (Darmor-bzh)														0.64 (0.94)
July (Bristol)														

The differential expression of the *LmSTEE* gene between two conditions is indicated here with the p-value in brackets. Significant differential expressions, with Log(Fold Change)>2 and p-value<0.05, are underlined in red.

Table S6: Differential expression of *LmSTEE98* in RNA-seq during stem colonization in field

<i>LmSTEE98</i>	November (Darmor-bzh)	November (Bristol)	December (Darmor-bzh)	December (Bristol)	February (Darmor-bzh)	February (Bristol)	March (Darmor-bzh)	March (Bristol)	April (Darmor-bzh)	April (Bristol)	May (Darmor-bzh)	May (Bristol)	July (Darmor-bzh)	July (Bristol)
November (Darmor-bzh)		-0.89 (1)	-1.01 (1)	-0.8 (1)	-0.6 (1)	-2.91 (1)	-0.56 (1)	<u>2.93 (0.04)</u>	2.15 (0.32)	<u>5.89 (0)</u>	<u>4.35 (0)</u>	<u>4.54 (0)</u>	<u>5.24 (0)</u>	<u>4.21 (0)</u>
November (Bristol)			-0.11 (1)	0.08 (1)	0.34 (1)	-2.04 (1)	0.38 (1)	<u>4.01 (0.01)</u>	3.1 (0.1)	<u>6.93 (0)</u>	<u>5.28 (0)</u>	<u>5.66 (0)</u>	<u>6.37 (0)</u>	<u>5.34 (0)</u>
December (Darmor-bzh)				0.19 (1)	0.45 (1)	-1.97 (1)	0.49 (1)	<u>4.14 (0)</u>	3.22 (0.1)	<u>7.05 (0)</u>	<u>5.4 (0)</u>	<u>5.8 (0)</u>	<u>6.51 (0)</u>	<u>5.48 (0)</u>
December (Bristol)					0.25 (1)	-2.11 (1)	0.29 (1)	<u>3.91 (0.02)</u>	3.01 (0.28)	<u>6.83 (0)</u>	<u>5.19 (0)</u>	<u>5.56 (0)</u>	<u>6.27 (0)</u>	<u>5.24 (0)</u>
February (Darmor-bzh)						-2.6 (1)	0.04 (1)	<u>3.61 (0.01)</u>	2.8 (0.13)	<u>6.56 (0)</u>	<u>5 (0)</u>	<u>5.24 (0)</u>	<u>5.94 (0)</u>	<u>4.92 (0)</u>
February (Bristol)							2.65 (1)	<u>7.87 (0)</u>	<u>5.4 (0.03)</u>	<u>10.02 (0)</u>	<u>7.49 (0)</u>	<u>11.48 (0)</u>	<u>15.08 (0)</u>	<u>13.24 (0)</u>
March (Darmor-bzh)								<u>3.58 (0.03)</u>	2.76 (0.27)	<u>6.52 (0)</u>	<u>4.96 (0)</u>	<u>5.21 (0)</u>	<u>5.91 (0)</u>	<u>4.88 (0)</u>
March (Bristol)									-0.67 (0.96)	<u>3 (0)</u>	1.57 (0.1)	1.57 (0.04)	<u>2.26 (0)</u>	1.24 (0.11)
April (Darmor-bzh)										<u>3.66 (0)</u>	2.22 (0.07)	<u>2.24 (0.01)</u>	<u>2.93 (0)</u>	1.91 (0.01)
April (Bristol)											-1.43 (0.09)	-1.43 (0.14)	-0.74 (0.43)	-1.77 (0.02)
May (Darmor-bzh)												0 (0.98)	0.69 (0.29)	-0.34 (0.81)
May (Bristol)													0.69 (0.83)	-0.34 (1)
July (Darmor-bzh)														-1.03 (0.62)
July (Bristol)														

The differential expression of the *LmSTEE* gene between two conditions is indicated here with the p-value in brackets. Significant differential expressions, with Log(Fold Change)>2 and p-value<0.05, are underlined in red.

Table S7: Differential expression of *LmSTEE78* in RNA-seq during stem colonization in field

<i>LmSTEE78</i>	November (Darmor-bzh)	November (Bristol)	December (Darmor-bzh)	December (Bristol)	February (Darmor-bzh)	February (Bristol)	March (Darmor-bzh)	March (Bristol)	April (Darmor-bzh)	April (Bristol)	May (Darmor-bzh)	May (Bristol)	July (Darmor-bzh)	July (Bristol)
November (Darmor-bzh)		2.02 (1)	2.02 (1)	1.32 (1)	1.53 (1)	1.61 (1)	0.56 (1)	<u>3.99 (0)</u>	<u>5.3 (0)</u>	<u>6.11 (0)</u>	<u>3.46 (0.05)</u>	<u>6.29 (0)</u>	<u>3.91 (0)</u>	<u>6.03 (0)</u>
November (Bristol)			-1.7 (1)	-0.7 (1)	-0.53 (1)	-0.43 (1)	-1.5 (1)	1.83 (0.09)	<u>3.24 (0)</u>	<u>3.98 (0)</u>	1.42 (0.63)	<u>4.1 (0)</u>	1.71 (0.04)	<u>3.83 (0)</u>
December (Darmor-bzh)				1 (1)	1.2 (1)	1.28 (1)	0.23 (1)	<u>3.63 (0)</u>	<u>4.97 (0)</u>	<u>5.75 (0)</u>	<u>3.14 (0.05)</u>	<u>5.92 (0)</u>	<u>3.54 (0)</u>	<u>5.65 (0)</u>
December (Bristol)					0.18 (1)	0.27 (1)	-0.79 (1)	<u>2.55 (0.02)</u>	<u>3.95 (0)</u>	<u>4.69 (0)</u>	2.12 (0.29)	<u>4.83 (0)</u>	<u>2.45 (0.01)</u>	<u>4.56 (0)</u>
February (Darmor-bzh)						0.09 (1)	-0.98 (1)	<u>2.37 (0.02)</u>	<u>3.78 (0)</u>	<u>4.51 (0)</u>	1.95 (0.28)	<u>4.64 (0)</u>	<u>2.26 (0.01)</u>	<u>4.37 (0)</u>
February (Bristol)							-1.07 (1)	<u>2.27 (0.05)</u>	<u>3.69 (0)</u>	<u>4.42 (0)</u>	1.86 (0.55)	<u>4.55 (0)</u>	<u>2.17 (0.01)</u>	<u>4.28 (0)</u>
March (Darmor-bzh)								<u>3.39 (0.01)</u>	<u>4.76 (0)</u>	<u>5.52 (0)</u>	2.93 (0.12)	<u>5.67 (0)</u>	<u>3.29 (0)</u>	<u>5.41 (0)</u>
March (Bristol)									1.44 (0.27)	<u>2.16 (0.02)</u>	-0.38 (0.96)	<u>2.27 (0.01)</u>	-0.12 (0.99)	1.99 (0.02)
April (Darmor-bzh)										0.71 (0.79)	-1.82 (0.19)	0.82 (0.4)	-1.57 (0.06)	0.55 (0.55)
April (Bristol)											<u>-2.54 (0.01)</u>	0.11 (1)	<u>-2.28 (0)</u>	-0.17 (0.94)
May (Darmor-bzh)												<u>2.65 (0)</u>	0.27 (0.76)	<u>2.38 (0)</u>
May (Bristol)													<u>-2.39 (0.01)</u>	-0.27 (1)
July (Darmor-bzh)														<u>2.11 (0.03)</u>
July (Bristol)														

The differential expression of the *LmSTEE* gene between two conditions is indicated here with the p-value in brackets. Significant differential expressions, with Log(Fold Change)>2 and p-value<0.05, are underlined in red.

Tableau 1: Caractéristiques de LmSTEE11

Name	Accession Nr	Size (aa)	Cysteins	Expression rank ^a	Closest blast hit
LmSTEE11	<i>Lema_P111710.1</i>	113	2	198	none

Tableau 2: Amplification par PCR et analyse HRM de LmSTEE11 dans les isolats de *Leptosphaeria maculans*

Origin of isolates	Presence	Absence ^b	Mutation ^c (Nb isolates)
Europe	93	0	0/34
Oceania	20	0	0/20
Canada	16	0	0/16
USA	10	0	0/10
Mexico	0	41	-
Chili	5	0	0/5
Total	144	41	0/85

3. Résultats complémentaires

3.1. Un effecteur tardif candidat supplémentaire: *LmSTEE11*

En plus des cinq effecteurs précédemment analysés, j'ai pu étudier un autre effecteur candidat, appelé *LmSTEE11*. Ce gène code pour une petite protéine sécrétée, enrichie en cystéines, et dont aucun homologue n'a pu être identifié dans les bases de données (Tableau 1).

L'analyse du polymorphisme de *LmSTEE11* montre que ce gène est absent de toutes les souches mexicaines isolées de *B. oleracea* mais conservé dans les autres souches *L. maculans* que ce soit en termes de présence ou de polymorphisme (Tableau 2).

Les approches de "silencing" et les essais de suppression de mort cellulaire dans le tabac n'ont cependant pas pu être mises en place pour ce candidat, l'annotation du gène présentant des erreurs au niveau de la position des introns. La nouvelle annotation du génome de *L. maculans* issue du projet Leptolife a permis, depuis, de résoudre l'annotation de *LmSTEE11*.

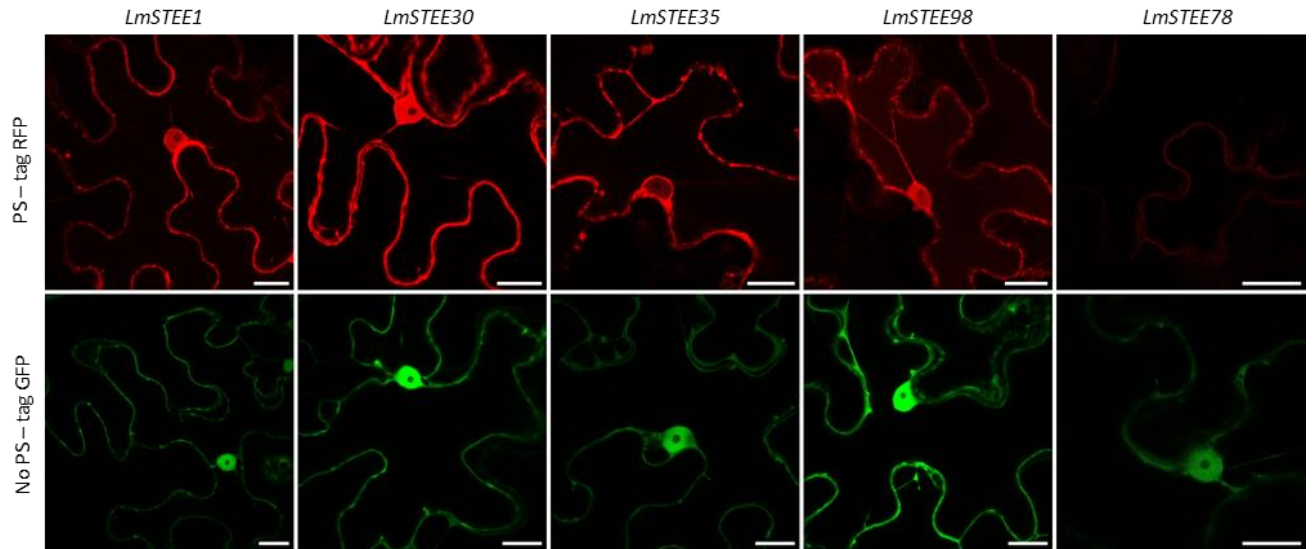


Figure 1: Localisation cellulaire des effecteurs *LmSTEE*

Les effecteurs tardifs *LmSTEE* de *Leptosphaeria maculans* ont été fusionnés soit avec leur peptide signal (PS) à la RFP à leur extrémité C-terminale, soit sans leur peptide signal (NoPS) à la GFP à leur extrémité C-terminale. Les vecteurs ont été exprimés dans de feuilles de *Nicotiana Benthamiana* par agroinfiltration qui ont été ensuite observées 48 h après infiltration au microscope confocal, sous un laser émettant à 488 nm pour la détection de la GFP et à 532 nm pour la détection de la RFP. L'échelle correspond à 20 μm .

3.2. Localisation subcellulaire des effecteurs LmSTEE

Afin de déterminer la localisation subcellulaire des effecteurs tardifs (*LmSTEE1*, *LmSTEE30*, *LmSTEE35*, *LmSTEE98* et *LmSTEE78*), je les ai fait exprimer transitoirement fusionné à la GFP ou à la RFP dans les feuilles de *Nicotiana Benthamiana* (Figure 1).

Ces effecteurs avaient une localisation nucléo-cytoplasmique lorsque exprimés dans les feuilles de tabac et ne semblaient pas posséder de localisation différentielle en absence et en présence de leur signal de sécrétion.

Chapitre III:

**Identification de nouvelles
sources de résistances
spécifiques aux effecteurs
tardifs de *L. maculans*, une
nouvelle approche**

1. Introduction

L'existence d'effecteurs exprimés par le champignon lors de la colonisation systémique, nous a amené à supposer que certains des effecteurs tardifs pourraient être reconnus par le système de défense de la plante sur un modèle de type gène-pour-gène, et ainsi participer, au moins en partie, à la résistance au stade adulte intervenant dans certains génotypes de colza.

L'identification de génotypes de colza possédant les gènes de résistance correspondant aux gènes d'avirulence de *L. maculans* connus et exprimés au stade précoce se fait par test cotylédonnaire. Les cotylédons inoculés développent une mort cellulaire localisée (HR) ou une macule permettant de différencier les variétés possédant ou non le gène de résistance correspondant (Annexe 1). Ces tests d'inoculation ne permettent cependant pas d'identifier des potentiels gènes de résistance correspondant à des effecteurs tardifs puisque ces derniers ne sont pas exprimés lors de la colonisation des cotylédons.

Dans le but d'identifier de telles sources de résistance spécifiques et/ou faciliter l'identification de résistances quantitatives dans le matériel végétal, j'ai créé des souches fongiques sur-exprimant précocement des effecteurs tardifs. Avec ces souches transformées j'ai évalué par test cotylédonnaire une grande collection de génotypes de colza pour identifier de potentielles relations de type gène-pour-gène. Le postulat sous-jacent à cette stratégie implique que la résistance correspondant à ces effecteurs tardifs est exprimée dans les cotylédons et qu'elle n'est pas spécifiquement régulée à des stades tardifs du développement de la plante.

Les résultats de ces tests sont ici présentés sous la forme de l'article " Manipulation of late effector expression in *Leptosphaeria maculans* to identify hidden resistance genes in oilseed rape" qui est en préparation.

2. Article

Manipulation of late effector expression in *Leptosphaeria maculans* to identify hidden resistance genes in oilseed rape

Authors

Julie Gervais¹, Régine Delourme², Bénédicte Ollivier¹, Isabelle Fudal¹, Thierry Rouxel¹ and Marie-Hélène Balesdent^{1*}

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

²INRA, UMR1349 IGEPP, BP35327, 35653 Le Rheu, France

*Corresponding author: Tel: + 33(0)1 30 81 45 73, Fax: +33(0)1 30 81 53 06, marie-helene.balesdent@inra.fr

Running title: New screening approach of canola resistance genes

Keywords: *Brassica napus*, *Leptosphaeria maculans*, resistance, screening, effector

Word count

Summary: 248

Introduction: 1297

Results: 1094

Discussion: 1502

Experimental procedures: 851

Acknowledgements: 65

Table and figure legends: 527

Total: 5584

ABSTRACT

The stem canker disease, caused by *Leptosphaeria maculans*, is an important disease of oilseed rape (Canola, *Brassica napus*) and is mainly controlled by genetic resistance. The fungus first colonizes leaves and cotyledons of the plant and then progresses inside the stem for several months, without inducing any symptoms, before switching to necrotrophy inducing the stem necrosis. During the stem colonization, the plant may exhibit adult-stage resistance limiting the stem necrosis development. By transcriptomic and molecular analysis, we previously showed that *L. maculans* expresses, during this stem colonization stage, several effector-encoding genes, called *LmSTEE*, that are different from effector genes expressed during cotyledon or leaf infection.

Here, we investigated whether *LmSTEE* proteins could be specifically recognized by the plant defense system, in a gene-for-gene manner, and thus could partly explain the adult-stage resistance. To identify such gene-for-gene relationship using a medium to high-throughput screening strategy, we created fungal strains over-expressing *LmSTEE* genes in cotyledons and screened a collection of 204 oilseed rape genotypes using the standard cotyledon inoculation test. We thus identified one oilseed rape genotype that specifically expressed hypersensitive response to isolates expressing *LmSTEE98* at the cotyledon stage. Genetic analyses and mapping identified a single gene control of this resistance in a 0.6 cM interval of the oilseed rape genetic map. Our study provides a proof of concept that this strategy allows identification of new resistance genes that now must be investigated further and could be a way to identify resistance genes contributing to partial quantitative resistance.

INTRODUCTION

Genetic resistance to plant diseases is a highly desirable trait to breed for to ensure global food security and avoid unintentional effects of pesticides. Also, in some crop species genetic resistance is the only possible way to control diseases in the absence of other efficient or sustainable control methods. Two types of resistance are deployed in fields to efficiently control plant diseases, the qualitative and the quantitative resistances. The qualitative resistance is usually controlled by a single resistance gene and confers complete resistance to pathogen populations harboring the corresponding avirulence gene. It is often associated with a hypersensitive response (HR) and localized cell death, preventing the pathogen from colonizing its host (Greenberg and Yao, 2004). By contrast, quantitative resistance does not prevent the pathogen from infecting the plant but limits symptom severity and therefore reduces its impact on yield. It is based on the joint effect of several genes, associated with genomic regions or QTL (Quantitative Trait Loci), each contributing quantitatively to the level of defense of the plant (Delourme *et al.*, 2006; Niks *et al.*, 2015; St.Clair, 2010). Over the last twenty years, many disease

resistance QTLs have been identified in plants. For example, Wilfert and Schmid-Hempel (2008) analyzed 194 publications describing a total of 445 resistance QTLs to various bio-aggressors in different plants, like wheat, barley, maize or melon. However, despite the importance of quantitative resistances to control plant diseases, their underlying mechanisms remain much less known (Poland *et al.*, 2009) and are probably very diverse (Corwin and Kliebenstein, 2017; Kushalappa *et al.*, 2016).

The fungus *Leptosphaeria maculans* is responsible for one of the most important diseases of oilseed rape (*Brassica napus*), the phoma stem canker disease, also termed blackleg. This disease which can induce over US\$900 million losses per year is mainly controlled by genetic resistance in most parts of the world (Fitt *et al.*, 2008). *L. maculans* first colonizes the leaves or cotyledons of the plant where the fungus has a short biotrophic stage followed by a necrotrophic stage inducing leaf spots. After this first colonization stage, the fungus migrates toward the stem tissues, from the leaves to the crown, during an asymptomatic phase of several months, before switching to a necrotrophic lifestyle and inducing necrosis at the stem base (Hammond *et al.*, 1985; Rouxel and Balesdent, 2005). Like in other pathosystems, qualitative and quantitative resistance to *L. maculans* have been described in *B. napus* (Delourme *et al.*, 2006). The qualitative resistance typically corresponds to race-specific resistance genes conferring complete resistance to the fungus and preventing it from colonizing cotyledons or leaves (Balesdent *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2006; Larkan *et al.*, 2013). This resistance is easily assessed in controlled conditions by cotyledon inoculation assays which are widely reproducibly used and provide a reliable method for high throughput screening of large collections of *B. napus* or populations of *L. maculans* (Balesdent *et al.*, 2006; Ghanbarnia *et al.*, 2012; Rouxel *et al.*, 2003). The quantitative resistance which operates during the petiole and stem colonization, corresponds to a partial resistance, and is under a polygenic control involving numerous QTLs whose expression seems to be highly dependent on environmental conditions (Fopa Fomeju *et al.*, 2015, Huang *et al.*, 2016; Jestin *et al.*, 2011; Jestin *et al.*, 2012; Jestin *et al.*, 2015, Pilet *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2001, Raman *et al.*, 2016). This resistance limits the onset and severity of stem necrosis but its mechanistic determinants are unknown and contradictory effects on speed growth in tissues, ability to move from petiole to stem or stem necrosis development are reported in the literature (Huang *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2014). In contrast to the qualitative resistance, reproducible methods to assess the quantitative resistance under controlled conditions are yet to be developed. Currently, this type of resistance is evaluated in field assays by scoring disease severity on mature plants at the end of the growing season, which can last from six to ten months depending on the geographical location. Furthermore, due to the influence of the environment on the quantitative resistance, identification of stable resistance QTL requires large replicated field plot experiments at different locations in different years (Huang *et al.*, 2016; Jestin *et al.*, 2015).

As for other pathogens, the infection of oilseed rape by *L. maculans* relies on the deployment of fungal effector molecules. During the colonization of oilseed rape, *L. maculans* expresses at least two distinct waves of effector genes (Gervais *et al.*, 2016). During the colonization of cotyledons, it expresses genes coding for "early effectors", including the avirulence genes that can be potentially "recognized" by the plant and lead to qualitative resistance. Numerous *L. maculans* avirulence genes (*AvrLm*) have been cloned to date (Balesdent *et al.*, 2013; Fudal *et al.*, 2007; Ghanbarnia *et al.*, 2014; Gout *et al.*, 2006; Parlange *et al.*, 2009; Plissonneau *et al.*, 2015; Van de Wouw *et al.*, 2014) which enabled the construction of isogenic isolates only differing by a single *AvrLm* gene useable in cotyledon tests to unequivocally identify the corresponding resistance (*Rlm*) genes (Larkan *et al.*, 2015; Parlange *et al.*, 2009; Van de Wouw *et al.*, 2014). During the systemic colonization of oilseed rape, during which the quantitative resistance operates, *L. maculans* expresses several effector-encoding genes to interfere with the plant defense system and notably to suppress plant cell death (Gervais *et al.*, 2016 and Gervais *et al.*, in prep. (Chapitre 2)). These genes called *LmSTEE*, for Stem Expressed Effector, are not or lowly expressed in axenic growth and during the cotyledon colonization, but are highly expressed during the stem colonization. Our working hypothesis is that at least some of the *LmSTEE* genes could be recognized by plant specific resistance genes during the systemic colonization, similarly to known avirulence genes of *L. maculans* that are part of the early stage effector pool. This hypothesis could thus explain, at least in part the quantitative resistance. Several studies have shown in some other pathosystems that quantitative resistance could be isolate-specific (Niks *et al.*, 2015). Specific relationships between resistance QTL and isolates have thus been observed in several systems like *Brassica oleracea/Plasmodiphora brassicae* (Rocherieux *et al.*, 2004), apple/*Venturia inaequalis* (Calenge *et al.*, 2004) or barley/*Pyrenophora graminea* (Arru *et al.*, 2003). A gene-for-gene interaction for partial resistance has also been identified in rice to *Magnaporthe oryzae*. An avirulence gene (*AvrPi34*) corresponding to the single dominant resistance gene *Pi34* was identified to be responsible for the partial resistance phenotype (Zenbayashi-Sawata *et al.*, 2005). These results support the hypothesis formulated by Parlevliet and Zadoks (1977) that partial resistance may be due, at least in part, to gene-for-gene interactions. If gene-for-gene type interactions occur between *LmSTEE* genes and resistance genes of *B. napus*, such relationships cannot be detected with the usual cotyledon inoculation assay, since the corresponding avirulence proteins are not produced at this stage. In addition stem inoculation assays (Gervais *et al.*, 2016) to identify such resistance are not amenable to high-throughput screening of plant genotypes due to length of the process, reproducibility problems in the time and space needed to screen many genotypes of grown-up plants. We therefore envisaged here a new strategy to identify putative new oilseed rape resistance genes matching late effectors of *L. maculans*. We transformed isolates with constructs in which the late effectors are under the control of the promoter of *AvrLm4-7*, an "early" avirulence effector gene (Parlange *et al.*, 2009).

This strategy allowed us to express six *LmSTEE* genes during cotyledon infection. With this approach we identified a *B. napus* genotype expressing a hypersensitive resistance to one late effector: LmSTEE98. Genetic control of this response was investigated and a double haploid (DH) population was used to map the associated region into the *B. napus* genome. This provides a proof of principle for our approach to identify new and uneasy-to-detect sources of resistance for effective control of *L. maculans*.

