



**HAL**  
open science

# Étude d'effecteurs de l'oomycète pathogène Phytophthora capsici exprimés au cours de l'interaction avec le piment et la tomate

Gaétan Maillot

► **To cite this version:**

Gaétan Maillot. Étude d'effecteurs de l'oomycète pathogène *Phytophthora capsici* exprimés au cours de l'interaction avec le piment et la tomate. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2018. Français. NNT : 2018AVIG0350 . tel-02946973

**HAL Id: tel-02946973**

**<https://theses.hal.science/tel-02946973v1>**

Submitted on 23 Sep 2020

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

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



Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

École doctoral 536 : Agrosciences et Science

---

## THESE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE**

Présentée et soutenue publiquement le 1<sup>er</sup> Octobre 2018 par

**Gaëtan MAILLOT**

---

Étude d'effecteurs de l'oomycète pathogène  
*Phytophthora capsici* exprimés au cours de  
l'interaction avec le piment et la tomate

---

Thèse dirigée par Véronique LEFEBVRE

Jury :

Laurence Godiard, Chargée de Recherche, INRA	Rapportrice
Fabienne Vailleau, Maître de Conférences, INP-ENSAT	Rapportrice
Bruno Favery, Directeur de recherche, INRA	Examineur
Marc Bardin, Directeur de Recherche, INRA	Examineur
Véronique Lefebvre, Directrice de Recherche, INRA	Directrice de thèse



## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité de recherche de Génétique et Amélioration des Fruit et Légumes (GAFL) de l'INRA d'Avignon avec le soutien de la région PACA et du projet ANR EffectOoRes. Elle a été soutenue par les sociétés Rijk Zwaan et Gautier semences.

Je tiens à remercier Fabienne Vailleau et Laurence Godiard d'être les rapportrices de cette thèse. Merci aussi à Bruno Favery et Marc Bardin pour avoir accepté d'être les examinateurs pour ma thèse.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse (officiels et officieux) qui ont participé à un ou plusieurs d'entre-eux ainsi que pour leurs suggestions et conseils concernant mes travaux de recherche. Merci à Guillem Rigail, Josselin Montarry, Benoît Moury, Joël Chadoeuf, Bernard Caromel et Emmanuel Szadkowski.

Un grand merci à Véronique de m'avoir permis d'intégrer son équipe pour réaliser cette thèse. Malgré la charge immense de la direction de l'unité, je te remercie d'avoir pris le temps de me caller entre tes multiples réunions pour m'encadrer, me soutenir et me corriger du mieux que tu as pu tout au long de la thèse.

Merci également tous les membres de l'équipe Phyto pour leur soutien et leur contribution à ce travail de thèse, qui sans eux n'existerait pas. Je remercie aussi les membres de l'équipe Résistance Durable chez les Solanacées (RDS) de l'époque, qui m'ont accueilli pendant mon séjour au château : Merci Anne-Marie, Ghislaine et Marion pour votre aide et votre bonne humeur quotidienne. J'ai une pensée particulière pour Alain Paloix, que j'ai malheureusement peu connu, mais qui c'est toujours montré bienveillant et prêt à donner des conseils.

J'adresse un merci particulier aux membres de l'IPS2, Marie-Laure, Véronique et surtout Guilhem qui m'ont accompagné dans l'apprentissage du traitement de données transcriptomiques. Merci infiniment pour votre patience. Je pense particulièrement à Guilhem qui m'a aidé plusieurs fois dans les moments où j'étais bloqué.

Un grand grand merci au Docteur Ingo Hein du James Hutton Institute et aux membres de son équipe, qui m'ont accueilli pendant deux mois pour acquérir la technique d'expression transitoire et un autre mois pour faire des analyses bio-informatique. Ces trois mois ont été incroyablement enrichissant et m'ont permis de rencontrer des personnes formidables (Et oui Sophie, je pense à toi et à ta petite famille, mais aussi à Laurence, Christianne et tous les autres ...).

Merci à toutes les personnes du GAFL qui ont rendu ces années plus joyeuses. Merci à l'équipe expérimentale pour les parties de ping-pong de digestion et la bonne humeur au quotidien. Merci aux membres de l'équipe Melon sans qui je n'aurais pu être sélectionné pour faire cette thèse.

J'adresse un merci particulier à toi Joël (et oui je te l'avais dit) et toi Emmanuel pour votre aide, nos conversations et votre soutien à tous les instants. Je n'aurais pas fini cette thèse sans vous.

Je remercie également les thésards de l'unité pour tous les moments de rigolades et de bonne humeur à l'intérieur de l'unité mais aussi en dehors : Je pense à Lucie, Isidore, Mariem, Maxime.

J'arrive maintenant au cœur du sujet : Les piliers 'Capo' et 'Zebra'. Vous êtes arrivées sur le tard, mais quelle entrée ! Que dire sur les piliers, sur les repas à la gloire de la bonne bouffe, des gâteaux dignes de grands pâtisseries, des jeudis à l'Explo, etc, etc. A un moment je vous ai demandé comment je pourrais vous remercier : vous m'avez dit que ce serait de finir ma thèse. Et ben voilà, le jalon est posé : Merci du fond du cœur.

Je remercie enfin tous mes proches, ma famille qui a été présente à tous les moments malgré la distance : merci à mon frère et à ma mère pour être toujours là en toute circonstance. Je remercie aussi la famille de Mélanie pour leur soutien tout au long de la thèse.

Enfin, Mélanie. Je te dis merci, merci, merci et mille mercis pour avoir été présente à mes côtés dans les bons comme les mauvais moments. Tu as été et es toujours pour moi un soutien sans faille. Merci.

## Liste des abréviations

ADP : Adenosine DiPhosphate

ATP : Adenosine TriPhosphate

Avr : Avirulence

BAK1 : BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BR : Brassinosteroid

CBEL : Cellulose Binding Elicitor Lectin

CC : Coiled-Coil

CNL : CC-NB-LRR

CRN : CriNkler and Necrosis

CWDE : Cell Wall Degrading Enzyme

DAMP : Damage Associated Molecular Pattern

DNA : DeoxyriboNucleic Acid

EFR : EF-Tu Receptor

EF-Tu : Elongation Factor Thermo unstable

ET : Ethylene

ETI : Effector Triggered Immunity

Flg22 : 22 amino acids motif from bacterial Flagellin

FLS2 : Flagellin Sensing 2

HR : Hypersensitive Response

JA : Jasmonic Acid

LysM : Lysine Motif

LRR : Leucine Rich-Repeat

MAMP : Microbe Associated Molecular Patterns

MAPK : Mitogen activated Protein Kinase

MAPKK : Mitogen activated Protein Kinase Kinase

MAPKKK : Mitogen activated Protein Kinase Kinase Kinase

NB : Nucleotide Binding

NB-LRR : Nucleotide Binding – Leucine Rich-Repeat

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NEP : Necrosis and Ethylene-inducing *Protein*

*NLP : NEP1-like protein*

NLR : Nucleotide-binding domain Leucine-Rich repeat containing

NO : Nitric oxide

PA : Phosphatidic Acid

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

PCF : *Phytophthora cactorum-Fragaria* protein

PEP1 : Plant Elicitor Protein

PEPR1 : PEP1 Receptor

PEPR2 : PEP2 Receptor

PRR : ‘Pattern Recognition Receptor’

PTI : PAMP-Triggered Immunity

QTL : Quantitative Trait Loci

R : Resistance

RK : ‘Kinase Receptor’

RLP : ‘Receptor-Like Protein’

RNA : Ribonucleic Acid

ROS : Reactive Oxygen Species

RxLR : RxLR motif (arginine, variable amino acid, leucine, arginine)

SA : Salicylic acid

SERK : SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

SP : Signal Peptide

TIR : Toll/Interleukin-1 Receptor

TNL : TIR-NB-LRR

FAO (2010) The State of Food Security in the World: Addressing Food Insecurity in Protracted Crises,  
Food and Agriculture Organization of The United Nations



## Liste des figures

Figure 1 : Activation des récepteurs NLRs par les effecteurs (adapté de Cui et al. 2015).

Figure 2 : Modèle zig-zag adapté de Jones and Dangl (2006).

Figure 3 : Vue d'ensemble de la phylogénie des oomycètes adapté de Thines (2014)

Figure 4 : Style de vie des oomycètes phytopathogènes (adapté de Fawke et al. 2015).

Figure 5 : Schéma de la sécrétion d'effecteur par l'haustorium d'un Oomycète (adapté de Schornack et al. 2009).

Figure 6 : Modèles de reconnaissance indirecte des effecteurs (adapté de Cesari et al. 2014).

Figure 7 : Pipeline effectoromique à haut débit (adapté de Pais et al. 2013).

Figure 8 : Symptômes causés par *Phytophthora capsici* (adapté de Lamour et al. 2012b).

Figure 9 : Cycle infectieux de *Phytophthora capsici* (Exemple d'une infection de concombre adapté de Hausbeck and Lamour 2004).

Figure 10 : Développement de *Phytophthora capsici* sur une feuille (adapté de Lamour et al. 2012b).

Figure 11 : Schématisation de la carte génétique consensus du chromosome P5 du piment (adapté de Mallard et al. 2013 par Cantet, 2013).

Figure 1.1: Kinetic of infection by *Phytophthora capsici* and size of the libraries from the 12 samples

Figure 1.2: Venn diagram illustrating the number of *P. capsici* differentially expressed genes according to the host (2 left circles) or to the isolate (2 right circles).

Figure 1.3: Expression patterns of differentially expressed genes coding for putative apoplastic effectors.

Figure 1.4: Expression patterns of differentially expressed genes coding for putative RxLR effectors.

Figure 1.5: qRT-PCR analysis expression levels of the differentially expressed RxLR effector CUST\_2407.

Figure 2.1 : Vecteur d'expression pGR106 compatible au clonage Gateway®.

Figure 2.2 : Caractérisation de la réponse du piment aux méthodes d'expression transitoire *in planta* par agro-infection et inoculation mécanique du PVX.

Figure 2.3 : Réponse hypersensible (HR) induite chez le piment 14 jours après agro-infection du témoin positif pGR106:PITG\_16240

Figure 2.4 : Pourcentages de sites développant des réponses hypersensibles avec les témoins après agro-infection.

Figure 2.5 : Pourcentages de sites développant des réponses hypersensibles après agro-infection des effecteurs CUST\_17572, CUST\_16519<sup>Pc107</sup>, CUST\_16519<sup>Pc273</sup>, Phyca11|16519<sup>Pc107</sup> et Phyca11|16519<sup>Pc273</sup>.

Figure 3.1 : Distribution des pourcentages de reads comptés sur les annotations de *Phytophthora capsici* pour les 33 isolats.

Figure 3.2 : Structure génétique des 33 isolats.

Figure 3.3 : Diagramme de Venn montrant les recouvrements entre les effecteurs exprimés par tous les isolats à 24 et à 72 heures post inoculation (hpi).

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Vue d'ensemble des effecteurs de *P. infestans* et *P. sojae* responsable de contournement de résistance (Vleeshouwers and Oliver 2014a)

Tableau 2 : Liste d'effecteurs d'ont la fonction moléculaire a été révélée (adapté de Sharpee and Dean 2016)

Table 1.1: Summary of the molecular functions observed for the differentially expressed genes (DEGs).

Tableau 2.1 : Amorces Gateway utilisées pour les clonages

Tableau 2.2 : Volume et quantité pour la PCR destinée au clonage

Tableau 2.3 : Conditions pour les cycles de PCR avec l'enzyme polymérase de type Herculase

Tableau 2.4 : Mélange de réaction BP.

Tableau 2.5 : Digestion du vecteur pGR106 Gateway.

Tableau 2.6 : Mélange de réaction LR.

Tableau 2.7 : Volumes et quantités pour les PCR sur colonies et plasmides.

Tableau 2.8 : Conditions pour les cycles de PCR avec la GoTaq®

Table n°2.9: Efficacité des méthodes d'expression transitoire *in planta*

Tableau 2.10 : Profil d'expression des effecteurs RxLR retenus pour le clonage.

Tableau 2.11 : Séquences protéiques des effecteurs RxLR sélectionnés pour le re-séquençage Sanger

Tableau 2.12 : Matrice des résultats de criblage des accessions de *Capsicum annuum* par les effecteurs RxLR de *Phytophthora capsici*.

Tableau 3.1 : Statistiques de SNP calling et métadonnées des 33 isolats.

Tableau 3.2 : Profil d'expression des 53 effecteurs conservés chez les 33 isolats.

## Liste des figures supplémentaires

Supplementary Table S1.1: Mapping statistics per sample (library) of library sizes and number of reads mapped to the reference genomes of *Phytophthora capsici* (*Pc*) and *Capsicum annuum* (*Ca*)

Supplementary table S1.2: GO terms enrichment among the DEGs

Supplementary Figure S1.1: Sample-to-sample distances for the 12 samples according to their respective *P. capsici* read number in the corresponding library

Supplementary Figure S1.2: Histograms of the gene distribution by sample according to the log-transformation of their TMM-normalized count per million values (TMM-CPM).

Supplementary figure S1.3: Projections of the log-transformed mean of the TMM-normalized count per million values (CPM) of the 3 replicates from a given biological condition (y-axis) on the log-transformed TMM-normalized CPM value of a replicate from the same biological condition (x-axis).

Tableau supplémentaire S2.1 : Test de compatibilité de 48 accessions de piment pour le protocole d'agro-infection

Tableau supplémentaire S2.2 : Tableau supplémentaire : Résumé des tests d'agro-infection.

Tableau supplémentaire S3.1 : Statistiques de mapping et de comptage

Tableau S3.2 : Coordonnées des 33 isolats de *Phytophthora capsici* basées sur l'analyse de structure et l'analyse de positionnement multidimensionnelle.

Tableau supplémentaire S3.3: Nombre d'effecteurs RxLR exprimé par isolat

---

## SOMMAIRE

---

REMERCIEMENTS.....	1
LISTE DES ABREVIATIONS .....	3
LISTE DES FIGURES .....	7
LISTE DES TABLEAUX.....	8
LISTE DES FIGURES SUPPLÉMENTAIRES.....	8
AVANT-PROPOS .....	14
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>16</b>
<b>1. LE SYSTEME IMMUNITAIRE DES PLANTES .....</b>	<b>17</b>
1.1. LES PLANTES PERÇOIVENT LES MOLECULES CONSERVEES DES AGENTS PATHOGENES.....	17
1.2. LA PERCEPTION DES EFFECTEURS .....	18
1.3. LA PERCEPTION DES AGENTS PATHOGENES INDUIT DES REPONSES CELLULAIRES COMPLEXES. ....	21
<b>2. LES OOMYCETES SONT DES AGENTS PATHOGENES REDOUTABLES.....</b>	<b>24</b>
2.1. LES OOMYCETES PHYTOPATHOGENES.....	24
2.2. LES EFFECTEURS DES OOMYCETES PHYTOPATHOGENES .....	28
<b>3. LA RESISTANCE DES PLANTES .....</b>	<b>31</b>
3.1 LES RESISTANCES QUALITATIVES SE CARACTERISENT PAR UN ARRET DE LA MALADIE .....	32
3.2. LES RESISTANCES QUANTITATIVES SE CARACTERISENT PAR UNE REDUCTION DE LA SEVERITE DE LA MALADIE .....	34
3.3. STRATEGIES DE GESTION DES RESISTANCES POUR UNE EFFICACITE DURABLE .....	34
<b>4. L’EFFECTOROMIQUE : LA GENOMIQUE APPLIQUEE A L’ETUDE DES EFFECTEURS .....</b>	<b>35</b>
4.1. LA PATHOGENOMIQUE .....	35
4.2. L’EFFECTOROMIQUE EST UN OUTIL PROMETTEUR POUR LES SELECTIONNEURS.....	37
<b>5. MODELE D’ETUDE : L’INTERACTION BIOLOGIQUE ENTRE LE PIMENT ET <i>PHYTOPHTHORA CAPSICI</i> .....</b>	<b>39</b>
5.1. <i>P. CAPSICI</i> EST UN PATHOGENE TELLURIQUE POLYPHAGE .....	39
5.2. LES RESISTANCES GENETIQUES DU PIMENT ET DE LA TOMATE A <i>P. CAPSICI</i> .....	43
5.3. LA PATHOGENOMIQUE APPLIQUEE A <i>P. CAPSICI</i> .....	44
<b>6. OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>48</b>
<b>CHAPITRE 1 .....</b>	<b>50</b>
<b>HOW A PARTIAL RESISTANT HOST GENOTYPE .....</b>	<b>50</b>
<b>IMPACTS THE GENE EXPRESSION OF A PATHOGEN? .....</b>	<b>50</b>
<b>A CASE STUDY ON THE.....</b>	<b>50</b>
<b>PEPPER - <i>PHYTOPHTHORA CAPSICI</i> INTERACTION.....</b>	<b>50</b>
1.1. INTRODUCTION.....	53
1.2. MATERIALS AND METHODS .....	56
1.2.1. PEPPER GENOTYPES, <i>PHYTOPHTHORA CAPSICI</i> ISOLATES AND INOCULATION PROCESS.....	56

1.2.2. LIBRARY PREPARATION AND ILLUMINA TRANSCRIPTOME SEQUENCING .....	57
1.2.3. SELECTION OF A ROBUST SUBSET OF <i>P. CAPSICI</i> GENES AND TMM NORMALIZATION OF <i>P. CAPSICI</i> GENE EXPRESSION DATA .....	58
1.2.4. ESTIMATION OF THE STATISTICAL EFFECT OF BIOLOGICAL FACTORS ON THE <i>P. CAPSICI</i> GENE EXPRESSION .....	58
1.2.5. IDENTIFICATION OF GENES WITH DIFFERENTIAL EXPRESSION (DE) IN DIFFERENT BIOLOGICAL CONDITIONS.....	59
1.2.6. GENE ONTOLOGY (GO) OF SELECTED <i>P. CAPSICI</i> GENES.....	59
1.2.7. QRT-PCR ANALYSIS.....	60
<b>1.3. RESULTS .....</b>	<b>60</b>
1.3.1. DISEASE PROGRESS IN THE BIOLOGICAL CONDITIONS OF INTERACTION .....	60
1.3.2. NON-NORMALIZED READ NUMBER ANALYSIS.....	61
<b>1.3.3. NORMALIZED READ NUMBER ANALYSIS .....</b>	<b>63</b>
<b>1.3.4. DIFFERENTIAL EXPRESSION ANALYSIS .....</b>	<b>63</b>
<b>1.3.5. GENE ONTOLOGY ANALYSIS.....</b>	<b>63</b>
1.3.6. HA GENE EXPRESSION IS ENRICHED IN NUTRIENT ASSOCIATED TRANSPORTER GENES IN THE HOST GENOTYPE COMPARISON .....	64
1.3.7. BETWEEN ISOLATE COMPARISONS HIGHLIGHT DIFFERENTIAL HOST ADAPTATION.....	65
1.3.8. APOPLASTIC EFFECTOR SHOWED ENRICHMENT FOR CELL WALL DEGRADING ENZYMES (CWDE).....	67
1.3.9. THE ISOLATES ARE CONTRASTED ON THEIR SET OF DE CYTOPLASMIC EFFECTORS.....	69
1.3.10. EXPRESSION PATTERNS VALIDATION FOR THE RXLR EFFECTOR CUST_2407 BY QRT-PCR.....	71
<b>1.4. DISCUSSION.....</b>	<b>72</b>
<b>1.5. SUPPLEMENTARY MATERIAL.....</b>	<b>76</b>

**CHAPITRE 2 : EXPRESSION TRANSITOIRE IN PLANTA D'EFFECTEURS DE *PHYTOPHTHORA CAPSICI*  
CHEZ LE PIMENT.....** **94**

<b>2.1. INTRODUCTION.....</b>	<b>95</b>
<b>2.2. OBJECTIFS .....</b>	<b>97</b>
<b>2.3. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>98</b>
2.3.1. MATERIELS VEGETAL ET ISOLATS DE <i>PHYTOPHTHORA CAPSICI</i> .....	98
2.3.2. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE DE <i>P. CAPSICI</i> .....	98
2.3.3. DESIGN DES AMORCES GATEWAY.....	99
2.3.4. CLONAGES .....	100
2.3.5. EXPRESSION TRANSITOIRE IN PLANTA PAR AGRO-INFECTION.....	104
2.3.6. EXPRESSION TRANSITOIRE IN PLANTA PAR INOCULATION MECANIQUE.....	105
2.3.7. ÉVALUATION DE L'ACCUMULATION VIRALE DU PVX PAR DAS-ELISA .....	105
<b>2.4. RESULTATS .....</b>	<b>106</b>
2.4.1. MISE AU POINT DE L'EXPRESSION TRANSITOIRE IN PLANTA SUR PIMENT .....	106
2.4.2. SELECTION DES ACCESSIONS DE PIMENT POUR LE CRIBLAGE.....	107
<b>2.4.3. SELECTION DES EFFECTEURS RXLR POUR LE CRIBLAGE .....</b>	<b>110</b>
2.4.4. ÉTUDE DE L'ACTIVITE D'AVIRULENCE DES EFFECTEURS RXLR .....	111
<b>2.5. DISCUSSION.....</b>	<b>117</b>
2.5.1. LE PIMENT PRESENTE DES PROBLEMES DE COMPATIBILITE POUR LES METHODES D'EXPRESSION TRANSITOIRE IN PLANTA BASEES SUR L'UTILISATION DE <i>RHIZOBIUM RADIOBACTER</i> .....	117
2.5.2. LE NIVEAU D'EXPRESSION DES EFFECTEURS RXLR ENTRE ISOLATS SERAIT POTENTIELLEMENT LIE A LEUR CAPACITE A INDUIRE DES MECANISMES DE DEFENSE CHEZ LE PIMENT. ....	119

<b>2.6. SUPPLEMENTS .....</b>	<b>122</b>
-------------------------------	------------

## **CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DU REPERTOIRE D'EFFECTEURS RXLR EXPRIMES DE *P. CAPSICI*..130**

<b>3.1. INTRODUCTION.....</b>	<b>131</b>
<b>3.2. OBJECTIFS DU CHAPITRE .....</b>	<b>132</b>
<b>3.3. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>133</b>
3.3.1 ISOLATS DE <i>P. CAPSICI</i> ET TEST D'INFECTION .....	133
3.3.2 MAPPING .....	133
3.3.3 DETECTION DES POLYMORPHISMES ET ANALYSE DE LA STRUCTURE GENETIQUE.....	134
3.3.4 GENERATION D'UN FICHIER D'ANNOTATIONS CUSTOMISE .....	134
3.3.5 ANALYSE DE L'EXPRESSION ET DES POLYMORPHISMES CHEZ <i>P. CAPSICI</i> .....	135
<b>3.4. RESULTATS .....</b>	<b>136</b>
3.4.1. STATISTIQUES DE MAPPING .....	136
3.4.2. DESCRIPTION DE LA DIVERSITE DES 33 ISOLATS. ....	137
3.4.3. DESCRIPTION DU REPERTOIRE DES EFFECTEURS RXLR DEPLOYE PAR <i>P. CAPSICI</i> PENDANT L'INTERACTION AVEC LA TOMATE .....	140
<b>3.5. DISCUSSION .....</b>	<b>142</b>
3.5.1 LA STRUCTURE GENETIQUE DES 33 ISOLATS S'EXPLIQUE PARTIELLEMENT PAR L'ORIGINE GEOGRAPHIQUE .....	143
3.5.2. LES ISOLATS DE <i>P. CAPSICI</i> POSSEDENT DES EFFECTEURS CONSERVES PARMIS CEUX QUI SONT EXPRIMES. ....	143
<b>3.6. SUPPLEMENTS .....</b>	<b>145</b>

## **DISCUSSION GENERALE .....**

ÉTUDE TRANSCRIPTOMIQUE DE L'EFFET DU GENOTYPE DE L'HOTE ET DE L'ISOLAT SUR L'EXPRESSION DES GENES DE <i>P. CAPSICI</i> .....	151
LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES EFFECTEURS RXLR, OBSERVEE ENTRE LES ISOLATS HA ET LA, SEMBLE CORRELEE A LEUR ACTIVITE D'AVIRULENCE.....	154
<i>PHYTOPHTHORA CAPSICI</i> POSSEDE UN REPERTOIRE DE CORE-EFFECTEURS CONSEQUENT. ....	155
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>159</b>



## Avant-propos

A l'horizon 2050, les projections prévoient une hausse considérable de la population qui devrait passer la barre des 9 milliards de personnes aggravant ainsi les problèmes d'insécurité alimentaire dans le monde. Pour satisfaire la demande que va causer cette croissance, la production agricole mondiale devrait augmenter de 50%. Mais de nombreux facteurs sont à prendre en compte quant à la difficulté d'augmenter de façon si importante la production. D'une part, l'appauvrissement des sols et la limitation des ressources en eau ainsi que les dégâts occasionnés par les changements climatiques sont des problèmes majeurs qu'il faudra traiter pour parvenir à cet objectif. D'autre part, les pertes occasionnées par les ravageurs et agents pathogènes qui attaquent les plantes risquent aussi d'augmenter et de constituer un autre défi à relever. Pendant des décennies, les produits phytosanitaires ont été employés pour tenter de réduire les dégâts causés par les ravageurs et agents pathogènes mais leur utilisation est de plus en plus controversée et limitée. L'usage de ces produits est hautement dangereux pour notre santé et pour l'environnement. Malgré leur utilisation, les pressions qu'exercent les organismes phytopathogènes n'ont cessé de se multiplier depuis 1960 avec un nombre croissant d'occurrences d'épidémies et la propagation de certains agents pathogènes dans de nouvelles régions du globe (Bebber et al. 2014; Bebber and Gurr 2015; FAO 2017). Enfin, ces agents pathogènes évoluent constamment et des résistances aux produits phytosanitaires sont apparues. La piste génétique a été investiguée depuis des décennies afin de développer une alternative plus 'propre'. Elle se base sur l'utilisation des défenses naturelles des plantes afin d'enrayer le développement des maladies végétales et la propagation des agents pathogènes qui les causent.

Les plantes ont développé des mécanismes de défense prévenant le développement des agents pathogènes qui se basent sur des barrières physiques et chimiques ainsi qu'un système immunitaire se déclenchant après la perception de diverses molécules des agents pathogènes. Ces mécanismes de résistance conduisent à la réduction ou au blocage du développement des maladies. Les pathogènes déploient un arsenal de protéines, appelés effecteurs, afin de perturber les mécanismes de défense de leur plante hôte et promouvoir le développement des maladies (Dodds and Rathjen 2010; Jones and Dangl 2006).

*Phytophthora capsici* est un pathogène tellurique à spectre d'hôte large causant des dégâts conséquents sur des plantes d'intérêt agronomique appartenant à différentes familles telles que les solanacées et les cucurbitacées (Lamour et al. 2012b). A ce jour, le nombre de géniteurs résistants identifiés reste faible et la gestion des épidémies de *P. capsici* nécessite l'emploi de pratiques culturales adaptées ainsi que l'application de fongicides. Cependant, ces approches ne suffisent pas à

limiter les dégâts causés par *P. capsici* lorsque les conditions environnementales sont optimales pour son développement. De plus, des résistances aux fongicides sont apparues et se sont très vite propagées dans les populations situées dans les régions où les traitements sont utilisés (Barchenger et al. 2018). Récemment, les approches effectomiques, se basant sur l'utilisation des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) pour analyser divers aspects de la biologie des effecteurs, ont permis d'accélérer l'étude des effecteurs et ainsi d'aider la découverte de nouvelles résistances chez les plantes (Pais et al. 2013; Vleeshouwers and Oliver 2014a).

L'utilisation des effecteurs de *P. capsici* pour rechercher des géniteurs résistants est une stratégie prometteuse. Cela nécessite une connaissance approfondie des mécanismes moléculaires et du répertoire d'effecteurs déployés par l'agent pathogène pendant l'interaction avec l'hôte. Le sujet de thèse s'intègre dans le contexte de la recherche de nouveaux géniteurs résistants à *P. capsici*. L'introduction se structurera en 5 parties, replaçant le contexte de cette thèse. La première traitera des mécanismes moléculaires sous-jacents au système immunitaire des plantes. La deuxième présentera les outils moléculaires déployés par les Oomycètes afin de promouvoir la maladie. Les différents déterminismes génétiques des résistances des plantes seront décrits et un bref résumé des connaissances sur leur durabilité sera fait dans la troisième partie. L'effectomique et ses utilités pour les sélectionneurs seront expliquées dans la quatrième partie. Le modèle d'étude Solanacée (piment et tomate) - *P.capsici* utilisé dans cette thèse, est présenté dans la cinquième partie. Enfin, les objectifs seront énoncés.