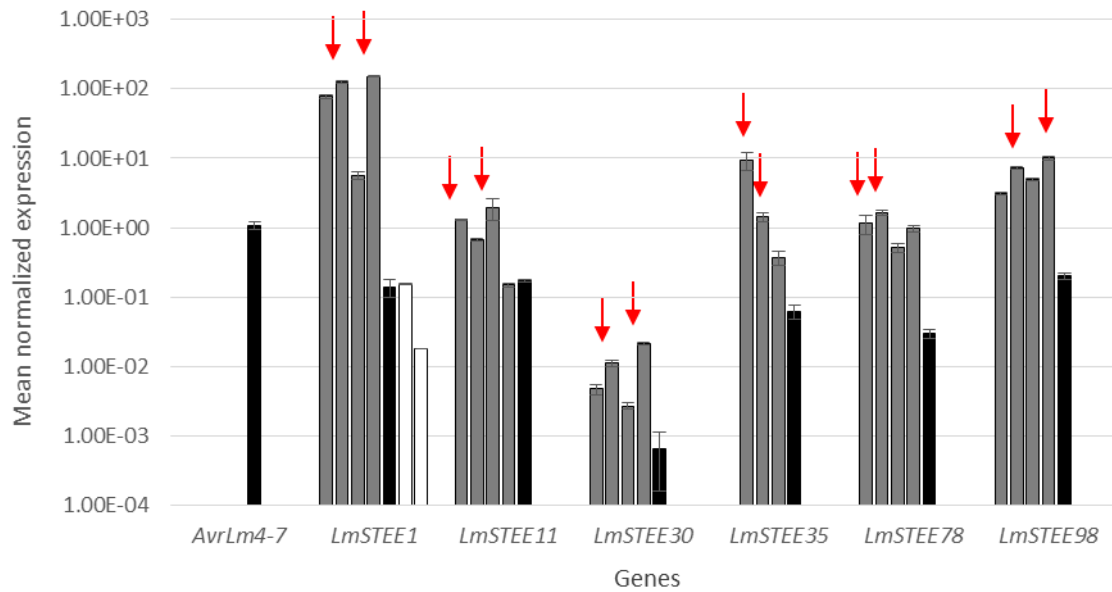


Figure 1: Expression values of *LmSTEE* genes in “over-expressing in cotyledons” (OEC) mutants during early stage of cotyledon colonization

OEC mutants expressing the genes *LmSTEE1*, *LmSTEE11*, *LmSTEE30*, *LmSTEE35*, *LmSTEE78* and *LmSTEE98* under the control of the promoter of the *AvrLm4-7* gene, specifically over-expressed during the early colonization stage, were created. The expression of *LmSTEE* genes in the different OEC mutants was assessed by qRT-PCR in infected cotyledons, 7 days post inoculation. Grey bars are expression data from three to four different mutants per construction, black bars represent expression in the wild type isolate (INV13.269) and white bars the expression in control mutants with the endogenous promoter (*LmSTEE1* only). Red arrows indicate the OEC mutants selected for the screening of plant genotypes. The mean expression is normalized with actin, and tubulin was used as a control. Error bars represent the standard error for two biological and three technical replicates.

RESULTS

The use of avirulence gene promoters allows over-expression of *LMSTEE* genes during cotyledon colonization

To induce the expression of *LmSTEE* genes during cotyledon colonization, we created mutant strains expressing the genes under the control of the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7*, that was previously shown to be specifically over-expressed during the early colonization stage (Parlange *et al.*, 2009). Constructions were realized into the INV13.269 isolate which is virulent towards all *Rlm* genes potentially present in current *B. napus* resources (*Rlm1*, *Rlm2*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7* and *Rlm9*) to allow the subsequent screening of a large genotype panel without interfering with already known *AvrLm-Rlm* interactions. In all resulting “over-expressing in cotyledons” (OEC) mutants, except one OEC *LmSTEE11* mutant, the use of the *AvrLm4-7* promoter strongly increased the expression of *LmSTEE* genes during cotyledon infection (Figure 1). Depending on the transformants and the gene used, the level of expression in cotyledons was variable, but comparable to that of the native *AvrLm4-7*. The most highly OEC mutants were *LmSTEE1*, with an expression level multiplied by 1000 in the mutants at 7 days post inoculation. For *LmSTEE1*, the mutants obtained using a construction with its native promoter displayed an expression level similar to that of the wild type (Figure 1). These results demonstrated the usefulness of the *AvrLm4-7* promoter to modify the expression profile of effector genes. The two most over-expressed mutants (indicated with an arrow on Figure 1) per construction were selected to further screen a large collection of oilseed rape genotypes using the cotyledon inoculation assay.

Table 1: Cultivars with significantly different behaviours toward *LmSTEE* mutants compared to the wild type isolate

<i>LmSTEE35</i>		<i>LmSTEE30</i>		<i>LmSTEE1</i>		<i>LmSTEE78</i>		<i>LmSTEE98</i>		<i>LmSTEE11</i>	
More susceptible ^a	Less susceptible ^a	More susceptible ^a	Less susceptible ^a	More susceptible ^a	Less susceptible ^a	More susceptible ^a	Less susceptible ^a	More susceptible ^a	Less susceptible ^a	More susceptible ^a	Less susceptible ^a
Alicante	Columbus	Doublol	Jet Neuf	Aviso	<u>Aragon</u>	INV1025	Fertodi Elit	Alicante	<u>Capitol</u>	Aviso	INV1030
Angus	ES Astrid	Angus	<u>Capitol</u>	Boston	<u>Capitol</u>	Alicante	Zeruca	DK Extract	Chelsi	Elvira	
	Idol	Sahara	Idol		DK Extract	DK Extract		Dariot	Doral	Angus	
	Jet Neuf		Napoli		Dariot	Dariot		DK Exmore	Falcon		
	Jupiter		Remy		Kadore	ES Cesario		DK Expansion	Fertodi Elit		
	Lioness		INV1030		Oleski	Local		<u>ES Cesario</u>	Idol		
	Mar				INV1030	d'Ukraine		Angus	Jupiter		
	Prerouska					Angus		Président	Kadore		
	Remy					Severino KWS		Raffiness	Mar		
	INV1030					Wembley		Dualis	Norde		
	Savannah							Severino KWS	Remy		
									<u>Yudal</u>		

^a Mean scoring of symptoms and percentage of virulent and avirulent phenotypes (associated with hypersensitive response) induced by the *LmSTEE* OEC mutants was determined for each cultivar and compared to symptoms induced by the wild type isolate on the same cultivar and at the same date (Kruskal test, p-value < 0.05).

Cultivars are underlined if the statistical differences were observed at all observation dates post inoculation (2 to 3) (For most cases, statistical differences were observed at the earliest scoring dates only). Cultivars associated with significant differential qualitative response (hypersensitive response) between *LmSTEE* mutants and the wild type isolate are indicated in bold. Only cultivars which had the same behaviour toward two independent mutants of each construction were considered.

Two *LmSTEE* genes expressed in cotyledons induce hypersensitive response in two different cultivars

The OEC mutants were inoculated on a panel of 204 genotypes of *B. napus* (Table S1). The panel comprised mostly winter type European genotypes and only one spring genotype of Asian origin which is widely used for association studies of traits of agronomic importance. In 81% of the accessions, the deregulation of *LmSTEE* gene expression did not change the interaction phenotype when inoculated with the OEC mutants compared to the wild type isolate. However, for 19% (39) of the cultivars, the phenotypes were quantitatively modified (more or less susceptible) when inoculated with some mutants (Table 1). We observed response polymorphism between the different *LmSTEE* effectors. The effectors *LmSTEE78* and *LmSTEE98* induced more severe symptoms on many cultivars, with six cultivars (Alicante, DK extract, Dariot, ES Cesario, Angus, KWS Severino) reacting similarly to these two *LmSTEE* genes. *LmSTEE78* and *LmSTEE11* induced partial resistance on less cultivars compared to the four other effectors that were recognized partially by a greater number of cultivars. We also observed response polymorphism between cultivars to the OEC mutants. Some cultivars, like Angus or Alicante, were nearly always more susceptible to all OEC mutants compared with the wild type. Conversely, other cultivars, like Capitol, Remy or INV1030, were frequently associated to more resistant phenotype towards OEC mutants. However in other cases, we observed specific interactions between cultivars and effectors. For example, Aragon was more susceptible only to the OEC *LmSTEE1* mutant. Finally, we identified two cultivars displaying specific and complete resistance towards two effectors: cultivar Dariot toward *LmSTEE1* and spring cultivar Yudal toward *LmSTEE98* (Table 1 and Figure 2). These phenotypes corresponded to HRs that were observed with the two independent OEC mutants of each construct but not with the other constructions. As regards Dariot, however, heterogeneous expression of a HR was observed towards some other effectors (Figure 2). From there, we focused our analysis on the specific resistance observed in Yudal towards *LmSTEE98*.

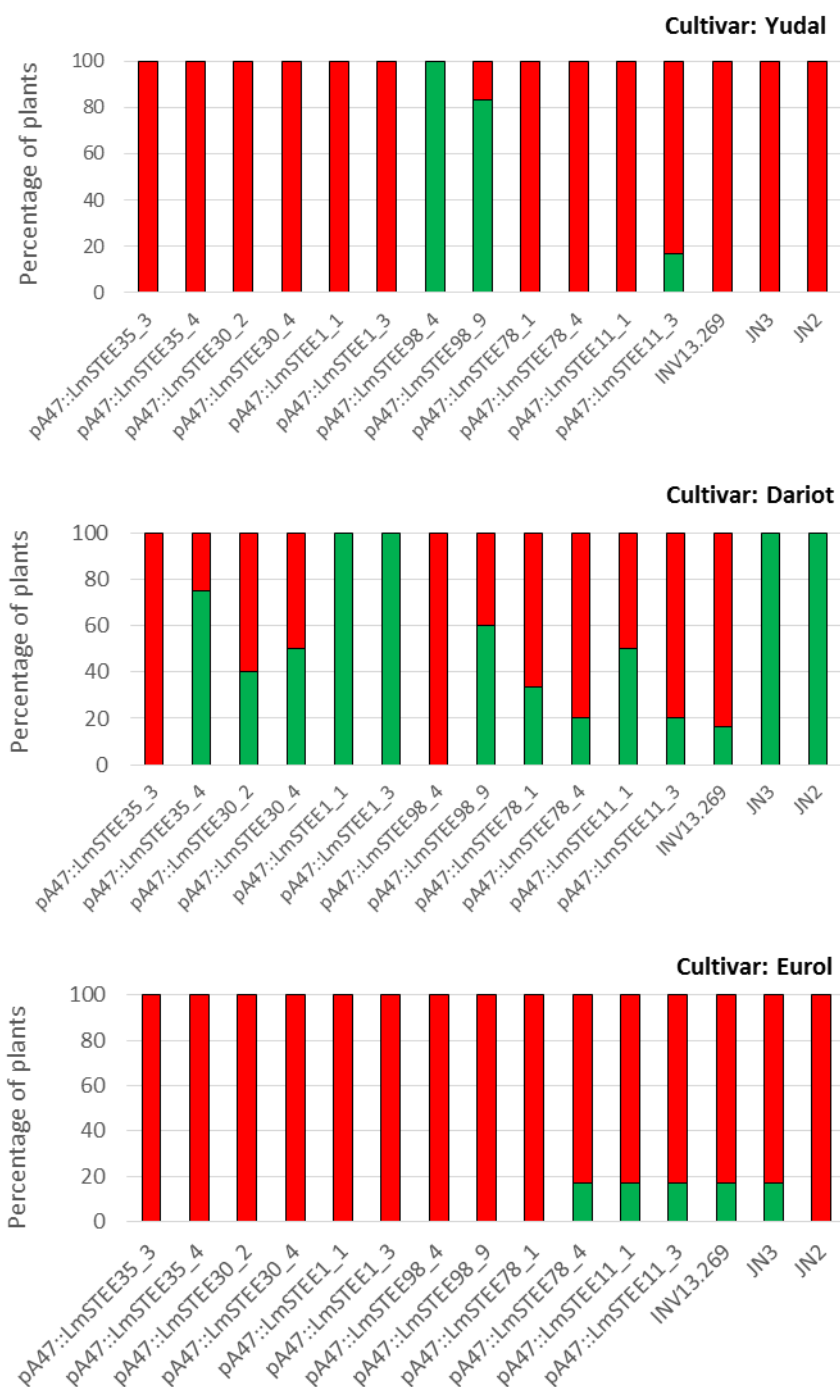


Figure 2. Hypersensitive response of the oilseed rape cultivars Yudal and Dariot towards two late effector genes

L. maculans mutants expressing *LmSTEE35*, *LmSTEE30*, *LmSTEE1*, *LmSTEE98*, *LmSTEE78* or *LmSTEE11* under the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were inoculated on the cultivars Yudal, Dariot and the susceptible cultivar Eurol. Two independent mutants were used per construction. The bars represents the percentage of plants showing susceptible (in red) or resistant (in green) phenotypes, based on the IMAScore rating scale (Balesdent 2006), 14 days after inoculation. Isolate INV13.269 is the wild-type isolate and isolates JN2 and JN3 are used as additional controls. Resistance phenotype of Dariot to JN3 and JN2 is linked to the presence of *Rlm7* in Dariot recognizing *AvrLm4-7* present in these isolates.

Table 2: co-segregation of resistance to *LmSTEE98* and two molecular markers in the Darmor-*bzh* x Yudal doubled haploid population

Phenotype toward <i>pA47::LmSTEE98</i> mutants ^a (nb of DH lines)	Marker Bn-A09- p33777987 ^b		Marker Bn-A09-p33971771 ^b	
	Darmor- <i>bzh</i> allele	Yudal allele	Darmor- <i>bzh</i> allele	Yudal allele
Resistant ^c (87)	1 (1%) ^d	86 (99%)	2 (2%)	85 (98%)
Susceptible ^c (171)	170 (99%)	1 (1%)	171 (100%)	0 (0%)

^aPlants were inoculated with the *LmSTEE98* mutants expressing the *LmSTEE98* gene during cotyledon colonization and symptoms were evaluated 14 days post inoculation.

^bThe two markers are flanking the region carrying the resistance to *LmSTEE98*.

^cResistant: phenotype identical to the parent Yudal, susceptible: phenotype identical to the parent Darmor-*bzh*. Values in brackets are numbers of lines in each phenotypic class.

^d values are numbers (percentages) of lines with the corresponding genotype.

A09 (Darmor-bzh x Yudal)

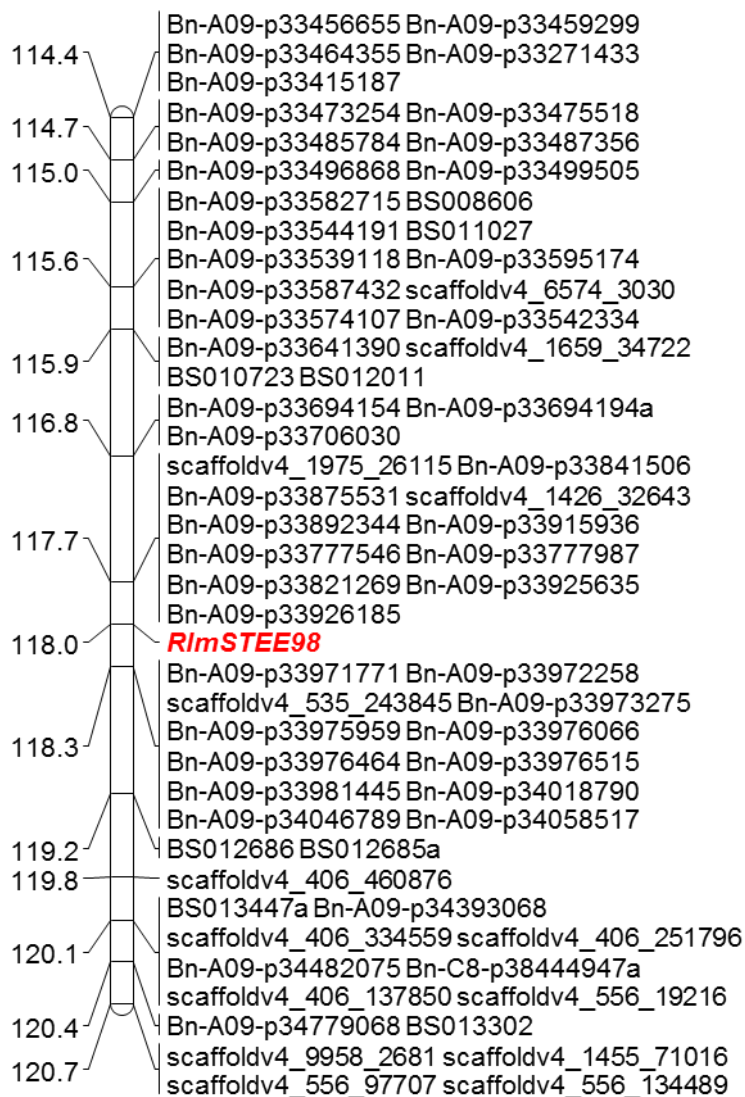


Figure 3. Genetic mapping of the resistance gene *RlmSTEE98* of Yudal

RlmSTEE98 was mapped on chromosome A09 of *Brassica napus*. The genetic distances, indicated in centiMorgan, are on the left side and the marker order is on the right side.

Genetic control and mapping of the resistance to LmSTEE98

A doubled haploid (DH) population derived from the cross Darmor-bzh x Yudal (BnDYDH), previously obtained by Foisset *et al.* (1996), was used to test the segregation of the HR phenotype of Yudal toward LmSTEE98. In the 258 tested offspring, 87 displayed the resistance phenotype to the LmSTEE98 OEC mutants, while 171 were susceptible (Table 2). This segregation did not corresponded to the 50:50 (resistant:susceptible) expected ratio in a DH population in case of monogenic control of the resistance. Each individual resulting from this cross was genotyped using markers of published maps for the BnDYDH population (Delourme *et al.*, 2008; Jestin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011) and new markers recently developed (Delourme *et al.*, unpublished data). Marker segregation however indicated that the resistance was controlled by a single dominant gene that we called *RlmSTEE98*. It was fine-mapped within a 0.6 cM interval on oilseed rape chromosome A09, flanked on one side by the marker Bn-A09-p33777987 and on the other side by Bn-A09-p33971771 (Table 2, Figure 3).

Candidate gene analysis

The region of interest carrying *RlmSTEE98* corresponded to a 266.33 kb sequence of the chromosome A09 and an unanchored 84 kb sequence (potentially located on chromosome A09). 70 genes were predicted in this interval in the reference genome of Darmor-bzh (Chalhoub *et al.*, 2014) (Table S2). None encoded for leucine-rich repeat protein or similar protein motifs characteristic of resistance genes. The *RlmSTEE98* interval corresponded to a syntenic region in *Arabidopsis thaliana* of 344kb containing 88 genes. Based on gene ontology analysis in orthologous genes in *A. thaliana*, we identified three major groups of function associated to these genes: genes with unknown molecular function (11 genes), genes encoding for transporter activity, in particular sugar transporters, (10 genes) and genes encoding for proteins with DNA binding ability (9 genes) such as transcription factors. In the latter category, we identified a gene coding for a WRKY transcription factor-like, involved in plant defense against pathogens and stress responses (Phukan *et al.*, 2016). There was also a gene presenting homologies to a transcription activator GLK1-like which encodes disease defense related proteins and confers resistance to *Fusarium graminearum* in *A. thaliana* (Savitch *et al.*, 2007). A gene coding for a histone binding protein, likely involved in the regulation of the expression of other genes, was present in the resistance gene interval. In this region, we also identified a gene encoding for a protein with a MACPF (Membrane attack complex/perforin) domain which is involved in the control of plant hypersensitive response by negatively controlling the salicylic acid mediated pathway of programmed cell death in plant immunity (Morita-Yamamuro *et al.*, 2005).

Expression analysis of the candidate genes during infection of cotyledon and stem in controlled conditions showed that, in the Darmor-*bzh* cultivar, there are genes with no expression in cotyledon and in stem (23 genes), genes with no differential expression between the two tissues (29 genes), and genes over-expressed either in cotyledons (9) or in stems (9) (Table S2). The different expression profiles were represented in the different functional categories identified above.

DISCUSSION

In this study we designed a new approach based on the widely-used cotyledon inoculation test to identify novel sources of resistance to *L. maculans* in *B. napus* that could contribute to quantitative resistance, a type of resistance that is to-date not amenable to miniaturized, medium throughput screening in growth chambers. This approach enabled us to screen a large collection of oilseed rape genotypes, and we focused on the identification of specific resistance genes recognizing effectors expressed during the stem colonization of oilseed rape. To increase the potential efficiency of such resistance genes, we focused our study on six late effector genes that were highly conserved in worldwide *L. maculans* populations (Gervais et al., *in prep*, Chapitre 2). Using this strategy, we firstly identified response polymorphism to the late effectors between different cultivars in a limited subset of the collection screened. Some cultivars were almost systematically associated with higher susceptibility, and others to increased resistance, whatever the late effector evaluated, thus suggesting the presence of susceptibility/resistance QTL to late effectors as a whole in these cultivars. With this approach we also demonstrated specific interactions between cultivars and one or a few effectors, with either increased susceptibility or cultivars able to only recognize one specific late effector leading to partial resistance. Six cultivars displayed the same phenotype when challenged to the two effectors LmSTEE78 and LmSTEE98, with higher susceptibility phenotypes toward LmSTEE78 LmSTEE98 OEC mutants compared to the wild-type isolate. The *LmSTEE78* and *LmSTEE98* genes have two common characteristics; (i) they maintain a high level of expression late in the growing season even when the stem necrosis develops, unlike the other tested effectors; and (ii) they do not, or only moderately, suppress BAX-induced cell death in a heterologous system (Gervais et al., *in prep*, Chapitre 2). These data could be indicative of a common genetic trait shared by these six cultivars that could favour the necrotic stages of the disease. In many cases, however, minor differential responses were found such as slightly delayed expression of symptoms and/or inconsistent results between the two OEC mutants tested per construction. The approach we developed in this study aimed however at identifying easy-to-record gene-for-gene interactions between late effectors of *L. maculans* and specific cultivars. Here we identified at least one such interaction between LmSTEE98 and the cultivar

Yudal, which would have otherwise remained unknown with the classical screening approaches. When inoculated with LmSTEE98 EOC mutants, a clear HR phenotype was observed that segregated in the BnDYDH population. The segregation of this phenotype in the BnDYDH population did not correspond to the 1:1 expected ratio in case of monogenic control of the resistance. However, we were able to conclude at a single major gene controlling that interaction and to map it precisely. The closely linked markers to *RlmSTEE78* on A09 also showed distorted segregations, as markers in other genomic regions. Such distortions were often observed in DH segregating populations in *B. napus* as a result of *in vitro* androgenesis (Delourme *et al.*, 2013; Foisset *et al.*, 1995).

Resistance QTLs to blackleg have been identified in a series of crosses and the BnDYDH population has been extensively used previously to search for QTLs following scoring of the stem necrosis severity in the field (Huang *et al.*, 2016; Jestin *et al.*, 2011; Pilet *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2001). Using the same BnDYDH population as that used by Jestin *et al.* (2011), we found here a single gene resistance, *RlmSTEE98*, mapped to chromosome A09 around position 118 cM, and originating from the susceptible parent of the cross. Resistance QTL were previously identified in the vicinity of the genomic region containing *RlmSTEE98* but no resistance QTL allele was identified in Yudal. Jestin *et al.* (2011) thus identified a QTL associated with stem canker resistance located on A9, where the resistance allele was from Darmor-*bzh*. Jestin *et al.* (2015), Larkan *et al.* (2016) and Raman *et al.* (2016) also detected stem canker resistance QTL or associated markers on A09 from other cultivars. However, all these regions were located upstream the physical position of *RlmSTEE78*. The genomic region around *RlmSTEE98* thus appears to have a role in *B. napus/L. maculans* interaction, but we have yet to understand its role since *RlmSTEE98* was identified in Yudal, a cultivar considered as very susceptible to *L. maculans*, and not in Darmor-*bzh* or other cultivars with quantitative resistance.

To explain the identification of a resistance QTL in a susceptible genotype, not previously identified at this genomic location following field evaluation of resistance, three hypotheses are envisaged. (i) One hypothesis would be that the corresponding avirulence effector gene *LmSTEE98* is expressed too late during the systemic colonization, inducing a late recognition by the plant, and thus inefficient to prevent the development of the stem cancer at this stage. Indeed, a previous transcriptomic analysis in the cultivar Darmor-*bzh* showed that *LmSTEE98* is not expressed in field condition from November to March, but its expression continuously increases from April to July, the time when its expression peaks (Gervais *et al.*, in prep, Chapitre 2). Under this hypothesis, the choice of *LmSTEE* genes to screen for resistance with the approach we develop here should be based on a preliminary precise characterization of their expression profiles under field conditions, and one should especially select effectors expressed at the earliest stages of the stem colonization. (ii) Another hypothesis to explain the absence of resistance QTL associated to this region would be that the *RlmSTEE98* region is

effectively associated to a resistance QTL conferring partial resistance to the fungus but not identified as such under field conditions. Several studies have shown that detection of resistance QTL can be strongly influenced by environmental conditions (Kaur *et al.*, 2009; Raman *et al.*, 2012). The effect of the *RlmSTEE98* gene could be under such influence, preventing its detection. Also, the partial resistance conferred by *RlmSTEE98* could have remained undetected due to insufficient sensitivity and accuracy of the G2 disease score that sums up the resulting effect of multiple biotic and/or abiotic effects during the whole growing season. (iii) We can also postulate that *RlmSTEE98* may not be expressed in the stem but only in cotyledons, preventing the recognition of the avirulence gene expressed during stem colonization in wild type isolates. Stage specific expression patterns have been observed for other resistance genes, like the wheat *Lr34* gene which has a low expression level at the cotyledonary stage but is highly induced in the adult stage, conferring quantitative resistance to several pathogens (*Puccinia striiformis* and *graminis*, *Blumeria graminis*) (Krattinger *et al.*, 2009). This hypothesis is also supported by the identification of differential expression profiles between cotyledons and stems for the genes present in the *RlmSTEE98* region in Darmor-*bzh* (Table S2). Similar transcriptomic data at the different developmental stages are now needed for the cultivar Yudal.

In the interval containing *RlmSTEE98*, we identified several candidate genes potentially involved in resistance, like genes associated to defense immunity in plants or to regulation of other genes. For example, numerous genes associated with transporter activity are present in this region and could also be involved in resistance, as shown in other systems. For instance the *LR34* gene in wheat, encoding for an ABC transporter, confers partial resistance to *Puccinia triticina*, *Puccinia striiformis* and *Blumeria graminis* (Krattinger *et al.*, 2009). The SWEET transporters have also been shown to be involved in plant-pathogen interactions, being probably targeted by pathogens and symbionts for nutritional gain, and conversely, disruption of these genes can produce host resistance (Chen *et al.*, 2010). A variant of the *Lr67* gene, coding for a hexose transporter, confers resistance to multiple pathogens in wheat (Moore *et al.*, 2015). By impacting the hexose transport in infected leaves, the growth of multiple biotrophic pathogen species is reduced. It has to be remembered that the oilseed rape reference genome is that of Darmor-*bzh* and that we have no wide genome resources available for Yudal that may substantially differ from Darmor-*bzh* in this interval. It has now to be investigated whether sequence polymorphism is present in gene sequence between Yudal and Darmor-*bzh* in the *RlmSTEE98* region, and/or whether expression differences exist that may explain the difference of behavior between the two cultivars.