---

## Introduction générale

---

# 1. Le système immunitaire des plantes

Les plantes, organismes sessiles, sont entourées par une multitude de micro-organismes. En effet, un gramme de sol peut contenir plus d'un milliard de bactéries et plus de 200 millions de champignons (Bardgett 2005; Roesch et al. 2007). Malgré cela, la maladie reste un fait rare chez les végétaux en milieu naturel. Pour se défendre, les plantes ont mis en place des mécanismes constitutifs pour prévenir la pénétration de leur épiderme par des agents pathogènes. Elles disposent de parois cellulaires recouvertes d'une cuticule de cire qui constitue leur première barrière de défense (Hématy et al. 2009; Malinovskiy et al. 2014). En complément, plusieurs molécules de leur métabolisme secondaire sont toxiques ou ont une fonction inhibitrice sur le développement des micro-organismes. Ces molécules constituent des barrières de défense chimique appelées anticypines (Dixon 2001). En réponse, les pathogènes se sont adaptés et ont développé des outils afin de réduire ou d'annuler l'effet de ces barrières et permettre leur entrée et leur développement au sein des tissus internes de leur hôte. En retour, pour contrer ces outils, les plantes ont établi un système immunitaire complexe déclenché par la perception soit de signatures moléculaires du pathogène, soit de l'activité biologique de ce dernier (Dodds and Rathjen 2010; Jones and Dangl 2006).

## 1.1. Les plantes perçoivent les molécules conservées des agents pathogènes

Les plantes sont capables de percevoir des molécules spécifiques des agents pathogènes afin de déclencher leurs mécanismes de défense associés à la défense dite 'basale' (Boller and Felix 2009; Dodds and Rathjen 2010; Jones and Dangl 2006). Cette perception se fait dans l'espace extracellulaire grâce à l'action de récepteurs PRR ou 'Pattern Recognition Receptor'. Les PRR sont catégorisés en deux groupes : les récepteurs kinases ou RK et les récepteurs analogues aux RK, les Receptor-like proteins ou RLP. Les PRR partagent un domaine extracellulaire permettant la reconnaissance des molécules de pathogènes et un domaine transmembranaire qui conditionne leur localisation aux membranes plasmiques. Ils diffèrent par la présence d'un domaine kinase intracellulaire qui est manquant chez les RLP (Zipfel 2014). Les récepteurs de types RK peuvent aussi être classés selon la nature du domaine extracellulaire qui peut être un domaine 'leucine-rich repeat' LRR ou un 'lysine motif' (LysM) (Cui et al. 2015)

Les molécules reconnues par ces récepteurs sont souvent conservées, partagées chez de nombreuses espèces, et présentent une évolution lente chez les pathogènes : ce sont les PAMP ou MAMP pour 'Pathogen Associated Molecular Patterns' ou 'Microbe Associated Molecular Patterns'. Ce sont des molécules de nature diverse incluant des sucres, des lipides et des protéines. Les

oligosaccharides composant les parois cellulaires chez les champignons et les oomycètes ainsi que le peptidoglycane qui compose les parois des bactéries font par exemple partie des PAMP/MAMP (Boller and Felix 2009; Dodds and Rathjen 2010; Jones and Dangl 2006). D'autres molécules endogènes de la plante peuvent être détectées par les PRR : ce sont les DAMP ou 'Damage Associated Molecular Patterns'. Ils sont marqueurs de la présence d'un élément pathogène dans l'organisme, et de son effet sur le métabolisme de la plante. On en distingue deux types. Le premier se compose de débris moléculaires issus des dégâts produits par l'action des pathogènes sur les tissus de la plante. Les seconds sont des peptides produits par la plante elle-même suite à l'endommagement de ces tissus par les pathogènes (Boller and Felix 2009; Yamaguchi and Huffaker 2011; Gust et al. 2017).

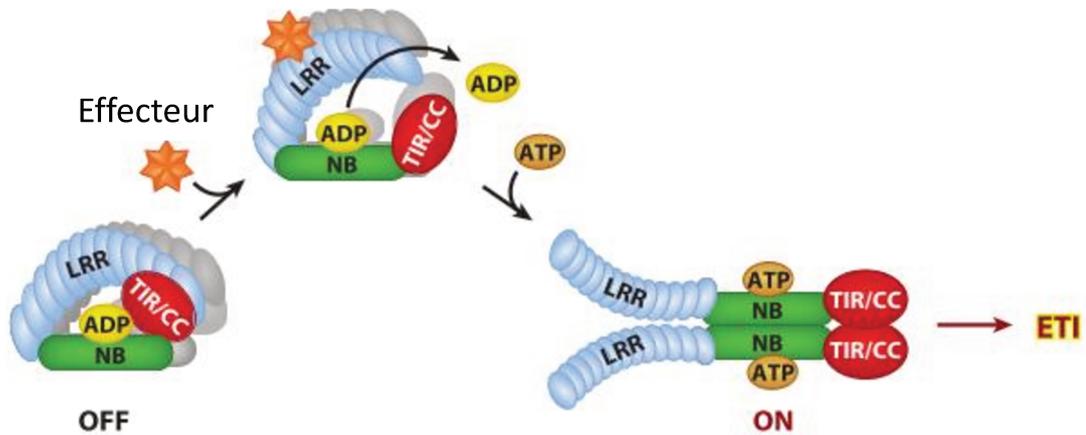
L'exemple de PAMP le plus connu est celui de la flagelline des bactéries. Elle est reconnue par un récepteur LRR-RK FLS2 (FLAGELLIN SENSING 2) identifié chez *Arabidopsis thaliana* (Gómez-Gómez and Boller 2000; Zipfel et al. 2004). Il se lie physiquement à la flagelline par l'intermédiaire d'un petit épitope de 22 acides aminés, *flg22* (Chinchilla 2006; Felix et al. 1999; Sun 2013). La perception de cette épitope par FLS2 entraîne le recrutement de BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1), analogue des récepteurs SERK (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE), qui est un récepteur LRR-RK localisé dans la membrane plasmique. BAK1 joue le rôle de co-récepteur et est un régulateur nécessaire pour l'activation des réponses de signalisation cellulaire ayant lieu en aval (Chinchilla et al. 2007; Heese et al. 2007). Il est un régulateur crucial de la perception du pathogène et s'associe aussi à d'autres récepteurs tels que le PRR EFR (ET-TU RECEPTOR) qui reconnaît le PAMP Ef-tu, et PEPR1 et PEPR2 (PEP1 RECEPTOR) qui reconnaissent le DAMP Pep1 et ses homologues (Chinchilla et al. 2007; Heese et al. 2007; Schulze et al. 2010; Roux et al. 2011).

## **1.2. La perception des effecteurs**

Pour contrer les réactions de défense mises en place après la perception des PAMP/MAMP et DAMP, les pathogènes ont développé un arsenal complexe d'effecteurs (Dodds and Rathjen 2010; Win et al. 2012). Ces effecteurs sont généralement des protéines sécrétées, à évolution rapide, spécifiques de certaines races de pathogènes et qui présentent des rôles divers (Hogenhout et al. 2009; Asai and Shirasu 2015; Lo Presti et al. 2015; T. Y. Toruño and Coaker 2016; Wang and Wang 2018). En réponse à ces effecteurs, les plantes déploient des récepteurs capables de les reconnaître, induisant ainsi une réaction de défense forte qui arrête, dans la majorité des cas, le développement du pathogène. Cette réaction est souvent associée à une réaction analogue à la mort cellulaire programmée, aussi appelée réponse hypersensible (HR) (Dodds and Rathjen 2010; Jones and Dangl 2006). La réponse hypersensible se manifeste par l'apparition d'une zone nécrotique, localisée au

point d'infection, visant à stopper la progression du pathogène dans les tissus de la plante. Elle est contrôlée par l'activation de récepteurs appelé 'Nucleotide-binding domain Leucine-Rich repeat containing' ou NLR (Jacob et al. 2013; Jones et al. 2016). Les NLR partagent un domaine NB 'Nucleotide-Binding' et un domaine 'Leucine-rich repeat' LRR C-terminal (Jacob et al. 2013; Jones et al. 2016). La présence de domaines N-terminaux, Toll-interleukin 1 (TIR) ou 'coiled coil' (CC) permet de les subdiviser en deux catégories : les 'Toll-interleukin receptor domain containing NB-LRR' ou TNLs et les 'Coiled-coil receptor domain containing NB-LRR' ou CNLs (Jacob et al. 2013; Jones et al. 2016). Ils sont maintenus inactifs par leur domaine TIR ou CC et liés à une molécule d'ADP en temps normal. La perception d'un effecteur ou de son activité entraîne un changement de conformation, l'échange de l'ADP pour une molécule d'ATP et l'activation de celui-ci (Cui et al. 2015) (Figure 1). Dans certains cas, la traduction du signal en réponse cellulaire nécessite le recrutement d'autres récepteurs NLR appelés 'helper' et la formation de complexes (Cui et al. 2015; Jacob et al. 2013; Jones et al. 2016).

### a. Interaction directe



### b. Interaction indirecte

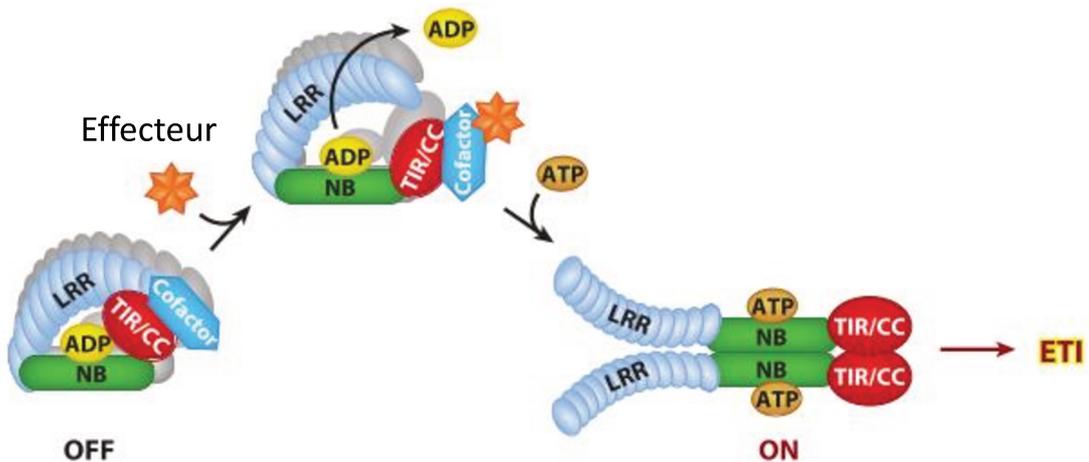


Figure 1 : Activation des récepteurs NLRs par les effecteurs (adapté de Cui et al. 2015). Les récepteurs NLRs peuvent percevoir les effecteurs par interaction directe (liaison de l'effecteur au récepteur) ou percevoir l'action de ces effecteurs sur une protéine de la plante ciblée ou un leurre (modèles 'Guard' et 'Decoy'). Suite à l'interaction directe (partie A) ou indirecte (partie B) avec l'effecteur, le récepteur NLR est activé. Cette activation conduit au remplacement de la molécule d'ADP en molécule d'ATP. Les récepteurs NLRs forment ensuite des complexes afin de transmettre le signal et induire l'ETI ou 'Effector Triggered Immunity'.

### **1.3. La perception des agents pathogènes induit des réponses cellulaires complexes.**

La perception du pathogène par la plante induit plusieurs étapes de signalisation nécessaires pour le déclenchement des défenses de la plante. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la reconnaissance des PAMP et MAMP ont reçu énormément d'attention de la part de la communauté scientifique comme en témoignent plusieurs revues (Boller and Felix 2009; Zipfel 2014; Couto and Zipfel 2016).

Quelques minutes après la perception des PAMP, MAMP, ou DAMP, la production de plusieurs messagers cellulaires est initiée. Dans les deux premières minutes qui suivent la détection du pathogène, des influx d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  causent la dépolarisation de la membrane (Boller and Felix 2009). L'ion  $\text{Ca}^{2+}$  est un messager secondaire ubiquitaire dans la signalisation des cellules végétales. Il joue notamment un rôle lors des réponses précoces de l'immunité. En effet, l'influx d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'oxyde nitrique (NO). Le « burst » oxydatif contribue à la défense de l'hôte contre l'agent pathogène (Boller and Felix 2009; Frederickson Matika and Loake 2014; Seybold et al. 2014). Tout d'abord, les ROS produites par l'hôte causent la destruction des membranes plasmiques par peroxydation et endommagent les protéines et acides nucléiques des pathogènes (Grant and Loake 2000). En plus de leur rôle cytotoxique, ils contribuent au renforcement des parois cellulaires de l'hôte par la création de liaisons croisées entre les protéines et certains polysaccharides. Enfin, les ROS et le NO vont causer des changements du statut redox de la cellule qui seront perçus par des protéines régulatrices en aval (Frederickson Matika and Loake 2014). L'influx de calcium conduit aussi à l'activation de la cascade de 'Mitogen-Activated Protein Kinases' ou MAPK qui régulent la réponse des plantes aux stress. Cette cascade se compose de trois kinases consécutives, la MAPK kinase kinase (MAPKKK), la MAPK kinase (MAPKK) et la MAPK (Dodds and Rathjen 2010; Jones and Dangl 2006; Lee et al. 2015). Le burst oxydatif ainsi que l'activation de la cascade de MAPK entraîne la modification des protéines par phosphorylation et S-nitrosylation contribuant ainsi à la propagation et à l'amplification du signal produit par la perception du pathogène. Ils contrôlent ainsi les réponses cellulaires ayant lieu ensuite (Boller and Felix 2009).

Suite à ces changements cellulaires très précoces, la production de phyto-hormones associées aux stress biotiques est observée (Boller and Felix 2009). Ces hormones incluent l'acide salicylique (SA), généralement associé à l'interaction avec des pathogènes biotrophes (qui gardent les tissus de l'hôte vivant), ainsi que l'acide jasmonique (JA) et l'éthylène (ET) qui sont associés aux interactions avec les pathogènes nécrotrophes (causant la nécrose des tissus) (Bari and Jones 2009; Loake and Grant 2007; Wasternack and Hause 2013). Elles jouent le rôle de chef d'orchestre en

induisant et régulant la reprogrammation de l'expression des gènes de la plante (Moore et al. 2011; Eulgem and Somssich 2007; Frederickson Matika and Loake 2014; Wu et al. 2012). Environ 10 à 20 minutes après la perception du pathogène, l'endocytose du récepteur activé est observée. Ce processus est supposé être une mesure de protection pour éviter une activation continue du récepteur et des systèmes de défense. Il s'ensuit sa dégradation ciblée au protéasome (Boller and Felix 2009; Couto and Zipfel 2016; Malinovsky et al. 2014). Plusieurs heures après l'infection (réponses tardives), des dépôts de callose sont induits au point d'infection. La callose est un polymère de  $\beta$ -(1,3)-glucane à haut poids moléculaire qui joue le rôle de matrice visant à stopper ou ralentir la progression du pathogène. Dans certains cas, le déclenchement de ces mécanismes de défense entraîne un ralentissement de la croissance de la plante (Boller and Felix 2009).

Les réponses cellulaires qui suivent la perception des effecteurs sont très similaires à celles ayant lieu après la perception des PAMP/MAMP/DAMP. L'étude des changements transcriptomiques de la plante après perception de la flagelline et d'effecteurs a révélé la redondance des réponses de l'hôte suite à la perception de ces molécules (Navarro et al. 2004; Tao et al. 2003). Outre les similarités de changements transcriptomiques, le « burst » oxydatif, les cascades de MAPK et la production de phyto-hormones associées aux stress sont aussi des mécanismes moléculaires partagés dans les deux cas.

Cependant, des différences quantitatives ont été observées et semblent expliquer les contrastes entre les résistances basales induites par la perception des PAMP/MAMP/DAMP et les résistances fortes à totales induites par la perception des effecteurs. Ces différences portent soit sur l'amplitude, soit sur la durée d'activation des réponses cellulaires contrôlant le déclenchement des défenses (Tsuda and Katagiri 2010; Fu and Dong 2013; Tsuda et al. 2013; Cui et al. 2015). Par exemple, le « burst » oxydatif biphasique, qui est caractéristique du déclenchement du système immunitaire de la plante, est plus intense après perception d'un effecteur qu'après la perception des PAMP/MAMP/DAMP (Torres et al. 2006). Pour les cascades de MAPK, la différence porte sur la durée de leur activation. En effet, Underwood et al. (2007) ont montré que l'activation des MAPK après perception de l'effecteur AvrRpt2 de *Pseudomonas syringae* durait plus longtemps qu'après perception de l'épitope *flg22* de la flagelline.

Les réponses qui suivent la perception des effecteurs semblent plus robustes aux perturbations causées par les pathogènes que celle induites par la perception des PAMP/MAMP/DAMP (Katagiri and Tsuda 2010; Tsuda and Katagiri 2010; Tsuda et al. 2009). Dans une étude portant sur les défenses mises en place par des lignées d'*Arabidopsis thaliana* mutées pour des composants cruciaux des régulations hormonales de stress, Tsuda et al. (2009) ont révélé les compensations existantes entre les voies de régulation de SA, JA et ET pendant la réponse

immunitaire et suggéré que ces compensations pouvaient être à l'origine de la robustesse du système immunitaire des plantes.

Dans leur revue, Cui et al. (2015) ont résumé les similarités existantes entre les réponses cellulaires induites par la perception des PAMP/MAMP/DAMP et par celles des effecteurs ; ils ont proposé des hypothèses expliquant les différences quantitatives observées. Ils proposent que les réponses, plus fortes en intensité et plus longues, induites chez l'hôte après la perception des effecteurs expliqueraient les réactions de défense fortes à totales souvent observées lors de la reconnaissance spécifique d'un agent pathogène. Ils proposent une seconde explication liée aux mécanismes d'autorégulation du système immunitaire. En effet, différents mécanismes régulent les réponses cellulaires induites par la perception des PAMP/MAMP/DAMP par les PRR. Ces mécanismes incluent la régulation des PRRs par des pseudokinases, le contrôle des statuts de phosphorylation, le recyclage des protéines, la régulation des MAPK ainsi que la régulation des réponses transcriptomiques (Couto et Zipfel 2016).

En 2006, Jones and Dangl ont proposé un modèle intégrant les différents mécanismes conduisant à la résistance des plantes via le système immunitaire : c'est le modèle 'zig-zag' largement repris aujourd'hui (Figure 2). Ce modèle caractérise le système immunitaire en deux phases avec la 'PAMP triggered immunity' (PTI) et 'l'Effector triggered immunity' (ETI). Dans ce modèle la PTI provoque le déclenchement des réponses basales induites par la perception des MAMP/PAMP conservés chez les pathogènes alors que l'ETI est responsable de la résistance totale de la plante induite par la perception des effecteurs très divers et spécifiques de certaines races de pathogènes. Cependant, plusieurs exemples suggèrent que cette vision est trop simpliste. Comme Thomma et al. (2011) l'ont résumé, certains PAMP sont spécifiques de certains agents pathogènes. De plus, la PTI peut aussi résulter en des réponses fortes et induire des HR. Enfin, certains NLR induisent des résistances faibles. Par exemple, la résistance conférée par RPS4 qui reconnaît l'effecteur AvrRps4 de *Pseudomonas syringae* chez *Arabidopsis thaliana* est assez faible (Wirthmueller et al. 2007).

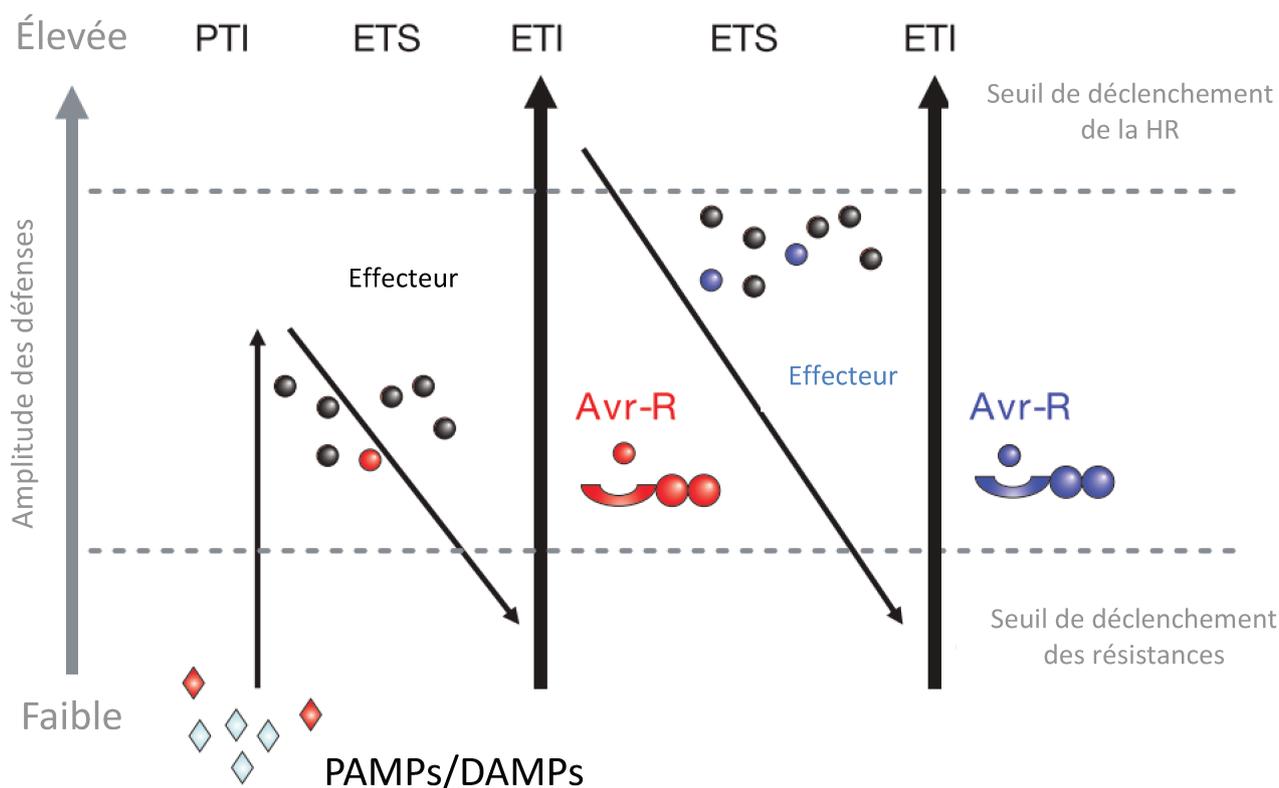


Figure 2 : Modèle zig-zag adapté de Jones and Dangl (2006). Lors de la perception des PAMP/MAMP/DAMP, la PTI ou 'PAMP triggered immunity' est induite et entraîne la mise en place des défenses basales de la plante. L'agent pathogène sécrète des effecteurs qui vont supprimer la PTI et rétablir la maladie : c'est l'ETS ou 'Effector Triggered Susceptibility'. Certains effecteurs (gènes Avr) sont reconnus par les récepteurs NLR de la plante (gènes R). Cette reconnaissance induit l'ETI ou 'Effector triggered immunity', responsable des réactions de défenses fortes incluant la HR ou réponse hypersensible. Les pathogènes et la plante sont engagés dans une course à l'armement qui résulte en l'apparition des nouveaux effecteurs capables de rétablir l'ETS et de nouveaux récepteurs NLR qui vont les reconnaître.

## 2. Les Oomycètes sont des agents pathogènes redoutables

### 2.1. Les oomycètes phytopathogènes

Malgré les nombreux mécanismes de défense des plantes, certains microorganismes sont capables de se développer sur leur hôte en parvenant à court-circuiter le système immunitaire des plantes. *Phytophthora infestans*, aussi connu sous le nom de 'destructeur de plantes', est l'un des plus célèbres de ces pathogènes. Il est responsable du mildiou de la pomme de terre à l'origine de la famine ayant eu lieu en Irlande au 19<sup>ème</sup> siècle (Fry 2008). Malgré des décennies de recherches, il est

toujours considéré comme une menace importante pour les cultures (Fry et al. 2015; Haverkort et al. 2008).

*P. infestans* fait partie de la classe des oomycètes. Ce sont des organismes filamenteux partageant des caractéristiques morphologiques avec les champignons, telles que la croissance mycélienne et la reproduction via des spores, mais appartenant au groupe des algues brunes straménopiles (Richards et al. 2006; Beakes et al. 2012). L'ordre des oomycètes est divisé en plusieurs grands clades : les clades basaux, le clade des Saprolegniales et le clade des Péronosporales (Figure 3). Les clades basaux comprennent une petite fraction des espèces d'Oomycètes connues qui sont des agents pathogènes d'organismes principalement marins tels que des crustacés, des mollusques et des algues (Thines 2014). La plupart des espèces appartenant au clade des Saprolegniales sont des parasites d'animaux ou des organismes saprophytes. Le plus célèbre d'entre elles est *Saprolegnia parasitica* qui attaque des poissons et cause des dégâts considérables en aquaculture (Kamoun et al. 2014; Derevnina et al. 2016b). *P. infestans* appartient au clade des Péronosporales qui contient le plus grand nombre d'espèces et dont 60% d'entre-elles sont phytopathogènes. Les Pythium, les Albugnales et les Phytophthora, qui sont connus pour être des agents pathogènes dévastateurs pour les cultures et écosystèmes naturels (Beakes et al. 2012; Derevnina et al. 2016b).

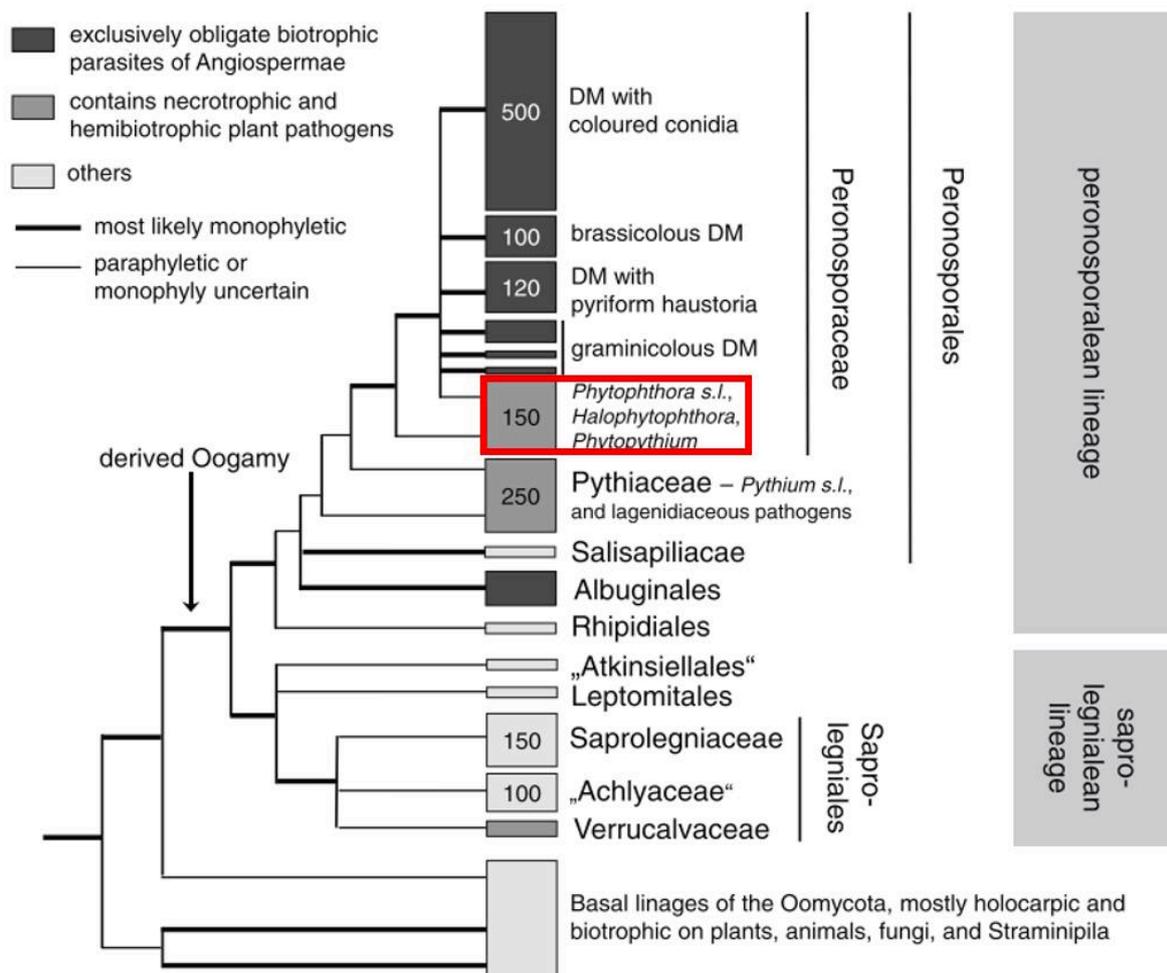


Figure 3 : Vue d'ensemble de la phylogénie des Oomycètes adapté de Thines (2014). Le genre *Phytophthora* est encadré en rouge.