In summary, we developed an original approach to screen for new resistance sources with the standard cotyledon inoculation test that enabled us to highlight a source of resistance which would have otherwise remained unknown through usual methods. A major gene was thus identified in Yudal that

recognizes a conserved LmSTEE effector. However, our work also highlighted potential limitations of this approach; it presupposes that the potential resistance genes interacting with the fungus in the stem is also expressed at the cotyledon stage. The created OEC mutants should also sufficiently express the effector genes at the cotyledonary stage. This was reached for five out of the six selected *LmSTEE* genes but one may wonder if, for example, *LmSTEE30* is sufficiently over-expressed in cotyledons to allow specific recognition by a resistance gene and induction of a HR. Our study also highlighted the importance of the diversity of the screened plant material. In our case we had a limited variability in our screening with only European winter oilseed rape varieties, with the exception of Yudal. We can thus postulate that more distant genotypes might also exhibit new specific resistances to *LmSTEE* effectors.

MATERIALS AND METHODS

Fungal and plant materials

The isolate INV13.269 is a single pycnidiospore isolate recovered from a French field obtained in 2013. This isolate is virulent towards *Rlm1*, *Rlm2*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7* and *Rlm9*, *i.e.* all *Rlm* genes potentially present in current *B. napus* resources. Fungal cultures were maintained on V8 juice agar medium and sporulating cultures were obtained on V8 juice as previously described (Ansan-Melayah *et al.*, 1995). The sequenced isolate JN3 (v23.1.3) (Rouxel *et al.*, 2011) and its closely related sister isolate JN2 (v23.1.2) are progenies from an *in vitro* cross between European field isolates (Balesdent *et al.*, 2001) and were used as controls in inoculation tests.

A collection of 204 plant genotypes of *Brassica napus* (Table S1) was screened in the search for gene-for-gene interactions with *LmSTEE* genes. This panel mostly comprised varieties that were previously used for association studies of quantitative resistance to *L. maculans* (Fopa Fomeju *et al.* 2015). The segregating doubled haploid population BnaDYDH derives from a cross between Darmor-*bzh* x Yudal (Foisset *et al.*, 1996). The parent Darmor-*bzh* is a French winter oilseed rape cultivar and the parent Yudal is a Korean spring oilseed rape cultivar.

Plant inoculations

Cotyledon inoculations were performed as previously described (Balesdent *et al.*, 2001). Cotyledons of ten days-old seedlings were punctured and inoculated with 10 µl of inoculum (10^7 pycnidiospores ml⁻¹). Four different isolates, *i.e.*, one on each half-cotyledon were inoculated on each plant. At least 6

plants were inoculated with each isolate. Plants were incubated for 2 days in the dark and at room temperature, and then in a growth chamber at 16 °C (night) and 24 °C (day) with a 12 h photoperiod and 90% of humidity. Symptoms were scored at 10, 14 and 18 days after inoculation with the IMAScore rating scale where scores 1 to 3 represent plant resistance and scores 4 to 6 susceptibility (Balesdent *et al.*, 2001). Mean scoring of symptoms and percentage of virulent and avirulent phenotypes (associated with hypersensitive response) induced by the *LmSTEE* OEC mutants were determined for each cultivar and compared to symptoms induced by the wild type isolate on the same cultivar and at the same date (Kruskal test).

Fungal transformation

The promoter of the *AvrLm4-7* gene was amplified with the primers indicated in Table S3. It was then digested with *NheI* and *BamHI* and ligated into a *SpeI*-*BamHI*-digested pZpNat1 vector. The *LmSTEE* genes (*LmSTEE1*, *LmSTEE30*, *LmSTEE35*, *LmSTEE98*, *LmSTEE78* and *LmSTEE11*) were amplified from their starting codon to their terminator region and then digested with *EcoRI* and *XhoI* or *Sall* and *XhoI* (Table S3). These fragments were ligated into the pZpNat1 vector containing the *AvrLm4-7* promoter and digested with the same enzymes.

The plasmids were then introduced into *Agrobacterium tumefaciens* C58 by electroporation at 2.5 kV, 200 ohm and 25 µF. *L. maculans* transformation with the *A. tumefaciens* strains was performed as described in Gout *et al.* (2006). Fungal transformants (pA47::LmSTEE_x) were selected on 50 µg.ml⁻¹ nourseothricin (WERNER BioAgents, Jena, Germany).

RNA manipulation and qRT-PCR

Total RNA was extracted from cotyledons inoculated with the pA47::LmSTEE_x mutants or the wild-type isolate as described in Fudal *et al.* (2007), at seven days after inoculation, corresponding to the expression peak of *AvrLm4-7* (Parlange *et al.*, 2009). All RNA samples were adjusted to 1µg of RNA and single-strand cDNA was generated using oligo-dT primed reverse transcription with PowerScript Reverse Transcriptase (Clontech, Palo Alto, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Plants inoculated with water were used as negative controls. For each condition, three technical replicates from two biological repeats were performed. The qRT-PCR experiments were performed as described in Fudal *et al.* (2007). The qRT-PCR primers used are indicated in Table S1. Ct values were analysed as described in Muller *et al.* (2002). Actin was used as a constitutive reference gene and tubulin expression relative to actin was used as a control.

Genetic mapping

Genotyping data for BnDYDH population included SNP from the Brassica 60K Illumina Infinium SNP array (Clarke *et al.*, 2016), the 20K Illumina Infinium SNP array (Chalhoub *et al.*, 2014) and from the 8K Illumina Infinium SNP array (Delourme *et al.*, 2013). The genetic map contained 28,000 loci that represented 3592 unique loci and covered 2128.2 cM (Laperche *et al.*, 2017). The phenotypic data were mapped as a quantitative trait using the R/qtl package (Broman *et al.*, 2003) or as a qualitative trait where scores 1 to 3 represent plant resistance and scores of 4 to 6 susceptibility.

RNAseq analysis

Expression of oilseed rape genes in the *RlmSTEE98* interval was investigated using data from RNAseq experiments described previously (Gervais *et al.*, 2016). Briefly, reads from inoculated Darmor-*bzh* cotyledons at 7 days post inoculation (dpi) and from inoculated Darmor-*bzh* stems at 14 dpi were analysed, with two biological replicates per condition. The reads were mapped on the reference genome of *B. napus* (Darmor-*bzh*) (Chalhoub *et al.*, 2014) using the CLC Genomics Workbench v7.5.1 (Qiagen, Venlo, the Netherlands). RNA-seq analyses were performed with EdgeR (Robinson *et al.*, 2010). Differentially expressed genes were identified based on the following criteria: Log₂ (Fold change) > 2.0 and p-value < 0.05 (Table S2).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Bertrand Auclair (INRA BIOGER) for plant management. J.G. was funded by a joint grant from the Santé des Plantes et Environnement (SPE) INRA department and Terres Inovia (formerly CETIOM). This work was supported in part by Promosol and France Génomique (METAPHOR and LeptoLife projects). The authors acknowledge Pascal Glory and the CRB BrACySol, INRA-IGEP, France, for providing BnDYDH population.

REFERENCES

Ansan-Melayah, D., Balesdent, M.H., Buée, M. and Rouxel, T. (1995) Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **85**, 1525–1529.

- Arru, L., Francia, E. and Pecchioni, N.** (2003) Isolate-specific QTLs of resistance to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in the “Steptoe” x “Morex” spring barley cross. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **106**, 668–675.
- Balesdent, M.H., Attard, A., Ansan-Melayah, D., Delourme, R., Renard, M. and Rouxel, T.** (2001) Genetic control and host range of avirulence toward *Brassica napus* cultivars Quinta and Jet Neuf in *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **91**, 70–76.
- 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., Louvard, K., Pinochet, X. and Rouxel, T.** (2006) A large-scale survey of races of *Leptosphaeria maculans* occurring on oilseed rape in France. In Sustainable strategies for managing *Brassica napus* (oilseed rape) resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker). (Fitt, B.D.L., Evans, N., Howlett, B.J., and Cooke, B.M., eds), pp. 53–65. Springer Netherlands.
- Bonman, J.M.** (1989) Race-specific partial resistance to blast in temperate japonica rice cultivars. *Plant Dis.* **73**, 496.
- Broman, K.W., Wu, H., Sen, S. and Churchill, G.A.** (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **19**, 889–890.
- Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., et al.** (2014) Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* **345**, 950–953.
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., et al.** (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**, 527–532.
- Clarke, W.E., Higgins, E.E., Plieske, J., et al.** (2016) A high-density SNP genotyping array for *Brassica napus* and its ancestral diploid species based on optimised selection of single-locus markers in the allotetraploid genome. *Theor. Appl. Genet.* **129**, 1887–1899.
- Corwin, J.A. and Kliebenstein, D.J.** (2017) Quantitative resistance: more than just perception of a pathogen. *Plant Cell* **29**, 655–665.
- Delourme, R., Chèvre, A.M., Brun, H., Rouxel, T., Balesdent, M.H., Dias, J.S., Salisbury, P., Renard, M. and Rimmer, S.R.** (2006) Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Eur. J. Plant Pathol.* **114**, 41–52.

- Delourme, R., Falentin, C., Fomeju, B.F., et al.** (2013) High-density SNP-based genetic map development and linkage disequilibrium assessment in *Brassica napus* L. *BMC Genomics* **14**, 120.
- Delourme, R., Piel, N., Horvais, R., Pouilly, N., Domin, C., Vallée, P., Falentin, C., Manzanares-Dauleux, M.J. and Renard, M.** (2008) Molecular and phenotypic characterization of near isogenic lines at QTL for quantitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **117**, 1055–1067.
- Fitt, B.D.L., Hu, B.C., Li, Z.Q., Liu, S.Y., Lange, R.M., Kharbanda, P.D., Butterworth, M.H. and White, R.P.** (2008) Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China; costs and benefits. *Plant Pathol.* **57**, 652–664.
- Foisset, N., Delourme, R., Barret, P., Hubert, N., Landry, B.S. and Renard, M.** (1996) Molecular-mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on a doubled-haploid progeny. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **93**, 1017–1025.
- Fopa Fomeju, B., Falentin, C., Lassalle, G., Manzanares-Dauleux, M.J. and Delourme, R.** (2015) Comparative genomic analysis of duplicated homoeologous regions involved in the resistance of *Brassica napus* to stem canker. *Front. Plant Sci.* **6**.
- Fudal, I., Ross, S., Gout, L., et al.** (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.
- 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.** (2014) Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm2*, using an intraspecific comparative genomics approach. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 699–709.
- Ghanbarnia, K., Lydiate, D.J., Rimmer, S.R., Li, G., Kutcher, H.R., Larkan, N.J., McVetty, P.B.E. and Fernando, W.G.D.** (2012) Genetic mapping of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene corresponding to the *LepR1* resistance gene of *Brassica napus*. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **124**, 505–513.

- 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.
- Greenberg, J.T. and Yao, N.** (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* **6**, 201–211.
- Hammond, K.E., Lewis, B.G. and Musa, T.M.** (1985) A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathol.* **34**, 557–565.
- Huang, Y.-J., Evans, N., Li, Z.-Q., Eckert, M., Chèvre, A.-M., Renard, M. and Fitt, B.D.L.** (2006) Temperature and leaf wetness duration affect phenotypic expression of *Rlm6*-mediated resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol.* **170**, 129–141.
- Huang, Y.J., Jestin, C., Welham, S.J., King, G.J., Manzanares-Dauleux, M.J., Fitt, B.D.L. and Delourme, R.** (2016) Identification of environmentally stable QTL for resistance against *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **129**, 169–180.
- Huang, Y.J., Pirie, E.J., Evans, N., Delourme, R., King, G.J. and Fitt, B.D.L.** (2009) Quantitative resistance to symptomless growth of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape). *Plant Pathol.* **58**, 314–323.
- Huang, Y.-J., Qi, A., King, G.J. and Fitt, B.D.L.** (2014) Assessing quantitative resistance against *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) in young plants. *PLoS ONE* **9**, e84924.
- Jestin, C., Bardol, N., Lodé, M., Duffé, P., Domin, C., Vallée, P., Mangin, B., Manzanares-Dauleux, M.J. and Delourme, R.** (2015) Connected populations for detecting quantitative resistance factors to phoma stem canker in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Mol. Breed.* **35**, 1–16.
- Jestin, C., Lodé, M., Vallée, P., Domin, C., Falentin, C., Horvais, R., Coedel, S., Manzanares-Dauleux, M.J. and Delourme, R.** (2011) Association mapping of quantitative resistance for *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Mol. Breed.* **27**, 271–287.
- Jestin, C., Vallée, P., Domin, C., Manzanares-Dauleux, M. and Delourme, R.** (2012) Assessment of a new strategy for selective phenotyping applied to complex traits in *Brassica napus*. *Open J. Genet.* **2**, 2.

- Kaur, S., Cogan, N.O.I., Ye, G., et al.** (2009) Genetic map construction and QTL mapping of resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in Australian canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Theor. Appl. Genet.* **120**, 71–83.
- Krattinger, S.G., Lagudah, E.S., Spielmeier, W., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L.L. and Keller, B.** (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* **323**, 1360–1363.
- Kushalappa, A.C., Yogendra, K.N. and Karre, S.** (2016) Plant innate immune response: qualitative and quantitative resistance. *Crit. Rev. Plant Sci.* **35**, 38–55.
- Laperche, A., Aigu, Y., Jubault, M., Ollier, M., Guichard, S., Glory, P., Strelkov, S., Gravot, A. and Manzaneres-Dauleux, M.** (2017) Clubroot resistance QTL are modulated by nitrogen input in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* **130**, 669–684.
- Larkan, N.J., Lydiate, D.J., Parkin, I. a. P., Nelson, M.N., Epp, D.J., Cowling, W.A., Rimmer, S.R. and Borhan, M.H.** (2013) The *Brassica napus* blackleg resistance gene *LepR3* encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector AVRML1. *New Phytol.* **197**, 595–605.
- Larkan, N.J., Ma, L. and Borhan, M.H.** (2015) The *Brassica napus* receptor-like protein RLM2 is encoded by a second allele of the *LepR3/Rlm2* blackleg resistance locus. *Plant Biotechnol. J.* **13**, 983–992.
- Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Schäfer-Pregl, R., Ritter, E., Knapp, S.J., Salamini, F. and Gebhardt, C.** (1994) Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics* **137**, 67–77.
- Moore, J.W., Herrera-Foessel, S., Lan, C., et al.** (2015) A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nat. Genet.* **47**, 1494–1498.
- Morita-Yamamuro, C., Tsutsui, T., Sato, M., et al.** (2005) The *Arabidopsis* gene *CAD1* controls programmed cell death in the plant immune system and encodes a protein containing a MACPF domain. *Plant Cell Physiol.* **46**, 902–912.
- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R. and Dobbie, Z.** (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* **32**, 1372–1374, 1376, 1378–1379.
- Niks, R.E., Qi, X. and Marcel, T.C.** (2015) Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: concepts, misconceptions, and mechanisms. *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**, 445–470.

- 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.
- Parlevliet, J.E. and Zadoks, J.C.** (1977) The integrated concept of disease resistance: A new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica* **26**, 5–21.
- Phukan, U.J., Jeena, G.S. and Shukla, R.K.** (2016) WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants. *Front. Plant Sci.* **7**.
- Pilet, M.L., Delourme, R., Foisset, N. and Renard, M.** (1998) Identification of loci contributing to quantitative field resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not., in Winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **96**, 23–30.
- Pilet, M.L., Duplan, G., Archipiano, M., et al.** (2001) Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oilseed rape. *Crop Sci.* **41**, 197.
- Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I., Rouxel, T. and Balesdent, M.-H.** (2015) A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.*
- Poland, J.A., Balint-Kurti, P.J., Wisser, R.J., Pratt, R.C. and Nelson, R.J.** (2009) Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci.* **14**, 21–29.
- Raman, H., Raman, R., Coombes, N., et al.** (2016) Genome-wide association study identifies new loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* in Canola. *Crop Sci. Hortic.*, 1513.
- Raman, R., Taylor, B., Marcroft, S., et al.** (2012) Molecular mapping of qualitative and quantitative loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* causing blackleg disease in canola (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **125**, 405–418.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J. and Smyth, G.K.** (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **26**, 139–140.
- 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., Willner, E., Coudard, L. and Balesdent, M.-H.** (2003) Screening and identification of resistance to *Leptosphaeria maculans* (stem canker) in *Brassica napus* accessions. *Euphytica* **133**, 219–231.

- Savitch, L.V., Subramaniam, R., Allard, G.C. and Singh, J.** (2007) The GLK1 “regulon” encodes disease defense related proteins and confers resistance to *Fusarium graminearum* in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 234–238.
- St.Clair, D.A.** (2010) Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**, 247–268.
- 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.
- Wang, J., Lydiate, D.J., Parkin, I.A., Falentin, C., Delourme, R., Carion, P.W. and King, G.J.** (2011) Integration of linkage maps for the Amphidiploid *Brassica napus* and comparative mapping with *Arabidopsis* and *Brassica rapa*. *BMC Genomics* **12**, 101.
- Wilfert, L. and Schmid-Hempel, P.** (2008) The genetic architecture of susceptibility to parasites. *BMC Evol. Biol.* **8**, 187.
- Zenbayashi-Sawata, K., Ashizawa, T. and Koizumi, S.** (2005) *Pi34-AVRPi34*: a new gene-for-gene interaction for partial resistance in rice to blast caused by *Magnaporthe grisea*. *J. Gen. Plant Pathol.* **71**, 395–401.

Figure 1: Expression values of *LmSTEE* genes in “over-expressing in cotyledons” (OEC) mutants during early stage of cotyledon colonization

OEC mutants expressing the genes *LmSTEE1*, *LmSTEE11*, *LmSTEE30*, *LmSTEE35*, *LmSTEE78* and *LmSTEE98* under the control of the promoter of the *AvrLm4-7* gene, specifically over-expressed during the early colonization stage, were created. The expression of *LmSTEE* genes in the different OEC mutants was assessed by qRT-PCR in infected cotyledons, 7 days post inoculation. Grey bars are expression data from three to four different mutants per construction, black bars represent expression in the wild type isolate (INV13.269) and white bars the expression in control mutants with the endogenous promoter (*LmSTEE1* only). Red arrows indicate the OEC mutants selected for the screening of plant genotypes. The mean expression is normalized with actin, and tubulin was used as a control. Error bars represent the standard error for two biological and three technical replicates.

Figure 2. Hypersensitive response of the oilseed rape cultivars Yudal and Dariot towards two late effector genes

L. maculans mutants expressing *LmSTEE35*, *LmSTEE30*, *LmSTEE1*, *LmSTEE98*, *LmSTEE78* or *LmSTEE11* under the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were inoculated on the cultivars Yudal, Dariot and the susceptible cultivar Eurol. Two independent mutants were used per construction. The bars represent the percentage of plants showing susceptible (in red) or resistant (in green) phenotypes, based on the IMASCORE rating scale (Balesdent 2006), 14 days after inoculation. Isolate INV13.269 is the wild-type isolate and isolates JN2 and JN3 are used as additional controls. Resistance phenotype of Dariot to JN3 and JN2 is linked to the presence of *Rlm7* in Dariot recognizing *AvrLm4-7* present in these isolates.

Figure 3. Genetic mapping of the resistance gene *RlmSTEE98* of Yudal

RlmSTEE98 was mapped on chromosome A09 of *Brassica napus*. The genetic distances, indicated in centiMorgan, are on the left side and the marker order is on the right side.

Supporting information

Table S1: List of *Brassica napus* genotypes screened for resistance

Table S2: Predicted genes of Darmor-*bzh* present in the region of *RlmSTEE98*

Table S3: List of primers used in this study

Table S1: List of *Brassica napus* genotypes screened for resistance

Varieties	G ² mean 2006	G ² mean 2013	G ² mean 2014	G ² mean 2015	G ² mean all years	Maintainer	Year released	Accession type	Type	Origin
12/239 Advanta	na	na	na	na	na	Limagrain	2014	00	Winter	France
15.23.4.1	na	na	na	na	na	na	na	00	Winter	
Action	4.43	1.08	2.92	3.81	2.60	NPZ	-	00	Winter	
Adder	3.2	0.58	2.49	2.63	1.90	SDME	1997	00	Winter	
Adriana	na	0.60	1.06	0.92	0.86	Advanta	2006	00	Winter	
Akamar	1.83	1.15	2.76	2.03	1.98	KWS	1995	00	Winter	Germany
Alesi	2.63	0.44	1.38	1.02	0.95	KWS	2002	00	Winter	
Alicante	na	na	na	na	na	Advanta	2015	00	Winter	France
Aligator	4.5	1.15	2.79	2.23	2.06	KWS	1994	00	Winter	Germany
Alsace 1360	4.26	3.36	5.22	4.03	4.20	INRA	<1960	++	Winter	France
Amber	na	1.78	3.61	3.44	2.94			00	Winter	Germany
Amor	4.63	1.35	4.05	3.91	3.10	RAPS GbR	1996	00	Winter	
Angus	na	na	na	na	na	NPZ	2015	00	Winter	France
Aragon	3.6	0.99	4.67	3.08	2.91	NPZ	2004	00	Winter	
Ariana	na	1.82	5.13	2.84	3.26			00	Winter	
Askari	na	2.39	3.32	1.76	2.49			++	Winter	
Atlantic	3.4	0.80	2.27	1.52	1.53	Nickerson	2005	00	Winter	
Aurum	3.16	0.88	2.49	1.52	1.63	NPZ	2004	00	Winter	
Aviso	2.5	0.72	1.38	0.74	0.95	Nickerson	2000	00	Winter	Denmark
Aztec	na	1.58	2.39	2.54	2.17			0+	Winter	United-Kingdom
Belinda	na	0.70	0.98	0.80	0.83			0+	Winter	
Bellini	2.53	0.68	1.10	0.60	0.79	Danisco Seec	2000	00	Winter	Denmark
Beryl	na	2.26	4.69	3.39	3.45			0+	Winter	Poland
Bienvenu	4.9	1.68	4.02	2.82	2.84	INRA	1983	0+	Winter	France
Bolko	na	0.99	2.06	2.35	1.80			00	Winter	Poland
Boston	3.63	1.79	3.53	2.89	2.74	Nickerson	1997	00	Winter	France
Brink	na	2.60	4.67	6.88	4.72			0+	Winter	Sweden
Bristol	4.66	2.03	4.37	2.28	2.89	Monsanto SA	1993	00	Winter	France
Caddy	na	0.51	1.97	1.25	1.24			00	Winter	Germany
Campala	2.33	0.67	1.32	0.76	0.92	Monsanto SA	2001	00	Winter	
Canberra	1.66	0.62	1.42	1.41	1.15	Monsanto SA	1999	00	Winter	
Cancan	4.06	1.00	2.08	1.44	1.51	PBI	2004	00	Winter	
Capitol	5	1.87	4.30	3.59	3.25	Monsanto SA	1995	00	Winter	
Captain	5.5	2.88	5.98	5.57	4.81	Monsanto SA	1999	00	Winter	
Capvert	2.1	0.75	2.02	1.26	1.34	Monsanto SA	2002	00	Winter	
Castille	2.9	2.23	1.86	1.56	1.88	Monsanto SA	2004	00	Winter	
Ceres	na	1.05	3.80	3.04	2.63			00	Winter	Germany
Chelsi	-	0.62	1.92	0.98	1.17	Caussade	2002	00	Winter	
Cheops	-	1.07	1.81	1.64	1.51	gety Agricult	2001	00	Winter	
Cheyenne	3.7	0.85	2.23	2.99	2.02	Euralis	1996	00	Winter	
Columbus	3.56	1.00	3.16	2.85	2.34	Monsanto SA	1996	00	Winter	
Colvert	2.3	0.88	1.43	1.04	1.11	Nickerson	1996	00	Winter	France
Constable	na	5.11	6.08	5.54	5.58			0+	Winter	United-Kingdom
Courage	4.96	1.38	3.70	3.28	2.79	KWS	2000	00	Winter	
Cristal	na	na	na	na	na	ences de Fra	2015	00	Winter	France
Cuzzco	na	na	na	na	na	AGT Semence	2015	00	Winter	France
CWH291	na	na	na	na	na	Dekalb	2015	00	Winter	na
Dariot	na	na	na	na	na	DSV	2015	00	Winter	France
Darmor	2.26	0.79	1.68	1.16	1.21	Serasem	1984	00	Winter	France
DK Exmore	na	na	na	na	na	Dekalb	2015	00	Winter	Austria
DK expansion	na	na	na	na	na	Dekalb	2015	00	Winter	France
DK Extract	na	na	na	na	na	Dekalb	2015	00	Winter	Poland
DK imperial	na	na	na	na	na	Dekalb	2014	00	Winter	Slovakia
DK impresario	na	na	na	na	na	Dekalb	2015	00	Winter	Hungria
Doral	na	1.83	3.63	1.43	2.30			00	Winter	France
Doublol	5.53	2.27	5.85	4.24	4.12	INRA	1989	00	Winter	France
Dozzen	na	na	na	na	na	ences de Fra	2013	00	Winter	United-Kingdom
Dualis	na	na	na	na	na	DSV	2016		Winter	
Dublanski	na	3.73	4.63	4.14	4.17			++	Winter	Russia
Ecrin	3.26	0.88	2.58	1.15	1.54	Serasem	2004	00	Winter	
Eleonore	3.5	1.03	2.40	1.67	1.70	Euralis	2002	00	Winter	
Elvira	na	4.34	4.30	5.50	4.71	na	na	na	Winter	na
Envol	na	na	na	na	na			00	Winter	France
ES angel	na	na	na	na	na	Euralis	2013	00	Winter	Italia
ES Astrid	1.53	0.29	0.60	0.54	0.48	Euralis	2003	00	Winter	France
ES Cesario	na	na	na	na	na	Euralis	2015	00	Winter	
ES imperio	na	na	na	na	na	Euralis	2015	00	Winter	France
ES Mambo	na	na	na	na	na	Euralis	2014	00	Winter	France
ES Pinson	2.36	0.81	1.03	0.98	0.94	Euralis	2004	00	Winter	

Chapitre III: Identification de nouvelles sources de résistances spécifiques aux effecteurs tardifs de *L. maculans*,
une nouvelle approche

Varieties	G2 ^o mean 2006	G2 ^o mean 2013	G2 ^o mean 2014	G2 ^o mean 2015	G2 ^o mean all years	Maintainer	Year released	Accession type	Type	Origin
Escort	5.03	1.61	4.10	3.94	3.22	Euralis	-	00	Winter	
Euro1	4.36	0.84	4.25	3.45	2.85	Monsanto SA	1991	00	Winter	France
Evri	-	0.78	1.91	1.18	1.29	Caussade	2003	00	Winter	
Expander	na	1.95	2.85	3.14	2.65			0+	Winter	
Express	3.33	1.23	2.48	2.03	1.91	NPZ	1992	00	Winter	Germany
Falcon	4.5	0.74	3.46	2.66	2.29	NPZ	1991	00	Winter	Germany
Fencer	na	na	na	na	na	Bayer	2014	00	Winter	
Fernando	na	na	na	na	na	KWS	2014	00	Winter	France
Fertodi Elit	na	1.27	2.34	0.91	1.51			++	Winter	Hungary
Fortis	4.26	0.86	2.30	1.45	1.53	Maisadour	2000	00	Winter	
Forto	na	1.86	2.01	2.58	2.15			++	Winter	Germany
Forza	2.66	0.74	1.78	1.48	1.33	Momont	2005	00	Winter	
Frederic	2.43	0.75	1.92	1.78	1.48	RAPS GbR	2003	00	Winter	
Gaspard	1.7	0.57	1.02	0.91	0.83	INRA	1985	++	Winter	France
Goeland	3.8	0.89	1.80	1.28	1.32	Momont	1992	00	Winter	Germany
Goldberger Zarter Butter	na	5.33	6.73	6.12	6.06			++	Winter	
Gorczański	na	2.05	4.48	3.73	3.42			++	Winter	
Grizzly	2.23	0.53	0.82	0.70	0.68	R2N	2003	00	Winter	
Groß Luzewitter	na	1.61	3.09	1.73	2.14			++	Winter	Germany
H9109901	na	na	na	na	na	KWS	2014	00	Winter	France
H9110523	na	na	na	na	na	KWS	2014	00	Winter	France
Hektor	3.33	0.98	1.88	1.37	1.41	JD	2003	00	Winter	Sweden
Hercules	na	1.91	2.73	3.94	2.86			0+	Winter	Sweden
Hourra	na	na	na	na	na	Momont	2014	00	Winter	France
HR 175160	na	na	na	na	na	RAGT 2n	2014	00	Winter	France
Ibex	3.33	1.21	3.24	2.44	2.30	R2N	2001	00	Winter	
Idol	na	0.75	1.97	1.60	1.44			00	Winter	
INV1025	na	na	na	na	na	Bayer	2015	00	Winter	France
INV1030	na	na	na	na	na	Bayer			Winter	
Jantar	6.66	6.19	5.85	7.57	6.54	IHAR	1985	00	Winter	France
Jet Neuf	2.13	0.92	1.20	1.00	1.04	Serasem	1977	0+	Winter	France
Jetton	2.3	1.10	2.07	1.16	1.44	NPZ	-	00	Winter	France
Jupiter	na	1.35	4.29	3.21	2.95			0+	Winter	Sweden
Kadore	2.4	0.72	2.10	1.53	1.45	Momont	2004	00	Winter	
Kid	na	0.88	2.78	1.79	1.82			0+	Winter	
Kosto	1.8	0.63	1.17	0.91	0.90	Momont	2001	00	Winter	France
Kurander	na	4.42	4.58	5.16	4.72			0+	Winter	Germany
Labrador	4.13	0.91	1.72	1.80	1.48	Momont	2003	00	Winter	
Lembkes	na	2.20	4.04	2.16	2.80			++	Winter	Germany
Lesira	na	3.44	5.44	5.55	4.81			0+	Winter	Germany
Lewis	3.53	0.88	1.88	1.96	1.57	Serasem	2003	00	Winter	
Liberator	na	2.90	4.08	2.75	3.24			00	Winter	
Ligora	na	4.74	5.06	5.68	5.16			0+	Winter	
Lingot	na	na	na	na	na			0+	Winter	
Link	na	3.77	5.11	2.82	3.90			00	Winter	Germany
Lioness	3.3	0.88	2.40	0.97	1.42	DSV	2004	00	Winter	France
Liporta	na	2.25	4.17	2.90	3.11			00	Winter	Germany
Liprima	3.7	1.23	2.53	2.00	1.92	DSV	2001	00	Winter	
Lirabon	na	2.34	4.46	4.32	3.71			00	Winter	
Lirajet	4.23	1.24	2.93	2.63	2.27	DSV	1989	00	Winter	
Local d'Ukraine	na	3.12	4.33	4.45	3.97			++	Winter	Ukraine
Madrigal	2.36	0.70	1.59	0.98	1.09	NK	1999	00	Winter	France
Major	5.1	3.65	4.75	4.11	4.17	INRA	1971	++	Winter	France
Makila	2.23	0.51	1.42	1.09	1.01	Maisadour	2001	00	Winter	
Mar	3.16	0.59	2.70	0.67	1.32	IHAR	1991	00	Winter	Poland
Markus	na	1.13	3.55	1.39	2.02			++	Winter	
Matador	na	1.96	3.07	2.15	2.39			++	Winter	Sweden
Maxol	na	2.69	4.23	3.15	3.36			00	Winter	
Mikado	na	0.93	3.90	2.07	2.30			0+	Winter	United-Kingdom
Milena	3.36	1.03	2.65	1.68	1.79	KWS	2000	00	Winter	Germany
Mirander	na	0.59	1.02	1.01	0.87				Winter	
Mohican	3.53	1.00	3.44	3.42	2.62	Euralis	1995	00	Winter	United-Kingdom
Moldavia	na	4.67	4.88	5.49	5.01			++	Winter	Russia
Montego	3.13	0.66	2.50	1.16	1.44	Nickerson	2001	00	Winter	United-Kingdom
Nain de Hambourg	3.33	2.38	2.87	1.84	2.37	INRA	<1960	++	Winter	Germany
Najavo	3.93	0.69	1.73	0.99	1.14	Euralis	1992	00	Winter	United-Kingdom
Napoli	na	na	na	na	na	AGT Semence	2015	00	Winter	France
Norde	na	3.15	4.12	6.56	4.61			++	Winter	
Oase	3.53	0.73	1.28	0.84	0.95	DSV	2004	00	Winter	France
Oleski	na	1.01	2.74	2.29	2.01			++	Winter	Russia
Olphi	1.6	0.42	1.29	0.88	0.86	Euralis	2002	00	Winter	

Varieties	G2 ^a mean 2006	G2 ^a mean 2013	G2 ^a mean 2014	G2 ^a mean 2015	G2 ^a mean all years	Maintainer	Year released	Accession type	Type	Origin
Olquell Gulzover	na	1.83	2.31	2.42	2.19			++	Winter	
Olymp	4.35	1.38	4.75	3.12	3.08	INRA	1990	00	Winter	Germany
Orléans	na	4.11	4.72	3.63	4.15			++	Winter	France
Pacha	na	1.82	3.73	2.43	2.66				Winter	
Pacific	2.26	0.78	1.20	1.18	1.06	Nickerson	2003	00	Winter	France
Pixel	na	na	na	na	na			++	Winter	
Pollen	3.73	0.57	2.12	1.01	1.23	Momont	1998	00	Winter	France
Pollux	na	0.84	2.39	1.78	1.67				Winter	
Popular	na	na	na	na	na	DSV	2013	00	Winter	
Potomac	3.06	0.96	2.49	1.51	1.65	Nickerson	2003	00	Winter	France
Prerouska	na	1.79	4.56	4.93	3.76			++	Winter	
President	na	na	na	na	na	aatbau Franc	2015	00	Winter	Denmark
Primor	5.63	5.67	5.11	6.78	5.85	INRA	1973	0+	Winter	France
Prince	3.26	1.14	2.23	2.60	1.99	NPZ	-		Winter	
PT246	na	na	na	na	na	neer Semenc	2014	00	Winter	France
PT255	na	na	na	na	na	neer Semences		00	Winter	
PT256	na	na	na	na	na	neer Semenc	2015	00	Winter	France
Quedlinburger Platzfester	na	2.68	3.61	2.62	2.97			++	Winter	
Quinta	5.8	4.75	4.10	4.87	4.57	INRA	1976	0+	Winter	France
Rafale	na	1.07	2.92	2.54	2.18	ences de Fra	2013	0+	Winter	
Raffiness	na	na	na	na	na				Winter	
Ramses	4.33	1.38	3.63	2.13	2.38	INRA	1970	++	Winter	France
Rapol	na	1.26	3.08	2.17	2.17			++	Winter	Germany
Rapora	na	4.95	3.97	3.87	4.26				Winter	
Recital	3.03	0.71	2.28	1.06	1.35	NK	2000	00	Winter	
Remy	2.83	0.70	1.42	1.03	1.05	KWS	2004	00	Winter	
Ridana	na	0.82	1.20	0.88	0.97			0+	Winter	Germany
Rocket	na	1.08	2.17	2.19	1.81			00	Winter	
Rodeo	2.23	0.65	1.41	0.86	0.97	KWS	2004	00	Winter	
Roxet	na	0.33	1.78	2.13	1.41			00	Winter	
Sahara	3.5	0.92	2.70	1.57	1.73	JD	2001	00	Winter	
Salomont	3.16	1.08	2.42	2.21	1.90	Serasem	2003	00	Winter	France
Sarepta	3.63	0.80	1.42	0.92	1.04	INRA	1962	++	Winter	France
Savannah	na	0.56	2.62	1.98	1.72			00	Winter	
Severino KWS	na	na	na	na	na	KWS	2014	00	Winter	France
Shogun	na	0.75	3.59	3.15	2.50			00	Winter	
Sinera	na	7.22	6.17	7.84	7.07				Winter	
Sinus	na	2.83	4.71	6.77	4.77			++	Winter	
Skrzesowicka-Fero	na	3.34	4.52	3.61	3.82			++	Winter	Poland
SW Gospel	4.46	1.08	2.75	3.17	2.33	SW	2003	00	Winter	
SY Alister	na	na	na	na	na	Syngenta	2012	00	Winter	United-Kingdom
Tapidor	na	na	na	na	na			00	Winter	France
Tennessee	1.93	0.88	1.69	1.09	1.22	Nickerson	2000	00	Winter	
Tenor	2.16	0.33	1.52	0.88	0.91	Momont	1999	00	Winter	France
Titus	na	5.32	4.20	3.16	4.22			++	Winter	
Tonus	na	1.98	3.00	3.31	2.76			++	Winter	
Tosca	4.63	0.78	2.39	1.72	1.63	SW	1999	00	Winter	Sweden
Tradition	3.3	1.09	2.88	2.71	2.23	INRA	1999	00	Winter	France
Trezzor	na	na	na	na	na	RAGT 2n	2014	00	Winter	France
Twister	3.73	1.30	3.37	1.88	2.19	NK	2000	00	Winter	na
V275OL	na	na	na	na	na	Dekalb	2011	00	Winter	
V316OL	na	na	na	na	na	Dekalb	2014	00	Winter	Denmark
Valdor	na	3.13	4.48	4.53	4.05			0+	Winter	France
Verona	4.5	0.81	2.33	1.87	1.67	SW	2004	00	Winter	
Victor	na	2.16	3.38	1.34	2.29			++	Winter	
Viking	5.06	1.52	3.25	3.25	2.67	NPZ	2002	00	Winter	
Vivol	3.46	1.95	3.43	2.59	2.66	Monsanto SA	1992	00	Winter	France
Warzanwski	na	4.57	4.14	3.95	4.22			++	Winter	Poland
Wembley	na	na	na	na	na	ences de Fra	2015	00	Winter	United-Kingdom
Whisky	na	na	na	na	na	ences de Fra	2015	00	Winter	France
Wotan	4.6	1.18	4.28	3.24	2.90	NPZ	1991	00	Winter	
Yudal	6.76	7.90	na	na	na	INRA	-	++	Spring	Korea
Zeruca	4.06	0.97	3.20	2.25	2.14	Serasem	1998	+0	Winter	France
Zorro	na	1.55	2.48	2.72	2.25			00	Winter	Germany

^aThe G2 disease score measured on a 1–6 scale is based on the internal area of necrosis at the stem-base cross section. These values were obtained by Jestin et al. (2011) and Delourme et al. (unpublished data).

The accession type (++, +0, 0+ or 00) is indicated with: " ++ ", varieties rich in erucic acid (C22:1) and glucosinolates (GSL); " +0 ", varieties rich in C22:1 and poor in GSL; " 0+ ", varieties poor in C22:1 and rich in GSL; " 00 ", varieties poor in C22:1 and in GSL.

Table S2: Predicted genes of Darmor-*bzh* present in the region of *RlmSTEE98*

Gene	Chromosome name	Ortholog in <i>A. thaliana</i>	Predicted function in all data bases	Predicted function in <i>A. thaliana</i>	GO category	logFC ^a between cotyledon and stem	FDR
BnaA09g45770D	A09	AT1G14150	psbq-like protein chloroplastic	Photosynthetic_NDH_subunit_of_luminal_location_2%2C_chloroplastic	transporter activity	-8.842570792	7.96487E-25
BnaA09g45450D	A09	AT1G14820	cral-trio domain-containing protein yk1091c1-like	Sec14p-like_phosphatidylinositol_transfer_family_protein	transporter activity	-1.786787266	0.116117639
BnaA09g45460D	A09	AT1G14780	macpf domain-containing protein at1g14780-like	MACPF_domain-containing_protein_At1g14780	plant-type_hypersensitive_response	-0.237832201	1
BnaA09g45480D	A09	AT1G14080	lucosyltransferase 6-like	lucosyltransferase_6	Protein_glycosylation	-4.450333882	3.36148E-10
BnaA09g45890D	A09	AT1G14040	phosphate transporter pho1 homolog 3-like	Phosphate_transporter_PHO1_homolog_3	transporter activity	-3.765463835	4.01684E-09
BnaA09g45490D	A09	AT1G14730	probable transmembrane ascorbate ferri reductase 3	Probable_transmembrane_ascorbate_ferri_reductase_3	oxidoreductase activity	0.095963634	1
BnaA09g45500D	A09	AT1G14730	elongation factor mitochondrial	-	unknown function	2.321327153	0.118553106
BnaA09g45510D	A09	AT1G14720	probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 28	Probable_xyloglucan_endotransglucosylase/hydrolase_protein_28	hydrolase activity	1.429596006	0.036485245
BnaA09g45520D	A09	AT1G14710	hydroxyproline-rich glyco protein	hydroxyproline-rich_glycoprotein_family_protein	Protein binding	1.897132527	0.009512234
BnaA09g45530D	A09	AT1G14710	-	-	unknown function	none	none
BnaA09g45540D	A09	AT1G14690	65-kda microtubule-associated protein 7	65-kDa_microtubule-associated_protein_7	microtubule binding	0.966096895	0.222776878
BnaA09g45550D	A09	AT1G14687	zinc-finger homeodomain protein 14	Zinc-finger_homeodomain_protein_14	DNA binding	1.919398305	0.092204195
BnaA09g45560D	A09	AT1G14685	-	Protein_BASIC_PENTACYSTEINE2	Transcription factor activity	1.262054623	0.078241274
BnaA09g45570D	A09	AT1G14685	-	-	unknown function	none	none
BnaA09g45680D	A09_random	AT5G19850	alpha beta fold family protein	alpha/beta-Hydrolases_superfamily_protein	hydrolase activity	-3.335849118	0.028854406
BnaA09g45590D	A09	AT1G14360	-	UDP-galactose/UDP-glucose transporter_3	transporter activity	0.436025279	0.898401069
BnaA09g45600D	A09	AT1G14330	F-box kelch-repeat protein skip11-like	Galactose_oxidase/kelch_repeat_superfamily_protein	blue light photoreceptor activity	-0.634912633	0.560712843
BnaA09g45610D	A09	AT1G14330	F-box kelch-repeat protein skip11-like	Galactose_oxidase/kelch_repeat_superfamily_protein	blue light photoreceptor activity	-0.049334849	1
BnaA09g45620D	A09	AT1G14320	60s ribosomal protein l10-1	60S_ribosomal_protein_l10-1	Structural constituent of ribosome	2.094248013	0.099929652
BnaA09g45580D	A09	AT1G14360	udp-galactose udp-glucose transporter 3	UDP-galactose/UDP-glucose transporter_3	transporter activity	-3.254292644	2.99896E-06
BnaA09g45640D	A09	AT1G14250	transcription activator glk1-like	Probable_apyrase_5	Transcription factor activity	none	none
BnaA09g45650D	A09	AT1G14250	dual specificity protein phosphatase 12-like	Probable_apyrase_5	DNA binding	none	none
BnaA09g45660D	A09	AT1G14250	probable apyrase 3	Probable_apyrase_5	ATP binding	none	none
BnaA09g45670D	A09	AT1G14220	ribonuclease 3-like	Ribonuclease_T2_family_protein	RNA binding	none	none
BnaA09g45680D	A09	AT1G14220	ribonuclease 3-like	Ribonuclease_T2_family_protein	RNA binding	none	none
BnaA09g45690D	A09	AT1G14210	ribonuclease t2 family protein	Ribonuclease_T2_family_protein	RNA binding	-1.558987988	0.149898883
BnaA09g45900D	A09	AT1G14030	fructose-bisphosphate aldolase-lysine n-chloroplastic	[Fructose-bisphosphate_aldolase]-lysine_N-methyltransferase%2C_chloroplastic	Fructose binding	-3.074173537	1.13771E-06
BnaA09g45710D	A09	AT1G14200	e3 ubiquitin-protein ligase ring1-like	RING/U-box_superfamily_protein	ubiquitin-protein transferase activity	-1.589124994	0.02149263
BnaA09g45860D	A09	AT1G14060	-	GCK_domain-containing_protein	unknown function	-2.969491041	0.00122332
BnaA09g457080D	A09_random	AT1G14440	zinc-finger homeodomain protein 4-like	Zinc-finger_homeodomain_protein_4	DNA binding	-2.746445007	0.014700931
BnaA09g45740D	A09	AT5G55930	oligopeptide transporter 1	Oligopeptide_transporter_1	transporter activity	none	none
BnaA09g45750D	A09	AT1G14170	kh domain-containing protein at1g18375-like isoform x1	RNA-binding_KH_domain-containing_protein	transporter activity	0.182076455	1
BnaA09g45760D	A09	AT1G14160	casparian strip membrane protein 6-like	CASP-like_protein_1A1	Integral component of membrane	none	none
BnaA09g45700D	A09	AT1G14205	50s ribosomal protein chloroplastic	Ribosomal_L18p/L5e_family_protein	Structural constituent of ribosome	-2.327004568	0.010436598
BnaA09g45780D	A09	AT1G14140	mitochondrial uncoupling protein 3	Mitochondrial_uncoupling_protein_3	transporter activity	0.248216037	1
BnaA09g45790D	A09	AT1G14130	2-oxoglutarate-dependent dioxigenase dao-like	2-oxoglutarate-[2OG]_and_Fe(II)-dependent_oxigenase_superfamily_protein	oxidation-reduction process	3.440399495	0.054814967
BnaA09g45800D	A09	AT1G14130	2-oxoglutarate-dependent dioxigenase dao-like	2-oxoglutarate-[2OG]_and_Fe(II)-dependent_oxigenase_superfamily_protein	oxidation-reduction process	none	none
BnaA09g45810D	A09	AT1G14130	galactoside 2-alpha-l-fucosyltransferase-like	galactoside_2-alpha-l-fucosyltransferase-like	Cell wall biogenesis	none	none
BnaA09g45820D	A09	AT1G14110	probable fucosyltransferase 7	Probable_fucosyltransferase_7	Protein glycosylation	none	none
BnaA09g45830D	A09	AT1G14110	probable fucosyltransferase 8	Probable_fucosyltransferase_8	Protein glycosylation	none	none
BnaA09g45730D	A09	AT1G14180	uncharacterized protein loc106380911	RING/U-box_superfamily_protein	ubiquitin-protein transferase activity	2.11498845	0.003751038

Gene	Chromosome name	Ortholog in <i>A. thaliana</i>	Predicted function in all data bases	Predicted function in <i>A. thaliana</i>	GO category	log ₂ FC between cotyledon and stem	FDR
BnaA09g45850D	A09	ATI.G1.4070	probable fucosyl transferase 7	fucosyl transferase_7	Protein glycosylation	2.561443177	0.111457449
BnaA09g56950D	A09_random	ATI.G1.4630	uncharacterized protein loc106310450	unknown_protein	unknown function	2.740079866	0.000968815
BnaA09g45880D	A09	ATI.G1.4040	vacuolar protein sorting-associated protein 24 homolog 1		hydrolase activity	2.760066946	0.001254522
BnaA09g45870D	A09	ATI.G1.4040	phosphate transporter pho1 homolog 3-like		transporter activity	3.27553999	2.04042E-07
BnaA09g45400D	A09	0	crat-tno domain-containing protein yk1091c-like	Dynamis-related_protein_3	microtubule binding	3.503100662	0.005275866
BnaA09g45720D	A09	ATI.G1.4190	protein hofhae-like		oxidoreductase activity	3.859561805	1.60641E-06
BnaA09g45930D	A09	ATI.G1.4010	transmembrane emp24 domain-containing protein p24delta7-like	Transmembrane_emp24_domain-containing_protein_p24delta7	transporter activity	-0.043800766	1
BnaA09g45920D	A09	ATI.G1.4000	probable serine threonine protein kinase drhd		ATP binding	-0.867854112	0.33069765
BnaA09g45930D	A09	ATI.G1.3970	uncharacterized protein loc106377453 is of form x1	Protein_of_unknown_function_(DUF1336)	unknown function	-1.886236684	0.273666618
BnaA09g45940D	A09	ATI.G1.3960	probable wryk transcription factor 4	Probable_WRYK_transcription_factor_4	Transcription factor activity	-0.651467001	0.541503906
BnaA09g45950D	A09	ATI.G1.3940	uncharacterized protein loc104801814	Plant_protein_of_unknown_function_(DUF863)	unknown function	0.19179279	1
BnaA09g456940D	A09_random	ATI.G1.4610	valine-trna ligase-like	Valine-trna_ligase	unknown function	-0.38132416	0.907829226
BnaA09g45630D	A09	ATI.G1.4260	ring-variant domain-containing protein	RING/FYVE/PHD_zinc_finger_superfamily_protein	Zinc ion binding	4.668613366	1.0262E-06
BnaA09g56960D	A09_random	ATI.G1.4650		Probable_splicing_factor_3A_subunit_1	RNA binding	-0.21391235	1
BnaA09g56970D	A09_random	ATI.G1.4680	rb1-inducible coiled-coil protein 1-like	unknown_protein	Catalytic activity	none	none
BnaA09g45470D	A09	ATI.G1.4760	homeobox protein knotted-1-like 12	KNOX_Arabidopsis_thaliana_melnox	DNA binding	6.242286524	0.015557168
BnaA09g56990D	A09_random	ATI.G1.4580	protein indeterminate-domain chloroplastic-like	Protein_indeterminate-domain_6%2C_chloroplastic	unknown function	none	none
BnaA09g57000D	A09_random	0	uncharacterized protein loc103834736		unknown function	none	none
BnaA09g57010D	A09_random	0	uncharacterized protein loc106311474 is of form x1		unknown function	none	none
BnaA09g57020D	A09_random	ATI.G1.4550	peroxidase 4	Peroxidase_5	Peroxidase activity	-1.262871473	0.413127339
BnaA09g57030D	A09_random	0	phytoalkaline receptor 1-like		Transcription factor activity	1.288492085	0.638717066
BnaA09g57040D	A09_random	ATI.G1.4510	phd finger protein a1fin-like 7	PHD_finger_protein_A1FIN-LIKE_7	Histone binding	-0.195374743	1
BnaA09g57050D	A09_random	ATI.G1.4500	ankyrin repeat-containing protein at3g12360-like	Ankyrin_repeat_family_protein	Ligase activity	none	none
BnaA09g57060D	A09_random	ATI.G1.4480	ankyrin repeat-containing protein at3g12360-like	Ankyrin_repeat_family_protein	Ligase activity	none	none
BnaA09g57070D	A09_random	ATI.G1.4455		unknown_protein	unknown function	none	none
BnaA09g45480D	A09	ATI.G1.4750	cyclins-d6-like	Cyclin-SDS	Cyclin	8.417880647	5.47949E-06
BnaA09g57090D	A09_random	ATI.G1.0290	probable sugar phosphate translocator at5g04160	Probable_sugar_phosphate/translocator_At5g10290	transporter activity	none	none
BnaA09g57100D	A09_random	ATI.G1.4430	galactose oxidase-like	glyoxal_oxidase-related_protein	oxidoreductase activity	none	none
BnaA09g57110D	A09_random	ATI.G1.4420	probable pectate lyase 3	Probable_pectate_lyase_3	Pectate lyase activity	none	none

(a) Genes over-expressed in cotyledons have a Fold Change (FC) < 0 and genes over-expressed in stems have a FC > 0. Genes differentially expressed are indicated in red (log₂(FC)>2 and FDR<0.05).