Contrairement aux champignons qui présentent un mycélium haploïde et des parois cellulaires composées principalement de chitine, les Oomycètes ont un mycélium diploïde et des parois cellulaires composées de cellulose. Leur cycle de reproduction asexuée produit des sporanges qui libèrent des zoospores. Ces sporanges et zoospores sont capables de se disperser via l'eau ou le vent. Les Oomycètes phytopathogènes peuvent présenter différents styles de vie (Figure 4). Certains comme *Hyaloperonospora arabidopsidis* et *Plasmopara viticola* sont biotrophes obligatoires. Ils ont besoin des cellules vivantes de l'hôte pour accomplir leur cycle de développement. A l'inverse, les Oomycètes nécrotrophes tel que *Pythium ultimum* dégradent les cellules et provoquent la nécrose des tissus de l'hôte pour se développer. Enfin, certains Oomycètes telle que la majorité des espèces du genre *Phytophthora* auquel appartiennent *Phytophthora infestans* et *Phytophthora capsici*, sont hémibiotrophes. Leur cycle de développement comprend une phase d'interaction précoce biotrophique suivie d'une transition vers une phase d'interaction tardive nécrotrophique (Fawke et al. 2015; Thines 2014).

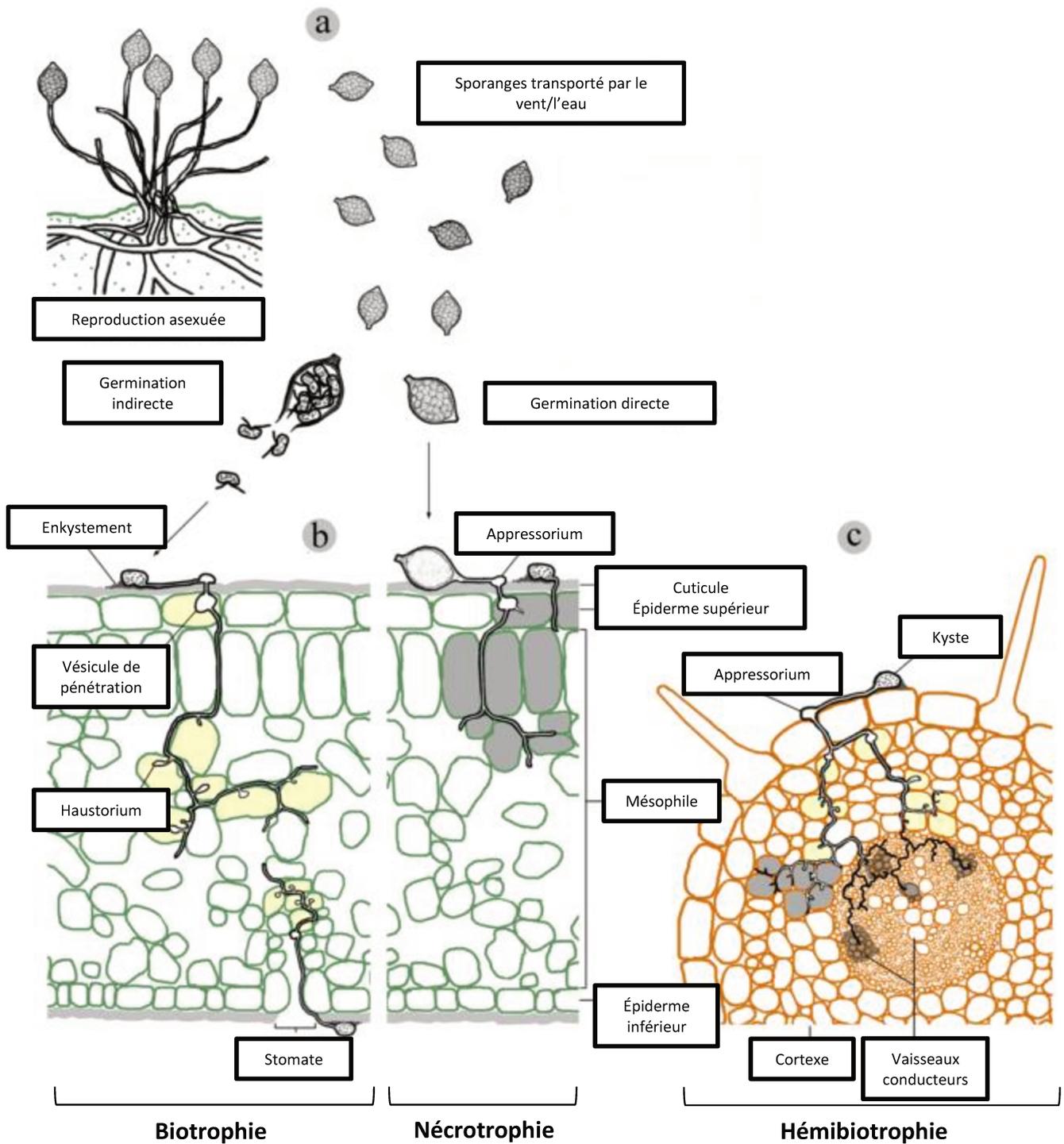


Figure 4 : Style de vie des oomycètes phytopathogènes (adapté de Fawke et al. 2015). (a) Structure de dispersion des *Phytophthora* spp. issus de la reproduction asexuée. (b) Colonisation d'une feuille. (c) Colonisation d'une racine. Les méthodes de germination directe, via un sporange, ou indirecte, via une zoospore, ont été représentées. Les différents styles de vie ont été schématisés. Les cellules colonisées par des Oomycètes biotrophes (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) sont colorées en jaunes et celles colonisées par des Oomycètes nécrotrophes (*Pythium ultimum*) sont grisées. Pour la colonisation de la racine par un oomycète hémibiotrophe (*Phytophthora capsici*), l'interaction est d'abord biotrophique puis devient nécrotrophique.

## 2.2. Les effecteurs des Oomycètes phytopathogènes

Les Oomycètes sont des pathogènes très efficaces capables de court-circuiter le système immunitaire de leur hôte pour permettre leur développement. Pour y parvenir, ils sécrètent des effecteurs qui vont perturber les mécanismes moléculaires associés au déclenchement des résistances. Ces effecteurs sont classés en deux catégories en fonction de la localisation où ils accomplissent leur fonction moléculaire : on distingue les effecteurs apoplastiques des effecteurs cytoplasmiques (Figure 5)(Bozkurt et al. 2012; Giraldo and Valent 2013; Kamoun 2006; Schornack et al. 2009; Sharpee and Dean 2016).

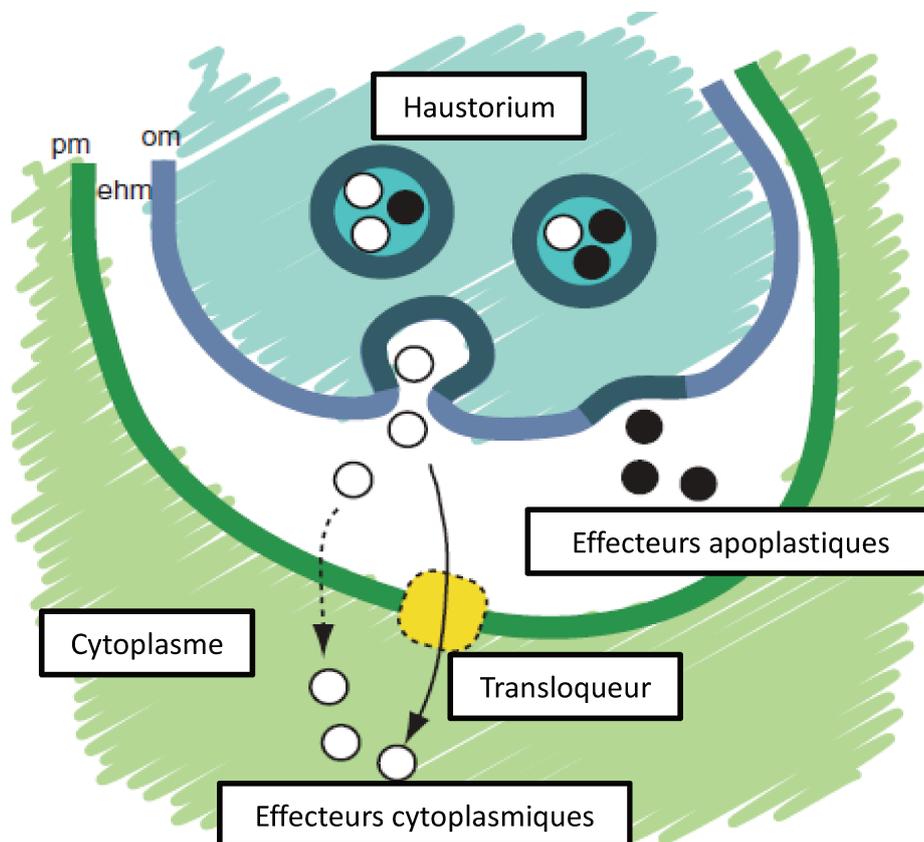


Figure 5 : Schéma de la sécrétion d'effecteur par l'haustorium d'un Oomycète (adapté de Schornack et al. 2009). Les effecteurs apoplastiques (ronds noirs) sont sécrétés dans l'espace extracellulaire ou espace extrahaustorial (ehm) qui se situe entre la membrane de l'haustorium de l'oomycète (om) et la membrane plasmique du cytoplasme de la cellule hôte (pm). Les effecteurs cytoplasmiques (ronds blancs) sont sécrétés dans l'espace extracellulaire puis transloqués dans le cytoplasme de la cellule hôte.

### 2.2.1. Les effecteurs apoplastiques

Les effecteurs apoplastiques sont sécrétés et accomplissent leur rôle dans l'espace extracellulaire délimité par les parois pectocellulosiques et formé par les espaces vides entre les cellules végétales, appelé l'apoplasme. Ils jouent des rôles variés pour l'agent pathogène incluant la modification des parois cellulaires de l'hôte, la protection contre les protéines de défense de l'hôte et l'acquisition de molécules indispensables à sa croissance (Giraldo and Valent 2013; Kamoun 2006; Schornack et al. 2009; Sharpee and Dean 2016). Les Oomycètes sécrètent des enzymes de dégradation des parois ('Cell Wall Degrading Enzymes', CWDE), des élicitines et des 'Cellulose Binding Elicitor Lectins' (CBEL). Les CWDE dégradent les polysaccharides complexes composant les parois cellulaires végétales et permettent la pénétration des haustoria qui sont les structures de nutrition du pathogène (Ospina-Giraldo et al. 2010). Les élicitines sont des protéines sécrétées par l'agent pathogène qui induisent les réactions de défense des plantes, une fois reconnues par le système immunitaire. Elles ont des rôles multiples. Certaines semblent participer à la captation des stérols, des molécules que les Oomycètes du genre *Phytophthora* ne peuvent pas synthétiser, qui sont indispensables à l'accomplissement du cycle de développement du pathogène (Derevnina et al. 2016a; Kamoun 2006). D'autres élicitines codent des phospholipases qui sont responsables de la production d'acide phosphatidique (PA), un second messager impliqué dans la signalisation de divers stress (Nespoulous et al. 1999). Les CBEL sont impliquées dans l'adhésion du pathogène aux parois des cellules de l'hôte, elles induisent les défenses des plantes lorsqu'elles sont reconnues (Gaulin et al. 2006; Séjalon-Delmas et al. 1997). Une partie des défenses des plantes se base sur l'activité d'enzymes visant à dégrader les protéines et parois cellulaires des agents pathogènes. Pour se prémunir de l'action de ces enzymes, les Oomycètes sécrètent des inhibiteurs tels que des inhibiteurs de glucanases qui vont prévenir la dégradation de leurs parois cellulaires (Brown et al. 2000; Rose et al. 2002; Damasceno et al. 2008), des inhibiteurs de protéases du type 'Kazal-like' et des inhibiteurs du type 'cystatin-like' qui inhibent l'activité des protéases de la plante (Kamoun 2006; Sharpee and Dean 2016).

Les Oomycètes nécrotrophes et hémibiotrophes (en phase tardive d'interaction) sécrètent des effecteurs qui provoquent la lyse des cellules végétales et l'apparition de nécroses des tissus végétaux. Ces effecteurs nécrotiques incluent les protéines de la famille des 'PcF' et 'PcF-like' qui sont de petites protéines riches en cystéine (Kamoun 2006; Wawra et al. 2012) et les protéines de la famille des 'NEP1-like proteins' (NLP) analogues aux 'Necrosis and Ethylene-inducing Proteins' (NEP) des champignons (Bailey et al. 1997; Pemberton and Salmond 2004).

## 2.2.2. Les effecteurs cytoplasmiques

Contrairement aux effecteurs apoplastiques, les effecteurs cytoplasmiques jouent leur rôle dans le cytoplasme des cellules végétales où ils sont transloqués après leur sécrétion dans la plante. On distingue deux familles : les effecteurs RxLR et les effecteurs 'Crinkler And Necrosis' (CRN).

### i. Les effecteurs RxLR

Les effecteurs RxLR-EER, appelés plus simplement les RxLR, sont des protéines modulaires qui contiennent à l'extrémité N-terminale un signal peptide impliqué dans la sécrétion, ainsi qu'un motif conservé RxLR contrôlant la translocation de ces effecteurs dans le cytoplasme des cellules hôtes, et en position C-terminal un domaine dont dépend la fonction moléculaire des effecteurs (Schornack et al. 2009). Le motif RxLR se caractérise par la présence d'une arginine (R) suivie d'un acide aminé variable (x), d'une leucine (L) et d'une autre arginine (R). Il est similaire au motif de translocation trouvé chez les espèces de *Plasmodium*, agent de la malaria, présents dans les globules rouges. Il est souvent suivi d'un motif 'EER', composé de deux acides glutamiques (E) et d'un arginine (R) (Bhattacharjee et al. 2006; Rehmany 2005). Ce motif RxLR est indispensable à la translocation des effecteurs RxLR dans le cytoplasme des cellules hôtes (Whisson et al. 2007; Dou et al. 2008b). Le domaine C-terminal présente dans certains cas, un ou des motifs WY qui sont nécessaires à la virulence du pathogène (Bos et al. 2006; Dou et al. 2008a; Jiang et al. 2008; Sohn et al. 2007). Les effecteurs RxLR appartiennent à une famille multigénique de gènes dont le nombre varie entre les espèces et genre d'Oomycètes (Jiang et al. 2008; Tyler 2006). De façon surprenante, leur nombre est très important chez la plupart des espèces du genre *Phytophthora* (563 prédits chez *Phytophthora infestans*, (Haas et al. 2009) ; 357 prédits chez *Phytophthora capsici*, (Lamour et al. 2012a)) comparativement aux espèces appartenant à d'autres genres tel que *Albugo candida* (26 variant RxL prédit, (.Links et al. (2011)) ou *Pythium ultimum* (aucun RxLR prédit, (Lévesque et al. 2010)). Plusieurs études ont révélé que les effecteurs RxLR contribuent positivement à la virulence des espèces de *Phytophthora* en supprimant les réactions de défense des plantes (Fabro et al. 2011; Wang et al. 2011). Avec un rôle parfois quantitatif (Badel et al. 2013; Pel et al. 2014), les effecteurs RxLR ciblent différents mécanismes moléculaires associés à la signalisation chez l'hôte pour court-circuiter le système immunitaire (Zheng et al. 2014). Il a été montré que plusieurs effecteurs RxLR ciblent les mêmes protéines qui sont des 'hubs' cellulaires interagissant avec différents composants du système immunitaire (Mukhtar et al. 2011; Weßling et al. 2014).

## ii. Les effecteurs CRN

Initialement identifiés comme étant responsables de nécroses chez *N. benthamiana* (Torto et al., 2003), les 'Crinklers and Necrosis' (CRN) constituent une autre famille d'effecteurs cytoplasmiques décrits chez les Oomycètes (Schornack et al. 2009; Amaro et al. 2017). Comme les RxLR, ce sont des protéines modulaires qui se composent d'un signal peptide, d'un motif de translocation conservé 'LxLFLAK' (leucine, acide aminé variable, leucine, phenylalanine, leucine, alanine et d'une lysine) suivi d'un motif HVLVxx (histidine, valine, leucine, valine suivi de deux acides aminés variables) et d'un domaine C-terminal (Schornack et al. 2009; Amaro et al. 2017). Comme avec les RxLR, le motif de translocation est nécessaire pour le passage des CRN de l'espace extracellulaire au cytoplasme des cellules hôtes (Haas et al. 2009; Win and Kamoun 2008). La plupart des CRN ciblent le noyau de la cellule hôte une fois transloqués dans le cytoplasme (Stam et al. 2013b). Cette localisation est nécessaire pour l'induction des nécroses (Liu et al. 2011; Schornack et al. 2010). Bien qu'initialement associés aux nécroses, un grand nombre d'effecteurs CRN n'en induisent pas (Stam et al. 2013a) et certains d'entre eux suppriment même l'apparition de nécrose (Liu et al. 2011; Shen et al. 2013). Bien que moins d'informations soient disponibles concernant les fonctions moléculaires des effecteurs CRN et leurs cibles chez la plante comparativement aux effecteurs RxLR, leur présence chez tous les Oomycètes et chez de nombreux eucaryotes suggère qu'ils jouent un rôle important pour ces organismes (Schornack et al. 2010; Stam et al. 2013a; Zhang et al. 2016).

## 3. La résistance des plantes

Les plantes et leurs pathogènes sont impliqués dans une course à l'armement. Les unes développent des gènes de résistance leur permettant de réduire l'impact des maladies ; les autres développent des moyens efficaces de contournement de ces résistances. Ainsi, chaque organisme applique une pression de sélection sur l'autre, influençant son évolution (Zhan et al. 2015).

On classe les résistances des plantes en deux catégories suivant la façon dont elles contrôlent le développement de la maladie. On distingue les résistances qualitatives qui se caractérisent par un arrêt total de la progression de l'agent pathogène, des résistances quantitatives, qui provoquent le ralentissement de sa propagation (Niks et al. 2015).

### 3.1 Les résistances qualitatives se caractérisent par un arrêt de la maladie

Les résistances qualitatives sont contrôlées par des gènes à effet majeur qui sont souvent des récepteurs NLR reconnaissant des effecteurs spécifiques de certaines races de pathogènes (Dodds and Rathjen 2010; Jones and Dangl 2006). Les récepteurs PRRs, qui reconnaissent les PAMP, MAMP et DAMP, et qui sont généralement associés aux défenses basales, peuvent aussi induire des défenses fortes, voir totales dans certains cas (Lacombe et al. 2010; Thomma et al. 2011). Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le fonctionnement de la reconnaissance du pathogène par les récepteurs végétaux. Flor a d'abord proposé le modèle 'gène pour gène'. Il stipule qu'un gène contrôlant une résistance majeure (gène *R*) reconnaît le facteur d'avirulence (effecteur) codé par un gène *Avr* qui lui est spécifique (Flor 1971). Depuis, des efforts considérables ont permis de décrire ces gènes de résistance et d'identifier les mécanismes déclenchant les défenses. D'après Kourelis et van der Hoorn (2018), 314 gènes *R* ont été identifiés chez les plantes et 128 ont eu leurs mécanismes moléculaires de fonctionnement révélés. L'étude de ces gènes de résistance a démontré que si la perception des effecteurs par liaison directe avec le récepteur est vraie pour certains gènes *R*, ce n'est pas toujours le cas. En effet, les effecteurs peuvent être reconnus indirectement. Cette reconnaissance peut se faire en détectant les modifications causées par un effecteur sur une protéine de la plante (modèle de garde). C'est le cas de l'effecteur de *Pseudomonas syringae* *AvrPto*, qui est reconnu par le NB-LRR *Prf* une fois qu'il se lie à la protéine *Pto* de la tomate (Dangl and Jones 2001). La reconnaissance indirecte peut aussi se faire grâce à la surveillance de leurres mis en place par la plante pour mimer la cible d'un effecteur (modèle 'decoy', Hoorn et Kamoun 2008). Dans certains cas, le 'decoy' est intégré au NLR ou est porté par un NLR qui va former un complexe avec un autre NLR appelé 'helper' qui va transmettre le signal (modèle 'integrated decoy', Cesari et al. 2014).

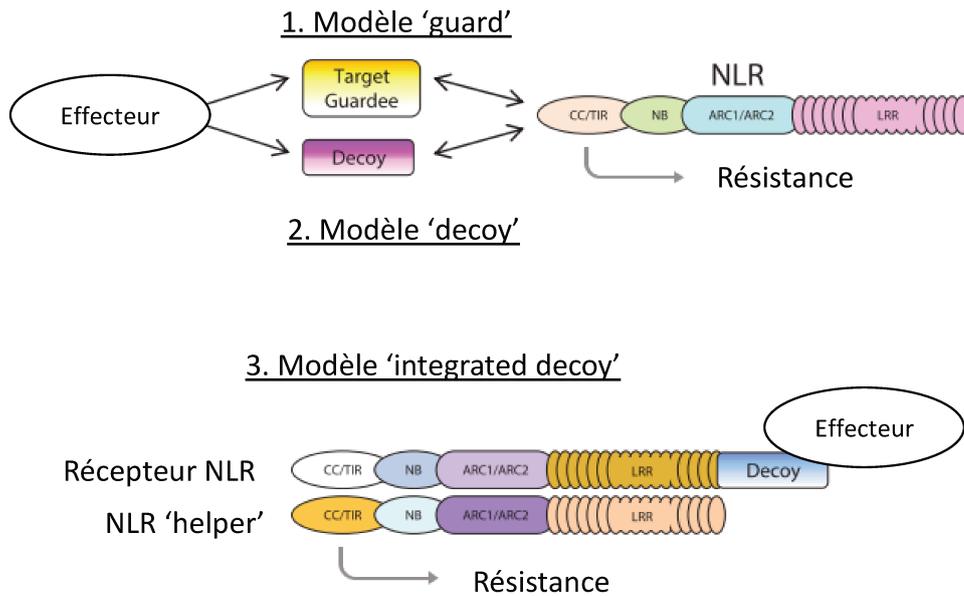


Figure 6 : Modèles de reconnaissance indirecte des effecteurs (adapté de Cesari et al. 2014). Au total, trois modèles de reconnaissance indirecte des effecteurs d'agents pathogènes ont été proposés. La reconnaissance de l'agent pathogène peut se faire par des NLR surveillant les protéines végétales ciblées par les effecteurs (1), ou surveillant des gènes dupliqués codant pour des protéines 'decoy' (2). Dans certains cas, le 'decoy' est intégré à la structure d'un NLR récepteur qui nécessite l'action d'un NLR 'helper' pour transmettre le signal (3)

Néanmoins, les résistances qualitatives ne sont pas toujours dues aux récepteurs NLR et PRRs et à leur interaction avec les molécules des pathogènes. Parmi les 9 mécanismes moléculaires des gènes conférant des résistances, Kourelis et van der Hoorn (2018) ont listé des gènes qui causent la perte de sensibilité active, passive ou programmée par l'hôte lui-même.

A cause de leur effet majeur et de leur facilité de suivi phénotypique, les gènes de résistance ont été largement employés dans les programmes de sélection et déployés dans les agrosystèmes. Cependant, leur déploiement à l'échelle des agrosystèmes induit une pression de sélection forte sur les populations des pathogènes qu'ils ciblent. Cela a résulté en l'apparition de nouvelles souches plus virulentes capables de contourner ces résistances. C'est la théorie du 'Boom and Bust' (McDonald and Linde 2002). Plusieurs exemples bien documentés existent dans la littérature. L'un d'entre eux correspond au pathosystème formé par *Phytophthora infestans* et la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). En effet, l'utilisation de gènes R chez la pomme de terre a vite résulté en l'apparition de populations virulentes capables de contourner ces résistances (Fry 2008).

### **3.2. Les résistances quantitatives se caractérisent par une réduction de la sévérité de la maladie**

Les résistances quantitatives sont contrôlées par des gènes à effet partiel et/ou des 'Quantitative trait loci' (QTL) (Poland et al. 2009; St.Clair 2010; Roux et al. 2014; Niks et al. 2015). En comparaison des gènes majeurs de résistance pour lesquels les mécanismes moléculaires d'action ont été révélés pour nombre d'entre eux, peu d'informations sont disponibles concernant les gènes conférant les résistances quantitatives aux maladies. D'après French et al. 2016, seulement 15 gènes responsables de résistances quantitatives ont été identifiés à ce jour. Cependant, des hypothèses ont été proposées sur ces mécanismes. Poland et al. (2009) ont listé ces hypothèses qui peuvent être classées en 3 catégories. Dans certains cas, les résistances quantitatives sont contrôlées par des gènes régulant des traits morphologiques tels que la densité des stomates ou la capacité à repousser l'eau (Bradley et al. 2003; Melotto et al. 2006). La deuxième catégorie comprend les gènes associés aux défenses des plantes incluant des allèles mutés de récepteurs PRR ou NLR (Poland et al. 2009), des gènes impliqués dans la production de molécules chimiques nocives pour les pathogènes et des gènes impliqués dans la signalisation ayant lieu en aval de la reconnaissance des pathogènes. La dernière catégorie se compose de gènes dont la fonction moléculaire n'a pas été identifiée. C'est le cas de *Pi34* qui a été identifié comme conférant une résistance partielle à *Magnaporthe grisea* (Zenbayashi-Sawata et al. 2007). Les résistances quantitatives sont décrites comme plus durables (Parlevliet 2002) que les résistances qualitatives qui sont très vite contournées (Brown 2015). Cependant les cas d'érosion des résistances quantitatives existant dans la littérature démontrent que ces résistances peuvent aussi être contournées dans le temps (Cowger and Mundt 2002; Caffier et al. 2014, 2016; Delmas et al. 2016).

### **3.3. Stratégies de gestion des résistances pour une efficacité durable**

L'utilisation de gènes majeurs de résistance ou de QTL de résistance seuls n'est pas suffisante pour développer des résistances durables comme l'illustre les contournements des premiers et l'érosion des derniers qui ont été rapportés dans la littérature (Pilet-Nayel et al. 2017). Pour améliorer la durabilité de ces résistances, plusieurs stratégies ont été proposées telles que l'utilisation en mélange de plusieurs variétés d'origines génétiques variées et portant des gènes de résistance différents (Sapoukhina et al. 2013), la rotation de variétés portant différents gènes de résistance dans l'espace et dans le temps (Papaix et al. 2011) ainsi que le pyramidage de gènes et/ou QTL de résistance dans des variétés (Mundt 2014; Brown 2015). Plusieurs variétés contenant

plusieurs gènes de résistance, plusieurs QTL, ou des gènes et des QTL de résistance ont été déployées (Zhang and Coaker 2017). Bien que suggérées comme étant plus durables, l'effet de l'utilisation de ces variétés sur la biologie du pathogène reste toutefois peu connu (Pilet-Nayel et al. 2017).

## **4. L'effectoromique : la génomique appliquée à l'étude des effecteurs**

### **4.1. La pathogénomique**

Plusieurs facteurs influencent la capacité des pathogènes à contourner les défenses des plantes notamment leur taux de mutation, leur mode de reproduction, leur capacité de dispersion et la taille efficace de population (McDonald and Linde 2002). La taille efficace de population étant l'effectif de la population de type Wright-Fisher pour laquelle la fluctuation du polymorphisme est équivalente à celle d'une population naturelle. L'arrivée des nouvelles technologies de séquençage a révolutionné l'étude des pathogènes. Le développement de la pathogénomique, qui se base sur l'utilisation des approches omiques pour étudier les facteurs moléculaires de la pathogénicité et leur évolution, en a résulté (Pais et al. 2013).

La publication des génomes d'Oomycètes et leur comparaison ont révélé les différences de tailles importantes qui existent entre les espèces (Baxter et al. 2010; Haas, et al. 2009; Lamour et al. 2012; Lévesque et al. 2010; Links et al. 2011; Quinn et al. 2013; Sharma et al. 2015; Tyler et al. 2006). Ces différences sont dues à la multiplication plus ou moins importante d'éléments répétés (éléments transposables et autres ADN répétés) chez certaines espèces. *Phytophthora infestans* qui a le génome le plus grand parmi les Oomycètes du genre *Phytophthora* (240 MB) est composé à 74 % de ces éléments répétés. Ces éléments sont localisés dans des régions instables et pauvres en gènes. A l'opposé, les autres régions plus stables du génome sont riches en gènes conservés. Ces observations ont conduit à la proposition du concept des génomes à deux vitesses avec d'une part les régions à évolution rapide riches en éléments répétés et d'autre part les régions à évolution lente riches en gènes (Raffaele et Kamoun 2012).

Le développement des méthodes transcriptomiques à haut débit a révélé les changements d'expression qui ont lieu chez les pathogènes. Chez les Oomycètes, plusieurs études comparant l'expression des gènes aux différents stades de développement ont montré des changements d'expression majeurs sur les gènes associés au métabolisme et au transport des molécules (Ye et al. 2011; Judelson et al. 2008; Chen et al. 2013; Ah-Fong et al. 2017b). Des modifications importantes ont aussi été observées entre les différentes phases d'interaction des Oomycètes avec leur hôte (Abrahamian et al. 2016; Attard et al. 2014; Blackman et al. 2015; Jupe et al. 2013; Savory et al. 2012;

Wang et al. 2011; Zuluaga et al. 2015). Ces études ont notamment montré que l'expression des gènes codant pour les effecteurs est hautement dynamique et strictement régulée pendant les différents stades de développement de l'agent pathogène et pendant la phase de l'interaction avec l'hôte suggérant leur importance cruciale pour l'agent pathogène.

Ces études génomiques et transcriptomiques ont grandement contribué à approfondir notre compréhension des mécanismes moléculaires associés au contournement des résistances. En effet, outre le taux de mutation élevé responsable des modifications des effecteurs, d'autres mécanismes peuvent entraîner le contournement des résistances tel que des changements de cadre de lecture, des délétions et des mécanismes de 'silencing' (Tableau 1, Na and Gijzen 2016).

Tableau 1 : Vue d'ensemble des effecteurs de *P. infestans* et *P. sojae* responsable de contournement de résistance (Vleeshouwers and Oliver 2014a)

Species, Avr gene	Allelic variants in virulent strains <sup>a</sup>						Host	R gene <sup>b</sup>	References
	Abs	AA	Shift	Silc	Suppr	Unk			
<i>Phytophthora infestans</i>									
<i>Avr1</i>	...	...	...	...	...	X	Potato	<i>R1</i>	Ballvora et al. 2002; Tyler 2009; Govers lab unpublished
<i>Avr2</i>	...	X	...	...	...	...	...	<i>R2</i>	Gilroy et al. 2011; Lokossou et al. 2009; Saunders et al. 2012a
<i>Avr3a</i>	...	X	...	...	...	...	...	<i>R3a</i>	Armstrong et al. 2005; Bos et al. 2010; Engelhardt et al. 2012; Huang et al. 2005
<i>Avr3b</i>	X	X	...	X	...	X	...	<i>R3b</i>	Jiang et al. 2006; Li et al. 2011; Rietman 2011; van der Lee et al. 2001; Vleeshouwers lab, unpublished
<i>Avr4</i>	...	X	X	...	...	...	...	<i>R4*</i>	van Poppel et al. 2008
<i>Avrblb1</i>	...	X	...	...	X	...	...	<i>Rpi-blb1</i>	Champouret et al. 2009; Chen et al. 2012b; Song et al. 2003; van der Vossen et al. 2003; Vleeshouwers et al. 2008
<i>Avrblb2</i>	...	X	...	...	...	X	...	<i>Rpi-blb2</i>	Bozkurt et al. 2011; Oh et al. 2009; van der Vossen et al. 2005
<i>Avrvnt1</i>	...	...	...	X	...	...	...	<i>Rpi-vnt1</i>	Foster et al. 2009; Pel 2010; Pel et al. 2009
<i>AvrSmira1</i>	...	X	...	...	...	X	...	<i>Rpi-Smira1*</i>	Rietman et al. 2012
<i>AvrSmira2/Avr8</i>	...	...	...	...	...	X	...	<i>Rpi-Smira2/R8*</i>	Kwang-Ryong 2013; Kwang-Ryong et al. 2011; Rietman et al. 2012
<i>P. sojae</i>									
<i>Avr1a</i>	X	...	...	X	...	...	Soybean	<i>Rps1a*</i>	Qutob et al. 2009
<i>Avr1b</i>	...	X	...	X	...	...	...	<i>Rps1b*</i>	Cui et al. 2012; Dou et al. 2008a; Shan et al. 2004
<i>Avr1c</i>	X	...	...	X	...	...	...	<i>Rps1c*</i>	Gijzen lab unpublished
<i>Avr1d</i>	X	...	...	...	...	...	...	<i>Rps1d*</i>	Na et al. 2013; Yin et al. 2013
<i>Avr1k</i>	...	...	X	...	...	...	...	<i>Rps1k*</i>	Gao and Bhattacharyya 2008; Song et al. 2013
<i>Avr3a/5</i>	...	X	...	X	...	...	...	<i>Rps3a/5*</i>	Dong et al. 2009, 2011b; Qutob et al. 2009
<i>Avr3b</i>	...	X	X	...	...	...	...	<i>Rps3b*</i>	Dong et al. 2011a
<i>Avr3c</i>	...	X	...	...	...	...	...	<i>Rps3c*</i>	Dong et al. 2009
<i>Avr4/6</i>	...	...	...	X	...	...	...	<i>Rps4/6*</i>	Dou et al. 2010; Sandhu et al. 2004

a : Mécanisme à l'origine des contournements. Délétion du gène (Abs), mutation causant un changement d'acide aminé (AA), changement du cadre de lecture (shift), régulation négative de l'expression ou silencing (Silc), suppression de la reconnaissance par un autre effecteur (Suppr), non connu (Unk). b : Gène de résistance identifié (R genes). \* indique que le gène n'est pas cloné

Les gènes codant pour les effecteurs forment des familles multigéniques suggérant que de la redondance fonctionnelle existe (Haas et al. 2009; Lamour et al. 2012a; Tyler et al. 2006). Nombre de ces gènes sont localisés dans les régions à évolution rapide des génomes (Raffaele and Kamoun 2012). Des polymorphismes de présence/absence, des 'copy number variation', des recombinaisons intragéniques et des conversions de gènes ont pu être observés dans ces régions (Jiang and Tyler 2012). Outre ces modifications génomiques, des polymorphismes d'expression et des modifications

épigénétiques peuvent aussi conduire à des contournements (Cui et al. 2012; Gilroy et al. 2011; Kasuga et Gijzen 2013; Gijzen et al. 2014). Enfin, certains effecteurs vont perturber la reconnaissance de gènes d'avirulence et éviter ainsi la reconnaissance de ceux-ci par le système immunitaire des plantes (Chen et al. 2012; Anderson et al. 2015).

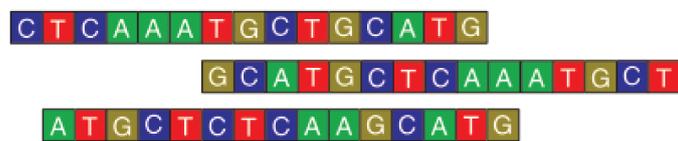
#### **4.2. L'effectoromique est un outil prometteur pour les sélectionneurs**

Les effecteurs, supports du pouvoir pathogène, constituent un outil majeur pour les programmes de sélection de résistance aux maladies. L'effectoromique, approche se basant sur l'utilisation des informations génomiques et transcriptomiques ciblées sur les effecteurs, a permis d'étudier différents aspects de la biologie des effecteurs (Figure 7). L'utilisation de système d'expression transitoire pour des effecteurs marqués par fluorescence a permis d'observer la localisation subcellulaire des effecteurs chez la plante modèle *Nicotiana benthamiana*. L'étude de 49 effecteurs RxLR de *Hyaloperonospora arabidopsidis* a révélé deux catégories, avec une première regroupant les effecteurs ciblant le noyau, et une deuxième, composée d'effecteurs ciblant les membranes des cellules hôtes (Caillaud et al. 2012). Similairement, Stam et al. (2013a) ont étudié la localisation subcellulaire de 11 domaines C-terminaux d'effecteurs CRN et montré leur localisation dans le noyau de l'hôte. Les criblages d'expression transitoire *in planta* apportent aussi des informations concernant le rôle des effecteurs dans le devenir de l'interaction entre l'agent pathogène et la plante. Chez 12 accessions d'*Arabidopsis thaliana*, l'expression transitoire de 64 effecteurs RxLR de *Hyaloperonospora arabidopsidis* a révélé que 70% d'entre eux contribuent à la virulence de l'agent pathogène (Fabro et al. 2011). Wang et al. (2011) ont analysé 169 effecteurs RxLR de *Phytophthora sojae* et montré que plusieurs d'entre eux sont capables de supprimer la mort cellulaire programmée induite par BAX, une protéine de souris induisant des nécroses chez les plantes, par des effecteurs et ou par la perception du PAMP INF1. Les criblages effectoromiques renseignent aussi sur l'activité d'avirulence des effecteurs. L'étude de 54 effecteurs RxLR provenant de *Phytophthora infestans* par expression transitoire chez des espèces sauvages de *Solanum* a révélé l'induction de la réponse hypersensible par les RxLR de la famille IpiO (Vleeshouwers et al. 2008). Les criblages des collections de ressources génétiques d'espèces hôtes par expression transitoire *in planta* à haut-débit ont contribué à la découverte de nouveaux gènes de résistance et accéléré leur clonage (Goritschnig et al. 2012; Lokossou et al. 2009; Vleeshouwers et al. 2008).

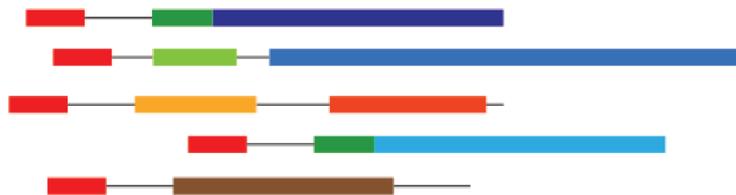
Enfin l'effectoromique apporte plusieurs informations permettant de guider les sélectionneurs dans leur choix de déploiement des résistances. Elle permet notamment d'identifier les gènes de résistances présents dans les variétés et d'évaluer leur spectre de reconnaissance (Vleeshouwers and Oliver 2014b). L'analyse de la diversité des effecteurs dans des populations

d'agents pathogènes combinée à l'analyse de leur expression chez différents génotypes hôtes permet de prédire les contournements potentiels et peut aider les sélectionneurs à développer des résistances plus durables (Kaschani et al. 2010; Birch et al. 2009)(Figure 7).

### a. Séquençage des génomes



### b. Prédiction des effecteurs



### c. Librairie des effecteurs clonés



### d. Tests d'expression transitoire à haut débits

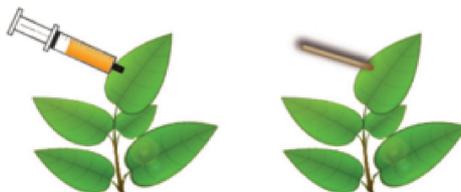


Figure 7 : Pipeline effectoromique à haut débit (adapté de Pais et al. 2013). a. Analyse des génomes des pathogènes. b. Utilisation des génomes et de pipeline de prédiction bio-informatique pour identifier les effecteurs. c. Création de bibliothèques d'effecteurs clonés. d. Screening par expression transitoire *in planta* des effecteurs. Peut se faire par agroinfiltration (droite) ou via d'autres méthodes se basant sur la réalisation de blessures (gauche). Cette approche permet d'étudier différents aspects de la biologie des effecteurs incluant leur capacité de supprimer les défenses de la plante, leur localisation sub-cellulaire, leurs cibles dans la plante et leur activité de gène d'avirulence.

## **5. Modèle d'étude : l'interaction biologique entre le piment et *Phytophthora capsici***

### **5.1. *P. capsici* est un pathogène tellurique polyphage**

*P. capsici*, un agent pathogène responsable du mildiou, a été isolé sur du piment au Nouveau-Mexique (Leonian, 1922). Il présente plusieurs caractéristiques qui font de lui une menace considérable pour les cultures de piments dans le monde. C'est un pathogène tellurique à spectre d'hôte large. Il est capable d'infecter différentes cultures d'intérêt agronomique incluant des solanacées, des cucurbitacées et des fabacées. Cependant, il présente une adaptation locale dans certaines régions géographiques et les isolats montrent des niveaux d'agressivité variables selon l'hôte infecté (Granke et al. 2012; Lamour et al. 2012). Il est responsable de la pourriture des racines et est capable d'attaquer la plupart des organes incluant le collet les feuilles, les fleurs et les fruits (Figure 8). Lorsque les conditions sont favorables (forte humidité > 80 % et température > 22°C), *P. capsici* est responsable de dégâts conséquents pouvant atteindre l'équivalent d'un milliard de dollars de pertes (Hausbeck and Lamour 2004). De plus, c'est un pathogène mondialement réparti. Sa présence a été reportée sur tous les continents (Dunn et al. 2010; Gobena et al. 2012 ; Hurtado-González et al. 2008; Hwang & Kim, 1995 ; Meitz et al., 2010 ; Silvar et al. 2006).

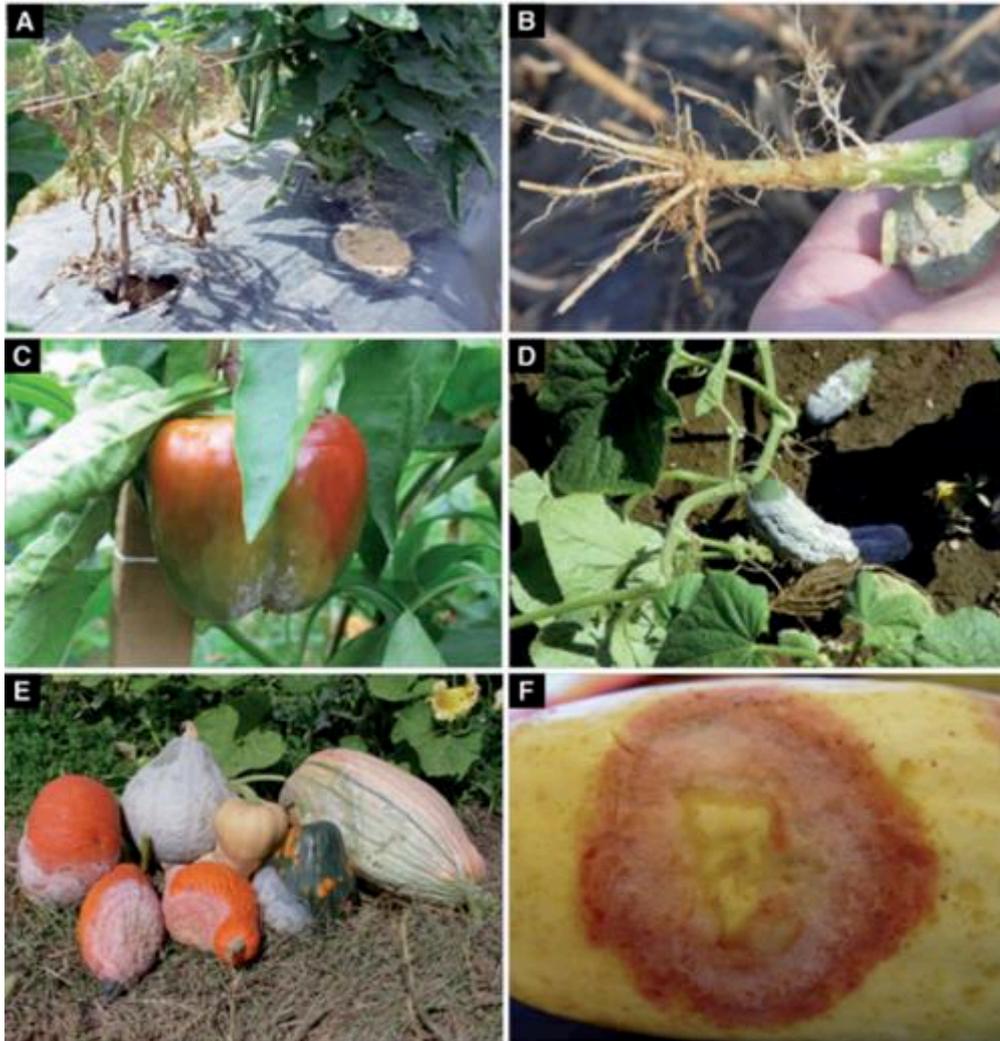


Figure. 8 : Symptômes causés par *Phytophthora capsici* (adapté de Lamour et al. 2012b). (A) Racines et collet d'une plante de tomate infectée par *P. capsici* ; les lésions correspondent aux marques marrons au niveau du collet et de la partie inférieure de tige. (B) Racine d'une plante de courge montrant un brunissement causé par l'infection. (C) Sporulation sur fruit de piment infecté. (D) Forte sporulation sur concombre. (E) Assortiment de cucurbitacées infectées par *P. capsici* au Tennessee. (F) Lésion causée par *P. capsici* ; l'îlot jaune correspond aux tissus contenant l'agent pathogène en phase biotrophe entourés par les tissus nécrosés résultant du passage à la phase nécrotrophe.

Comme la plupart des oomycètes du genre *Phytophthora*, *P. capsici* peut utiliser la reproduction sexuée et/ou asexuée lors de son cycle de développement (Figure 9). C'est un agent pathogène hétérothallique qui présente des isolats de type A1 et A2. Lorsque des isolats des deux types sont proches, ils produisent des facteurs d'accouplement. La perception de ces facteurs déclenche la différenciation des structures sexuelles mâles et femelles appelées anthéridies et oogones, respectivement. La fécondation de l'oogone par l'anthéridie conduit à la production d'une oospore aux parois épaisses et résistantes (Erwin & Ribeiro, 1996 ; Lamour et al. 2012). La reproduction sexuée présente plusieurs avantages évolutifs pour l'agent pathogène. Elle garantit notamment des niveaux de diversité et d'hétérozygotie élevés (Granke et al. 2012; Lamour al. 2012).

Les oospores, hautement résistantes au froid, constituent la principale source d'infection dans les régions soumises à des hivers rudes (Bowers et al. 1990; Lamour and Hausbeck 2003; Granke et al. 2012). De plus, elles peuvent persister dans le sol pendant plusieurs années (Babadoost and Pavon 2013; Granke et al. 2012; Hausbeck and Lamour 2004; Lamour and Hausbeck 2003). L'importance de la reproduction sexuée varie selon les régions géographiques et influence les niveaux de diversité observés dans les régions. Dans les régions où elle prédomine, tel que dans les USA, en Afrique du Sud et du Nord, au Sud de la Chine, au Mexique et dans la forêt amazonienne du Pérou, des niveaux élevés de diversité sont observés (Castro-Rocha et al. 2016; Dunn et al. 2010; Gobena et al. 2012; Hu et al. 2013; Hurvey et al., 2011; Meitz et al. 2010). A l'inverse, sur la côte du Pérou, en Argentine, en Europe et dans les régions Est, Ouest et centrale de la Chine, les populations de *P. capsici* sont principalement clonales (Gobena et al. 2012; Hu et al. 2013; Hurtado-González et al. 2008; Silvar et al. 2006).

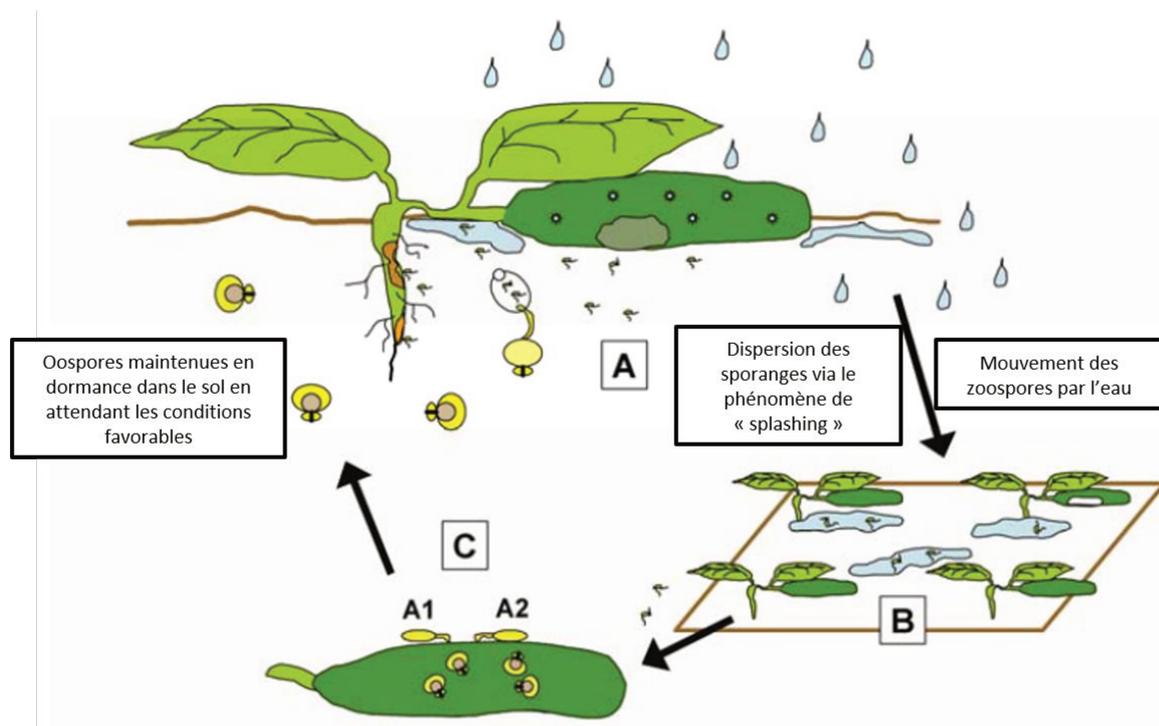


Figure 9 : Cycle infectieux de *Phytophthora capsici* (Exemple d'une infection de concombre adapté de Hausbeck and Lamour 2004). (A) Germination des oospores lorsque l'humidité du sol est élevée. (B) Les sporanges et leurs zoospores sont disséminés dans les champs via l'eau de pluie et d'irrigation. (C) Des oospores sont produites lorsque les types A1 et A2 sont à proximité ; les isolats forment les gamétocystes qui se croisent ; ces oospores permettent la survie de l'agent pathogène pendant les périodes hivernales dans les zones tempérées.

Lorsque les conditions environnementales sont favorables, *P. capsici* se propage par reproduction asexuée explosive qui permet la production de millions de sporanges (Lamour et al. 2012). Quand ils sont immergés, chaque sporange peut relarguer 20 à 40 zoospores biflagellées se

déplaçant vers les racines par chimiotactisme, ainsi capables d'initier une infection. Bien que moins efficace pour la conservation, la reproduction asexuée favorise une dispersion rapide lors des épidémies au détriment de la diversité génétique.

Lorsqu'elles adhèrent à une plante, les zoospores s'enkystent et produisent une structure appelée 'appressorium' leur permettant de percer la cuticule et les parois cellulaires des plantes. Une fois entré dans l'espace extracellulaire, l'hyphe mycélien se propage. Comme tous les Oomycètes du genre *Phytophthora*, *P. capsici* est hémibiotrophe. Au début de l'interaction, il développe des structures appelées haustoria qui lui permettent d'établir un dialogue moléculaire étroit avec son hôte tout en limitant les dégâts occasionnés et évitant ainsi le déclenchement du système immunitaire : c'est la phase biotrophe. Après une période pouvant varier de 18 à 42 heures selon les conditions environnementales, il bascule vers un mode d'interaction plus agressif pendant lequel il cause la nécrose des cellules et l'effondrement des tissus de l'hôte : c'est la phase nécrotrophe (Lamour et al. 2012) (Figure 10).

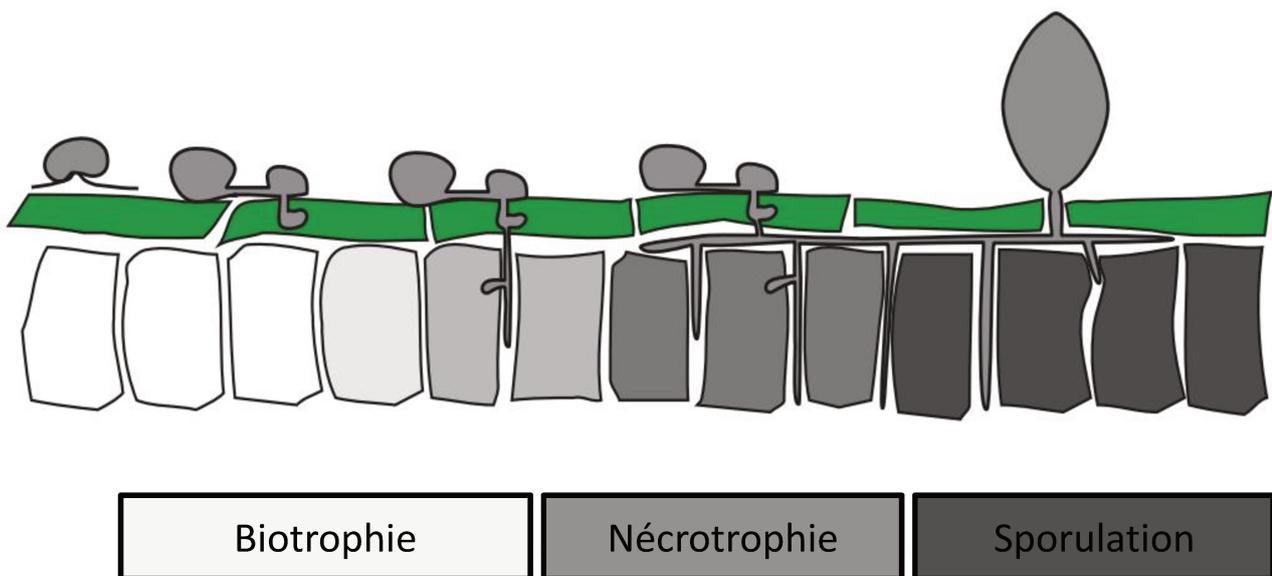


Figure 10 : Développement de *Phytophthora capsici* sur une feuille (adapté de Lamour et al. 2012b). L'épiderme est représenté par les rectangles verts et les cellules des tissus infectés sous-jacentes sont représentées par les rectangles colorés en blanc (phase biotrophe), gris (transition vers la nécrotrophie) et gris sombre (phase nécrotrophe et sporulation). La description des différentes étapes du cycle de développement se trouve dans le texte.

## 5.2. Les résistances génétiques du piment et de la tomate à *P. capsici*

Les attaques de *P. capsici* sur piment peuvent entraîner des pertes considérables allant jusqu'à la perte totale de la culture (Granke et al. 2012). Les études de l'hérédité de la résistance ont montré que son déterminisme génétique est complexe (Lefebvre and Palloix 1996; Thabuis et al. 2003; Truong et al. 2012; Mallard et al. 2013). Mallard et al. (2013) ont décrit un complexe de QTL composé de 3 QTL liés (*Pc5.1*, *Pc5.2* et *Pc5.3*) à effet majeur sur le chromosome P5 du piment (Figure 11). Ils ont montré que le QTL *Pc5.1*, qui appartient à ce complexe, confère une résistance partielle à spectre relativement large contre *P. capsici*. Ils ont aussi montré que ce QTL existe chez les trois sources de résistance étudiées : Perennial, PI201234 et Criollo de Morelos 334 (CM334). Comme mentionné précédemment, le piment n'est pas la seule culture de Solanacées qui souffre d'attaques de *P. capsici*. En effet, la tomate fait aussi partie des hôtes potentiels de ce pathogène. Une accession résistante appartenant à l'espèce apparentée sauvage *Solanum habrocaites* et 4 géotypes partiellement résistants de *Solanum lycopersicum* ont été identifiés (Quesada-Ocampo et Hausbeck 2010). Bien que des résistances génétiques existent, la maladie causée par *P. capsici* reste un danger conséquent menaçant les productions de piment et de tomate dans le monde (Granke et al. 2012; Lamour et al. 2012). Cela s'explique par différents traits biologiques du pathogène qui lui donnent un potentiel évolutif explosif, la capacité à surmonter les résistances végétales et à développer des résistances aux produits phytosanitaires.