(b) none: no expression in the tested conditions (reads<15)

Table S3: List of primers used in this study

Name	Sequence (5'-3')	Experiment
LmSTEE1_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGGGCTACTGTAAACCGGTTTTGTAC	Cloning
LmSTEE1_EcoRI_Up	GAGAGAGAATTCATGCAATTCTCAACCATCTTTAACGC	Cloning
LmSTEE1_qUp	AGCTGCTCTTCTTACCC	qPCR
LmSTEE1_qLow	ATTTTCCACACACGTCCCA	qPCR
LmSTEE30_SalI_Up	GAGAGAGTCGACATGAAGTTCACAAACACC	Cloning
LmSTEE30_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGTCATGTCACTTGTCTGACCGA	Cloning
LmSTEE30_qUp	GAACCGCCATAACCTTTGCA	qPCR
LmSTEE30_qLow	GCCATCCAGTCTTCAGCCAT	qPCR
LmSTEE35_EcoRI_Up	GAGAGAGAATTCATGTATCTCTGCAAAACTG	Cloning
LmSTEE35_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGCTGCGAGTTAGGCTGTTGTT	Cloning
LmSTEE35_qUp	TGCAAAACTGTTATCGTCCCTTT	qPCR
LmSTEE35_qLow	TGCAAGTACGTTAATAGGTCC	qPCR
LmSTEE78_EcoRI_Up	GAGAGAGAATTCATGTTTACCAGCACATTCATTTT	Cloning
LmSTEE78_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGTGTGACGAGGCTACATGGTT	Cloning
LmSTEE78_qUp	GGTGGCAAGGGCGTTAAGA	qPCR
LmSTEE78_qLow	AGTCTGGAATTGGATCTGGT	qPCR
LmSTEE98_SalI_Up	GAGAGAGTCGACATGAAGACCTTTATCACCATTGC	Cloning
LmSTEE98_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGTGTGGCATTGGGTTTAGGC	Cloning
LmSTEE98_qUp	ATGAAGACCTTTATCACCATTGC	qPCR
LmSTEE98_qLow	CCGCCACAGTGAACATAAT	qPCR
LmSTEE11_EcoRI_Up	GAGAGAGAATTCATGAAGCTTAATTTTGTACTGCTTTTGC	Cloning
LmSTEE11_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGGTGTGCACCCTGGAGAAGAA	Cloning
LmSTEE11_qUp	CAGCGATGTGGAGGTTGA	qPCR
LmSTEE11_qLow	TGAGGGCGTTGTAGCAAT	qPCR
promAvrLm4-7_Up	GTTTTGGTTAGGTTTAGGGTCT	Cloning
promAvrLm4-7_Down BamHI	GAGAGAGGATCCGTTGTTAACTGTCAAAGGGTT	Cloning
Tubulin_Up	AAGAACTVATCCTACTTCGT	qPCR
Tubulin_Low	TGAATAGCTCCTGAATGG	qPCR
Actin_Up	AGTGCGATGTCGATGTCAG	qPCR
Actin_Low	AAGAGCGGTGATTCCTTCT	qPCR

Discussion et perspectives

Lorsque j'ai commencé ma thèse, la colonisation de la tige de colza par *L. maculans* était très mal comprise, avec une méconnaissance quasi-totale de la cinétique de colonisation des tissus, des différents stades de vie du champignon (dormance? endophytisme latent? colonisation active des tissus? nécrotrophie, reproduction sexuée), des facteurs déclenchant leur transition et des gènes exprimés à ces différents stades par le champignon. La seule exception concernait une analyse ciblée sur les gènes impliqués dans la production de la sirodesmine PL, intervenant dans le développement de la nécrose au collet (Elliott *et al.*, 2007). L'objectif de cette thèse était donc d'apporter une meilleure compréhension de cette phase de colonisation et d'infection, en se focalisant sur les gènes exprimés par *L. maculans* lui permettant de coloniser la plante de façon systémique et ainsi poursuivre son cycle infectieux jusqu'à la nécrose au collet finale. Sur la base des avancées récentes mettant en avant le rôle des effecteurs comme molécules déterminantes pour le succès de l'infection des plantes par leurs agents pathogènes, mon travail de thèse a été focalisé sur l'étude de gènes codant des effecteurs.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse m'ont permis d'identifier plusieurs vagues de gènes exprimés pendant la colonisation de la tige et qui sont différents de ceux qui sont exprimés lors de la colonisation des cotylédons. Parmi ces gènes dits tardifs, j'ai identifié un grand nombre de gènes codant pour des effecteurs candidats. Avant ma thèse, de nombreux effecteurs étaient prédits dans le génome sans support transcriptionnel. Mes travaux démontrent que ces gènes existent réellement et semblent bien être des effecteurs, puisqu'ils sont induit spécifiquement *in planta*. J'ai confirmé par ailleurs que les gènes codant des effecteurs précoces de *L. maculans* sont spécifiquement localisés dans les régions pauvres en gènes et riches en éléments répétés du génome fongique. A l'inverse les gènes codant des effecteurs candidats tardifs sont absents de ces régions et sont localisés dans les régions riches en gènes du génome.

J'ai ensuite montré que lors de la colonisation de la tige le champignon exprime une première vague d'effecteurs candidats en hiver, une deuxième au printemps, avant l'apparition de la nécrose au collet (dont certains sont impliqués dans la suppression de la mort cellulaire végétale), et une troisième vague à la fin de la saison culturale, lors du développement de la nécrose au collet. Ces différents résultats obtenus permettent de proposer le modèle suivant pour expliquer les différentes phases de vie du champignon dans les tissus végétaux: *L. maculans* s'installerait dans les tissus et coloniserait la tige de colza en sécrétant, durant une très longue période, des effecteurs supprimant la mort cellulaire et/ou interférant avec les défenses de la plante. Il est à noter que différents effecteurs ayant cette même fonction pourraient être produits, comme je l'ai montré avec LmSTEE30 et LmSTEE35. A la fin de la saison culturale, la diminution de l'expression des gènes correspondants ainsi que la surexpression d'enzymes de dégradation permettraient au champignon de passer d'un stade de vie

biotrophe à un stade de vie nécrotrophe et d'induire la nécrose au collet. Cette transition entre les deux modes de vie serait donc basée sur un équilibre entre effecteurs supprimant la mort cellulaire et effecteurs induisant la mort cellulaire. J'ai par ailleurs effectué une première comparaison du comportement transcriptionnel du champignon dans les tissus d'une plante sensible ou présentant un bon niveau de résistance au stade adulte et montré que le génotype de la plante hôte influence le profil d'expression des gènes du champignon.

Dans le but d'identifier de nouvelles sources de résistance spécifique et/ou faciliter l'identification de résistances quantitatives dans le matériel végétal, j'ai créé des souches fongiques sur-exprimant précocement des effecteurs tardifs et j'ai ainsi identifié du polymorphisme de réponse entre les différents cultivars testés face aux effecteurs tardifs. Parmi ces résultats, j'ai pu mettre en évidence une résistance spécifique portée par la variété Yudal à l'effecteur tardif LmSTEE98. En interaction avec l'UMR IGEPP de Rennes, nous avons validé le contrôle monogénique de cette réponse et effectué sa cartographie génétique. Se pose maintenant la question de l'utilisation de ce gène de résistance en tant que source possible de diversification des résistances disponibles et pour contribuer à la lutte contre la nécrose du collet.

Les travaux effectués au cours de cette thèse apportent donc une meilleure compréhension de la colonisation systémique du colza par *L. maculans* et ouvrent de nouvelles pistes d'étude à la fois sur les différentes phases de colonisation par le champignon, sur l'analyse de la résistance quantitative chez le colza et sur l'identification de nouvelles sources de résistances, en particulier des résistances spécifiques, jusqu'ici insoupçonnées et potentiellement durables car ciblant des gènes d'avirulence très peu variables dans les populations.

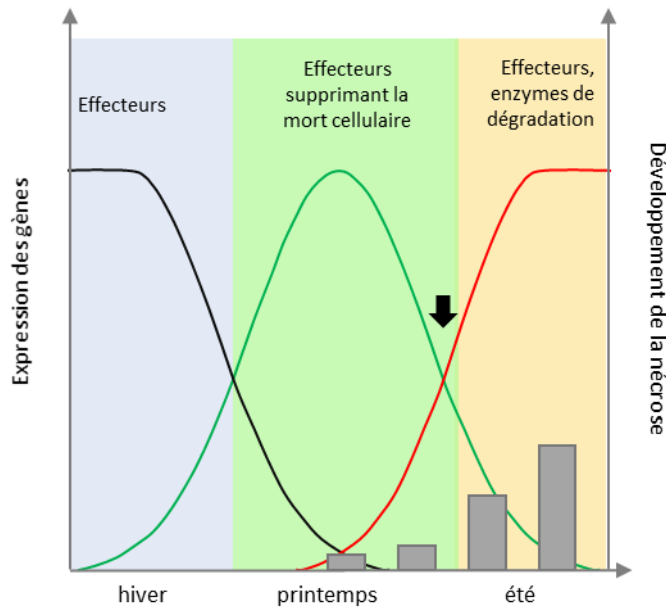


Figure 1: Modèle simplifié des vagues d'expression d'effecteurs lors de la colonisation de la tige de colza par *Leptosphaeria maculans*

Trois vagues d'expression de gènes codant pour des effecteurs ont pu être identifiées, en hiver (en noir), au printemps (en vert) et en été (en rouge). Au cours du processus infectieux de la tige de colza, *L. maculans* exprimerait en hiver et au printemps, avant l'établissement de la nécrose, des effecteurs interférant avec les réactions de défenses de la plante. A la fin de la saison culturale, la diminution de l'expression de ces effecteurs ainsi que la surexpression d'enzymes de dégradation permettraient au champignon de passer d'un stade de vie biotrophe à un stade de vie nécrotrophe et d'induire la nécrose au collet. Cette transition entre les deux modes de vie (indiquée par une flèche noire) serait donc basée sur un équilibre entre effecteurs supprimant la mort cellulaire et effecteurs induisant la mort cellulaire. Les histogrammes (gris) correspondent au développement de la nécrose observée à la base de la tige de colza.

1. Les vagues d'effecteurs de *L. maculans*

Des vagues d'expression d'effecteurs sont observées chez de nombreux agents pathogènes ou organismes symbiotiques. Ces différentes vagues semblent avoir souvent des fonctions différentes voire antagonistes pour permettre au microorganisme de réaliser l'ensemble de son cycle de vie (p. 31). Il est toutefois à noter qu'au début de ma thèse, cette notion commençait juste à émerger et était très peu documentée. De façon un peu schématique, nous envisagions, au début de cette thèse, l'existence de deux vagues d'effecteurs exprimés *par L. maculans* et spécifiques aux phases précoces (infection primaire des organes aériens) et tardives (colonisation systémique de la tige) de l'infection. Les analyses transcriptomiques réalisées montrent non seulement qu'il y a des effecteurs spécifiques de la colonisation des cotylédons et de la tige, mais qu'il existe plusieurs vagues d'expression lors de cette dernière et qui semblent être en étroite corrélation avec le stade de développement de la plante hôte, voir même avec l'environnement. On a ainsi observé une première vague d'effecteur en hiver, quand la plante est au stade rosette, une deuxième vague au printemps, quand l'élongation de la plante a lieu et l'activité transcriptomique du champignon et les températures augmentent, et enfin une troisième vague en été lors du remplissage des graines du colza, avec l'apparition en parallèle d'une nécrose au collet (Figure 1).

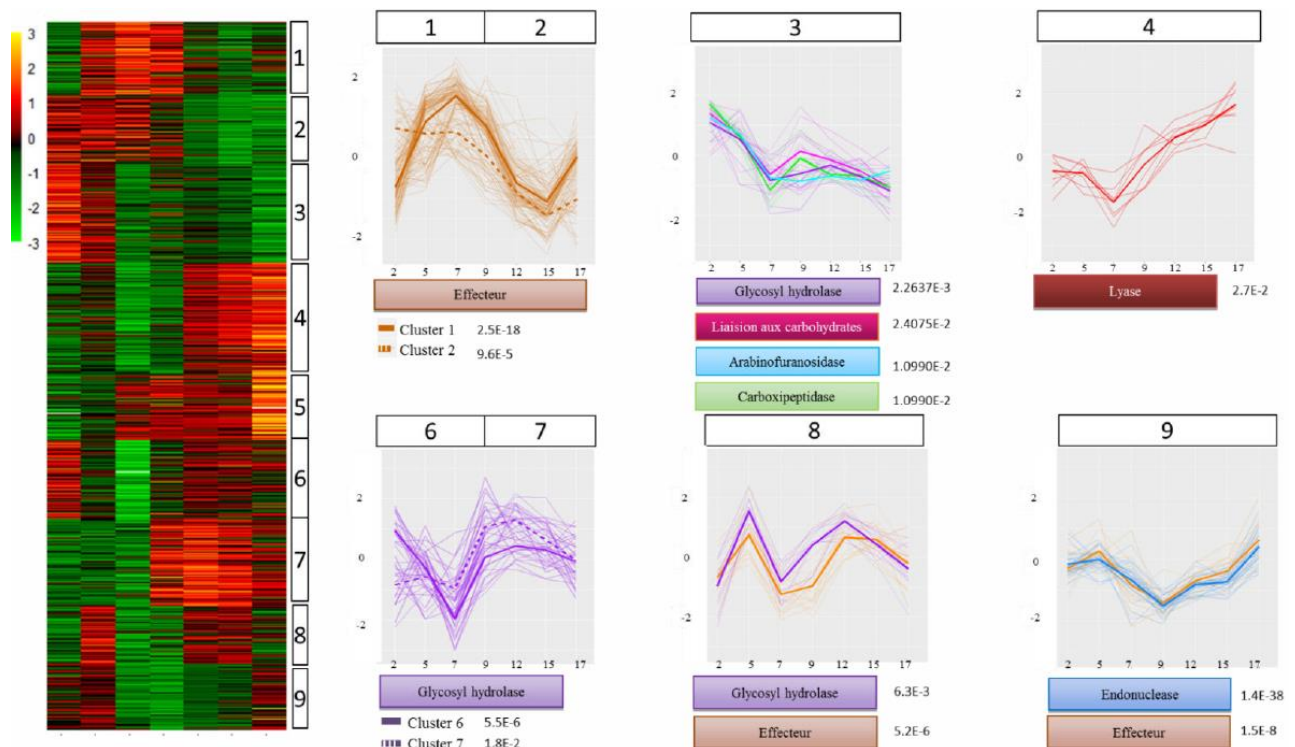


Figure 2: Représentation des profils d'expression des gènes différentiellement exprimés et les fonctions associées au cours de la cinétique d'infection des cotylédons par *L. maculans*

Les données totales d'expression de la cinétique ont été normalisées (CPM) et centrées (moyenne = 0, écart-type = 1). Les gènes différentiellement exprimés ont été extraits de ces données normalisées et classés par cluster puis représentés sous forme de carte de chaleur. Pour chaque cluster, les courbes représentent le niveau d'expression (traits fins) et la moyenne (traits gras) des gènes dont les fonctions ont été détectées comme enrichies. Chaque fonction enrichie est représentée par une couleur différente et les FDR (False Discovery Rate) associés à chacune d'entre elles sont spécifiés. Lorsque deux clusters sont enrichis en une même fonction, les courbes sont tracées sur un même graphique (cluster 1 et 2, et clusters 6 et 7) (Tiré du rapport de stage de M2 d'Elise Gay).

Des études, en particulier chez les oomycètes, ont montré une corrélation entre la fonction d'un effecteur et sa cinétique d'expression. Ainsi on retrouve associés à la phase de vie biotrophe des effecteurs impliqués dans la suppression de la mort cellulaire ou la lutte contre les réactions de défense de la plante et à l'inverse, on retrouve associés à la phase de vie nécrotrophe des effecteurs impliqués dans l'induction de la mort cellulaire et des enzymes de dégradation (Jupe *et al.*, 2013; Kelley *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Yoshino *et al.*, 2012; Zuluaga *et al.*, 2016). Depuis très récemment, nous savons que des vagues d'effecteurs distincts sont aussi produites par *L. maculans* lors de l'infection des organes aériens (E. Gay, non publié): les résultats du M2 d'Elise Gay montrent que lors de la colonisation des cotylédons il y a, de la même façon, plusieurs vagues d'effecteurs à 5 et 7 jours post-inoculation (jpi) lors de la colonisation biotrophe des tissus et à 12 et 15 jpi au stade nécrotrophe (Figure 2). La transition vers la nécrotrophie est également accompagnée de l'augmentation de l'expression de gènes codant pour des enzymes de dégradation (lyases, hydrolases). En accord avec ce qu'on trouve chez d'autres modèles, on peut supposer que les effecteurs surexprimés en phase biotrophe de la colonisation des cotylédons permettraient de contrecarrer les réaction de défense de la plante en les supprimant ou en protégeant le champignon contre celles-ci et/ou seraient impliqués dans la suppression de la mort cellulaire, et, inversement, ceux surexprimés lors de la phase nécrotrophe seraient incapables d'une telle suppression et/ou induiraient la macule foliaire nécessaire à la multiplication asexuée. En me focalisant sur un petit panel de cinq effecteurs de *L. maculans*, j'ai pu montrer que certains des effecteurs surexprimés au printemps, avant le développement de la nécrose, étaient capables de supprimer l'induction de la mort cellulaire en système hétérologue. En été, au moment du développement de la nécrose du collet, l'expression de ces effecteurs est réprimée, et en parallèle des enzymes de dégradation ainsi que d'autres effecteurs (non ou peu capables de supprimer la nécrose) sont surexprimés. La combinaison de l'ensemble de ces cinétiques permettrait au champignon de passer d'une phase de vie biotrophe à une phase nécrotrophe (Figure 1). Cette transition qui dure plusieurs semaines voire plusieurs mois chez *L. maculans*, est beaucoup plus rapide, n'excédant pas quelques jours, chez les autres agents pathosystèmes hémibiotrophes chez lesquels un tel modèle de transition a été observé, tels que *P. infestans* (Kelley *et al.*, 2010), *C. higginsianum*, *C. orbiculare* (Gan *et al.*, 2013; Yoshino *et al.*, 2012). Il y a donc chez *L. maculans*, lors de la colonisation systémique, comme chez les autres microorganismes, des vagues d'expression d'effecteurs. La particularité est que chacune de ces vagues d'effecteurs perdure plusieurs mois, alors que chez les autres microorganismes phytopathogènes, elles n'excèdent pas les quelques jours, correspondant à la colonisation des organes aériens et à la sporulation (Cantu *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2015; Hacquard *et al.*, 2012; Mirzadi Gohari *et al.*, 2015).

Dans cette thèse, j'ai fait la distinction entre les effecteurs précoces, sous-exprimés dans la tige, et les effecteurs tardifs, sous-exprimés dans les cotylédons. Il existe peut-être des effecteurs communs entre les deux phases de colonisation et notamment des effecteurs communs entre les phases biotrophes de la colonisation des cotylédons et de la tige qui auraient une fonction de suppression des défenses de la plante, indépendante du type de tissus (et réciproquement pour la phase nécrotrophe), mais je ne les ai pas identifiés au cours de cette thèse. De même, je n'ai pas identifié au cours de cette thèse d'effecteurs qui auraient une action directe sur l'induction de mort cellulaire, et donc une action directe sur le développement de la nécrose. Là encore, de tels effecteurs, s'ils existent pourraient au moins en partie être similaire lors de l'induction de la macule foliaire ou de la nécrose du collet. On peut en tous cas se poser la question de savoir pourquoi des pools différents d'effecteurs à fonction similaire (par exemple la suppression des réactions de défense) sont produits lors de la colonisation biotrophe des cotylédons ou de la tige et donc pourquoi le champignon ne réutilise pas les effecteurs qui ont permis de supprimer de façon efficace les réactions de défense au stade cotylédon lors de la colonisation systémique de la tige.

En hiver et au printemps, à un stade où la colonisation est encore asymptomatique, le champignon exprime deux vagues d'effecteurs distinctes (Figure 1). Ces deux vagues auraient donc des fonctions ou modes d'action différents dans le processus de colonisation et de suppression des défenses de la plante. De la même manière, chez *Puccinia graminis* et *P. striiformis*, plusieurs vagues d'effecteurs ont été identifiés lors des phases précoces d'infection. Ces vagues auraient des fonctions différentes dans le processus infectieux puisque les effecteurs associés ne suppriment pas forcément la mort cellulaire induite par les mêmes inducteurs et que seuls certains sont capables de supprimer la production de ROS par la plante (Ramachandran *et al.*, 2017). Les deux vagues d'effecteurs de *L. maculans* en hiver et au printemps sont aussi à mettre en regard du profil d'expression génique de la plante hôte. Entre l'hiver et le printemps, la physiologie de la plante de colza subit d'importantes modifications, en conséquence de quoi le champignon devrait sécréter différentes vagues d'effecteurs pour se maintenir dans la tige qui se développe. De la même façon, lors de l'interaction symbiotique entre les bactéries *Sinorhizobium meliloti* et la plante modèle *Medicago truncatula*, différents gènes, principalement associés au stress, sont exprimés au cours des différentes phases symbiotiques, pendant la différenciation du nodule (Lang and Long, 2015). Une analyse plus globale du profil d'expression des gènes du champignon et de la plante permettront une meilleure compréhension de ces différents stades de colonisation.

La colonisation du pétiole par *L. maculans* est aussi une phase importante du cycle parasitaire, permettant au champignon de transiter des feuilles infectées à la tige où il va pouvoir réaliser sa

reproduction sexuée. Le champignon doit pouvoir coloniser efficacement le pétiole sans déclencher les défenses de la plante et assez rapidement pour atteindre la tige avant que la feuille ne vieillisse et ne se détache de la plante. On peut donc supposer que de la même façon que lors de la colonisation des cotylédons et de la tige, *L. maculans* exprimerait des effecteurs spécifiques au pétiole. Les données transcriptomiques issues du projet Leptolife (Annexe 1) permettront d'approcher cette question et de savoir si un niveau de complexité transcriptionnel additionnel pourrait être lié à cette phase spécifique du cycle, voire à la transition du pétiole à la tige.

Il est à souligner qu'au cours de cette thèse je n'ai étudié la colonisation systémique de la tige de colza par *L. maculans* que sous l'angle des effecteurs. Les autres gènes du champignon, comme par exemple, les gènes impliqués dans le métabolisme du champignon qui apporteraient une meilleure compréhension des besoins nutritionnels du champignon lors de la colonisation de la tige et notamment lors de la transition biotrophie-nécrotrophie n'ont pas été étudiés. Ces travaux de thèse représentent donc une première approche dans la compréhension du cycle infectieux du champignon et nécessiteront par la suite une analyse plus globale du profil transcriptionnel.

2. Les effecteurs tardifs de *L. maculans*

2.1. Caractéristiques des effecteurs tardifs

Les analyses transcriptomiques en condition contrôlées ont mis en évidence l'existence de plusieurs vagues d'effecteurs au cours du cycle infectieux de *L. maculans*, avec des effecteurs spécifiquement exprimés lors de la colonisation des cotylédons et des effecteurs exprimés uniquement lors de la colonisation de la tige. Ces effecteurs précoces et tardifs possèdent des caractéristiques communes en termes de séquence, ce sont des protéines sécrétées de petite taille et enrichies en cystéines, comme c'est très souvent le cas pour les effecteurs (p. 23). La différence majeure observée entre ces deux types d'effecteurs, outre leur cinétique d'expression, est leur localisation génomique avec un enrichissement particulier en gènes codant des effecteurs précoces dans les isochores AT alors que les gènes codant des effecteurs tardifs sont complètement absents de ces régions et localisés dans les isochores GC. Ces résultats posent donc question sur le mode de régulation de l'expression de ces gènes, en lien avec leur localisation génomique.

2.2. Régulation des gènes codant des effecteurs tardifs

Le cycle de vie de *L. maculans* se caractérise notamment par de multiples transitions entre différents modes de vie. Une phase majeure du champignon correspond à la transition d'un mode de vie saprophytique sur résidus de culture à un mode de vie pathogène lors de la colonisation des feuilles. Associé à cette transition, le champignon doit pouvoir exprimer très rapidement et dans un court laps de temps l'ensemble des gènes associés à la colonisation des cotylédons pour permettre ainsi l'infection efficace de la plante après germination sur les feuilles. Chez *L. maculans*, cette expression concertée des effecteurs précoces passe notamment par un contrôle épigénétique. Soyer *et al.* (2014) ont montré qu'en condition *in vitro*, les isochores AT abritant les effecteurs précoces et les éléments transposables sont maintenus sous forme condensée (hétérochromatine) induisant leur répression. La transition de *L. maculans* d'un mode de vie axénique à la pathogénie sur cotylédons induit une modification de l'état chromatinien avec une décondensation de la chromatine permettant ainsi une expression concertée des gènes localisés dans ces isochores et notamment ceux qui codent des effecteurs précoces (Soyer *et al.*, 2014). D'autres études ont démontré le rôle du contrôle épigénétique dans la réponse rapide aux stress environnementaux et dans les transitions de mode de vie. Par exemple, chez le virus Herpès Simplex humain, les modifications épigénétiques déterminent soit la latence de ce virus, c'est-à-dire son état de repos lorsqu'il n'y a pas de production *de novo* du virus, ou

de l'infection lytique, c'est-à-dire son état actif lorsqu'un grand nombre de gènes viraux sont exprimés (Knipe and Cliffe, 2008). Chez *M. oryzae*, au stade axénique l'ADN génomique est fortement méthylé mais une proportion significative de ces méthylations disparaît dans lors de la formation des conidies et des appressoria. Les profils de méthylation de l'ADN dans le génome subissent donc d'importants changements corrélés à la progression du développement pathogène (Jeon *et al.*, 2015).