## Carte consensus P5

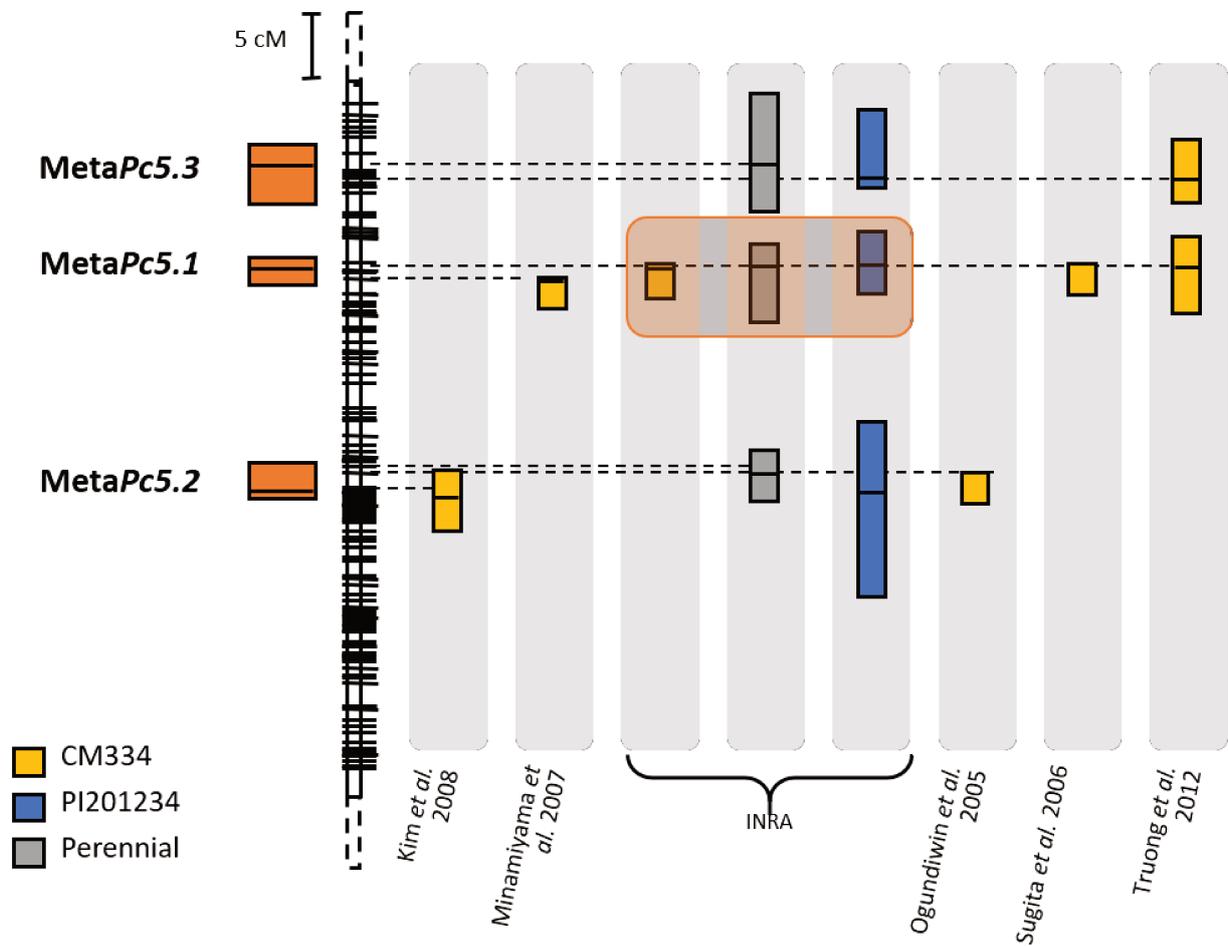


Figure 11 : Schématisation de la carte génétique consensus du chromosome P5 du piment (adapté de Mallard et al. 2013 par Cantet, 2013). cM: centimorgan. CM334: Criolo de Morelos 334

### 5.3. La pathogénomique appliquée à *P. capsici*

A l'inverse de *P. infestans* et *P. sojae*, pour lesquels les fonctions de plusieurs effecteurs ont été décrites (Tableau 2), les informations sont moins nombreuses pour les effecteurs de *P. capsici*.

Tableau 2 : Liste d'effecteurs dont la fonction moléculaire a été révélée (adapté de Sharpee and Dean 2016)

Effecteur	Fonction moléculaire	Références
EPIC1 et EPIC2B	Ciblent et inhibent de multiples protéases à cystéine.	(Kaschani et al. 2010; Tian et al. 2006)
EPI1 et EPI10	Inhibent des protéases à sérine extracellulaires.	(Tian et al. 2004, 2005)
PSR1 et PSR2	Suppriment le 'silencing' chez les plantes, les rendant plus sensibles aux infections par des champignons et des virus.	(Qiao et al. 2013, 2015)
GIP1	Inhibe l'endoglucanase EgaseA pour prévenir le déclenchement de la PTI.	(Rose et al. 2002)
PsCRN63	Promeut la mort cellulaire chez l'hôte en perturbant les catalases.	(Zhang et al. 2015)
PsCRN115	Maintient le niveau adéquate de peroxyde d'hydrogène pour empêcher la mort cellulaire des cellules hôtes.	(Zhang et al. 2015)
PsCRN70	Supprime l'accumulation de peroxyde d'hydrogène pour rendre <i>N. benthamiana</i> plus sensible à <i>P. sojae</i> .	(Rajput et al. 2014)
AVRblb2	Empêche la sécrétion de la protéase à cystéine C14 dans l'espace extracellulaire.	(Bozkurt et al. 2011)
PexRD54	Se lie à la protéine ATG8CL pour altérer les autophagosomes.	(Dagdas et al. 2016)
Pi03192	Empêche les facteurs de transcription NTP1 et NTP2 d'atteindre le noyau promouvant ainsi la virulence de <i>P. infestans</i> .	(McLellan et al. 2013)
PexRD2	Interagit avec le domaine kinase d'une MAPKKK pour interrompre la signalisation de défense de la plante.	(King et al. 2014)
Avr3a	Stabilise l'E3 ligase CMPG1 pour supprimer la réponse hypersensible pendant la phase biotrophe de développement. Il s'associe avec DRP2 qui est impliqué dans l'endocytose médiée par des récepteurs.	(Bos et al. 2010)

Cependant, la recherche d'effecteurs présentant de l'homologie avec les effecteurs déjà caractérisés moléculairement chez d'autres espèces d'oomycètes peut permettre d'identifier des effecteurs dont la fonction moléculaire contribue à la virulence de *P. capsici*. C'est le cas des homologues de l'effecteur RxLR Avr3a de *P. infestans*. Cet effecteur a initialement été identifié comme étant reconnu par le gène de résistance *R3a* de la pomme de terre (Armstrong 2005). Les domaines effecteurs de *PiAvr3a* et de l'homologue *PcAvr3a4* se lient au phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI4,5P2) grâce à un domaine riche en acide aminé chargé positivement. Yaeno et al. (2011) ont montré que cette liaison à PI4,5P2 est nécessaire à l'accumulation de l'E3 ligase CMPG1 qui est responsable de la promotion de l'infection, suggérant que l'homologue d'Avr3a de *P. capsici* partage la même fonction. Un autre homologue de *PiAvr3a* de *P. capsici*, *PcAvr3a1*, a été montré comme étant corrélé à la résistance non hôte chez des espèces de *Nicotiana* (Vega-Arreguín et al. 2014).

La publication du génome a permis d'identifier les effecteurs putatifs de *P. capsici* (Lamour et al. 2012a). La taille du génome est de 64 Mb (Lamour et al. 2012a). Parmi les oomycètes séquencés, *P. capsici* présente un génome de taille intermédiaire plus compact que ceux de *P. sojae* et *P. infestans* qui font 90 et 240 Mb respectivement mais plus large que celui de *Pythium ultimum* dont la

taille est inférieure à 45 Mb (Haas et al. 2009; Lévesque et al. 2010; Tyler et al. 2006). Au total, 357 effecteurs RxLR putatifs et 29 CRN putatifs ont été prédits. Plus récemment des études ciblées sur ces familles d'effecteurs ont révélé que ces effectifs étaient sous-estimés. En effet, Jupe et al. (2013) ont identifié 516 effecteurs RxLR putatifs et Stam et al. (2013b) ont identifié 84 effecteurs CRN après ré-annotation de ces familles. Les informations concernant la fonction de ces effecteurs sont limitées mais les approches de pathogénomique appliquées à *P. capsici* ont montré qu'un certain nombre d'entre eux sont important pour l'infection. Jupe et al. (2013) ont identifié 346 effecteurs exprimés pendant l'interaction de *P. capsici* avec un génotype sensible de tomate grâce à une étude transcriptomique. Ils ont révélé que des groupes d'effecteurs RxLR étaient différenciellement exprimés entre les phases de l'interaction liées au mode de vie hémibiotrophe, suggérant ainsi qu'ils jouent un rôle important pour l'infection. Avec une approche RNAseq, Chen et al. (2013) ont identifié 98 effecteurs différenciellement exprimés dans les phases précoces de l'interaction avec *Nicotiana benthamiana*. La majorité des effecteurs RxLR qui montraient des différentiels d'expression étaient plus exprimés en début d'interaction suggérant qu'ils sont associés à la phase biotrophe de l'infection par *P. capsici*. Ils ont confirmé cette hypothèse grâce à l'expression transitoire *in planta* d'un de ces effecteurs RxLR (Pc22053) qui supprime la PTI et l'ETI. Dans une étude d'expression et de localisation cellulaire des effecteurs CRN de *P. capsici* chez *N. benthamiana*, Stam et al. (2013a) ont montré que ceux-ci ciblent le noyau des cellules hôtes.



## 6. Objectifs de la thèse

La thèse est articulée autour de deux objectifs majeurs. Le premier est d'étudier l'impact du génotype de l'hôte piment et de l'agressivité des isolats de *Phytophthora capsici* sur l'expression des gènes du pathogène pendant leur interaction avec l'hôte. Le deuxième est d'identifier des effecteurs exprimés et conservés chez *P. capsici* pouvant servir de candidats pour rechercher de nouveaux génotypes résistants à *P. capsici* chez les Solanacées. Pour répondre à ces objectifs, trois approches ont été utilisées. Ces approches correspondent aux trois chapitres de résultats et le premier fait l'objet d'un article en préparation.

Le chapitre 1 traite de l'étude de l'expression des gènes de *P. capsici* pendant l'interaction avec le piment à 24 heures après inoculation. Une approche RNA-seq a été utilisée pour analyser l'expression des gènes de *P. capsici* pendant l'interaction entre deux isolats contrastés par leur agressivité sur le piment et deux génotypes de piment contrastés par leur niveau de résistance à *P. capsici*.

Le chapitre 2 présente une analyse de la capacité d'effecteurs de *P. capsici* à induire les mécanismes de défense du piment. Une core-collection d'accessions de piment dont les profils de résistance à *P. capsici* sont déjà connus a été criblée grâce à une approche d'expression transitoire *in planta*. Plusieurs gènes RxLR différentiellement exprimés dans le jeu de données exploité dans le chapitre 1 ont été sélectionnés sur la base de leur profil d'expression et leur niveau de diversité chez les deux isolats. Pour les gènes RxLR non-conservés, les deux allèles ont été testés afin d'analyser le lien entre la régulation de l'expression des gènes RxLR et leur activité d'avirulence.

Le chapitre 3 porte sur l'analyse des niveaux de diversité des gènes RxLR couplée à une analyse d'expression pendant l'interaction de *P. capsici* avec la tomate. L'expression des gènes RxLR a été étudiée grâce à une approche RNAseq de l'interaction de 33 isolats de *P. capsici* pendant leur interaction avec la tomate à 24 et 72 heures après inoculation. Les 33 isolats proviennent de différentes régions géographiques dans le monde et ont été collectés sur différents hôtes. Les niveaux de diversité des gènes RxLR ont été analysés et la fréquence des polymorphismes non-synonymes évaluée afin d'identifier ceux qui sont conservés dans le but d'élargir la liste de candidats exploitables avec l'approche d'expression transitoire du chapitre 2 des résultats.

Le dernier chapitre discute des résultats des trois chapitres de résultats et des perspectives associées.



---

## Chapitre 1

How a partial resistant host genotype impacts the gene expression of a pathogen? A case study on the Pepper - *Phytophthora capsici* interaction

---

### Contribution des auteurs

Gaëtan Maillot<sup>1</sup>, Emmanuel Szadkowski<sup>2</sup>, Anne Blattes-Massire<sup>2</sup>, Guilhem Rigai<sup>3</sup>, Bernard Caromel<sup>2</sup>, Joël Chadoeuf<sup>3</sup>, Véronique Brunaud<sup>3</sup>, Jean-Paul Bouchet<sup>2</sup>, Sandrine Balzergue<sup>3</sup>, Kurt Lamour<sup>2</sup>, Véronique Lefebvre<sup>1</sup>

Véronique Lefebvre a construit la question de recherche, défini le matériel à étudier et la stratégie à déployer, et défendu le projet d'étude auprès de différentes instances pour le faire financer. Anne Blattes-Massire a réalisé la production des échantillons allant de l'infection des plantes à la quantification des ARN produits après extraction ainsi que l'analyse qPCR. Le séquençage a été réalisé sur la plateforme de transcriptomique pilotée par Sandrine Balzergue à l'URGV d'Evry, aujourd'hui rattachée à l'Institut des Sciences des Plantes de Paris-Saclay. Le nettoyage des reads ainsi que des analyses bioinformatiques préliminaires ont été réalisés conjointement par Véronique Brunaud, Jean-Paul Bouchet et Kurt Lamour. J'ai effectué l'analyse bioinformatique des données et la rédaction du manuscrit en bénéficiant de l'aide d'Emmanuel Szadkowski qui a aidé à optimiser le pipeline d'analyse ainsi que de l'aide de Joël Chadoeuf pour les questions statistiques, et de Véronique Lefebvre, Bernard Caromel, Emmanuel Szadkowski pour définir les analyses à conduire en relation avec la question de recherche. Guilhem Rigai a vérifié le pipeline d'analyse transcriptomique et fourni des conseils pour résoudre les problèmes de normalisation des données. Le manuscrit a été co-écrit par moi-même, Véronique Lefebvre, Bernard Caromel, Emmanuel Szadkowski, et Joël Chadoeuf.

### Résumé de l'article :

**Objectif :** L'objectif de cette étude était d'analyser l'impact du génotype de la plante hôte et des isolats sur l'expression des gènes de *Phytophthora capsici*.

**Stratégie :** Nous avons comparé l'expression des gènes de *P. capsici* dans quatre conditions biologiques où deux isolats contrastés par leur niveau d'agressivité (« Agressif », HA ; « Faiblement agressif », LA) interagissaient avec deux génotypes de piment contrastés par leur niveau de résistance à *P. capsici* (« Sensible », S ; « Résistant », R) à 24 heures post inoculation. La détection des gènes différentiellement exprimés (DEG) et leur analyse a été réalisée. Les fonctions moléculaires putatives associées à ces gènes ont été étudiés afin d'identifier les mécanismes physiologiques impactés lors des différentes interactions (SxHA, SxLA, RxHA et RxLA).

**Résultats :** Des pourcentages de reads nettement plus élevés ont été observés avec la condition biologique SxHA (varient entre 5,4 % et 9,4 %) comparativement aux conditions RxHA, SxLA et RxLA (varient entre 0,16 % et 2,95 %). Au total, 361 gènes différentiellement exprimés (DEG) ont été détectés avec les quatre comparaisons. Une faible proportion de ces DEG a été identifiée avec les comparaisons des profils d'expression des gènes de *P. capsici* quand l'hôte était différent (RxHA vs SxHA : 48 DEGs et RxLA vs SxLA : 0 DEG) suggérant que le génotype de l'hôte a peu d'impact sur l'expression des gènes de *P. capsici* comparativement à l'agressivité de l'isolat. L'étude des fonctions moléculaires associées au DEG a révélé des contrastes importants sur les mécanismes moléculaires utilisés par *P. capsici* dans les différentes conditions biologiques. Des gènes associés au transport de nutriment et à la biosynthèse de molécules étaient plus exprimés par *P. capsici* dans la condition SxHA suggérant que celle-ci est plus favorable au développement du pathogène. A l'inverse, des transporteurs ABC impliqué dans la détoxification et des gènes associés au catabolisme des molécules, en situation de stress et de carence, étaient plus exprimés par *P. capsici* dans les conditions RxHA, SxLA et RxLA suggérant que ces conditions sont défavorables au développement du pathogène. Enfin, 13 effecteurs RxLR ont été identifiés dont une majorité étaient plus exprimée par l'isolat agressif.

# How a partial resistant host genotype impacts the gene expression of a pathogen?

## – A case study on the Pepper - *Phytophthora capsici* interaction

### Authors

Gaëtan Maillot<sup>1</sup>, Emmanuel Szadkowski<sup>1</sup>, Anne Blattes-Massire<sup>1</sup>, Guilhem Rigail<sup>2</sup>, Bernard Caromel<sup>1</sup>, Joël Chadoeuf<sup>1</sup>, Véronique Brunaud<sup>2</sup>, Jean-Paul Bouchet<sup>1</sup>, Sandrine Balzergue<sup>2,3</sup>, Kurt Lamour<sup>1,4</sup>, Véronique Lefebvre<sup>1</sup>

Transcriptomic analyses of plant-pathogen interactions revealed the complex regulation of the gene expression associated with resistance in the host and associated with pathogenicity in pathogens. However the impact of partial plant resistances on pathogen transcriptomes is still poorly understood. We analyzed the impacts of *Capsicum annuum* partial resistance to *P. capsici* and the impact of the isolate of *P. capsici* on the pathogen gene expression 24 hours post inoculation (hpi). We compared the gene expression profiles of *P. capsici* in four biological conditions where two isolates contrasted by their aggressiveness on pepper (Highly aggressive, HA ; Lowly aggressive, LA) interacted with two genotypes of pepper contrasted by their resistance level to *P. capsici* (Susceptible, S ; Partially resistant, R). Comparisons of the pathogen transcriptome in the four biological conditions (RxHA, SxHA, RxLA and SxLA) highlighted 361 genes differentially expressed (DEGs). Numbers of DEGs were higher in transcriptome comparisons between isolates (RxHA VS RxLA ; SxHA VS SxLA) than between hosts (RxHA VS SxHA ; RxLA VS SxLA), suggesting that the host genotype weakly impact the pathogen gene expression at 24 hpi. Genes related to transport processes; protein, lipid and carbohydrate metabolic pathways highlighted the compatibility differences between the biological conditions. Transporters of nutrients and biosynthesis related genes were up-regulated in the compatible interaction SxHA. Strikingly, ABC-transporters associated with detoxification, stress signaling and starvation related genes were up-regulated in the interactions RxHA, SxLA and RxLA suggesting that they are weakly compatible for the pathogen development. Among the 43 pathogenicity genes DE, several Cell Wall Degrading Enzymes were up-regulated in the four biological conditions supporting the idea than plant host cell wall modification is a crucial mechanism for the pathogen colonization of its host at 24 hpi. Additionally, 13 genes coding for RxLR effectors were DE with most of them being up-regulated in HA. The fewer number of up-regulated RxLR in LA may be the reason of its lowly aggressiveness on pepper. Our comparison study of *P. capsici* transcriptome in different biological conditions at 24 hpi identified physiological mechanisms and pathogenicity factors of the pathogen to cope with unfavorable developmental environment.

### Affiliation

<sup>1</sup>INRA, UR 1052 GAFL Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes. Centre de Recherche PACA, Montfavet, France. <sup>2</sup>INRA, Institut of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), UMR 9213 / UMR1403, CNRS, INRA, Université Paris-Sud, Université d'Evry, Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Orsay, France. <sup>3</sup>INRA, Institut de Recherche en Horticulture et Semences (IRHS), UMR 1345, Beaucauzé, France. <sup>4</sup>Department of Entomology and Plant Pathology, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, United States of America.

## 1.1. Introduction

Despite the fact that plants are surrounded by billions of potentially pathogen microorganisms, plant disease is a rare occurrence in nature. Pre-formed physical and chemical barriers established by the plant prevent pathogen penetration (Dixon 2001; Hématy et al. 2009; Malinovsky et al. 2014). Against adapted pathogens able to bypass those barriers, plants evolved a complex immune system triggered when they perceive pathogens or the action of those pathogens in their tissues. They either recognize conserved molecules such as Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs), damages to themselves with Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) or pathogen effectors which are secreted proteins used to disrupt the plant defences (Boller and Felix 2009; Dodds and Rathjen 2010; Gust et al. 2017; Jones and Dangl 2006). This recognition induces in plant a batch of molecular mechanisms including calcium influx, oxidative bursts, mitogen activated P kinase cascades, hormones production, transcriptomic reprogramming, callose deposition and sometimes an hypersensitive response (Boller and Felix 2009; Dodds and Rathjen 2010; Jones and Dangl 2006).

According to the intensity of the plant response, the resistance is either qualitative when the disease progression is stopped, or quantitative when characterized by a reduction of the pathogen development. Qualitative resistances are controlled by genes with major effects, also called R-genes. They are often nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing proteins or NLR (Zhang et al. 2013). Since the first R genes cloning in 1992 (Johal and Briggs 1992), strong efforts have been made to identify genes associated with those qualitative resistances and the underlying molecular mechanisms. Up to date, more than 300 R-genes have been identified and the mechanisms responsible for the resistance have been revealed for 128 of them (Kourelis and van der Hoorn 2018). By opposition to the monogenic determinism of qualitative resistances, quantitative resistances frequently show a polygenic determinism (Poland et al. 2009). The underlying molecular mechanisms are quite diverse including genes involved in the plant immune system and other unrelated mechanisms like the transport of molecules (Roux et al. 2014).

Deployments of qualitative resistances at a broad scale in agrosystems revealed that qualitative resistances apply a strong pressure on the targeted pathogen populations and frequently result in the breakdown of the plant resistance, followed by the quick spread of the virulent strains, phenomenon coined as “boom and bust cycle” of major resistance genes (McDonald and Linde 2002). By contrast, quantitative disease resistance exert a lower selective pressure and present a great potential for sustainability in agrosystems (Barbary et al. 2014; Bourget et al. 2015; Brun et al. 2010; Fournet et al. 2013; Laloi et al. 2017; Palloix et al. 2009), even if adaptation of pathogen

populations have already been described (Andrivon et al. 2007; Caffier et al. 2014; Delmotte et al. 2014).

While quantitative resistance is promising in term of durability, the knowledge of the molecular factors underlying this resistance is still scarce due to the complexity of the genetic determinism of the plant-pathogens interactions (Poland et al. 2009). In the past decade, pathogenicity genes and resistance genes have been a major object of scientific interest that brought to light molecular mechanisms involved in recognition and breakdown of resistance (Kushalappa et al. 2016). However, the impact of quantitative resistance on the molecular mechanisms associated to the development and the pathogenicity of the pathogens is still under-investigated. How much quantitative resistance affects the gene expression of a pathogen? Answering this question will provide a deeper insight on the molecular dialogue between a pathogen and a host in the case of complex interaction.

When they breach the host preformed barriers, pathogens must protect themselves against the plant defense mechanisms and manipulate the host physiology in order to build a suitable environment for their growth. The molecular dialogue taking place between both protagonists has a major impact on their biological processes leading to either the disease (compatible interaction) or the host resistance (quantitative or qualitative). Gene expression studies shedded light on the transcriptomic changes occurring during plant-pathogen interactions and underlined their complexity (Lodha and Basak 2012). One example is the transcriptomic studies of the oomycetes spp. from the *Phytophthora* genus.

*Phytophthora* oomycetes are hemibiotrophic filamentous organisms. They switch from an early biotrophic phase of interaction, during which they keep the host cells alive, to a necrotrophic phase where they induce the collapsing and necrosis of the host tissues in order to feed themselves (Fawke et al. 2015; Thines 2014). They rely on an array of effectors that accomplish their molecular function in the extracellular space (apoplastic effectors) or in the cell cytoplasm of the host (cytoplasmic effectors) (Giraldo and Valent 2013; Kamoun 2006; Schornack et al. 2009). *Phytophthora* apoplastic effectors include Cell Wall Degrading Enzymes (CWDEs) used to breach the host cell wall, protease inhibitors and secreted proteases used to counter the host defenses and necrosis inducing proteins necessary for the switch to necrotrophy (Kamoun 2006; Schornack et al. 2009; Wawra et al. 2012). Cytoplasmic effectors are part of two multigenic families: the crinklers (CRNs) and RxLRs. They display a modular structure with N-terminal signal peptide, a translocation motif and the C-terminal domain carrying their molecular function (Schornack et al. 2009).

Studies of the *Phytophthora* spp. different life stages gene expression patterns revealed the important differences existing between them. Chen et al. (2013) studied the transcriptomic changes occurring in *Phytophthora capsici* during the early life stages including zoospores, germinated cysts

and mycelium. They revealed that although less biological processes were up-regulated in the mycelium compared to the zoospore and germinated stages, DEGs related to secondary metabolism and energy conversion were more expressed in hyphae. They also observed the differential expression of many pathogenicity genes including RxLRS, CRNs, elicitors, transglutaminase elicitors, NLPs, CBELs and enzyme inhibitors. In a study on *Phytophthora infestans*, (Ah-Fong et al. 2017a) also observed the changes between different life stages including zoospore, germinated cyst, sporangia and mycelium. Nutrient transport, conversion of energy (glycolysis and beta-oxidation) and proteasome activities allowing the use of proteins as a nutrient source appeared more active in the mycelium stage. More pathogenicity genes were up-regulated in the zoospores and germinated cysts, still, several were also more expressed in hyphae (Ah-Fong et al. 2017a). In a study focused on *Phytophthora infestans* transporters during the infection of potato tubers and leaves compared to artificial media, Abrahamian et al. (2016) showed that the gene expression of transporters displayed dynamic patterns. Interestingly, they observed the consequent up-regulation of 17 transporters in the biotrophic stage of the interaction showing that the transport of molecules is an important process at this moment of the interaction. Some studies focused on the expression changes occurring in both the pathogen and host during their interaction. Jupe et al. (2013) studied the molecular dialogue between tomato and *Phytophthora capsici* with a micro-array approach, and showed a differential transcriptional expression of both the pathogen effector genes and the plant immune system-related genes during the shift between the biotrophic and necrotrophic phases of the interaction. Similarly, in the pathosystem tomato x *Phytophthora infestans*, the gene expression analysis highlighted a tight temporal expression regulation of the pathogen genes, such as genes coding for cytoplasmic and apoplastic effectors, associated with the suppression of the plant defenses (Zuluaga et al. 2015), and a major reorganization of the plant metabolism with the differential induction of both development and defense-related genes (Zuluaga et al. 2016).

Those transcriptional studies successfully identified metabolism, transporter and pathogenicity associated genes showing that their transcriptional regulation were highly dependent on the different life stages of the pathogen and phases of interaction between both the host and the pathogen. However, the host resistance effect on the pathogen gene expression is still poorly understood as those studies focused on compatible interactions where the totally susceptible host permits the normal development of the pathogen. Indeed, investigating the resistance effect of the host on the pathogen gene regulation is technically challenging since the host resistance strongly affects the pathogen development in the plant, consequently the amount of RNA available for sequencing and the quantity of data produced. To address this issue, we chose to analyze the transcriptome of a pathogen when it interacts with a partially resistant host. The pathosystem composed of *Capsicum annuum* and *P. capsici* provides an excellent model to do so, since they both

display quantitative behaviors during their interaction. On one hand, *C. annuum* harbors only quantitative resistance against *P. capsici* enabling the pathogen to grow in the early phases of interaction and thus the study of the host resistance effect on the gene expression of this pathogen (Mallard et al. 2013; Lamour et al. 2012b). On the other hand, while displaying a broad host range and causing great damages on various vegetables, such as peppers, tomatoes, beans and cucurbits, the isolates of the soilborne oomycete *P. capsici* show important plasticity and an host adapted aggressiveness responsible for a wide range of aggressiveness among the natural *P. capsici* populations (Granke et al. 2012).

To study how a partially resistant pepper accession modulates the development of *P. capsici*, we applied an RNAseq analysis on infected tissues at 24 hours post inoculation (hpi). For this, two *P. capsici* isolates with contrasted aggressiveness levels on pepper were confronted to two pepper accessions differing by their resistance levels to *P. capsici*. To evaluate the effect of biological factors “host genotype” and “isolate aggressiveness” on the whole *P. capsici* transcriptome, we statistically measured their own effects and their pairwise interaction on the *P. capsici* gene expression by a GLM-Poisson approach. Then, to identify which genes were impacted by the “host” or by the “isolate”, we analyzed the differential expression of *P. capsici* genes including metabolism, transport and pathogenicity related genes.

## 1.2. Materials and Methods

### 1.2.1. Pepper genotypes, *Phytophthora capsici* isolates and inoculation process

Two genotypes of pepper (*C. annuum*) that showed contrasted resistant levels to *P. capsici* were used: Yolo Wonder, susceptible (S), and Criollo de Morelos 334, partially resistant (R). Seeds were sown in greenhouse and plantlets grown for 2 weeks. After transplanting, plants were grown in greenhouse for 4 to 6 additional weeks. Two isolates which differed in their level of aggressiveness on pepper were used: the lowly aggressive isolate Pc273 (LA), collected on pumpkin in the USA (from Entomology and Plant Pathology Department of Institute of Agriculture, University of Tennessee, local code: LT263), and the highly aggressive isolate Pc107 (HA), collected on pepper in South of France (from INRA GAFL Avignon).

Prior to inoculation, the apexes of the pepper plants were removed with a razor blade. Inoculations were performed, as described in Lefebvre and Palloix (1996), by putting a 3-mm diameter mycelium plug, previously grown on a V8 media for 7 days at 22°C, on the wounded stem. To promote the inoculation, an aluminum square of 4-cm<sup>2</sup> capped the mycelium plug for 1 day to

guarantee a high humidity at the inoculation site. Inoculated plants were transferred to a growth chamber at 12/12H light/dark cycle and 24/22°C temperature for the assay. The experiment was triplicated in the period, each triplicate being inoculated with an independent inoculum, in order to produce 3 true biological replicates.

RNA samples were extracted from the inoculated plants for the following 4 biological conditions: Criollo de Morelos 334 (R) with Pc107 (HA), Yolo Wonder (S) with Pc107 (HA), Criollo de Morelos 334 (R) with Pc273 (LA) and Yolo Wonder (S) with Pc273 (LA), at 24 hours post-inoculation (hpi). Each biological condition was triplicated, giving a total of 12 samples. Each sample consisted of six and four pooled stem fragments for the R and S genotypes, respectively, each fragment being 5-mm long, cut under the stem necrosis. Samples were flash-frozen in liquid-nitrogen and stored at -80°C until further use.

Disease progression was observed on an extra set of plants inoculated in the same conditions as described above. Necrosis lengths were measured at 24 and 72 hours post inoculation for the same biological conditions and the same number of replicates.

### **1.2.2. Library preparation and Illumina transcriptome sequencing**

Samples were grinded in liquid nitrogen with a cold mortar and pestle. Total RNA was extracted using QIAGEN Rneasy Plant Mini Kit. The library preparation and the Illumina sequencing were done at the Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPSS, France). To facilitate comparisons, raw sequences of each sample followed the same steps from trimming to count. RNA-Seq preprocessing included trimming library adapters and performing quality controls. The fastq raw data were trimmed by the FASTX toolkit with Phred Quality Score Qscore > 20, read length > 30 bases, and ribosomal RNA sequences were removed with the sortMeRNA tool (Kopylova et al. 2012). By using the software Hisat2 with the mode parameter “end to end”, a percentage of mismatch of 4 (--score-min L,0,-0.24) and a max intron length of 10,000 bp (--max-intronlen 10000) (Kim et al. 2015), the retained paired-end reads were mapped simultaneously to the 37,989 genomic scaffolds of the pepper genome of Criollo de Morelos 334 (Kim et al. 2014) and to the 917 scaffolds of the Phyca11 version of *P. capsici* genome (<http://genome.jgi.doe.gov/Phyca11/Phyca11.home.html>), (Lamour et al. 2012a). As further data analyses were restricted to the pathogen gene expression, we built a custom annotation file for the *P. capsici* transcriptome by adding 79 re-annotated CRNs from Stam et al. (2013a) and 472 re-annotated RxLRs from Jupe et al. (2013) to the 19,805 transcript models of the *P. capsici* genome, leading to 20,052 non redundant *P. capsici* predicted genes. Then we selected only the paired-end reads that mapped to the *P. capsici* predicted genes. The mapped PCR duplicates were removed using the “MarkDuplicates” script from Picard Tools (version 2.5.0). Finally, the

remaining transcripts (paired-end reads) were counted using the package “Feature Counts” (Liao et al. 2014) of the R software (R Core Team 2016) with the mode “IntersectionStrict”. In order to visualize the main factors controlling the dispersion in the dataset, we performed a Multi-Dimensional-Scaling plot (MDS) based on the paired-end read numbers of the 500 most discriminating genes, as implemented in the edgeR package (Robinson et al. 2010).

### **1.2.3. Selection of a robust subset of *P. capsici* genes and TMM normalization of *P. capsici* gene expression data**

To keep genes with enough mapped paired-end reads, we filtered out the genes with low paired-end read counts, using the maximum-based filter on the Count Per Million values ( $CPM_{ik} = [\text{number of reads for the gene } i \text{ in the sample } k / \text{total number of reads for all genes in the sample } k] * 10^6$ ) implemented in the edgeR package, version 3.14.0, (Robinson et al. 2010; McCarthy et al. 2012). Genes with a CPM value  $\geq 1$  in at least 2 replicates of each biological condition were selected. Finally, we applied for each selected gene the Trimmed Mean of M-values (TMM) normalization (Robinson et al. 2010) in order to normalize their number of paired-end reads counted in the 12 samples.

### **1.2.4. Estimation of the statistical effect of biological factors on the *P. capsici* gene expression**

To understand in which magnitude the *P. capsici* gene expression varies according to the biological conditions, we tested the effect of different factors by maximum likelihood ratio of the TMM-normalized CPM values for each selected gene using GLM-Poisson (generalized linear models) implemented in the package edgeR (McCarthy et al. 2012), by constructing a model including the host resistance level (H), the isolate aggressiveness (I), their pairwise interaction (H x I), and the replicate factor (R) which represents the intra-condition heterogeneity:

$$\text{Model: } \text{Log}_2(\text{TMM-CPM normalized value}) = H + I + H \times I + R$$

The magnitude of each factor was measured by the number of differentially expressed genes according to the different modalities of those factors. A gene was declared differentially expressed (DEG) when its Benjamini-Hochberg-corrected (BH-corrected) p-value was less than 0.01 and its  $|\log_2\text{-fold-change}|$  greater than 1.5 (Benjamini and Hochberg 1995).

### **1.2.5. Identification of genes with differential expression (DE) in different biological conditions**

To identify among the selected *P. capsici* genes which of them showed a differential expression according to modalities of the biological factors, the expression rates of each gene were compared using the previous Model (with BH-corrected p-value < 0.01 and  $|\log_2\text{-fold-change}| > 1.5$ ), as follow: 1/ in the HA isolate when it infects the R versus the S hosts (R vs. S | HA); 2/ in the LA isolate when it infects the R versus the S hosts (R vs. S | LA); 3/ in the HA versus the LA isolates when they infect the R host (HA vs. LA | R); 4/ in the HA versus the LA isolates when they infect the S host (HA vs. LA | S). We illustrated the number of DEGs for each comparison on a Venn diagram.

To evaluate the robustness of these results, we implemented a bootstrap pipeline, where the expression rates of a subset of 4,000 genes randomly taken from the 7,307 selected genes were *de novo* compared in the 4 above comparisons. These steps were repeated 10,000 times thereby ensuring that each gene was selected on average more than 5000 times. Then, we calculated the ratio of the number of times that a gene was declared DE on the number of times that it was selected. The genes with a ratio of more than 0.95 were considered robust and tagged as truly DE. We obtained thus a robust DEG list for each of the four pairwise comparisons.

### **1.2.6. Gene ontology (GO) of selected *P. capsici* genes**

To identify the molecular functions of the selected *P. capsici* genes, homology searches were performed with BLASTp against the NCBI non-redundant protein database (January, 25, 2016) with an E-value threshold of  $1.0E^{-5}$ . Ontology search, InterProScan search (Quevillon et al. 2005) and enrichment tests were achieved using BLAST2GO Basic v4.1.9 (Europe, Germany) with default parameters. GO terms and RxLR annotations were tested for enrichment in the DEG compared to the whole selected *P. capsici* genes, using a two-sided Fisher tests with a p-value threshold of 0.05. A manual curation of the DEG annotations was performed with a second blastp against the NCBI non-redundant protein database using an E-value threshold of  $1.0E^{-5}$ . The best among the 50 first blast hits, that was not an hypothetical protein, with at least 70% of identify on at least 50% the DEG length, was employed to interrogate the Uniprot Knowledgebase (uniprotKB, The Uniprot Consortium 2017). Based on the information retrieved, DEGs were classified into 8 categories: Nutrient and inorganic substances transport (1); Detoxification transport (2), Stress protection (3), Lipid metabolism (4), Protein metabolism (5), Carbohydrate metabolism (6), Other metabolic pathways (7,

Includes genes associated with pathways different from lipid, protein and carbohydrate metabolism), Other (8, genes belonging to categories different than those mention above, including the cytoplasmic effectors and genes without annotations). Presence of signal peptide was ascertained by using signalP version 3.0 (Bendtsen et al. 2004) and Interproscan (Quevillon et al. 2005). Signal peptide presence was used to identify the apoplastic and cytoplasmic effectors.

### **1.2.7. qRT-PCR analysis**

To confirm the changes of the expression patterns observed, primers were designed with primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) for the RxLR effector CUST\_2407. Primers specificity was validated by the analysis of dissociation curves using genomic DNA as template. The genes coding *β-Actin*, *β-tubulin* and ubiquitin-conjugating enzyme (*Ubc*) of *P. capsici* were used as constitutive internal controls. The samples used for the study were produced independently with the same method and experimental design used for the sequenced samples. A total of three biological replicates was evaluated for the four biological conditions RxHA, RxLA, SxHA and SxLA. The RNA was treated with DNase and reverse transcribed to cDNA. Real time PCR were performed using SYBRGreen. Quantification of the gene expression were performed using the delta CT method (Livak and Schmittgen 2001). Results were obtained from two repeated trials.

## **1.3. Results**

### **1.3.1. Disease progress in the biological conditions of interaction**

Infection progress was measured for two isolates (HA, highly aggressive; LA low aggressiveness) on both susceptible (Yolo Wonder) and partially resistant host (Criollo de Morelos 334). As shown in Figure 1.1A, disease symptoms progression was similar at 24 hours post inoculation (hpi) for all interactions, with an average necrosis length of 3 mm for the 4 biological conditions. At 72 hpi, the disease symptoms were more contrasted, ranging from 3.46 to 19.50 mm on average. The interaction between the partially resistant host and the lowly aggressive isolate (RxLA) showed the weakest symptoms while the interaction between the susceptible host and the highly aggressive isolate (SxHA) showed the strongest. Given the contrasted interactions we observed at 72h, we therefore focused our analysis on the 24h time point in order to compare similar

stages of interaction. RNA extraction and Illumina sequencing were performed on plant and pathogen tissues in the area preceding the necrosis.

### 1.3.2. Non-normalized read number analysis

Mapping of total reads on *P. capsici* and *C. annuum* reference genomes yielded from ~27 to ~38 Million paired-end reads by library for the 12 samples from the 4 biological conditions. Of those, 18.5 to 24.2% were identified as mapped PCR duplicates and dropped. The total number of non-duplicated paired-end reads kept for further analyses ranged from ~21 to ~29 Million. In the following, we will denote “reads” for “mapped, non-duplicated, counted, paired-end reads”. To focus on gene expression of the pathogen, we only considered the reads mapped to the 20,052 predicted genes of *P. capsici*. The 12 samples counted each between around  $2.6 \times 10^4$  and  $1.7 \times 10^6$  reads from *P. capsici*, corresponding to 0.16 to 9.42% of the total reads (supplementary, Table S1.1). Of the 20,052 *P. capsici* annotated genes, 13,998 had at least one read in at least one sample. In each of the 4 conditions, between 7,566 and 9,405 genes had at least one read in at least two replicates.

As shown in Figure 1.1B, samples from the condition SxHA showed significantly higher log-transformed number of reads than those from the other conditions ( $p < 0.05$ , Tukey tests with a Bonferroni correction). As expected, the host drastically impacts the percentage of *P. capsici* reads per library, the resistant host showing on average a lower percentage than the susceptible one (0.70% of total reads from R samples versus 4.75% from S samples,  $p < 0.05$ , Tukey test) (supplementary, Table S1.1). Interestingly, a specific interaction between the host and the isolate was detected. Samples from LA isolate showed a low difference of read numbers between R and S (1.02% on average for RxLA and 1.70% on average for SxLA,  $p > 0.05$ , t-test), while samples from HA showed extreme values with the lowest percentage on R and the highest on S (0.38% on average for RxHA and 7.80% on average for SxHA,  $p < 0.05$ , t-test). MDS plots illustrate the consistency between replicates of each biological condition in terms of number of *P. capsici* reads. They revealed a structuration according to the host and the isolate. The first dimension separates HA from LA samples, suggesting a strong effect of the isolate on the number of *P. capsici* reads. The second dimension is mainly driven by the difference between the replicates (supplementary Figure S1.1). The third dimension separates the samples according to the host. When looking at the plot of the first and third dimensions (Figure 1.1C), RxHA and SxHA were well separated while RxLA and SxLA were not, suggesting an interaction effect between the host and the isolate on the *P. capsici* gene expression.

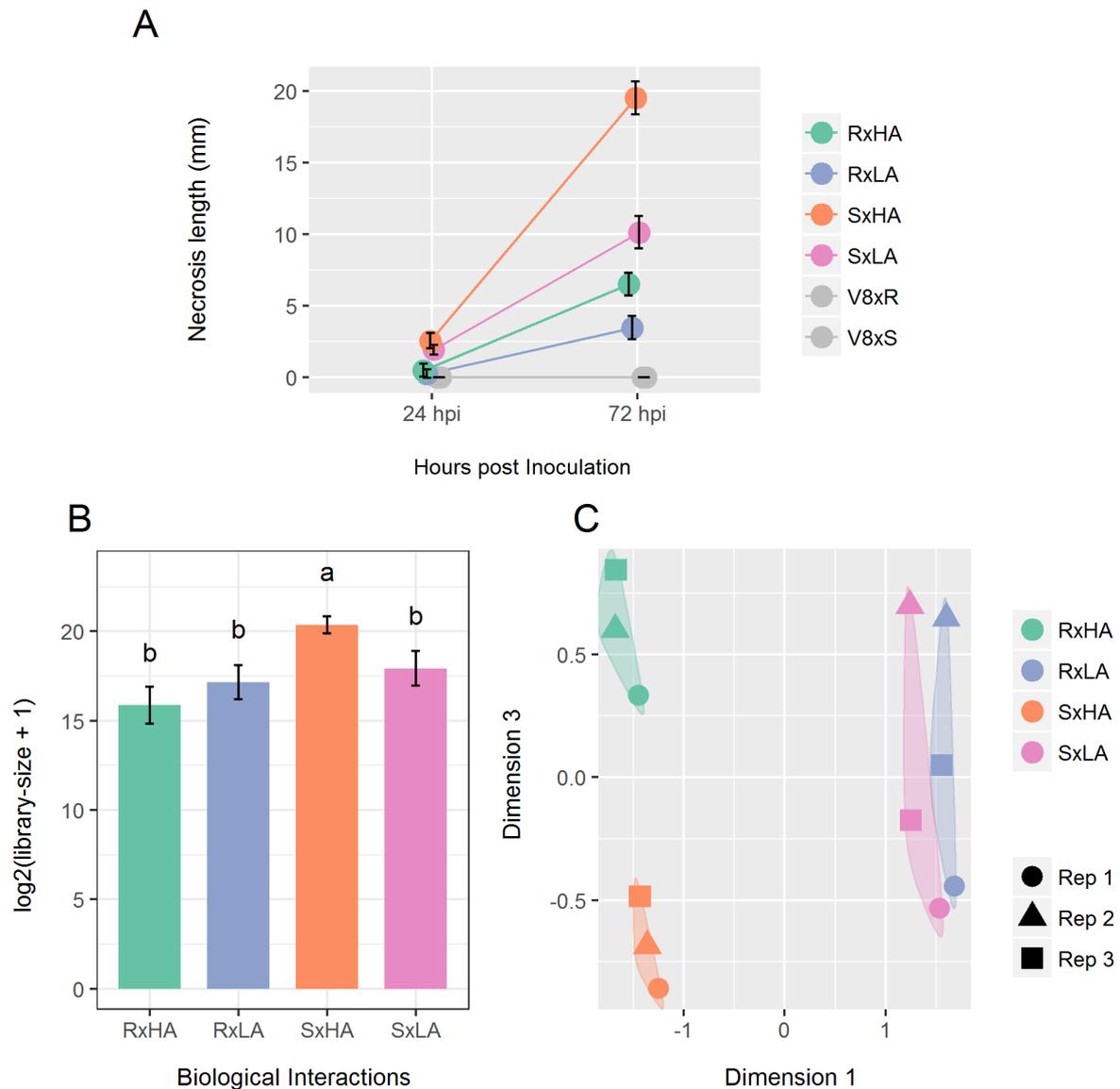


Figure 1.1: Kinetic of infection by *Phytophthora capsici* and size of the libraries from the 12 samples. (A): Kinetic of infection. Necrosis lengths on the stem of 16 susceptible and 24 resistant plants were measured at 24 and 72 hours post inoculation with the isolate HA (highly aggressive) and LA (lowly aggressive). Error bars show the standard deviation. V8: negative controls (plant inoculated with V8 media). (B): Mean size of the *P. capsici* libraries for the four biological conditions containing reads that mapped to the 20,052 predicted genes of *P. capsici* [expressed by the Log-2 transformation of the total number of reads + 1 on the y-axis:]. Error bars show the standard deviation. The categories (a) and (b) were determined with a HSD test using a p-value < 0.05. (C): Sample-to-sample distances according to their respective *P. capsici* read number in the corresponding library. Multi-dimensional scaling plot based on the log Fold-Change for the 500 most contrasted transcripts across the 4 biological conditions in the dimensions 1 (x-axis) and 3 (y-axis). RxHA: Interaction of the resistant host (R) with the highly aggressive isolate (HA); RxLA: Interaction of the resistant host (R) with the lowly aggressive isolate (LA); SxHA: Interaction of the susceptible host (S) with the highly aggressive isolate (HA); SxLA: Interaction of the susceptible host (S) with the lowly aggressive isolate (LA). The shapes symbolize the biological replicates.

### **1.3.3. Normalized read number analysis**

To insure the robustness of following analyses, we selected 7,307 robust *P. capsici* genes with the highest numbers of reads (procedure described in the materials and methods section). The distribution of Trimmed Means M-normalized Count Per Million (TMM-normalized-CPM) values within each sample were mostly Gaussian-shaped (Supplementary Figure S1.2), even if the RxHA samples, whose library-sizes were the smallest, showed left-censored distributions. The TMM-normalized CPM values were homogeneous between replicates (Supplementary Figure S1.3). The low library-size samples and the variability between replicates thus only marginally affected the subset of selected genes allowing a gene-by-gene comparison of the host genotype (H) and the isolate aggressiveness (I) effects on the *P. capsici* number of reads. Among the 7,307 *P. capsici* selected genes, a GLM-Poisson analysis revealed that no gene was impacted by the host genotype factor, 272 genes were impacted by the isolate factor and 7 by their interaction. At last, the replicate factor had an effect on 61 genes, in agreement with the MDS plot analysis (Supplementary Figure S1.1).

### **1.3.4. Differential expression analysis**

Pairwise comparisons of *P. capsici* gene expression between the 4 biological conditions revealed a total of 404 genes differentially expressed (DEGs) out of the 7,307 expressed genes. Of these 404 genes, 361 (89.36%) were found DE between the 4 biological conditions in 95% of bootstrap resampling and were considered for further analyses. The biggest expression variation were observed between the 2 isolates, first when they infect the S host with 248 DEGs in the comparison HA vs. LA | S (3.4% of the 7307 genes set), second when they infect the R host with 136 DEGs in the comparison HA vs. LA | R (1.9 % of the 7307 genes set). Only 48 HA genes (0.7 % of the 7307 genes set) differentially expressed according to the infected host (R vs. S | HA). No LA gene differentially expressed between the two hosts (R vs S. | LA). A total of 71 DEGs (1.0 % of the 7307 genes) were found common to two comparisons (Figure 1.2).

### **1.3.5. Gene ontology analysis**

A rather equivalent proportion of the selected expressed genes and of the DEGs had gene ontology (GO) annotations: 5224 of 7,307 (71%) and 252 of 361 (70%), respectively (Supplementary Table S1.4). Five GO categories were enriched and 29 were depleted in the list of 361 DEGs compare

to the 7,307 selected *P. capsici* genes (Supplementary Table S1.3). The ubiquitous gene functions of the GO categories and absence of pathogenesis-related categories justified that we achieved a manual curation of DEG annotations to classify them into 8 categories of biological processes (Cf. materials and methods section) (Table 1.1).

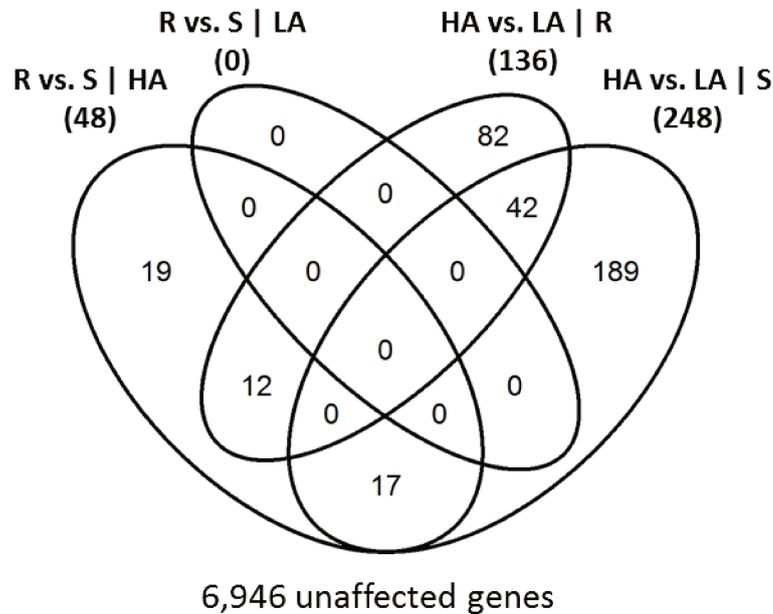


Figure 1.2: Venn diagram illustrating the number of *P. capsici* differentially expressed genes according to the host (2 left circles) or to the isolate (2 right circles). HA: highly aggressive isolate (Pc107); LA: lowly aggressive isolate (Pc273); R: resistant genotype (Criollo de Morelos 334); S: susceptible genotype (Yolo Wonder); R vs. S | HA: Pairwise comparison of the biological conditions RxHA and SxHA; R vs. S | LA: Pairwise comparison of the biological conditions RxLA and SxLA; HA vs. LA | R: Pairwise comparison of the biological conditions RxHA and RxLA; HA vs. LA | S: Pairwise comparison of the biological conditions SxHA and SxLA.

### 1.3.6. HA gene expression is enriched in nutrient associated transporter genes in the host genotype comparison

Isolates behave differently when subjected to the two hosts, HA being the only isolate for which differential expression was observed between R and S. Out of the 361 DEGs, 48 DEGs were DE in the comparison R vs. S | HA, with 23 DEGs more expressed by HA on the R host and 25 DEGs more expressed by HA on the S host (Table 1.1). Several transport associated genes were observed with 13 DEGs being putative transporters (Table 1.1). On the S host, HA expressed more nutrient and inorganic substance related transporters whereas on the R host, detoxification related transporters were predominant. Metabolism associated genes were more expressed by HA in the two compared biological conditions but the target molecules were different according to the host. On the S host, an increase in genes related to carbohydrate metabolism was observed. These included several genes

with the annotation “hydrolase activity, acting on glycosyl bonds’, characteristic of the enzymes targeting cells walls. On the R host, lipid metabolism associated genes were more expressed. Notably, we observed 3 phospholipase D alpha involved in the synthesis of phosphatidic acid (PA), a key signaling molecules during stresses (Supplementary table S1.3).

Table 1.1: Summary of the molecular functions observed for the differentially expressed genes (DEGs)

Biological process		R vs. S   HA		HA vs. LA pairwise comparisons					
		R>S	R<S	HA>LA (R&S)	HA<LA (R&S)	HA>LA (R)	HA<LA (R)	HA>LA (S)	HA<LA (S)
Nutrition	Nutrient & inorganic sub. transport	1	10	0	0	2	5	14	8
	Defense against stresses	2	0	0	0	1	2	1	12
Metabolism	Stress protection	2	2	2	3	3	6	4	2
	Lipid	4	0	2	1	4	7	3	6
	Protein	1	1	0	3	1	5	6	23
Others	Carbohydrate	3	9	1	1	4	10	7	8
	Other pathways	0	0	1	1	2	3	6	6
Total number of DEGs		23	25	16	26	43	51	64	142
DEG numbers by comparison		48		42		94		206	
Total sum		48		342					

HA: highly aggressive isolate (Pc107); LA: lowly aggressive isolate (Pc273); R: resistant genotype (Criollo de Morelos 334); S: susceptible genotype (Yolo Wonder); R vs. S | HA: Pairwise comparison of the biological conditions RxHA and SxHA; HA vs. LA: Pairwise comparison of the biological conditions with HA and LA. R > S: DEGs more expressed by HA on the R; R < S: DEGs more expressed by HA on the S; HA < LA | R&S: DEGs more expressed by LA on the R and the S host; HA > LA | R&S: DEGs more expressed by HA on the R and the S; HA < LA | S: DEGs more expressed by LA on the S host specifically; HA > LA | S: DEGs more expressed by HA on the S host specifically; HA < LA | R: DEGs more expressed by LA on the R host specifically; HA > LA | R: DEGs more expressed by HA on the R host specifically; Inorganic sub.: Inorganic substance; Other pathways: Includes genes associated with pathways different from lipid, protein and carbohydrate metabolism; Other: Genes belonging to categories different than those mention above, include the cytoplasmic effectors and genes without annotations.

### 1.3.7. Between isolate comparisons highlight differential host adaptation

More genes were found DE between the two isolates (HA vs. LA) than between hosts. As observed with the GLM-Poisson model and the MDS plots, the isolate aggressiveness had a broader impact on the gene expression of *P. capsici* as 342 DEGs of the DEGs were detected at least once when comparing the two isolates (Table 1.1). We observed a weak overlap between the DEGs of the

isolate comparisons with only 42 DEGs of them observed in both HA vs. LA | S and HA vs. LA | R. A diverse array of pathways and functions were found implicated, among them being protein metabolism associated genes with 3 genes were more expressed in this pathway for LA. Those included a highly expressed putative serine protease (RxLA: 1693.36 CPM ; SxLA: 1168.21 CPM). Additionally, an Acyl-CoA oxidase (ACOX) involved in the conversion of energy by using fatty acids (beta-oxidation) was more expressed by LA during the interaction with the R and S host (Supplementary table S1.3).

Out of the 361 DEGs, 206 DEGs were only detected in HA vs. LA | S (Table 1.1). As observed in R vs. S | HA, the DEGs more expressed by HA or LA were contrasted for transport associated genes. Transport associated DEGs more expressed by HA were mainly nutrient transporters and included four folate-Biopterin transporters. In comparison, the transporters more expressed by LA were mostly involved in detoxification (Table 1.1). Indeed, a total of 12 DEGs encoding for ABC-transporters were observed. Additionally we identified several DEGs involved in the vesicle transport of proteins (Supplementary table S1.3). Among them, we detected an “Autophagy related protein 3” involved in the formation of autophagosome during autophagy processes. For both isolates, but with higher number in HA, we observed DEGs associated with biosynthesis processes. We detected amino-acids and lipids biosynthesis genes in both isolate and one IMP cyclohydrolase involved in the biosynthesis of purine nucleotides were more expressed by the HA isolate (Supplementary table S1.3). Strikingly, we also observed an important increase for genes associated with protein catabolism in the DEGs more expressed by the LA isolate (Table 1.1). These included several putative ubiquitin ligases, involved in the degradation of proteins via the proteasome, and several proteases without peptide signals. One putative serine protease was notably highly expressed and showed CPM values larger than 2000 in the biological conditions RxLA and SxLA. (Supplementary table S1.3).

Almost twice less DEGs (94 DEGs) were detected for HA vs. LA | R compared to HA vs. LA | S. Among these, we observed the same proportion of nutrient and detoxification associated transporters (Table 1.1). In this comparison, 2 phospholipase D were more expressed by the HA isolate. We also observed the DE of a nitrite reductase that was more expressed in the same isolate. Similarly to the results observed for the LA isolate in HA vs. LA | S, several genes involved in protein catabolism were DE, including proteases and a putative ubiquitin ligase (Supplementary table S1.5). Interestingly, we observed an increase for genes potentially associated with nutrition stresses among the DEGs more expressed in the LA isolate. Indeed, several genes involved in beta-oxidation including a putative acyl-CoA dehydrogenase were identified. Additionally, we observed an allantoicase, which is involved in the catabolism of purines when nitrogen sources are limited.