L'absence de gènes codant des effecteurs tardifs au sein des isochores AT est cohérente avec leur non-induction au stade précoce d'infection du colza. Une expression concertée des gènes localisés dans le même environnement génomique paraît en effet indispensable pour contrer les réponses de la plante lors de la phase déterminante de pénétration dans les tissus et de colonisation initiale. Mes données semblent suggérer qu'une telle réactivité n'est plus nécessaire lorsque le champignon est installé dans les tissus (sauf peut-être lors du passage du pétiole à la tige, ce que je n'ai pas analysé ici) et qu'une régulation plus classique utilisant des facteurs de transcription permettrait une régulation individuelle des effecteurs tardifs, sans nécessiter leur mobilisation rapide et concertée. L'expression de multiples vagues d'effecteurs tout au long de la colonisation de la tige nécessite cependant une régulation sans doute plus spécifique et étalée sur plusieurs mois.

Des résultats très préliminaires issus de la thèse de Colin Clairet (thèse débutée en 2016 dans l'équipe) montrent toutefois que certains des gènes codant des effecteurs tardifs seraient associés à des marques d'hétérochromatine facultative, à l'inverse des gènes codant des effecteurs précoces qui sont associés à des marques d'hétérochromatine constitutive. Ces premiers résultats indiqueraient que le contrôle des effecteurs tardifs pourrait aussi impliquer, au moins en partie, un contrôle épigénétique, différent de celui des effecteurs précoces permettant une certaine concertation d'expression. Une analyse plus poussée de l'expression des gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine et des facteurs de transcription est effectuée par Colin Clairet et devrait permettre une meilleure compréhension de la régulation de l'expression des gènes codant des effecteurs (précoces et tardifs).

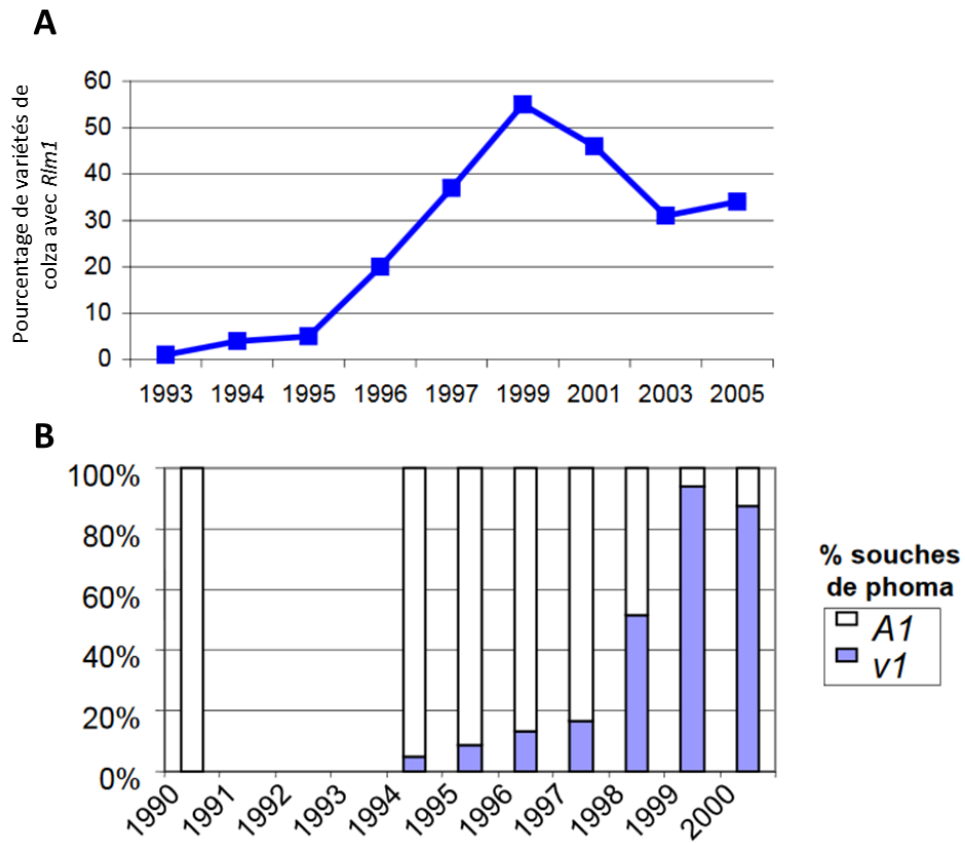


Figure 3: Vitesse de contournement de *Rlm1* en France

(A) Variétés de colza avec *Rlm1* déployées en France. (B) Pourcentage de souches avirulentes (en blanc) et virulentes (en bleu) identifiées dans les populations françaises de *L. maculans*. (Balesdent *et al.*, 2003).

2.3. Les gènes codants des effecteurs tardifs évoluent-ils moins rapidement que les gènes codant des effecteurs précoces?

Comme souligné par Lo Presti *et al.* (2015), les agents pathogènes sont soumis à un conflit évolutif puisque les gènes codant pour des effecteurs nécessitent une évolution rapide et beaucoup de flexibilité, alors que le reste du génome doit évoluer à une vitesse beaucoup plus modérée. En ce sens la localisation des gènes impliqués dans la pathogénie dans des régions plastiques d'un génome à deux vitesses est une réponse adaptée et adoptée par de nombreux agents pathogènes, dont *L. maculans* (p. 35).

Localisés dans des régions très dynamiques, les gènes codant des effecteurs précoces, et notamment les gènes d'avirulence connus, sont susceptibles d'évoluer rapidement à l'aide de nombreux mécanismes favorisés par leur environnement génomique (Rouxel and Balesdent, 2017) (p. 35). Ainsi suite au déploiement de variétés *Rlm1* en France, les souches virulentes correspondantes sont très rapidement apparues pour représenter presque 100 % de la population de *L. maculans* 3 ans après (Figure 3). Une délétion de la région génomique contenant *AvrLm1* a ainsi permis le contournement de *Rlm1* (Gout *et al.*, 2007). Des études expérimentales ont permis par ailleurs de montrer une capacité de contournement très rapide des gènes de résistance *Rlm6* et *Rlm7*, par mutation de type RIP ou délétion des gènes d'avirulence correspondants, *AvrLm6* et *AvrLm4-7*, en trois voire quatre ans seulement (Balesdent *et al.*, 2006; Brun *et al.*, 2010; Daverdin *et al.*, 2012). *AvrLm3* du fait de son caractère probablement indispensable pour le champignon et de sa relation complexe avec *AvrLm4-7*, montre un mécanisme évolutif particulier avec des mutations de substitution mais sans délétion ou inactivation du gène (Plissonneau *et al.*, 2017). Un cas similaire mais moins bien étudié concerne sans doute *AvrLm2* (Ghanbaria *et al.*, 2014).

La localisation des effecteurs tardifs en isochores GC pose question sur leurs mécanismes évolutifs et l'adaptabilité de ces gènes à une nouvelle pression de sélection. Seraient-ils susceptibles d'évoluer moins rapidement que les gènes localisés en isochores AT? Quels seraient les mécanismes de contournement mis en place pour le champignon en cas de déploiement d'une résistance spécifique à l'un de ces effecteurs tardifs, le mécanisme de RIP n'agissant pas sur les isochores GC (Rouxel *et al.*, 2011)? Peu d'information sont disponibles à ce jour sur l'évolution de gènes codant des effecteurs localisés en "core" génome et soumis à pression de sélection chez les autres organismes, puisque les effecteurs soumis à pression de sélection restent généralement associés à des éléments transposables, même lorsqu'ils sont localisés dans le "core" génome (Möller and Stukenbrock, 2017).

Les six gènes *LmSTEE* étudiés dans cette thèse (*LmSTEE1*, *LmSTEE30*, *LmSTEE35*, *LmSTEE98*, *LmSTEE78* et *LmSTEE11*) montrent dans leur ensemble une très bonne conservation parmi les isolats de la population mondiale de *L. maculans* et ne montrent pas de proximité avec des éléments transposables. Cette forte conservation nucléotidique va à l'encontre de l'idée communément admise selon laquelle l'un des critères d'identification des effecteurs réside dans leur polymorphisme nucléotidique non-synonyme. Elle sous-entend que ces gènes ne seraient pas soumis à une pression de sélection. Une analyse au champ a montré que la résistance quantitative présente chez la variété Darmor permet de réduire l'incidence de la nécrose au collet mais sans pour autant impacter la capacité du champignon à réaliser sa reproduction sexuée et donc la production d'ascospores (Lô-Pelzer *et al.*, 2009). La résistance au stade adulte n'exercerait donc qu'une faible pression de sélection sur les populations de *L. maculans*, expliquant ainsi l'absence de polymorphisme des effecteurs tardifs.

Des études chez d'autres pathosystèmes ont montré que la résistance quantitative pouvait être "érodeé" au cours du temps (p. 67). Cependant chez le pathosystème *B. napus* / *L. maculans*, de tels résultats, s'ils sont soupçonnés pour certaines variétés anciennes, n'ont à ce jour pu être documentés de façon certaine à cause de la durée de telles expérimentations, du caractère essentiellement quantitatif de telles érosions, difficiles à appréhender sur le long terme, voire de la dérive génétique des variétés à résistance quantitative. Une expérience au champ a montré que la résistance quantitative associée à la variété Darmor était toujours efficace après 5 ans d'utilisation (Brun *et al.*, 2010). Les effecteurs tardifs associés à cette résistance quantitative seraient donc sans doute moins facilement soumis à des modifications que la plupart des gènes d'avirulence identifiés. Cela reste cependant à confirmer, par exemple par des suivis à long terme de populations soumises à des pressions de sélection de variétés portant des résistances quantitatives (et sans résistance spécifique efficace).

3. Les vagues d'expression géniques chez le colza

Au cours de ma thèse je me suis intéressée spécifiquement aux gènes du champignon exprimés lors de la colonisation de la tige et ai pu observer l'existence de plusieurs vagues d'expression d'effecteurs à ce stade, par contre les gènes exprimés par la plante hôte pendant cette période sont en cours d'analyse (INRA IGEPP, R. Delourme) et n'ont pu être exploités dans le cadre de ma thèse.

Lors de l'infection du blé par *Z. tritici*, des études d'expression des gènes de la plante hôte en réponse à l'infection ont été réalisées (Rudd *et al.*, 2015). Aux stades précoces d'infection les gènes associés au système de défense de la plante étaient sous-exprimés, probablement lié à l'expression d'effecteurs par le champignon interférant et inhibant les réponses de la plante. Au moment de la transition de *Z. tritici* vers la nécrotrophie, le transcriptome de la plante se modifie aussi avec une surexpression de gènes associés à la mort cellulaire programmées, de gènes codant pour des protéases, des peroxydases générant des ROS, ou des facteurs de transcription de défense de type WRKY. En outre, un grand nombre des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'acide jasmonique et de l'éthylène, des hormones connues pour leur rôle dans la signalisation de défense, en particulier vis-à-vis des agents pathogènes nécrotrophes sont considérablement surexprimés lors du passage à la nécrotrophie. Une modification du transcriptome de la plante entre le stade infectieux biotrophe et nécrotrophe a aussi été observée lors de la colonisation du pois par les oomycètes *Aphanomyces euteiches* and *Phytophthora pisi* avec notamment l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'éthylène dès le début de l'infection et l'expression des gènes associés à la biosynthèse de l'acide jasmonique seulement en fin d'infection (Hosseini *et al.*, 2015). Ces études semblent indiquer que l'agent pathogène est capable de manipuler le transcriptome de la plante hôte afin qu'il puisse réaliser l'ensemble de son cycle infectieux avec la suppression du système de défense lors de la phase biotrophe et du début de la colonisation et l'induction de la mort cellulaire lors de la phase nécrotrophe et de la reproduction du champignon. Chez *L. maculans* seules les réactions de la plante lors de la colonisation des cotylédons ont été analysées (Haddadi *et al.*, 2016). Les auteurs ont aussi identifié des gènes associés aux voies de biosynthèse de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique aux stades biotrophe et nécrotrophe de la colonisation des cotylédons, respectivement. La transition du champignon vers la nécrotropie est également accompagnée par l'expression d'un gène NPL (Nep1-Like) impliqué dans la nécrose. Des profils d'expression identiques sont donc envisageables lors de la colonisation de la tige de colza par *L. maculans*.

Si le champignon est capable de manipuler l'expression des gènes de la plante, la réciproque est également vraie: nos travaux montrent que la variété de colza influence le profil d'expression des

gènes de *L. maculans*. Chez Darmor-*bzh*, on observe une importante modification transcriptionnelle des gènes fongiques entre le mois de mai et juillet, marquant sans doute la transition entre un stade de vie biotrophe et un stade de vie nécrotrophe, alors que chez Bristol cette modification transcriptionnelle est plus précoce au mois de mars/avril. Les effecteurs étudiés sont aussi exprimés plus précocement et plus intensément dans la variété sans résistance adulte comparé à la variété avec résistance adulte. La résistance quantitative observée au stade adulte semble donc induire une baisse de l'expression des effecteurs et un fort ralentissement dans le cycle infectieux du champignon à activité transcriptomique similaire du champignon dans les tissus.

En conséquence de quoi, on peut s'interroger sur la cinétique d'expression des gènes végétaux et leur intensité entre Darmor-*bzh* et Bristol. Lors de l'infection de la tomate par *P. capsici*, des données transcriptomiques suggèrent que la plante hôte participe activement à la transition vers la nécrotrophie de l'agent pathogène avec notamment l'expression de gènes candidats associés à la signalisation immunitaire (Jupe *et al.*, 2013). Est-ce que dans le cas du pathosystème colza / *L. maculans* les gènes de la plante induisant la mort cellulaire et associés à la transition vers la nécrotrophie du champignon ne seraient pas ou moins exprimés, et ce plus tardivement, dans la variété avec résistance adulte au cours de la saison culturale? La comparaison des cinétiques d'expression des gènes de la plante en réponse à l'infection par *L. maculans*, entre une variété à haut niveau de résistance adulte et une variété sensible, nous permettrait d'identifier les gènes végétaux potentiellement impliqués dans le retard de développement du champignon dans la tige et la diminution de l'expression des effecteurs. De tels gènes végétaux, si l'on peut les identifier, constitueraient une ressource d'importance pour mieux comprendre les composantes de la résistance quantitative et pour lutter plus efficacement contre la maladie.

4. Le développement d'une nouvelle approche de criblage

Les analyses transcriptomiques réalisées au cours de cette thèse nous ont permis d'identifier des effecteurs de *L. maculans* spécifiquement exprimés lors de la colonisation systémique du colza. De la même façon qu'au stade cotylédonnaire où le champignon exprime des effecteurs qui peuvent être reconnus par la plante et induire une interaction incompatible, nous avons supposé que les effecteurs tardifs pouvaient également être reconnus par des gènes de résistance de la plante et induire des réactions de défense, expliquant ainsi en partie la résistance au stade adulte. L'identification de tels gènes de résistance permettrait à la fois d'enrichir le panel de gènes de résistance disponible pour lutter contre *L. maculans* mais ces résistances seraient aussi potentiellement plus durables puisque les effecteurs tardifs correspondants subiraient *a priori* une évolution moins rapide que les effecteurs précoces. Pour identifier de telles relations de type gène-pour-gène entre effecteur tardif et gène de la plante, nous avons mis au point une nouvelle stratégie impliquant la création de souches fongiques mutantes exprimant, au stade cotylédonnaire, des effecteurs tardifs choisis. Pour cela, j'ai placé les gènes tardifs testés sous le contrôle du promoteur d'un gène précoce, celui d'*AvrLm4-7*, pour modifier leurs profils d'expression. Cette stratégie, encore jamais testée chez *L. maculans*, s'est révélée efficace et nous avons utilisé les souches mutantes obtenues pour cribler un grand nombre de variétés de colza par test cotylédonnaire.

Avec cette approche, nous avons pu mettre en évidence du polymorphisme de réponse en fonction des variétés testées et des effecteurs tardifs utilisés. Nous avons identifié des variétés avec une sensibilité générale aux effecteurs tardifs testés et inversement des variétés avec une résistance générale aux effecteurs, mais également des variétés avec une résistance spécifique vis-à-vis de l'un des effecteurs. La majorité des réponses différentielles entre souches mutantes et souche sauvage sont observées en début d'infection. Les gènes sous-jacents à ces résistances spécifiques mais partielles permettraient de ralentir la colonisation de la plante par le champignon. Il est toutefois nécessaire de répéter et analyser plus en détail les phénotypes des variétés identifiées comme présentant des résistances partielles, avec notamment une mesure de la taille des macules foliaires ou la quantification du champignon dans les cotylédons. Au cours de ce criblage, j'ai pu néanmoins détecter deux variétés déclenchant spécifiquement des résistances de type HR vis-à-vis de deux effecteurs tardifs. L'une de ces interactions a été validée génétiquement mettant en évidence une interaction gène-pour-gène entre un cultivar de colza et un effecteur tardifs de *L. maculans*. Cette approche permet effectivement de cribler un grand nombre de variétés en minimum de temps et d'espace, pour identifier de nouvelles sources de résistance.

Lors de la mise au point de cette approche, j'ai choisi six effecteurs tardifs parmi les gènes surexprimés dans la tige par rapport au stade cotylédonnaire, en condition contrôlées. Par la suite j'ai pu détailler le profil d'expression des effecteurs lors de la colonisation de la tige au champ et démontrer l'existence de trois vagues d'expression au cours de la colonisation de la tige. Parmi les six effecteurs choisis, quatre sont surexprimés uniquement au printemps, avant l'établissement de la nécrose, (LmSTEE1, LmSTEE30, LmSTEE35, LmSTEE11), et deux en fin de saison culturale (LmSTEE78 et LmSTEE98). De plus, ces derniers ne suppriment pas ou peu la mort cellulaire en conditions contrôlées (Figure 1). Les souches mutantes sur-exprimant LmSTEE78 et LmSTEE98 au stade cotylédonnaire sont celles qui induisent des réponses de sensibilité sur un grand nombre de variétés communes. Ces effecteurs étant exprimés au même moment, on peut supposer qu'ils auraient des modes d'action communs ou des cibles végétales communes pour permettre le développement de la nécrose. Les variétés identifiées comme spécifiquement sensibles à ces effecteurs pourraient avoir des QTL communs de sensibilité entre elles, et donc des marqueurs moléculaires communs qui seraient à identifier.

La mise au point de l'approche de criblage réalisée dans cette thèse a mis en évidence le rôle central du choix des effecteurs tardifs utilisés. Pour identifier des résistances spécifiques qui permettraient de limiter l'apparition de la nécrose au collet, il faudrait maintenant se focaliser sur des effecteurs surexprimés pendant l'hiver et au début du printemps quand la nécrose du collet ne s'est pas encore développée, voire des effecteurs surexprimés spécifiquement lors de la colonisation du pétiole, s'il en existe. Par ailleurs, le panel de cultivars de colza testés au cours de cette thèse reste peu diversifié, avec essentiellement des variétés européennes d'hiver, utilisées pour la production d'huile. Le criblage d'une plus grande diversité de géotypes de colza permettra sans doute d'identifier de nouvelles sources de résistances

5. Comment utiliser la résistance *RlmSTEE98* identifiée chez Yudal?

Avec cette approche nous avons pu identifier deux variétés, Dariot et Yudal, présentant une résistance spécifique totale et stable dans le temps à deux effecteurs tardifs, *LmSTEE1* et *LmSTEE98*, respectivement. La résistance identifiée dans Dariot n'a pas été étudiée plus en détail dans le cadre de cette thèse, faute du matériel végétal adapté pour déterminer le déterminisme génétique de la résistance et de sa moins grande spécificité de réponse. Au contraire, l'exploitation d'un croisement largement étudié à l'INRA (IGEPP) a permis d'établir le déterminisme génétique de la résistance dans Yudal et de cartographier dans le génome du colza le gène correspondant, *RlmSTEE98*.

L'identification d'une résistance chez la variété Yudal est surprenante puisque cette variété est sensible à *L. maculans* et qu'aucun QTL de résistance n'a, jusqu'ici, pu être identifié dans la région associée à *RlmSTEE98*, malgré les nombreuses études d'identification de QTL utilisant cette variété (Huang *et al.*, 2014; Jestin *et al.*, 2011; Pilet *et al.*, 1998; Pilet *et al.*, 2001). Une des hypothèses envisagée (Chapitre 3) pour expliquer l'existence d'un gène de résistance dans cette variété sensible serait une expression spécifique de *RlmSTEE98* au stade cotylédonnaire et non dans la tige. Il n'y aurait donc pas de reconnaissance gène-pour-gène dans la tige au moment où *LmSTEE98* est naturellement exprimé, et donc aucune réaction de défense. J'ai par ailleurs réalisé, en conditions contrôlés, des inoculations sur tige de la variété Yudal avec des souches mutantes "silencées" pour *LmSTEE98* et je n'ai observé aucune différence en termes de développement de nécrose de la tige entre souches sauvages et souches avec faible et haut niveau de "silencing" (données non présentées). Le niveau d'expression de *LmSTEE98* dans la tige n'a donc aucun impact sur le développement de la nécrose lors d'infections en conditions contrôlées, et il n'y aurait donc pas de réaction de défense, même partielle face à cet effecteur chez Yudal dans la tige. Ces résultats iraient dans le sens de l'hypothèse d'un profil différentiel de *RlmSTEE98* en cotylédons et en tige.

Si cette hypothèse se confirme, l'utilisation de ce gène de résistance dans le cadre d'amélioration végétale semble difficilement applicable, hormis par le biais de colzas génétiquement modifiés exprimant constitutivement *RlmSTEE98*. Une approche que l'on pourrait envisager, après identification du gène, serait la recherche d'un polymorphisme de *RlmSTEE98* dans différentes variétés, et qui exprimeraient *RlmSTEE98* dans la tige.

La compréhension et l'utilisation de cette résistance implique donc tout d'abord l'identification du gène de résistance *RlmSTEE98* et de son polymorphisme de séquence et/ou d'expression entre Darmor-*bzh* et Yudal.

Conclusion

Au début de cette thèse, nous émettions seulement l'hypothèse de l'existence d'effecteurs tardifs lors de la colonisation systémique du colza par *L. maculans*. Avec mes travaux de recherche j'ai pu démontrer l'existence de ces effecteurs qui sont différents des effecteurs précoces et qui ne partagent pas la même la localisation génomique. L'analyse de certains de ces effecteurs a aussi permis de mieux comprendre le processus infectieux lors de la colonisation de la tige de colza. J'ai également mené une approche exploratoire, considérée comme risquée, de manipulation d'effecteurs tardifs pour cribler des variétés de colza afin de mieux comprendre la résistance quantitative. Cette approche nous a non seulement permis de générer un outil utilisable en routine et d'identifier une nouvelle interaction de type gène-pour-gène mais ouvre la voie à de nombreuses pistes de recherche telles que:

- (i) Le clonage et l'analyse de polymorphisme de *RlmSTEE98*.
- (ii) L'utilisation d'une nouvelle approche de criblage pour identifier de nouvelles sources de résistances à *L. maculans*. Une exploitation des données transcriptomiques du projet Leptolife permettra de mieux cibler les effecteurs choisis et l'utilisation d'une banque de génotypes de colza plus diversifiée permettra sans doute d'identifier d'autres résistances.
- (iii) L'analyse des effets du génotype de colza sur les vagues d'expression des effecteurs.

Annexes

Annexe 1 : Test cotylédonnaire sur colza en conditions contrôlées

A



B

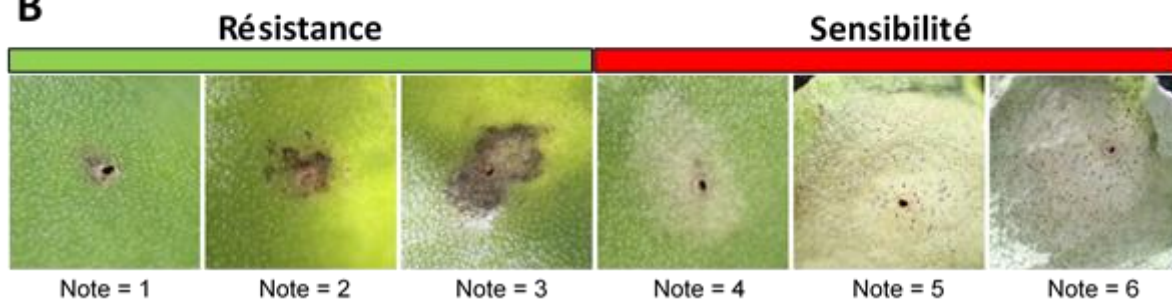


Figure 1: Test cotylédonnaire sur colza

(A) Les tests cotylédonnaires sont réalisés comme décrit par Balesdent *et al.* (2001). Les cotylédons de plantules de 11 jours sont blessés par une aiguille et inoculés avec 10 μ l d'inoculum (10⁷ pycnidiospores/ml) de *L. maculans*. Jusqu'à quatre souches différentes peuvent être inoculées sur chaque plante. Après inoculation les plantes restent à l'obscurité pendant 2 jours et à température ambiante, puis elles sont transférées en chambre climatique avec une photopériode de 12 h à 24 °C jour et 16 °C nuit, et 90% d'humidité. (B) Echelle de notation des symptômes. Les symptômes sont notés entre 11 et 16 jours après inoculation. Les notes 1 à 3 correspondent à un phénotype de résistance de la plante avec le développement d'une réaction hypersensible (HR) plus ou moins importante au point d'inoculation. Les notes 4 à 6 correspondent à un phénotype de sensibilité de la plante sans induction de HR et dans le cas des notes 5 et 6, formation de pycnides.

Annexe 2 : Le projet de transcriptomique Leptolife

Le projet Leptolife est un projet de métatranscriptomique du pathosystème colza – *L. maculans*, débuté en 2015, financé par France Génomique et en collaboration entre l'équipe, le GENOSCOPE d'Evry et l'INRA de Rennes. Ce projet vise à comprendre les interactions multipartenaires et les traits de vie intrinsèque de ce pathosystème par l'étude de 420 échantillons de transcriptomique (Figure 1).