### **1.3.8. Apoplastic effector showed enrichment for Cell Wall Degrading Enzymes (CWDE)**

Successful pathogens must modulate the host physiology in order to grow. To grasp the effect of the host on the transcriptomic changes occurring in the isolates and between them, we searched for the genes coding for known effectors. Across the 3 pairwise comparisons that revealed DEGs, we identified a total of 43 putative effectors with 69.8% (30 DEGs) of them being apoplastic effectors. Among these 30 apoplastic effectors, 18 DEGs encoding for Cell Wall Degrading Enzymes (CWDE) were identified (Figure 1.3A). These included several putative CWDE known to target the pectines composing plant cell walls such as pectinesterases, an arabinogalactan endo- $\beta$ -1,4-galactanase, a polygalacturonase and a rhamnogalacturonate lyase A. Among the remaining putative apoplastic effectors, we observed different elicitors of plant defenses, a berberin-like protein, a kazal-like serine protease inhibitor domain-containing protein and two putative NPP1. Additionally, 4 secreted proteases were detected. Out of these, 3 were more expressed by the LA isolate in the pairwise comparison HA vs. LA | S. Notably, one serine protease (Phyca11|509178) showed an extremely high level of expression in the biological condition SxLA (Figure 1.3B).

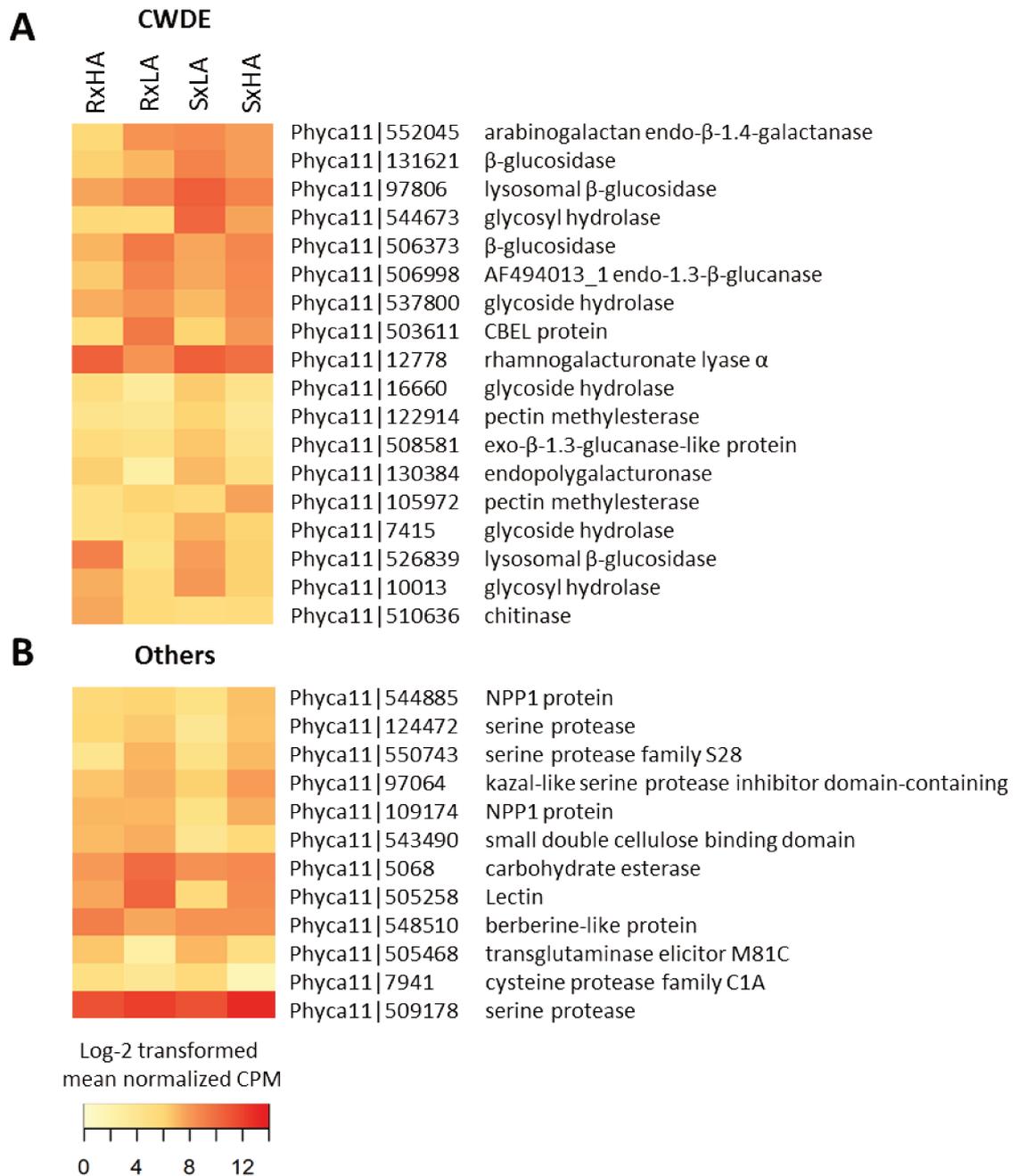


Figure 1.3: Expression patterns of differentially expressed genes coding for putative apoplastic effectors. RxHA: Interaction of the resistant host with the highly aggressive isolate; SxHA: Interaction of the susceptible host with the highly aggressive isolate; RxLA: Interaction of the resistant host with the lowly aggressive isolate; SxLA: Interaction of the susceptible host with the lowly aggressive isolate. The genes are labeled with their protein ID and the homologue annotation retrieved from the nr protein database from the ncbi. (A): Cell Wall Degrading Enzymes (CWDE). (B): Other apoplastic effectors

### **1.3.9. The isolates are contrasted on their set of DE cytoplasmic effectors**

Among the DE putative effectors, we identified 13 RxLR effectors (Figure 1.4A, Supplementary table S1.6). Of these, a total of 12 RxLR were DE in HA vs. LA | R and HA vs. LA | S. Only one RxLR (Cust\_2407) was DE in R vs. S | HA and more expressed by the HA isolate on the S host. Few RxLR effectors were DE in more than one pairwise comparison (Figure 4B). Interestingly, the 3 DE RxLR detected in HA vs. LA | R and HA vs. LA | S were more expressed by the HA isolate and showed a high level of expression (Figure 1.4C). These results suggest that these RxLR effectors might be crucial for the development of the isolate on pepper hosts. In HA vs. LA | S, we observed 4 RxLR effectors more expressed by the LA isolate and 1 RxLR effector by the HA isolate. By contrast, the 4 DE RxLR effectors detected in HA vs. LA | R were all more expressed by the HA isolate (Figure 1.4C).

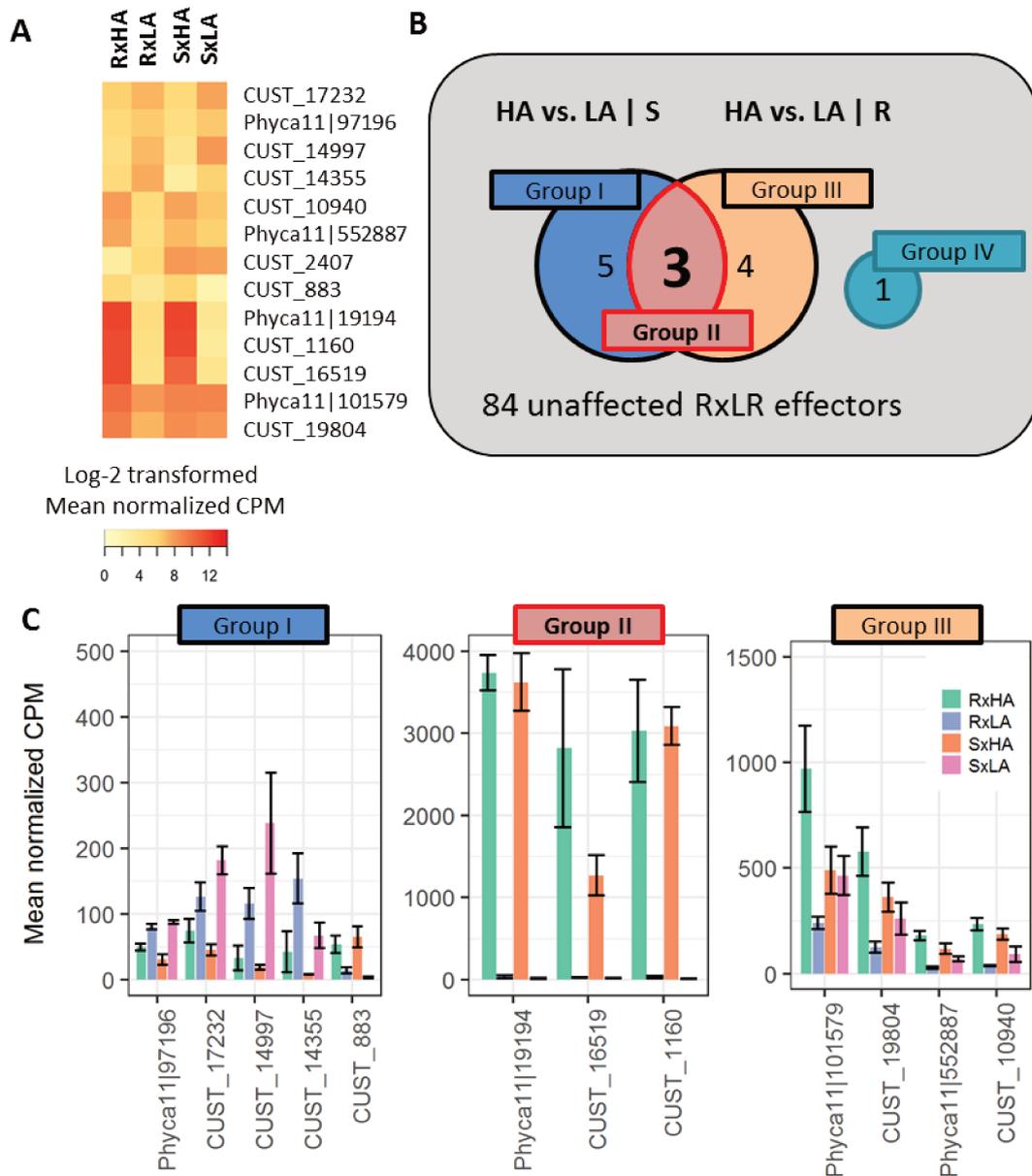


Figure 1.4: Expression patterns of differentially expressed genes coding for putative RxLR effectors. (A): Heatmap showing the expression patterns of the differentially expressed genes coding for putative RxLR effectors. RxHA: Interaction of the resistant host with the highly aggressive isolate; SxHA: Interaction of the susceptible host with the highly aggressive isolate; RxLA: Interaction of the resistant host with the lowly aggressive isolate; SxLA: Interaction of the susceptible host with the lowly aggressive isolate. Labels are not shown due to space limitations, but the data are in supplementary table S6. (B): Venn diagram showing the assessment of overlap between the differentially expressed genes coding for putative RxLR detected with the isolate comparisons (HA vs. LA | R and HA vs. LA | S). HA vs. LA | S: Pairwise comparison of the biological conditions SxHA and SxLA. HA vs. LA | R: Pairwise comparison of the biological conditions RxHA and RxLA. Genes are classified into Group I (Differentially expressed only in HA vs. LA | S), Group II (Differentially expressed in both HA vs. LA | S and HA vs. LA | R), Group III (Differentially expressed only in HA vs. LA | R) and Group IV (Differentially expressed in R vs. S | HA). (C): Expression patterns of the differentially expressed genes coding for putative RxLR categorized into Group I, II and III. Error bars show the standard deviation.

### 1.3.10. Expression patterns validation for the RxLR effector CUST\_2407 by qRT-PCR

The expression patterns observed with the transcriptomic analysis were validated using quantitative RT-PCR. We selected the RxLR effector CUST\_2407 which was differentially expressed and more expressed by the HA isolate in the S host (R vs. S | HA). The relative expression levels were higher in the biological condition SxHA compared to RxHA (R vs. S | HA, Figure 1.5) while no changes were detected between SxLA and RxLA (R vs. S | LA, Figure 1.5).

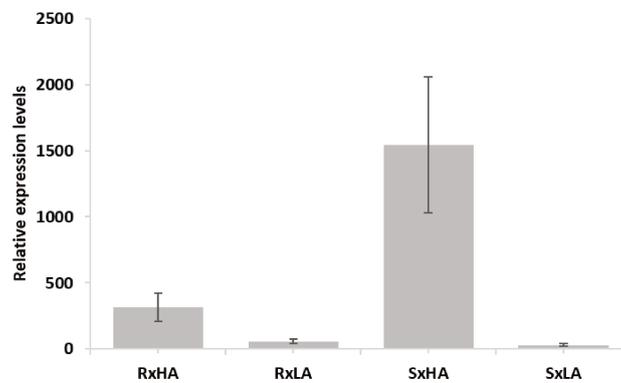


Figure 1.5: qRT-PCR analysis expression levels of the differentially expressed RxLR effector CUST\_2407. The genes coding *β-actin*, *β-tubulin* and ubiquitin-conjugating enzyme (*Ubc*) of *P. capsici* were used as constitutive internal controls. The relative expression levels were determined with the delta CT method (Livak and Schmittgen 2001).

## 1.4. Discussion

We report a transcriptomic analysis of the interaction between *Phytophthora capsici* and pepper. Several transcriptomic studies described the transcriptomic changes of *Phytophthora* spp when interacting with their host (Judelson et al. 2008; Zuluaga et al. 2015; Jupe et al. 2013; Ah-Fong et al. 2017a; Attard et al. 2014; Blackman et al. 2015). However, to our knowledge, our study is the first to describe the changes occurring in isolates contrasted for their aggressiveness levels during their interaction with host genotypes contrasted by their resistance level for an oomycete of the *Phytophthora* genus. We aimed to study the effect of the pepper host genotype on the gene expression of *P. capsici* and to observe the biological processes contrasted between different biological interactions. The progression of symptoms after the inoculation of the two hosts with the two isolates highlights the differences of disease development between the biological conditions. At 72 hours post inoculation (hpi), necrosis length ranged from 3.46 to 19.50 mm suggesting that the pathogen development was highly contrasted. By comparison, necrosis lengths were inferior to 5 mm and the variation between them was weaker at 24 hpi suggesting that the pathogen was the same stage of interaction. We thus focused our transcriptomic study on the comparison of the *P. capsici* gene expression profiles at 24 hpi.

Following the recommendation of Lin et al. (2016) which showed with a multifactorial transcriptomic study on *Drosophila* that some normalisation methods could be susceptible to genes selection, we applied a bootstrap procedure to assure the robustness of the transcriptomic changes observed in the differential analysis. Of the 404 differentially expressed genes (DEGs), a total of 361 genes (89.4%) were still DE in more than 95% of the gene sampling (see Mat & Meth for the procedure).

Pairwise comparisons confirmed the small quantitative impact of the host genotype on each isolate expression patterns. We observed only 13.3% (48 DEGs) of the total robust DEG in the pairwise comparison where the highly aggressive isolate (HA) interacted with the resistant (R) and the susceptible host (S) (R vs. S | HA). In the same comparison with the lowly aggressive isolate (LA), no gene was significantly DE (R vs. S | LA). Interestingly, the comparison of *Zymoseptoria tritici* gene expression profiles during its interaction with wheat (compatible host) and *Brachypodium distachyon* (incompatible host) revealed similar results with 40 DEGs highlighted (Kellner et al. 2014).

On the contrary, the pairwise comparisons of the biological interactions where the isolates interacted with the same host (HA vs. LA) highlighted more DEGs with 136 and 248 genes detected in HA vs. LA | R and HA vs. LA | S respectively.

Transport is a crucial physiological process for pathogens development during the interaction with plant hosts (Yi and Valent 2013; Lapin and Van den Ackerveken 2013). Previous transcriptomic studies focusing on *Phytophthora* spp. highlighted the dynamism of the gene expression for the transporters between the different stages of development and phases of interaction (Abrahamian et al. 2016; Attard et al. 2014; Ah-Fong et al. 2017a). Similarly, we observed an enrichment for transport associated genes among the DEGs detected in the 3 pairwise comparisons. The proportions varied among the pairwise comparisons with 27.1%; 17.0% and 10.6% of the DEGs of R vs. S | HA, HA vs. LA | S and HA vs. LA | R respectively.

Apart from nutrient and inorganic substance acquisition, transporter can also promote the development by protecting the pathogen against the defenses deployed by the plant during interaction. ABC-transporters has been shown to play a role in the virulence of filamentous pathogen and suggested to be responsible for the environment detoxification by controlling the efflux of the plant chemicals (Stefanato et al. 2009; Ammar et al. 2013; Coleman et al. 2011). In a transcriptomic study of the interaction between *P. infestans* and a susceptible tomato genotype, (Zuluaga et al. 2015) observed high levels of transcript accumulation for these transporters during the biotrophic phase. In the present study, we observed an increased proportion of DE ABC-transporters in the biological conditions RxHA and SxLA that were compared to SxHA. In the pairwise HA vs. LA | S, the number of DE ABC-transporters was stronger as we identified 12 more expressed by the LA isolate (Table 1.1). Furthermore, we observed an autophagy-related gene more expressed by the LA isolate in the comparison. HA vs. LA | S. The increase number of these over expressed detoxification transporters in the conditions RxHA and SxLA may be the result of the stress applied by the defense mechanisms triggered in the plant when the interaction is weakly compatible.

During their development cycle, plant pathogenic oomycetes switch from a phase based on nutrient acquisition to a phase relaying on the use of stocks. Contradictions can be observed in the literature. An early transcriptomic study of *P. infestans* development highlighted a complex regulation of the gene expression of gene associated with energy conversion (beta-oxidation and glycolysis) and protein turnover (Judelson et al. 2008). More recently, Ah-Fong et al. (2017a) observed that these genes showed higher levels of expression during the mycelium stage compared to other development stages. In our study, the metabolism processes used by the isolates is highly dependent of the host genotype.

In the pairwise comparison on the S host (HA vs. LA | S), the HA isolate had more DEGs associated with the biosynthesis of molecules including amino-acids, lipids and purines, when compared to the LA isolate. By contrast we observed more genes associated with catabolism in the LA isolate and particularly with protein catabolism. Indeed, several ubiquitin ligases and non-secreted proteases were more expressed by the LA isolate (Supplementary table S1.5). This increased

number of genes involved in protein turnover may be used to support the development of the LA isolate. Taking together, these results seem to reflect the development contrast between the isolates on the susceptible pepper genotype.

In the pairwise comparison on the R host (HA vs. LA | R), less biosynthesis genes were DE compare to the comparison on the S host suggesting that the development contrast between the isolates is lower. Although less DEGs were observed, the LA isolate still showed DEGs related to protein turnover more expressed. In the HA isolate, we observed the overexpression of a nitrite reductase. *P. infestans* was shown to be inapt to grow in media containing nitrates and nitrites as only source of nitrogen but it was suggested that this pathway may contribute to its development when other sources are limited (Abrahamian et al. 2016). In the LA isolate, an allantoinase was detected more expressed. In *Saccharomyces cerevisiae*, it was shown to degrade purines during nitrogen deficiency (Yoo and Cooper 1991). Additionally, we observed several genes associated with beta-oxidation, which allows the production of energy using fatty-acids, more expressed in the LA on the R host. Taking together, these results suggest that the LA isolate may be subject to nutrient limitation during the interaction with the R host. This stress seems to be higher for the LA isolate as suggested by the activation of beta-oxidation.

Among the genes associated with lipid metabolism, we detected 3 phospholipases D. Phospholipase D hydrolyzes the phospholipids phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) that compose the plasma membranes to produce phosphatidic acid (PA). PA is a signaling molecule which regulate many physiological processes associated with biotic and abiotic stresses in plants (Zhao 2015) and was proposed to play a role in pathogenesis (Meijer et al. 2011). During the interaction of *P. infestans* and a susceptible tomato genotype, it was shown to be expressed during the transition from the biotrophic phase to the necrotrophic phase with a pic expression at the necrotrophic phase of interaction (Zuluaga et al. 2015). Two of them were more expressed by the isolate HA on the R host in R vs. S | HA and HA vs. LA | R. The last one was more expressed by the HA and LA isolates in the R vs. S | HA and HA vs. LA | S comparisons respectively (Supplementary table S1.5). Their expressions in those biological conditions, which are weakly compatible for the pathogen development, suggest that they may play a role in the protection against the defense mechanisms of the host by modulating the host physiological processes.

Effectors are the main tools to promote the development of pathogen in their hosts. In *Phytophthora* spp., their expression is highly dynamic and regulated between the different development stages and phases of the interaction with the host (Ah-Fong et al. 2017a; Chen et al. 2013; Jupe et al. 2013; Zuluaga et al. 2015). The pairwise comparisons revealed an important proportion of the DEG encoding for putative effectors (11.2%).

*Phytophthora* spp. secrete enzymes that digest the polysaccharides that compose the plant cell walls in order for them to penetrate the plant cells. Not surprisingly, an important proportion (41.9%) of the DE effectors detected encoded for putative cell wall degrading enzymes (CWDE). Among them, we observed several CWDE associated with the degradation of pectic molecules. Similarly, pectinases CWDE were observed predominantly expressed during the biotrophic phase of the interaction between the lupin roots and *Phytophthora parasitica* (Blackman et al. 2015).

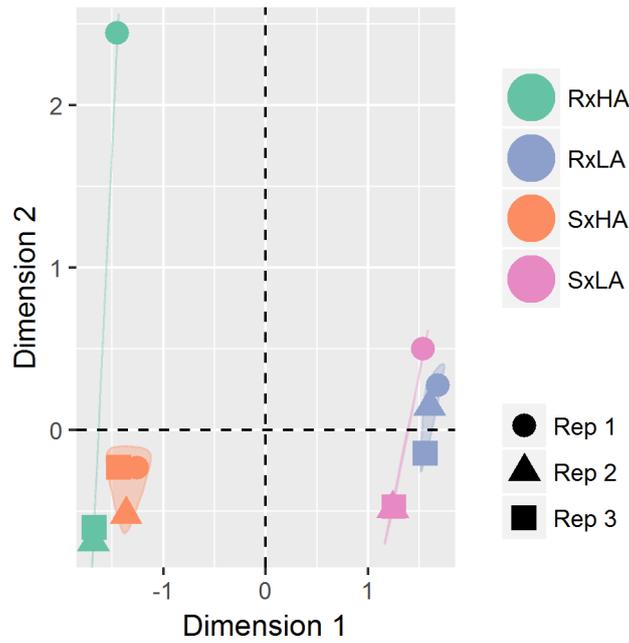
A total of 97 RxLR effectors were expressed in all the biological conditions of interaction of this study. Among them, 13.4% were DE. This relative weak number compared to previous studies on *P. infestans* or *P. capsici* can be explained by the difference in experimental design. It was predictable that our study focusing on one time of interaction (24 hpi) would highlight less DE RxLR compared to transcriptomic studies comparing the expression profiles of different stages of development and phases of interaction (Ah-Fong et al. 2017a; Chen et al. 2013; Jupe et al. 2013; Zuluaga et al. 2015). Out of the 13 DE RxLR, 11 were observed expressed or differentially expressed in previous studies (Chen et al. 2013; Jupe et al. 2013). We observed that the HA isolate overexpressed more RxLR compare to the LA isolate. Furthermore, some of these were expressed on both the R and S host and showed high level of expression suggesting that they are important for the colonization of pepper hosts. In comparison, the LA isolate only over expressed RxLR on the S host while none was more expressed on the R host. Given that RxLR effectors modulate host physiology during plant infection, the difference between the sets of RxLR DE might explain the difficulty of the LA isolate to colonize pepper hosts.

We compared the transcriptomic profiles of *Phytophthora capsici* in different biological conditions of interaction at 24 hours post inoculation. We observed a relatively weak impact of the host genotype on the number of genes detected differentially expressed (R vs. S). However, the weak overlap between the isolate comparisons (HA vs. LA) on the R and S hosts showed that host genotypes differently contrast the gene expression of the *P. capsici* isolates. Among the DEGs, several genes associated with transport, lipid and protein metabolism and pathogenicity were observed. Our findings serve as a source of testable candidates to develop a better understanding of the effect of partial host resistance on plant pathogens.

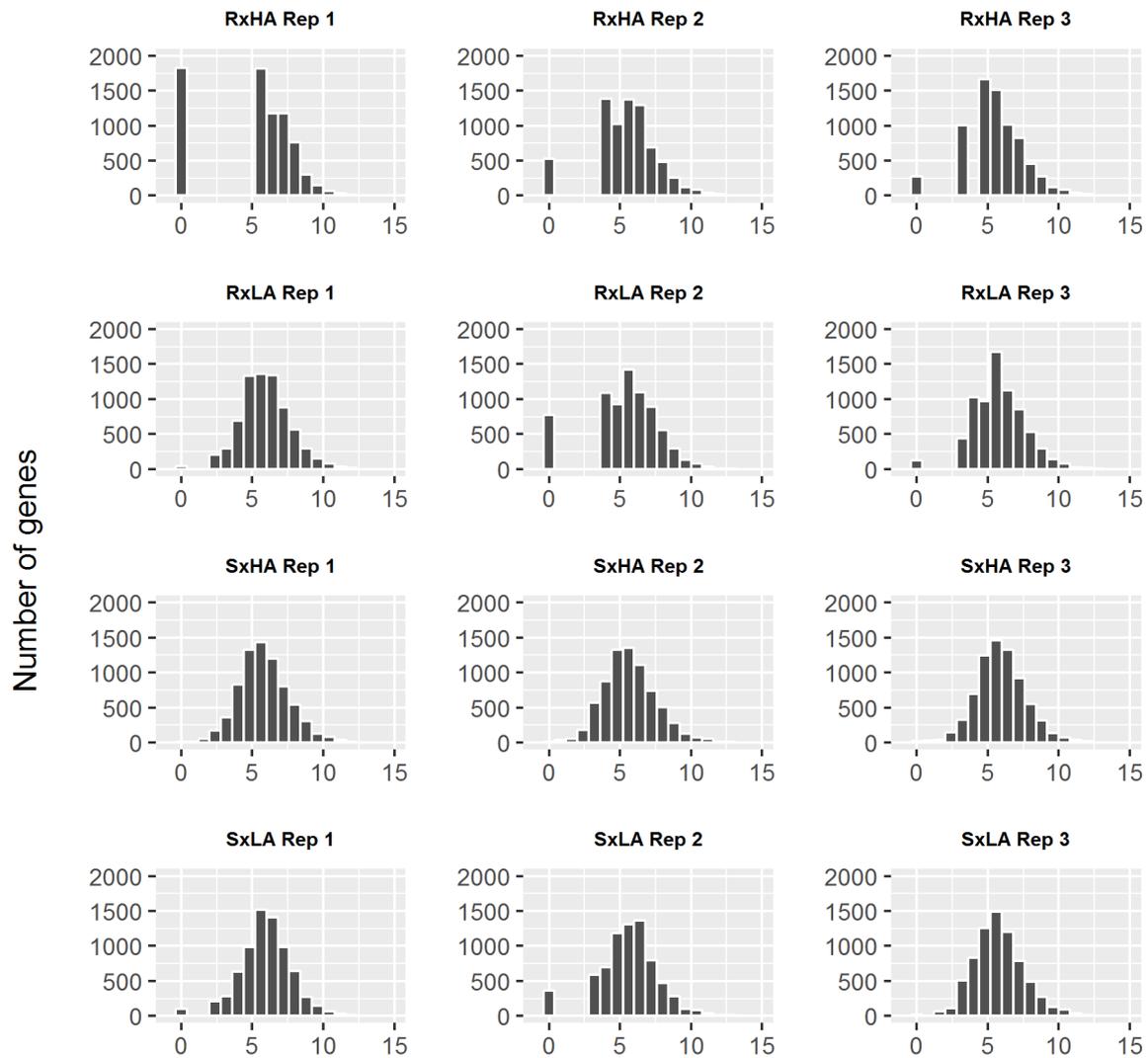
## 1.5. Supplementary material

Sample	<i>Pc</i> + <i>Ca</i> number of mapped paired-end reads	<i>Pc</i> + <i>Ca</i> number of paired-end reads mapped to annotations	Number of <i>Pc</i> paired-end reads' (%)	Number of <i>Pc</i> genes with at least one read
RxHA Rep.1	31,185,077	16,181,787	26,430 (0.163)	6,113
RxHA Rep.2	27,284,302	16,024,029	78,831 (0.492)	7,786
RxHA Rep.3	37,725,642	21,165,909	100,828 (0.476)	8,474
RxLA Rep.1	29,456,661	15,758,983	254,743 (1.616)	11,210
RxLA Rep.2	32,331,008	17,924,249	70,548 (0.394)	9,018
RxLA Rep.3	28,684,269	16,489,701	171,472 (1.040)	10,309
SxHA Rep.1	30,507,218	18,296,966	1,573,691 (8.601)	11,910
SxHA Rep.2	29,630,304	17,929,401	1,689,382 (9.422)	11,771
SxHA Rep.3	28,351,006	17,194,375	922,598 (5.366)	11,475
SxLA Rep.1	34,657,570	17,940,011	234,600 (1.308)	11,058
SxLA Rep.2	27,488,735	15,580,182	130,145 (0.835)	9,813
SxLA Rep.3	30,056,058	16,878,196	498,825 (2.955)	11,444

Supplementary Table S1.1: Mapping statistics per sample (library) of library sizes and number of reads mapped to the reference genomes of *Phytophthora capsici* (*Pc*) and *Capsicum annuum* (*Ca*). Column 1: Sample names. R: Resistant host (Criollo de Morelos 334), S: Susceptible host (Yolo Wonder), HA: highly aggressive isolate (Pc107), LA: lowly aggressive isolate (Pc273), Rep: Biological replicate. Column 2: Number of paired-end reads mapped onto *Pc* and *Ca* reference genomes. Column 3: Number of paired-end reads mapped on the *Ca* and *Pc* gene annotations after removing the duplicated reads. Column 4: Number of paired-end *Pc* reads; the percentages represent the amount of *Pc* reads among the total number of column 3 reads. Column 5: Number of *Pc* genes with at least one read in the sample.