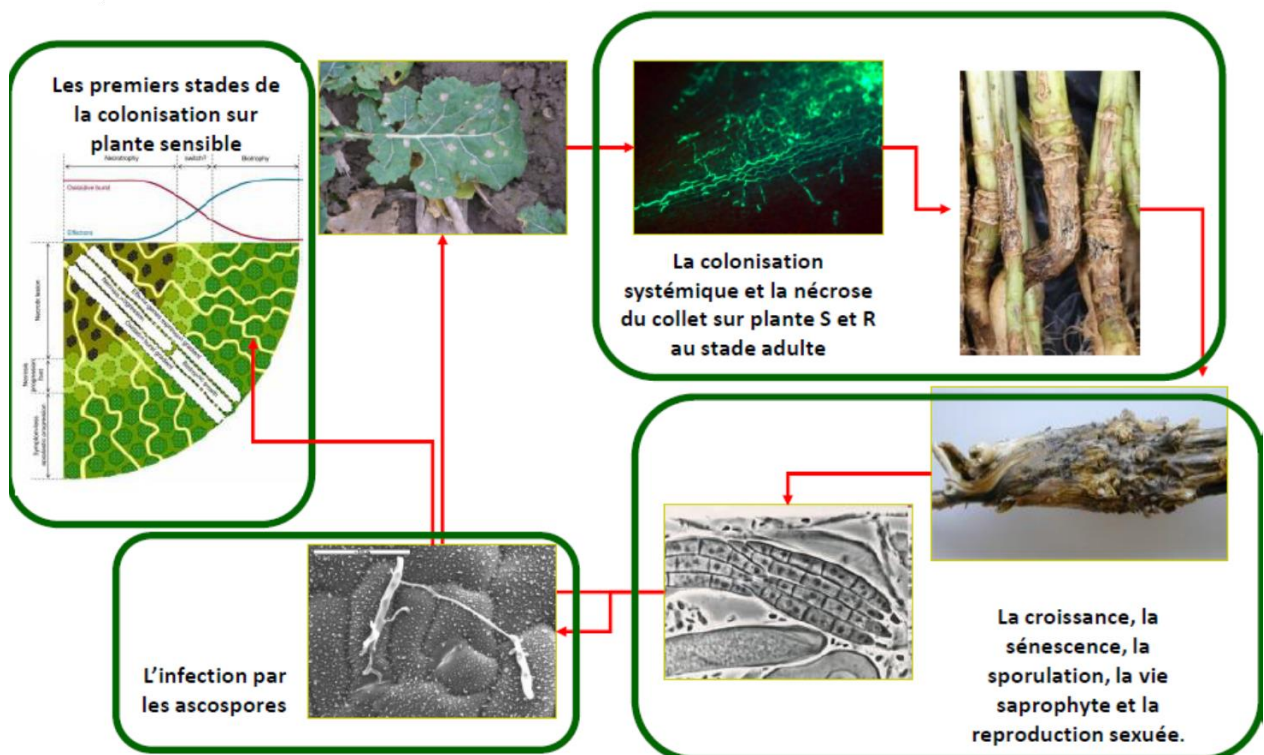


Figure 1 : Le projet de transcriptomique Leptolife

420 échantillons des différentes phases de vie du champignon ont été produits (en condition contrôlée et au champ) et séquencés. Ils comprennent notamment l'étude au stade cotylédonnaire, au niveau des pétioles, dans la tige, dans les résidus de culture et *in vitro*. Deux variétés de colza Darmor-bzh (avec résistance quantitative) et Bristol (sans résistance quantitative) ont été utilisées ainsi que deux souches de *L. maculans* (JN2 et NzT4) avec différents niveaux d'agressivité, et une souche de *L. biglobosa*.

Annexe 3: Bilan d'activités

Articles scientifiques

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.

Meyer, M., Bourras, S., Gervais, J., Labadie, K., Cruaud, C., Balesdent, M.-H. and Rouxel, T. (2017) **Impact of biotic and abiotic factors on the expression of fungal effector-encoding genes in axenic growth conditions.** Fungal Genet. Biol.

Présentations orales

Hunting down late effectors produced by *Leptosphaeria maculans* during stem colonization of oilseed rape.

Gervais J., Plissonneau C., Ollivier B., Rouxel T., Fudal I., Balesdent M.H.

PhD Days, 4-6 novembre 2015, Orsay (France)

Identification et analyse fonctionnelle des effecteurs produits par *Leptosphaeria maculans* lors de la colonisation systémique du colza.

Gervais J., Ollivier B., Rouxel T., Fudal I., Balesdent M.H

Séminaire d'unité, mars 2016, BIOGER

Different waves of effector genes with contrasted genomic location are expressed by *Leptosphaeria maculans* during cotyledon and stem colonization of oilseed rape

Gervais J., Plissonneau C., Linglin J., Meyer M., Labadie K., Cruaud C., Fudal I., Rouxel T. et Balesdent M.H.

IS-MPMI XVII Congres, 17-21 juillet 2016, Portland (Etats-Unis)

Different waves of effector genes with contrasted genomic location are expressed by *Leptosphaeria maculans* during cotyledon and stem colonization of oilseed rape

Gervais J., Plissonneau C., Linglin J., Meyer M., Labadie K., Cruaud C., Fudal I., Rouxel T. et Balesdent M.H.

M2 mycologie, 28 septembre 2016, BIOGER

Les effecteurs tardifs de *Leptosphaeria maculans*: impliqués dans la colonisation systémique du colza.

Gervais J., Plissonneau C., Linglin J., Meyer M., Labadie K., Cruaud C., Fudal I., Rouxel T. et Balesdent M.H.

Séminaire d'unité, 3 mars 2017, BIOGER

***Leptosphaeria maculans* effectors involved in the oilseed rape systemic colonization.**

Gervais J., Plissonneau C., Linglin J., Meyer M., Labadie K., Cruaud C., Fudal I., Rouxel T. et Balesdent M.H.

28th Fungal Genetics Conference, Dothideomycete workshop, 14 mars 2017, Asilomar (Etats-Unis)

Présentation de posters

Identification and functional analysis of late effectors involved in systemic colonization of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*.

Gervais J., Rouxel T., Fudal I., Balesdent M.H.

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

***Leptosphaeria maculans* effectors involved in the oilseed rape systemic colonization.**

Gervais J., Ollivier B., Rouxel T., Fudal I., Balesdent M.H.

14th International rapeseed congress, 6-8 juillet 2015, Saskatoon (Canada)

***Leptosphaeria maculans* effectors involved in the oilseed rape systemic colonization.**

Gervais J., Ollivier B., Rouxel T., Fudal I., Balesdent M.H.

Carrefours de la sélection du colza, 27-28 janvier 2016, Saint-Malo (France)

***Leptosphaeria maculans* effectors involved in the oilseed rape systemic colonization.**

Gervais J., Ollivier B., Rouxel T., Fudal I., Balesdent M.H.

13th European Conference on Fungal Genetics, 4-6 avril 2016, Paris (France)

***Leptosphaeria maculans* effectors involved in the oilseed rape systemic colonization.**

Gervais J., Ollivier B., Rouxel T., Fudal I., Balesdent M.H.

28th Fungal Genetics Conference, 14-19 mars 2017, Asilomar (Etats-Unis)

➔ Prix du meilleur poster de la session "Agents pathogènes et interactions mutualistes"

Different waves of effector genes with contrasted genomic location are expressed by *Leptosphaeria maculans* during cotyledon and stem colonization of oilseed rape

Gervais J., Plissonneau C., Linglin J., Meyer M., Labadie K., Cruaud C., Fudal I., Rouxel T. et Balesdent M.H.

IS-MPMI XVII Congres, 17-21 juillet 2016, Portland (Etats-Unis)

Présentation de posters (co-auteur)

"LeptoLife" : un projet de transcriptomique et de métagénomique pour explorer les phases "cachées" du cycle infectieux de *Leptosphaeria maculans* (Phoma).

Balesdent M.H., Fudal I., Gervais J., Rouxel T., Laval V., Delourme R., Chaloub B., Cruaud C., Gravot A., Manzanares-Dauleux M.

Carrefours de la sélection du colza, 22-23 janvier 2014, Vannes (France)

The StructuralLEP 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)

Autres productions

Interview

Gervais J. (2017) **Fungal Genetics Conference Q&A – identifying new *L. maculans* effectors, a fungal pathogen of oilseed rape.** Fungal Biology and Biotechnology

Rapports de conférence

Barff T., Cavdar M., Gervais J., Petit Y. (Soumis) **Report of the IS-MPMI XVIII congress (Portland, USA – 17-21 July 2016)** IS-MPMI

Gervais J. et Petit Y. (2016) **Report of the IS-MPMI XVIII congress (Portland, USA – 17-21 July 2016)**
GCIRC (Groupe Consultatif International de Recherche sur le Colza)

Gervais J. et Petit Y. (2017) **Rapport de la conférence Fungal Genetics à Pacific Grove (Californie), le 14-19 mars 2017.** Académie d'Agriculture de France

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

Références bibliographiques

- Alabouvette, C., Brunin, B. and Louvet, J.** (1974) Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. IV. Pouvoir infectieux des pycnidiospores et sensibilité variétale. *Ann. Phytopathol.*, 265–275.
- Amorim-Vaz, S., Tran, V.D.T., Pradervand, S., Pagni, M., Coste, A.T. and Sanglard, D.** (2015) RNA enrichment method for quantitative transcriptional analysis of pathogens *in vivo* applied to the fungus *Candida albicans*. *mBio* **6**, e00942-15.
- Andrивon, D., Pilet, F., Montarry, J., Hafidi, M., Corbière, R., Achbani, E.H., Pellé, R. and Ellissèche, D.** (2007) Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* **97**, 338–343.
- Ansan-Melayah, D., Balesdent, M.H., Delourme, R., Pilet, M.L., Tanguy, X., Renard, M. and Rouxel, T.** (1998) Genes for race-specific resistance against blackleg disease in *Brassica napus* L. *Plant Breed.* **117**, 373–378.
- Ansan-Melayah, D., Balesdent, M.H., Buée, M. and Rouxel, T.** (1995) Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **85**, 1525–1529.
- Arru, L., Francia, E. and Pecchioni, N.** (2003) Isolate-specific QTLs of resistance to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in the “Steptoe” x “Morex” spring barley cross. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **106**, 668–675.
- Aubertot, J.-N., Sohbi, Y., Brun, H., Penaud, A. and Nutter, F.** (2004) Phomadidacte: A computer-aided training program for the severity assessment of phoma stem canker of oilseed rape. *Integr. Control Oilseed Crops*, 247–254.
- Bailey, B.A.** (1995) Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology* **85**, 1250–1255.
- Balesdent, M.H., Attard, A., Ansan-Melayah, D., Delourme, R., Renard, M. and Rouxel, T.** (2001) Genetic control and host range of avirulence toward *Brassica napus* cultivars Quinta and Jet Neuf in *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **91**, 70–76.
- 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., Barbetti, M.J., Li, H., Sivasithamparam, K., Gout, L. and Rouxel, T.** (2005) Analysis of *Leptosphaeria maculans* race structure in a worldwide collection of isolates. *Phytopathology* **95**, 1061–1071.
- Balesdent, M.-H., Fudal, I., Ollivier, B., Bally, P., Grandaubert, J., Eber, F., Chèvre, A.-M., Leflon, M. 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., Louvard, K., Pinochet, X. and Rouxel, T.** (2006) A large-scale survey of races of *Leptosphaeria maculans* occurring on oilseed rape in France. In sustainable strategies for managing *Brassica napus* (oilseed rape) resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker). (Fitt, B.D.L., Evans, N., Howlett, B.J., and Cooke, B.M., eds), pp. 53–65. Springer Netherlands.
- Battin, J.** (2010) Le feu Saint-Antoine ou ergotisme gangreneux et son iconographie médiévale. In Histoire des sciences médicales, pp. 373–382.
- Berruyer, R., Poussier, S., Kankanala, P., Mosquera, G. and Valent, B.** (2006) Quantitative and qualitative influence of inoculation methods on in planta growth of rice blast fungus. *Phytopathology* **96**, 346–355.
- Bigeard, J., Colcombet, J. and Hirt, H.** (2015) Signaling mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Mol. Plant* **8**, 521–539.
- 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.
- Bonman, J.M.** (1989) Race-specific partial resistance to blast in temperate Japonica rice cultivars. *Plant Dis.* **73**, 496.
- Bonneuil, C. and Thomas, F.** (2012) Semences, une histoire politique: amélioration des plantes, agriculture et alimentation en France depuis la Seconde Guerre mondiale, ECLM.
- Boscari, A., Giudice, J. del, Ferrarini, A., Venturini, L., Zaffini, A.-L., Delledonne, M. and Puppo, A.** (2013) Expression dynamics of the *Medicago truncatula* transcriptome during the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*: which role for nitric oxide? *Plant Physiol.* **161**, 425–439.

- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Win, J., et al.** (2011) *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20832–20837.
- Brasier, C.M. and Kirk, S.A.** (2010) Rapid emergence of hybrids between the two subspecies of *Ophiostoma novo-ulmi* with a high level of pathogenic fitness. *Plant Pathol.* **59**, 186–199.
- Broman, K.W., Wu, H., Sen, S. and Churchill, G.A.** (2003) R/qt1: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **19**, 889–890.
- Brun, H., Chèvre, A.-M., Fitt, B.D.L., et al.** (2010) Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol.* **185**, 285–299.
- Burg, H.A. van den, Harrison, S.J., Joosten, M.H.A.J., Vervoort, J. and Wit, P.J.G.M. de** (2006) *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **19**, 1420–1430.
- Caillaud, M.-C., Asai, S., Rallapalli, G., Piquerez, S., Fabro, G. and Jones, J.D.G.** (2013) A downy mildew effector attenuates salicylic acid-triggered immunity in *Arabidopsis* by interacting with the host mediator complex. *PLOS Biol.* **11**, e1001732.
- Cantu, D., Segovia, V., MacLean, D., Bayles, R., Chen, X., Kamoun, S., Dubcovsky, J., Saunders, D.G. and Uauy, C.** (2013) Genome analyses of the wheat yellow (stripe) rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* reveal polymorphic and haustorial expressed secreted proteins as candidate effectors. *BMC Genomics* **14**, 270.
- Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., et al.** (2014) Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* **345**, 950–953.
- Chapelle, E., Alunni, B., Malfatti, P., Solier, L., Pédrón, J., Kraepiel, Y. and Van Gijsegem, F.** (2015) A straightforward and reliable method for bacterial in planta transcriptomics: application to the *Dickeya dadantii/Arabidopsis thaliana* pathosystem. *Plant J.* **82**, 352–362.
- Chen, L.-Q., Hou, B.-H., Lalonde, S., et al.** (2010) Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* **468**, 527–532.

- Clarke, W.E., Higgins, E.E., Plieske, J., et al.** (2016) A high-density SNP genotyping array for *Brassica napus* and its ancestral diploid species based on optimised selection of single-locus markers in the allotetraploid genome. *Theor. Appl. Genet.* **129**, 1887–1899.
- Corwin, J.A. and Kliebenstein, D.J.** (2017) Quantitative resistance: more than just perception of a pathogen. *Plant Cell* **29**, 655–665.
- Croll, D., Zala, M. and McDonald, B.A.** (2013) Breakage-fusion-bridge cycles and large insertions contribute to the rapid evolution of accessory chromosomes in a fungal pathogen. *PLoS Genet.* **9**.
- Cui, H., Tsuda, K. and Parker, J.E.** (2015) Effector-Triggered Immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 487–511.
- Dalmis, B., Schumacher, J., Moraga, J., LE Pêcheur, P., Tudzynski, B., Collado, I.G. and Viaud, M.** (2011) The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 564–579.
- 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.
- Delourme, R., Piel, N., Horvais, R., Pouilly, N., Domin, C., Vallée, P., Falentin, C., Manzanares-Dauleux, M.J. and Renard, M.** (2008) Molecular and phenotypic characterization of near isogenic lines at QTL for quantitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **117**, 1055–1067.
- Delourme, R., Chèvre, A.M., Brun, H., Rouxel, T., Balesdent, M.H., Dias, J.S., Salisbury, P., Renard, M. and Rimmer, S.R.** (2006) Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Eur. J. Plant Pathol.* **114**, 41–52.
- Dilmaghani, A., Gladioux, P., Gout, L., Giraud, T., Brunner, P.C., Stachowiak, A., Balesdent, M.-H. and Rouxel, T.** (2012) Migration patterns and changes in population biology associated with the worldwide spread of the oilseed rape pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Ecol.* **21**, 2519–2533.

- Dilmaghani, A., Gout, L., Moreno-Rico, O., Dias, J.S., Coudard, L., Castillo-Torres, N., Balesdent, M.-H. and Rouxel, T.** (2013) Clonal populations of *Leptosphaeria maculans* contaminating cabbage in Mexico. *Plant Pathol.* **62**, 520–532.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., 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.
- Dong, S., Raffaele, S. and Kamoun, S.** (2015) The two-speed genomes of filamentous pathogens: waltz with plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **35**, 57–65.
- Dong, Y., Li, Y., Zhao, M., et al.** (2015) Global genome and transcriptome analyses of *Magnaporthe oryzae* epidemic isolate 98-06 uncover novel effectors and pathogenicity-related genes, revealing gene gain and lose dynamics in genome evolution. *PLoS Pathog* **11**, e1004801.
- Duplessis, S., Hacquard, S., Delaruelle, C., Tisserant, E., Frey, P., Martin, F. and Kohler, A.** (2011) *Melampsora larici-populina* transcript profiling during germination and time course infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **24**, 808–818.
- Duplessis, S., Morin, E., Grigoriev, I.V., De Mita, S., Halkett, F. and Frey, P.** (2016) Deciphering host specificity in poplar rust fungi through life-cycle transcriptomics and comparative genomics. *ISMPMI Congr. Abstr.*
- Eber, F., Lourgant, K., Brun, H., Lodé, M., Huteau, V., Coriton, O., Alix, K., Balesdent, M.H. and Chèvre, A.-M.** (2011) Analysis of *Brassica nigra* chromosomes allows identification of a new effective *Leptosphaeria maculans* resistance gene introgressed in *Brassica napus*. *13th Int. Rapeseed Congr. Prague 5 – 9 June 2011*.
- Elliott, C.E., Gardiner, D.M., Thomas, G., Cozijnsen, A., VAN DE Wouw, A. and Howlett, B.J.** (2007) Production of the toxin sirodesmin PL by *Leptosphaeria maculans* during infection of *Brassica napus*. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 791–802.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., Heijne, G. von and Nielsen, H.** (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* **2**, 953–971.

- Fahlgren, A., Westermark, L., Akopyan, K. and Fällman, M.** (2009) Cell type-specific effects of *Yersinia pseudotuberculosis* virulence effectors. *Cell. Microbiol.* **11**, 1750–1767.
- Faino, L., Seidl, M.F., Shi-Kunne, X., Pauper, M., Berg, G.C.M. van den, Wittenberg, A.H.J. and Thomma, B.P.H.J.** (2016) Transposons passively and actively contribute to evolution of the two-speed genome of a fungal pathogen. *Genome Res.* **26**, 1091–1100.
- Faris, J.D., Liu, Z. and Xu, S.S.** (2013) Genetics of tan spot resistance in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **126**, 2197–2217.
- 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., Hu, B.C., Li, Z.Q., Liu, S.Y., Lange, R.M., Kharbanda, P.D., Butterworth, M.H. and White, R.P.** (2008) Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China; costs and benefits. *Plant Pathol.* **57**, 652–664.
- 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.
- Flor, H.H.** (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**, 275–296.
- Foisset, N., Delourme, R., Barret, P., Hubert, N., Landry, B.S. and Renard, M.** (1996) Molecular-mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on a doubled-haploid progeny. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **93**, 1017–1025.
- Fopa Fomeju, B., Falentin, C., Lassalle, G., Manzanares-Dauleux, M.J. and Delourme, R.** (2015) Comparative genomic analysis of duplicated homoeologous regions involved in the resistance of *Brassica napus* to stem canker. *Front. Plant Sci.* **6**.
- 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.
- Fudal, I., Ross, S., Gout, L., et al.** (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.

- Gan, P., Ikeda, K., Irieda, H., Narusaka, M., O’Connell, R.J., Narusaka, Y., Takano, Y., Kubo, Y. and Shirasu, K.** (2013) Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. *New Phytol.* **197**, 1236–1249.
- Garnica, D.P., Upadhyaya, N.M., Dodds, P.N. and Rathjen, J.P.** (2013) Strategies for wheat stripe rust pathogenicity identified by transcriptome sequencing. *PLoS ONE* **8**, e67150.
- 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.** (2014) Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm2*, using an intraspecific comparative genomics approach. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 699–709.
- Ghanbarnia, K., Lydiate, D.J., Rimmer, S.R., Li, G., Kutcher, H.R., Larkan, N.J., McVetty, P.B.E. and Fernando, W.G.D.** (2012) Genetic mapping of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene corresponding to the *LepR1* resistance gene of *Brassica napus*. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **124**, 505–513.
- Giraldo, M.C. and Valent, B.** (2013) Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 800–814.
- 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.
- Greenberg, J.T. and Yao, N.** (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* **6**, 201–211.

- Gururani, M.A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C.P., Nookaraju, A., Pandey, S.K. and Park, S.W.** (2012) Plant disease resistance genes: current status and future directions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **78**, 51–65.
- Haas, B.J., Kamoun, S., Zody, M.C., et al.** (2009) Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**, 393–398.
- Hacquard, S., Kracher, B., Maekawa, T., Vernaldi, S., Schulze-Lefert, P. and Themaat, E.V.L. van** (2013) Mosaic genome structure of the barley powdery mildew pathogen and conservation of transcriptional programs in divergent hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E2219–E2228.
- Hacquard, S., Joly, D.L., Lin, Y.-C., et al.** (2012) A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Mol. Plant. Microbe Interact.* **25**, 279–293.
- Haddadi, P., Ma, L., Wang, H. and Borhan, M.H.** (2015) Genome-wide transcriptome analyses provides insights into the lifestyle transition and effector repertoire of *Leptosphaeria maculans* during colonization of *B. napus* seedlings. *Mol. Plant Pathol.*
- Haegeman, A., Bauters, L., Kyndt, T., Rahman, M.M. and Gheysen, G.** (2013) Identification of candidate effector genes in the transcriptome of the rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *Mol. Plant Pathol.* **14**, 379–390.
- Hammond, K.E., Lewis, B.G. and Musa, T.M.** (1985) A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathol.* **34**, 557–565.
- Hebinger, H.** (2013) *Le Colza*, Editions France Agricole.
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M. and Doeblemann, G.** (2012) The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathog.* **8**, e1002684.
- Henderson, M.P.** (1918) The black-leg disease of cabbage caused by *Phoma lingam* (Tode) Desmaz. *Phytopathology* **8**, 379–431.
- Hoon, M.J.L. de, Imoto, S., Nolan, J. and Miyano, S.** (2004) Open source clustering software. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **20**, 1453–1454.

- Hosseini, S., Elfstrand, M., Heyman, F., Funck Jensen, D. and Karlsson, M.** (2015) Deciphering common and specific transcriptional immune responses in pea towards the oomycete pathogens *Aphanomyces euteiches* and *Phytophthora pisi*. *BMC Genomics* **16**, 627.
- Huang, Y.-J., Evans, N., Li, Z.-Q., Eckert, M., Chèvre, A.-M., Renard, M. and Fitt, B.D.L.** (2006) Temperature and leaf wetness duration affect phenotypic expression of *Rlm6*-mediated resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol.* **170**, 129–141.
- Huang, Y.J., Jestin, C., Welham, S.J., King, G.J., Manzanares-Dauleux, M.J., Fitt, B.D.L. and Delourme, R.** (2016) Identification of environmentally stable QTL for resistance against *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **129**, 169–180.
- Huang, Y.J., Pirie, E.J., Evans, N., Delourme, R., King, G.J. and Fitt, B.D.L.** (2009) Quantitative resistance to symptomless growth of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape). *Plant Pathol.* **58**, 314–323.
- Huang, Y.-J., Qi, A., King, G.J. and Fitt, B.D.L.** (2014) Assessing quantitative resistance against *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) in young plants. *PLoS ONE* **9**, e84924.
- Idnurm, A. and Howlett, B.J.** (2003) Analysis of loss of pathogenicity mutants reveals that repeat-induced point mutations can occur in the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet. Biol. FG B* **39**, 31–37.
- Jeon, J., Choi, J., Lee, G.-W., Park, S.-Y., Huh, A., Dean, R.A. and Lee, Y.-H.** (2015) Genome-wide profiling of DNA methylation provides insights into epigenetic regulation of fungal development in a plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Sci. Rep.* **5**, srep08567.
- Jestin, C., Bardol, N., Lodé, M., Duffé, P., Domin, C., Vallée, P., Mangin, B., Manzanares-Dauleux, M.J. and Delourme, R.** (2015) Connected populations for detecting quantitative resistance factors to phoma stem canker in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Mol. Breed.* **35**, 1–16.
- Jestin, C., Lodé, M., Vallée, P., Domin, C., Falentin, C., Horvais, R., Coedel, S., Manzanares-Dauleux, M.J. and Delourme, R.** (2011) Association mapping of quantitative resistance for *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Mol. Breed.* **27**, 271–287.

- Jestin, C., Vallée, P., Domin, C., Manzaneres-Dauleux, M. and Delourme, R.** (2012) Assessment of a new strategy for selective phenotyping applied to complex traits in *Brassica napus*. *Open J. Genet.* **2**, 2.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L.** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Jonge, R. de, Esse, H.P. van, Maruthachalam, K., et al.** (2012) Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 5110–5115.
- Jonge, R. de and Thomma, B.P.H.J.** (2009) Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol.* **17**, 151–157.
- Jupe, J., Stam, R., Howden, A.J., Morris, J.A., Zhang, R., Hedley, P.E. and Huitema, E.** (2013) *Phytophthora capsici*-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle. *Genome Biol.* **14**, R63.
- Kaur, S., Cogan, N.O.I., Ye, G., et al.** (2009) Genetic map construction and QTL mapping of resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in Australian canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Theor. Appl. Genet.* **120**, 71–83.
- Kawahara, Y., Oono, Y., Kanamori, H., Matsumoto, T., Itoh, T. and Minami, E.** (2012) Simultaneous RNA-seq analysis of a mixed transcriptome of rice and blast fungus interaction. *PLoS ONE* **7**, e49423.
- Kelley, B.S., Lee, S.-J., Damasceno, C.M.B., Chakravarthy, S., Kim, B.-D., Martin, G.B. and Rose, J.K.C.** (2010) A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death. *Plant J.* **62**, 357–366.
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L.J., Takahara, H., et al.** (2012) Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathog* **8**, e1002643.
- Kloppholz, S., Kuhn, H. and Requena, N.** (2011) A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Curr. Biol.* **21**, 1204–1209.
- Knipe, D.M. and Cliffe, A.** (2008) Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 211–221.

- Kong, L., Qiu, X., Kang, J., et al.** (2017) A *Phytophthora* effector manipulates host histone acetylation and reprograms defense gene expression to promote infection. *Curr. Biol. CB* **27**, 981–991.
- Krattinger, S.G., Lagudah, E.S., Spielmeyer, W., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L.L. and Keller, B.** (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* **323**, 1360–1363.
- Kulkarni, R.D., Kelkar, H.S. and Dean, R.A.** (2003) An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 118–121.
- Kushalappa, A.C., Yogendra, K.N. and Karre, S.** (2016) Plant innate immune response: qualitative and quantitative resistance. *Crit. Rev. Plant Sci.* **35**, 38–55.
- 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.
- Lang, C. and Long, S.R.** (2015) Transcriptomic analysis of *Sinorhizobium meliloti* and *Medicago truncatula* symbiosis using nitrogen fixation deficient nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI*.
- Laperche, A., Aigu, Y., Jubault, M., Ollier, M., Guichard, S., Glory, P., Strelkov, S., Gravot, A. and Manzaneres-Dauleux, M.** (2017) Clubroot resistance QTL are modulated by nitrogen input in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* **130**, 669–684.
- Larkan, N.J., Lydiate, D.J., Parkin, I. a. P., Nelson, M.N., Epp, D.J., Cowling, W.A., Rimmer, S.R. and Borhan, M.H.** (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.
- Larkan, N.J., Ma, L. and Borhan, M.H.** (2015) The *Brassica napus* receptor-like protein RLM2 is encoded by a second allele of the *LepR3/Rlm2* blackleg resistance locus. *Plant Biotechnol. J.* **13**, 983–992.
- Lee, B.-N., Kroken, S., Chou, D.Y.T., Robbertse, B., Yoder, O.C. and Turgeon, B.G.** (2005) Functional analysis of all nonribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, NPS6, involved in virulence and resistance to oxidative stress. *Eukaryot. Cell* **4**, 545–555.

- Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Schäfer-Pregl, R., Ritter, E., Knapp, S.J., Salamini, F. and Gebhardt, C.** (1994) Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics* **137**, 67–77.
- Li, H., Barbetti, M.J. and Sivasithamparam, K.** (2005) Hazard from reliance on cruciferous hosts as sources of major gene-based resistance for managing blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease. *Field Crops Res.* **91**, 185–198.
- Li, W., Wang, B., Wu, J., et al.** (2009) The *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AvrPiz-t* encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene *Piz-t*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **22**, 411–420.
- Liu, Z., Gao, Y., Kim, Y.M., Faris, J.D., Shelver, W.L., Wit, P.J.G.M. de, 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.
- Lô-Pelzer, E., Aubertot, J.N., David, O., Jeuffroy, M.H. and Bousset, L.** (2009) Relationship between severity of blackleg (*Leptosphaeria maculans*/*L. biglobosa* species complex) and subsequent primary inoculum production on oilseed rape stubble. *Plant Pathol.* **58**, 61–70.
- Lo Presti, 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.
- Love, M.I., Huber, W. and Anders, S.** (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550.
- Lowe, R.G.T., Cassin, A., Grandaubert, J., Clark, B.L., Van de Wouw, A.P., Rouxel, T. and Howlett, B.J.** (2014) Genomes and transcriptomes of partners in plant-fungal-interactions between canola (*Brassica napus*) and two *Leptosphaeria* species. *PLoS One* **9**, e103098.
- Ma, L.-J., Does, H.C. van der, Borkovich, K.A., et al.** (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **464**, 367–373.
- McDonald, M.C., McDonald, B.A. and Solomon, P.S.** (2015) Recent advances in the *Zymoseptoria tritici*–wheat interaction: insights from pathogenomics. *Front Plant Sci* **6**, 102.

- McDonald, B.A. and Linde, and C.** (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**, 349–379.
- Mehrabi, R., Bahkali, A.H., Abd-Elsalam, K.A., et al.** (2011) Horizontal gene and chromosome transfer in plant pathogenic fungi affecting host range. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 542–554.
- Meinhardt, L.W., Costa, G.G.L., Thomazella, D.P., et al.** (2014) Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. *BMC Genomics* **15**, 164.
- Mendes-Pereira, E., Balesdent, M.-H., Brun, H. and Rouxel, T.** (2003) Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*-*L. biglobosa* species complex. *Mycol. Res.* **107**, 1287–1304.
- Michelmore, R.W., Christopoulou, M. and Caldwell, K.S.** (2013) Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**, 291–319.
- Mirzadi Gohari, A., Ware, S.B., Wittenberg, A.H.J., et al.** (2015) Effector discovery in the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Mol. Plant Pathol.*
- Moerschbacher, B.M., Witte, U., Königs, D. and Reisener, H.-J.** (1989) Changes in the level of enzyme activities involved in lignin biosynthesis during the temperature sensitive resistant response of wheat (*Sr6*) to stem rust (*P6*). *Plant Sci.* **65**, 183–190.
- Möller, M. and Stukenbrock, E.H.** (2017) Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.*
- Moore, J.W., Herrera-Foessel, S., Lan, C., et al.** (2015) A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nat. Genet.* **47**, 1494–1498.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L. and Wold, B.** (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* **5**, 621–628.
- Morita-Yamamuro, C., Tsutsui, T., Sato, M., et al.** (2005) The *Arabidopsis* gene *CAD1* controls programmed cell death in the plant immune system and encodes a protein containing a MACPF domain. *Plant Cell Physiol.* **46**, 902–912.
- Mueth, N.A., Ramachandran, S.R. and Hulbert, S.H.** (2015) Small RNAs from the wheat stripe rust fungus (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*). *BMC Genomics* **16**, 718.

- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R. and Dobbie, Z.** (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* **32**, 1372–1374, 1376, 1378–1379.
- Münch, S., Lingner, U., Floss, D.S., Ludwig, N., Sauer, N. and Deising, H.B.** (2008) The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *J. Plant Physiol.* **165**, 41–51.
- Niks, R.E., Qi, X. and Marcel, T.C.** (2015) Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: concepts, misconceptions, and mechanisms. *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**, 445–470.
- Niks, R.E. (Wageningen U. (Pays B.L. voor P., Walther, U., Jaiser, H., et al.** (2000) Resistance against barley leaf rust (*Puccinia hordei*) in West-European spring barley germplasm. *Agron. Fr.*
- O’Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., et al.** (2012) Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Genet.* **44**, 1060–1065.
- Oh, Y., Donofrio, N., Pan, H., Coughlan, S., Brown, D.E., Meng, S., Mitchell, T. and Dean, R.A.** (2008) Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Genome Biol.* **9**, R85.
- Oide, S., Moeder, W., Krasnoff, S., Gibson, D., Haas, H., Yoshioka, K. and Turgeon, B.G.** (2006) NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *Plant Cell* **18**, 2836–2853.
- Oliva, R., Win, J., Raffaele, S., et al.** (2010) Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell. Microbiol.* **12**, 705–715.
- Oliver, R.P. and Ipcho, S.V.S.** (2004) *Arabidopsis* pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. *Mol. Plant Pathol.* **5**, 347–352.
- Palma-Guerrero, J., Torriani, S.F.F., Zala, M., Carter, D., Courbot, M., Rudd, J.J., McDonald, B.A. and Croll, D.** (2016) Comparative transcriptomic analyses of *Zymoseptoria tritici* strains show complex lifestyle transitions and intraspecific variability in transcription profiles. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 845–859.
- 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.
- Parlevliet, J.E. and Zadoks, J.C.** (1977) The integrated concept of disease resistance: A new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica* **26**, 5–21.
- Petrie, G.A.** (1995) Long-term survival and sporulation of *Leptosphaeria maculans* (blackleg) on naturally-infected rapeseed/canola stubble in Saskatchewan. *Can. Plant Dis. Surv.*, 23–34.
- Phukan, U.J., Jeena, G.S. and Shukla, R.K.** (2016) WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants. *Front. Plant Sci.* **7**.
- Pierleoni, A., Martelli, P.L. and Casadio, R.** (2008) PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics* **9**, 392.
- Pilet, M.L., Delourme, R., Foisset, N. and Renard, M.** (1998) Identification of loci contributing to quantitative field resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not., in Winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **96**, 23–30.
- Pilet, M.L., Duplan, G., Archipiano, M., et al.** (2001) Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oilseed rape. *Crop Sci.* **41**, 197.
- Plett, J.M., Daguerre, Y., Wittulsky, S., 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., 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.* **26**, 2183–2198.
- Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I., Rouxel, T. and Balesdent, M.-H.** (2015) A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.*
- Poland, J.A., Balint-Kurti, P.J., Wisser, R.J., Pratt, R.C. and Nelson, R.J.** (2009) Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci.* **14**, 21–29.

- Ramachandran, S.R., Yin, C., Kud, J., Tanaka, K., Mahoney, A.K., Xiao, F. and Hulbert, S.H.** (2017) Effectors from wheat rust fungi suppress multiple plant defense responses. *Phytopathology* **107**, 75–83.
- Raman, H., Raman, R., Coombes, N., et al.** (2016) Genome-wide association study identifies new loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* in Canola. *Crop Sci. Hortic.*, 1513.
- Raman, R., Taylor, B., Marcroft, S., et al.** (2012) Molecular mapping of qualitative and quantitative loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* causing blackleg disease in canola (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **125**, 405–418.
- Redkar, A., Hoser, R., Schilling, L., Zechmann, B., Krzymowska, M., Walbot, V. and Doehlemann, G.** (2015) A secreted effector protein of *Ustilago maydis* guides maize leaf cells to form tumors. *Plant Cell* **27**, 1332–1351.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J. and Smyth, G.K.** (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **26**, 139–140.
- 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. and Balesdent, M.-H.** (2013) From model to crop plant–pathogen interactions: cloning of the first resistance gene to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol.* **197**, 356–358.
- 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., Grandaubert, J., Hane, J.K., Hoede, C., Wouw, A.P. van de, Couloux, A., Dominguez, V., Anthouard, V., et al.** (2011) Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nat. Commun.* **2**, 202.
- 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.

- Rovenich, H., Boshoven, J.C. and Thomma, B.P.** (2014) Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20**, 96–103.
- Rudd, J.J., Kanyuka, K., Hassani-Pak, K., et al.** (2015) transcriptome and metabolite profiling of the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions and a variation on the hemibiotrophic lifestyle definition. *Plant Physiol.* **167**, 1158–1185.
- Rusch, A.** (2010) Analyse des déterminants des attaques de *Meligethes aeneus* (Coleoptera, Nitidulidae) et de sa régulation biologique à l'échelle d'un paysage agricole: contribution à l'amélioration de la protection intégrée du colza. phdthesis. AgroParisTech.
- Saldanha, A.J.** (2004) Java Treeview—extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* **20**, 3246–3248.
- Šašek, V., Nováková, M., Dobrev, P.I., Valentová, O. and Burketová, L.** (2012) β -aminobutyric acid protects *Brassica napus* plants from infection by *Leptosphaeria maculans*. Resistance induction or a direct antifungal effect? *Eur. J. Plant Pathol.* **133**, 279–289.
- Savitch, L.V., Subramaniam, R., Allard, G.C. and Singh, J.** (2007) The GLK1 “regulon” encodes disease defense related proteins and confers resistance to *Fusarium graminearum* in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 234–238.
- Schardl, C.L., Florea, S., Pan, J., Nagabhyru, P., Bec, S. and Calie, P.J.** (2013) The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**.
- Shen, D., Liu, T., Ye, W., Liu, L., Liu, P., Wu, Y., Wang, Y. and Dou, D.** (2013) Gene duplication and fragment recombination drive functional diversification of a superfamily of cytoplasmic effectors in *Phytophthora sojae*. *PLoS ONE* **8**.
- Schilling, L., Matei, A., Redkar, A., Walbot, V. and Doehlemann, G.** (2014) Virulence of the maize smut *Ustilago maydis* is shaped by organ-specific effectors. *Mol. Plant Pathol.* **15**, 780–789.
- Schoch, C.L., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., et al.** (2009) A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Stud. Mycol.* **64**, 1-15-S10.

- Schorneck, S., Damme, M. van, Bozkurt, T.O., Cano, L.M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S. and Huitema, E.** (2010) Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 17421–17426.
- Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R.** (2011) A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends Plant Sci.* **16**, 117–125.
- Soyer, J.L., El Ghalid, M., Glaser, N., et al.** (2014) Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genet.* **10**, e1004227.
- St.Clair, D.A.** (2010) Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**, 247–268.
- Stergiopoulos, I., Collemare, J., Mehrabi, R. and De Wit, P.J.G.M.** (2013) Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic Dothideomycete fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 67–93.
- Stotz, H.U., Mitroussia, G.K., Wit, P.J.G.M. de and Fitt, B.D.L.** (2014) Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. *Trends Plant Sci.* **19**, 491–500.
- Sun, P., Fitt, B.D.L., Steed, J.M., Underwood, C.T. and West, J.S.** (2001) Factors affecting development of phoma canker (*Leptosphaeria maculans*) on stems of winter oilseed rape (*Brassica napus*) in southern England. *Ann. Appl. Biol.* **139**, 227–242.
- Tan, X., Meyers, B.C., Kozik, A., West, M.A., Morgante, M., St Clair, D.A., Bent, A.F. and Michelmore, R.W.** (2007) Global expression analysis of nucleotide binding site-leucine rich repeat-encoding and related genes in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* **7**, 56.
- Testa, A.C., Oliver, R.P. and Hane, J.K.** (2016) OcculterCut: a comprehensive survey of AT-Rich regions in fungal genomes. *Genome Biol. Evol.* **8**, 2044–2064.
- Thewes, S., Kretschmar, M., Park, H., Schaller, M., Filler, S.G. and Hube, B.** (2007) *In vivo* and *ex vivo* comparative transcriptional profiling of invasive and non-invasive *Candida albicans* isolates identifies genes associated with tissue invasion. *Mol. Microbiol.* **63**, 1606–1628.
- Tör, M., Lotze, M.T. and Holton, N.** (2009) Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *J. Exp. Bot.* **60**, 3645–3654.

- Toruño, T.Y., Stergiopoulos, I. and Coaker, G.** (2016) Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners. *Annu. Rev. Phytopathol.* **54**, 419–441.
- U, N.** (1935) Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *Brassica napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn. J. Bot.* **7**, 389–452.
- 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 de Wouw, A.P., Marcroft, S.J., Barbetti, M.J., Hua, L., Salisbury, P.A., Gout, L., Rouxel, T., Howlett, B.J. and Balesdent, M.H.** (2009) Dual control of avirulence in *Leptosphaeria maculans* towards a *Brassica napus* cultivar with ‘sylvestris-derived’ resistance suggests involvement of two resistance genes. *Plant Pathol.* **58**, 305–313.
- Wang, J., Lydiate, D.J., Parkin, I.A., Falentin, C., Delourme, R., Carion, P.W. and King, G.J.** (2011) Integration of linkage maps for the Amphidiploid *Brassica napus* and comparative mapping with *Arabidopsis* and *Brassica rapa*. *BMC Genomics* **12**, 101.
- Wang, M., Weiberg, A. and Jin, H.** (2015) Pathogen small RNAs: a new class of effectors for pathogen attacks. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 219–223.
- Wang, Q., Han, C., Ferreira, A.O., et al.** (2011) Transcriptional programming and functional interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR effector repertoire. *Plant Cell Online*, tpc.111.086082.
- Wang, Q., Jiang, C., Wang, C., Chen, C., Xu, J.-R. and Liu, H.** (2017) Characterization of the two-speed subgenomes of *Fusarium graminearum* reveals the fast-speed subgenome specialized for adaptation and infection. *Front. Plant Sci.* **8**.
- Webb, C.A. and Fellers, J.P.** (2006) Cereal rust fungi genomics and the pursuit of virulence and avirulence factors. *FEMS Microbiol. Lett.* **264**, 1–7.
- 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., 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.
- 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.
- Wilfert, L. and Schmid-Hempel, P.** (2008) The genetic architecture of susceptibility to parasites. *BMC Evol. Biol.* **8**, 187.
- Wilson, R.A. and Talbot, N.J.** (2009) Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 185–195.
- Wit, P.J.G.M. de, Burgt, A. van der, Ökmen, B., et al.** (2012) The genomes of the fungal plant pathogens *Cladosporium fulvum* and *Dothistroma septosporum* reveal adaptation to different hosts and lifestyles but also signatures of common ancestry. *PLoS Genet* **8**, e1003088.
- 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.
- Yoshino, K., Irieda, H., Sugimoto, F., Yoshioka, H., Okuno, T. and Takano, Y.** (2012) Cell death of *Nicotiana benthamiana* is induced by secreted protein NIS1 of *Colletotrichum orbiculare* and is suppressed by a homologue of CgDN3. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **25**, 625–636.
- Young, J.P.W.** (2015) Genome diversity in arbuscular mycorrhizal fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* **26**, 113–119.
- Yu, F., Gugel, R.K., Kutcher, H.R., Peng, G. and Rimmer, S.R.** (2013) Identification and mapping of a novel blackleg resistance locus *LepR4* in the progenies from *Brassica napus* × *B. rapa* subsp. *sylvestris*. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* **126**, 307–315.
- Yu, F., Lydiate, D.J. and Rimmer, S.R.** (2008) Identification and mapping of a third blackleg resistance locus in *Brassica napus* derived from *B. rapa* subsp. *sylvestris*. *Genome* **51**, 64–72.

- Yu, F., Lydiate, D.J. and Rimmer, S.R.** (2005) Identification of two novel genes for blackleg resistance in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* **110**, 969–979.
- Zadoks, J.C.** (2008) The potato murrain on the European continent and the revolutions of 1848. *Potato Res.* **51**, 5–45.
- Zipfel, C. and Robatzek, S.** (2010) Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity: Veni, Vidi...? *Plant Physiol.* **154**, 551–554.
- Zuluaga, A.P., Vega-Arreguín, J.C., Fei, Z., Ponnala, L., Lee, S.J., Matas, A.J., Patev, S., Fry, W.E. and Rose, J.K.C.** (2016) Transcriptional dynamics of *Phytophthora infestans* during sequential stages of hemibiotrophic infection of tomato. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 29–41.

Title : Identification and functional analysis of late effectors involved in the systemic colonization of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*

Keywords : phytopathology, resistance, fungus, *Brassica napus*, transcriptomics

Abstract: *Leptosphaeria maculans* is a pathogenic fungus, responsible for one of the main diseases of oilseed rape (*Brassica napus*), the stem canker disease. The infectious life cycle of *L. maculans* is especially complex. After the primary infection of leaves and cotyledons, the fungus develops a long endophytic stage in the stem. This infection stage, which is entirely asymptomatic, lasts several months before necrosis develops at the stem base, responsible of yield loss. At this stage, the oilseed rape may exhibit "adult resistance" limiting the onset and severity of symptoms. While the fungal genes expressed during the primary infection are extensively studied, very little knowledge was available concerning the systemic colonization. To explain the ability of the fungus to colonize the stem without inducing symptom, we have therefore hypothesized that *L. maculans* expressed effectors, *i.e.* small secreted proteins, interfering with the plant defense system.

The objective of my thesis was to identify such effectors and to characterize them to better understand the systemic colonization of oilseed rape by *L. maculans*. One of the underlying challenges of this thesis was also to identify new resistances allowing the specific recognition of these effectors expressed during stem colonization, and which may explain, at least in part, the adult resistance observed in some varieties.

Using a transcriptomic approach, I was able to identify 307 "late" effector candidates specifically expressed during stem colonization and 107 "early" effector candidates specifically expressed during cotyledon colonization. I confirmed that the genes encoding early effectors of *L. maculans* are specifically localized in gene-poor regions and rich in repeated elements of the fungal genome.

Conversely, late candidate effectors are absent from these regions and are located in regions rich in genes of the genome. *L. maculans* effectors have thus a distinct genomic localization based on their expression profile.

A detailed analysis of five of these late effectors showed their conservation in the natural populations of *L. maculans* and their involvement in the suppression of plant cell death. These results, associated with the analysis of their expression profile in stem samples from the fields during a growing season, allowed us to propose the following model: *L. maculans* would colonize systemically the oilseed rape stem by secreting effectors suppressing cell death and thus interfering with plant defenses. At the end of the growing season, the decreased expression of these effectors would allow the fungus to switch from a biotrophic to a necrotrophic lifestyle and to induce stem canker. This transition between the two ways of life would therefore be based on a balance between effectors suppressing and effectors inducing cell death.

In order to identify new specific sources of resistance and/or to facilitate the identification of quantitative resistances in plant material, I created fungal strains over-expressing late effectors during cotyledon colonization. With these transformed strains I evaluated by cotyledonary test a large collection of oilseed rape genotypes to identify potential gene-for-gene relationships. A variety with a hypersensitive response to a late effector was thus identified, the monogenic control of this response was validated and its genetic mapping carried out in two progenies. This approach therefore effectively enables the identification of new sources of resistance for effective control of *L. maculans*.

Titre : Identification et analyse fonctionnelle des effecteurs tardifs impliqués dans la colonisation systémique du colza par *Leptosphaeria maculans*

Mots clés : phytopathologie, résistance, champignon, *Brassica napus*, transcriptomique

Résumé: *Leptosphaeria maculans* est un champignon pathogène, responsable de l'une des principales maladies du colza (*Brassica napus*), la nécrose du collet. Le cycle de vie infectieux de *L. maculans* est particulièrement complexe. Après l'infection primaire des feuilles et des cotylédons, le champignon développe une longue phase de vie endophytique dans la tige. Cette phase de vie, qui est entièrement asymptomatique, dure plusieurs mois, avant que la nécrose ne se développe à la base de la tige, préjudiciable à l'élaboration du rendement. Durant cette phase, le colza peut présenter une « résistance adulte » limitant l'apparition et la gravité des symptômes. Alors que les gènes fongiques exprimés au cours de l'infection primaire du colza sont largement étudiés, très peu de connaissances étaient disponibles concernant la phase de colonisation systémique. Pour expliquer la capacité du champignon à coloniser la tige sans induire de symptômes, nous avons donc émis l'hypothèse que *L. maculans* exprimait à ce stade des effecteurs, c'est-à-dire des petites protéines sécrétées, interférant avec le système de défense de la plante.

L'objectif de ma thèse était d'identifier de tels effecteurs et de les caractériser afin de mieux comprendre la colonisation systémique du colza par le champignon. Un des enjeux sous-jacents de cette thèse était aussi d'identifier de nouvelles résistances permettant la reconnaissance spécifique de ces effecteurs, qui pourraient expliquer, au moins en partie, la résistance adulte observée dans certaines variétés.

Par une approche transcriptomique, j'ai pu identifier 307 effecteurs candidats "tardifs", spécifiquement exprimés lors de la colonisation de la tige et 107 effecteurs "précoces", spécifiquement exprimés lors de la colonisation des cotylédons. J'ai confirmé que les gènes codant des effecteurs précoces de *L. maculans* sont spécifiquement localisés dans les régions pauvres en gènes et riches en éléments répétés du génome fongique.

A l'inverse les gènes codant des effecteurs candidats tardifs sont absents de ces régions et sont localisés dans les régions riches en gènes du génome. Les effecteurs de *L. maculans* ont donc une localisation génomique distincte en fonction de leur profil d'expression.

Une analyse approfondie de cinq de ces effecteurs tardifs a permis de montrer leur conservation dans les populations naturelles de *L. maculans* et leur implication dans la suppression de la mort cellulaire végétale. Ces résultats associés à l'analyse de leur profil d'expression dans des échantillons de tige issus du champ au cours d'une saison culturale ont permis de proposer le modèle suivant: *L. maculans* coloniserait la tige de colza en sécrétant des effecteurs supprimant la mort cellulaire et donc interférant avec les défenses de la plante. A la fin de la saison culturale, la diminution de l'expression de ces effecteurs permettrait au champignon de passer d'un stade de vie biotrophe à un stade de vie nécrotrophe et d'induire la nécrose au collet. Cette transition entre les deux modes de vie serait donc basée sur un équilibre entre effecteurs supprimant la mort cellulaire et effecteurs induisant la mort cellulaire.

Dans le but d'identifier de nouvelles sources de résistance spécifiques et/ou faciliter l'identification de résistances quantitatives dans le matériel végétal, j'ai créé des souches fongiques sur-exprimant précocement des effecteurs tardifs. Avec ces souches transformées j'ai évalué par test cotylédonnaire une grande collection de génotypes de colza pour identifier de potentielles relations de type gène-pour-gène. Une variété présentant une réponse hypersensible à un effecteur tardif a ainsi pu être identifiée, le contrôle monogénique de cette réponse a été validé et sa cartographie génétique effectuée dans deux descendances. Cette approche permet donc effectivement d'identifier de nouvelles sources de résistances pour lutter efficacement contre la nécrose du collet.