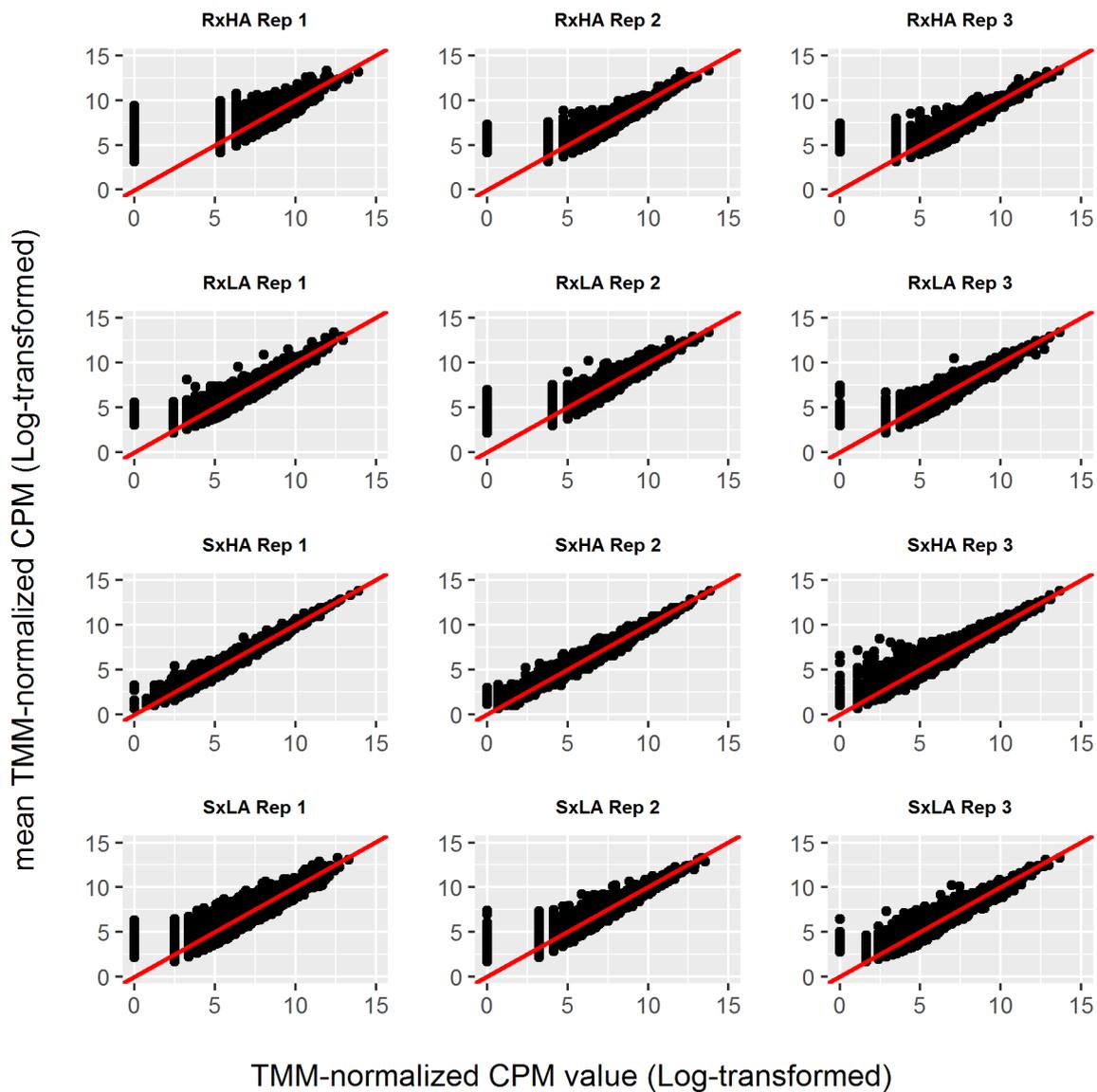


Supplementary Figure S1.1: Sample-to-sample distances for the 12 samples according to their respective *P. capsici* read number in the corresponding library. Multi-dimensional scaling plot based on the log Fold-Change for the 500 most contrasted transcripts across the 4 biological conditions in dimensions 1 (x-axis) and 2 (y-axis). Green: Interaction of the resistant host with the highly aggressive isolate (RxHA); Blue: Interaction of the resistant host with the lowly aggressive isolate (RxLA); Orange: Interaction of the susceptible host with the highly aggressive isolate (SxHA); Pink: Interaction of the susceptible host with the lowly aggressive isolate (SxLA). The shapes symbolize the biological replicates: Circle: Replicate 1, Triangle: Replicate 2 and Square: Replicate 3.



TMM-normalized CPM value (Log-transformed)

Supplementary Figure S1.2: Histograms of the gene distribution by sample according to the log-transformation of their TMM-normalized count per million values (TMM-CPM). The 3 biological replicates (Rep) are represented in line. Biological conditions from top to bottom: Interaction of the resistant host with the highly aggressive isolate (RxHA), Interaction of the resistant host with the lowly aggressive isolate (RxLA), Interaction of the susceptible host with the highly aggressive isolate (SxHA), Interaction of the susceptible host with the lowly aggressive isolate (SxLA).



Supplementary figure S1.3: Projections of the log-transformed mean of the TMM-normalized count per million values (CPM) of the 3 replicates from a given biological condition (y-axis) on the log-transformed TMM-normalized CPM value of a replicate from the same biological condition (x-axis). The projections of the 3 biological replicates (Rep) are represented in line. Biological conditions from top to bottom: Interaction of the resistant host with the highly aggressive isolate (RxHA), Interaction of the resistant host with the lowly aggressive isolate (RxLA), Interaction of the susceptible host with the highly aggressive isolate (SxHA), Interaction of the susceptible host with the lowly aggressive isolate (SxLA).

Supplementary table S1.2: GO terms enrichment among the DEGs

Tags	GO ID	GO Name	GO Category	P-Value
[OVER]	GO:0016798	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	F	1,14E-08
[OVER]	GO:0016491	oxidoreductase activity	F	6,65E-05
[OVER]	GO:0003824	catalytic activity	F	1,72E-03
[OVER]	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	P	2,27E-10
[OVER]	GO:0071554	cell wall organization or biogenesis	P	9,70E-04
[UNDER]	GO:0043229	intracellular organelle	C	3,20E-12
[UNDER]	GO:0005622	intracellular	C	8,99E-12
[UNDER]	GO:0043226	organelle	C	2,87E-11
[UNDER]	GO:0044424	intracellular part	C	6,32E-11
[UNDER]	GO:0005623	cell	C	9,73E-10
[UNDER]	GO:0032991	protein-containing complex	C	5,17E-09
[UNDER]	GO:0044464	cell part	C	5,20E-09
[UNDER]	GO:0043227	membrane-bounded organelle	C	8,28E-09
[UNDER]	GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	C	2,48E-08
[UNDER]	GO:0044444	cytoplasmic part	C	1,51E-06
[UNDER]	GO:0005737	cytoplasm	C	4,86E-06
[UNDER]	GO:0005634	nucleus	C	6,51E-05
[UNDER]	GO:0043228	non-membrane-bounded organelle	C	2,62E-04
[UNDER]	GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle	C	2,62E-04
[UNDER]	GO:0005829	cytosol	C	3,41E-03
[UNDER]	GO:0012505	endomembrane system	C	4,91E-03
[UNDER]	GO:0005198	structural molecule activity	F	8,74E-04
[UNDER]	GO:0003735	structural constituent of ribosome	F	1,92E-03
[UNDER]	GO:1901363	heterocyclic compound binding	F	2,25E-03
[UNDER]	GO:0097159	organic cyclic compound binding	F	2,25E-03
[UNDER]	GO:0003676	nucleic acid binding	F	3,87E-03
[UNDER]	GO:0016043	cellular component organization	P	6,81E-06
[UNDER]	GO:0071840	cellular component organization or biogenesis	P	1,17E-05
[UNDER]	GO:0009987	cellular process	P	1,43E-05
[UNDER]	GO:0044237	cellular metabolic process	P	3,17E-05
[UNDER]	GO:0010467	gene expression	P	3,57E-05
[UNDER]	GO:0043170	macromolecule metabolic process	P	1,23E-04
[UNDER]	GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	P	1,48E-04
[UNDER]	GO:0044267	cellular protein metabolic process	P	1,62E-04
[UNDER]	GO:0009058	biosynthetic process	P	1,79E-04
[UNDER]	GO:0019538	protein metabolic process	P	4,04E-04
[UNDER]	GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	P	4,02E-04
[UNDER]	GO:1901576	organic substance biosynthetic process	P	7,39E-04
[UNDER]	GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic process	P	7,39E-04
[UNDER]	GO:0044249	cellular biosynthetic process	P	7,39E-04

[UNDER]	GO:0009059	macromolecule biosynthetic process	P	7,39E-04
[UNDER]	GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic process	P	7,33E-04
[UNDER]	GO:0006996	organelle organization	P	8,74E-04
[UNDER]	GO:1901564	organonitrogen compound metabolic process	P	1,22E-03
[UNDER]	GO:0006518	peptide metabolic process	P	1,68E-03
[UNDER]	GO:0006412	translation	P	1,68E-03
[UNDER]	GO:1901566	organonitrogen compound biosynthetic process	P	1,68E-03
[UNDER]	GO:0043604	amide biosynthetic process	P	1,68E-03
[UNDER]	GO:0043603	cellular amide metabolic process	P	1,68E-03
[UNDER]	GO:0043043	peptide biosynthetic process	P	1,68E-03
[UNDER]	GO:0022607	cellular component assembly	P	2,93E-03
[UNDER]	GO:0044085	cellular component biogenesis	P	3,04E-03
[UNDER]	GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	P	5,17E-03

---

Column 1: Tag (Over: Overrepresented; Under: Underrepresented); Column 2 : GO ID determined by Blast2GO ; Column 3 : GO annotation determined by Blast2GO ; Column 4: GO category (C: Cellular\_component; F: Molecular\_fonction; P: Biological\_Process); p-Value given for the enrichment Fisher test.

Supplementary table S1.3: Biological processes impacted by differential expression in *Phytophthora capsici* during different states of interaction

gene	Profil	Blastp-nr annotation	Signal Peptide	Category
Phyca11 100106	HA<LA R	anoctamin-like protein	TRM	1
Phyca11 10013	HA>LA S	glycosyl hydrolase	Y	6
Phyca11 101579	HA>LA R	secreted effector peptide (canonic RxLR)	Y	8
Phyca11 102612	HA<LA S	GNAT family N-acetyltransferase	N	8
Phyca11 102730	HA>LA S	conserved hypothetical protein	Y	8
Phyca11 102852	HA<LA S	hypothetical protein L914_07344	Y	8
Phyca11 10328	R<S HA & HA>LA S	major Facilitator Superfamily (MFS)	TRM	1
Phyca11 103467	HA<LA S	hypothetical protein L915_18415	N	8
Phyca11 103940	HA>LA R & HA>LA S	long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG2	N	4
Phyca11 103968	HA>LA R	long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG2	N	4
Phyca11 105742	HA<LA R & HA<LA S	hypothetical protein AM587_10002338	N	8
Phyca11 105776	HA>LA S	ABC transporter C family member 5	N	2
Phyca11 105972	HA<LA S	pectin methylesterase	Y	6
Phyca11 108131	HA<LA R & HA<LA S	peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase (ACOX)	N	4
Phyca11 109174	HA<LA S	NPP1 protein	Y	8
Phyca11 110351	HA>LA S	antibiotic biosynthesis monooxygenase protein	N	8
Phyca11 110478	HA<LA R	antibiotic biosynthesis monooxygenase protein	N	8
Phyca11 111011	HA>LA R & HA>LA S	DEAD DEAH box RNA	N	7
Phyca11 113180	HA>LA S	hcp beta-lactamase	N	8
Phyca11 113332	HA>LA S	myotubularin-like protein	N	5
Phyca11 113742	HA<LA S	RAS signaling inhibitor ST5	N	8
Phyca11 113839	HA<LA R	chloroperoxidase	Y	3
Phyca11 113941	HA>LA R	pectin lyase F	N	6
Phyca11 114347	HA<LA S	radial spoke 1 (RSP)	N	8
Phyca11 114417	R>S HA	zinc-type alcohol dehydrogenase protein	N	3
Phyca11 114461	HA<LA R & HA<LA S	hypothetical protein PHYSODRAFT_471665, partial	N	8
Phyca11 114633	R>S HA & HA>LA R	phospholipase D A	Y	4
Phyca11 114784	HA>LA R	GTP-binding	N	8
Phyca11 114976	HA<LA S	hypothetical protein F444_16440, partial	N	8
Phyca11 115229	HA<LA S	hypothetical protein L914_07900	N	8
Phyca11 116150	HA<LA S	N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase 2 / Glutamate carboxypeptidase	N	5

Phyca11 116168	HA<LA S	cytochrome c1	N	8
Phyca11 116578	HA>LA R & HA>LA S	12-oxophytodienoate reductase 1	N	4
Phyca11 116585	HA>LA R	hypothetical protein PPTG_00267	Y	8
Phyca11 117010	HA>LA R & HA>LA S	maspardin-like protein (poor homology)	N	8
Phyca11 117681	HA>LA S	eukaryotic initiation factor (eIF4E)	N	8
Phyca11 118289	HA<LA R	glucosylceramidase	Y	4
Phyca11 11846	HA>LA S	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	Y	4
Phyca11 122378	HA>LA R & HA>LA S	effector candidate (putative RxLR without RxLR motif)	Y	8
Phyca11 122914	HA>LA S	pectin methylesterase	Y	6
Phyca11 123091	HA<LA S	EF-hand domain pair	N	8
Phyca11 123222	HA>LA S	GTP-dependent nucleic acid-binding protein engD (poor homology)	N	8
Phyca11 123797	HA>LA R	necrosis inducing protein NPP1	N	8
Phyca11 124293	HA>LA S	omega-hydroxypalmitate O-feruloyl transferase	N	7
Phyca11 124432	HA>LA S	D-threonine aldolase (poor homology)	Y	8
Phyca11 124472	HA<LA S	serine protease	Y	5
Phyca11 125614	R>S HA & HA<LA S	hypothetical protein PPTG_03325	N	8
Phyca11 126259	HA>LA R	hypothetical protein F441_22566 (poor homology)	Y	8
Phyca11 127743	HA>LA S	hypothetical protein PHYSODRAFT_503027, partial (poor homology)	N	8
Phyca11 12778	HA>LA R	rhamnogalacturonate lyase A	Y	6
Phyca11 128194	R<S HA & HA>LA S	transmembrane protein, putative	TRM	1
Phyca11 128228	R<S HA & HA>LA S	transmembrane protein, putative	TRM	1
Phyca11 129116	HA>LA R & HA>LA S	secreted effector peptide (putative RxLR without RxLR motif) (poor homology)	Y	8
Phyca11 12927	HA>LA R	hypothetical protein PHYSODRAFT_475452 (poor homology)	Y	8
Phyca11 130384	HA>LA R & HA>LA S	endopolygalacturonase	Y	6
Phyca11 130385	HA<LA S	cleavage induced protein	N	8
Phyca11 130418	HA<LA S	hypothetical protein PHYSODRAFT_253098 (poor homology)	N	8
Phyca11 130611	HA<LA S	FOG: Ankyrin repeat	N	8
Phyca11 131420	HA<LA R & HA<LA S	aldehyde dehydrogenase mitochondrial precursor (ALDH-E2)	N	3
Phyca11 131621	R<S HA	family 3 glycoside hydrolase / beta glucosidase	Y	6
Phyca11 131676	HA<LA R & HA<LA S	zinc-binding alcohol dehydrogenase domain-containing 2	N	3

Phyca11 13224	HA<LA S	riboflavin kinase	N	7
Phyca11 133125	HA>LA S	isoflavone reductase P3	Y	8
Phyca11 13415	HA<LA S	hypothetical protein PPTG_07832	Y	8
Phyca11 14034	HA<LA S	putative FAD-linked oxidoreductase YvdP	Y	8
Phyca11 14257	HA>LA S	solute:sodium symporter family	TRM	1
Phyca11 14770	HA<LA S	Neuron-specific calcium-binding protein hippocalcin	N	8
Phyca11 15288	HA<LA S	hypothetical protein L916_20007	N	8
Phyca11 15957	HA<LA S	FMN-dependent NADH-azoreductase-like	N	8
Phyca11 16063	HA<LA S	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA damage sensor)	N	8
Phyca11 16336	HA<LA R	beta-glucosidase, putative	N	6
Phyca11 16541	HA<LA S	P-type ATPase (P-ATPase)	TRM	1
Phyca11 16660	HA>LA S	glycoside hydrolase	Y	6
Phyca11 17052	HA>LA S	long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1	N	4
Phyca11 17207	HA<LA R & HA<LA S	hypothetical protein L915_16801	N	8
Phyca11 17321	HA<LA R & HA<LA S	putative membrane protein C20F10.07	N	8
Phyca11 17329	HA>LA S	3-oxoacyl-ACP reductase	N	4
Phyca11 17480	HA<LA S	ABC transporter A family member 1	N	2
Phyca11 17851	HA>LA R	beta-glucan synthesis-associated KRE6	TRM	8
Phyca11 18070	HA>LA S	folate-Biopterin Transporter	TRM	1
Phyca11 19194	HA>LA R & HA>LA S	RxLR effector protein (canonic RxLR)	Y	8
Phyca11 19513	HA<LA S	hypothetical protein F442_05668	Y	8
Phyca11 19608	HA>LA S	hypothetical protein L917_12519 (poor homology)	Y	8
Phyca11 19816	R<S HA & HA<LA R	xylose isomerase	N	6
Phyca11 20053	HA>LA R & HA>LA S	carbonic anhydrase	Y	8
Phyca11 20264	HA>LA S	threonine ammonia- biosynthetic	N	5
Phyca11 20792	HA<LA R	cytochrome P450 86A2	N	3
Phyca11 20870	HA>LA R	bZIP transcription factor 1	N	3
Phyca11 21306	HA<LA S	hypothetical protein PHYSODRAFT_508297	Y	8
Phyca11 21359	HA>LA S	folate-Biopterin Transporter (FBT) Family	TRM	1
Phyca11 21764	HA<LA S	hypothetical protein F443_10721 (poor homology)	Y	8
Phyca11 22104	R>S HA	ATP-binding Cassette (ABC) superfamily	N	2
Phyca11 34163	HA<LA R	argonaute1 (AGO1)	N	8
Phyca11 34841	HA>LA S	tRNA (cytosine-C(5))-methyltransferase	N	7
Phyca11 35263	HA<LA S	alpha-glucosidase YihQ	N	6
Phyca11 37922	HA>LA R	serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat subunit B	N	8

Phyca11 49801	HA<LA S	ABC transporter	N	2
Phyca11 49816	HA<LA S	ABC transporter	N	2
Phyca11 502645	HA<LA S	glutamate carboxypeptidase, putative	N	5
Phyca11 502885	HA>LA S	phosphomannomutase b1	N	6
Phyca11 503235	HA>LA R	conserved hypothetical protein	Y	8
Phyca11 503292	HA<LA S	serine protease	N	5
Phyca11 503318	HA>LA S	nucleotide binding protein	N	8
Phyca11 503352	HA<LA S	2-acylglycerol O-acyltransferase 2	N	4
Phyca11 503538	HA<LA S	NA	N	8
Phyca11 503611	HA<LA R	CBEL protein	Y	6
Phyca11 503726	R<S HA & HA<LA R	E3 ubiquitin ligase complex SCF subunit scon-3	N	5
Phyca11 503760	HA<LA S	cyclic AMP-dependent kinase regulatory subunit	N	8
Phyca11 503763	R<S HA	inositol oxygenase	N	6
Phyca11 503872	R>S HA & HA<LA S	conserved hypothetical protein	N	8
Phyca11 504061	R>S HA & HA<LA S	hypothetical protein PPTG_06636	N	8
Phyca11 504108	HA<LA R	hypothetical protein F444_20985	N	8
Phyca11 504139	HA<LA R	ABC transporter G family member 29	N	2
Phyca11 504342	HA<LA S	calcineurin-like phosphoesterase, putative	N	7
Phyca11 504357	HA<LA R & HA<LA S	atypical RIO kinase	N	8
Phyca11 504819	HA<LA R	ATP-dependent Clp ATP-binding subunit	N	5
Phyca11 504859	HA<LA S	NA	N	8
Phyca11 505003	HA<LA R	peroxisomal protein pox18	N	4
Phyca11 505024	HA<LA R	dihydroxyacetone kinase (Glycerone kinase)	N	4
Phyca11 505109	HA<LA R & HA<LA S	hypothetical protein PPTG_06395 (poor homology)	Y	8
Phyca11 505185	HA<LA S	ancient ubiquitous 1	N	5
Phyca11 505258	HA<LA R & HA<LA S	lectin	Y	6
Phyca11 505432	HA<LA S	purine nucleoside phosphorylase -type elongation factor Ts, putative (poor homology)	N	7
Phyca11 505438	HA<LA S	transglutaminase elicitor M81C	Y	8
Phyca11 505468	HA>LA R & HA>LA S	arrestin domain-containing A	N	5
Phyca11 505523	HA<LA S	dual adapter for phosphotyrosine and 3- phosphotyrosine and 3- phosphoinositide	N	8
Phyca11 505546	HA<LA S	hypothetical protein F442_04491	N	8
Phyca11 505611	HA<LA R	glycoside hydrolase, putative	N	8
Phyca11 505622	HA>LA R	ATP-binding Cassette (ABC) superfamily (poor homology)	N	2
Phyca11 505770	HA<LA S	phosphoethanolamine N-	N	4
Phyca11 505777	R>S HA &			

	HA>LA R	methyltransferase		
Phyca11 505843	HA>LA R	ankyrin 2	N	8
Phyca11 505845	HA>LA R &	quinone oxidoreductase 2	N	3
	HA>LA S			
Phyca11 506056	HA<LA R	heat shock protein 90	Y	3
Phyca11 506241	HA<LA R	sodium glucose co-transporter	TRM	1
Phyca11 506248	HA<LA S	hypothetical protein PPTG_05375	N	8
Phyca11 506356	HA<LA S	D-isomer specific 2-hydroxyacid	N	8
		dehydrogenase		
Phyca11 506373	HA<LA R	beta-glucosidase, putative	Y	6
Phyca11 506596	HA>LA S	asparagine synthase	N	5
Phyca11 5068	HA<LA R	carbohydrate esterase	Y	6
Phyca11 506998	HA<LA R	AF494013_1 endo-1,3-beta-glucanase	Y	6
Phyca11 507305	HA>LA R	aldehyde dehydrogenase	N	3
Phyca11 507555	HA<LA R &	2OG-Fe(II) oxygenase superfamily	N	8
	HA<LA S	protein		
Phyca11 507579	HA<LA S	12-oxophytodienoate reductase,	N	4
		putative		
Phyca11 507584	R>S HA &	phospholipase D alpha 1	N	4
	HA<LA S			
Phyca11 507795	HA<LA S	ZZ-type zinc finger-containing protein	N	8
		P35G2.11c		
Phyca11 508162	HA<LA R	DNA excision repair protein ERCC-6	N	8
		trifunctional enzyme subunit beta,		
Phyca11 508178	HA<LA R	mitochondrial precursor (HADHB) /	N	4
		acetyl-CoA acyltransferase		
Phyca11 508254	HA<LA S	hypothetical protein	N	8
		PHYSODRAFT_354574		
Phyca11 508352	HA<LA R &	CTD small phosphatase (SCP)	N	5
	HA<LA S			
Phyca11 508469	HA<LA R	NAD(P)H:quinone type IV	N	3
Phyca11 508491	HA>LA R	NAD(P)H:quinone type	N	3
Phyca11 508581	HA>LA S	exo-beta-1,3-glucanase-like protein	Y	6
Phyca11 508749	HA<LA S	autophagy-related 3	N	8
Phyca11 508846	HA>LA R	serine hydroxymethyltransferase 1,	N	7
		mitochondrial precursor		
Phyca11 508915	HA>LA S	L-aminoadipate-semialdehyde	N	5
		dehydrogenase large		
Phyca11 508937	HA>LA S	apoptosis-inducing factor B	Y	8
Phyca11 509173	HA<LA S	serine protease	N	5
Phyca11 509178	HA<LA S	serine protease	Y	5
Phyca11 509303	HA<LA S	calcium/calmodulin-dependent protein	N	5
		kinase		
Phyca11 509375	HA<LA R &	glutathione S-transferase, putative	N	3
	HA<LA S			
Phyca11 509403	HA<LA R	carboxypeptidase Y A	N	5
Phyca11 509490	HA<LA R &	hypothetical protein L916_06677	Y	8
	HA<LA S			
Phyca11 509593	HA<LA S	exocyst complex component 7	N	8

Phyca11 509600	HA<LA S	NADP-dependent alcohol dehydrogenase C 2	N	3
Phyca11 509658	HA<LA S	hypothetical protein F443_14618	N	8
Phyca11 509804	HA<LA S	pleiotropic drug resistance protein transporter	N	2
Phyca11 509827	HA<LA R	putative GPI-anchored serine-threonine rich hypothetical protein	Y	8
Phyca11 509839	HA>LA R	unc-13 C	N	8
Phyca11 509851	HA<LA S	protein kinase	N	8
Phyca11 509856	HA<LA S	SUMO-activating enzyme subunit 1	N	8
Phyca11 510085	HA>LA R	ATP-binding Cassette (ABC) superfamily	N	2
Phyca11 510111	R<S HA & HA>LA S	dicarboxylate amino acid:cation (Na or H ) symporter (DAACS) family	TRM	1
Phyca11 510165	HA<LA S	pyruvate kinase	N	6
Phyca11 510189	R<S HA & HA>LA S	solute carrier family 2	TRM	1
Phyca11 510194	HA<LA S	RNA 3 -phosphate cyclase	N	7
Phyca11 510195	HA<LA R & HA<LA S	threonine-tRNA variant 3	N	7
Phyca11 510323	HA<LA S	E3 ubiquitin- ligase TOM1	N	5
Phyca11 510324	R>S HA & HA<LA S	HECT ubiquitin ligase, putative	N	5
Phyca11 510469	HA>LA S	serine threonine- kinase 11-interacting hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	N	7
Phyca11 510493	HA<LA S	endochitinase 1	TRM	8
Phyca11 510636	R>S HA	myb-like DNA-binding protein, putative	Y	6
Phyca11 510702	HA<LA S	glycoside-Pentoside-Hexuronide (GPH):Cation Symporter Family	Y	8
Phyca11 510852	R<S HA & HA>LA S	glycerol-3-phosphate mitochondrial precursor (GDP)	TRM	1
Phyca11 510858	HA<LA R	hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH)	N	7
Phyca11 510964	HA>LA S	nucleolar GTP-binding 2	N	8
Phyca11 510978	HA>LA R	hypothetical protein	N	8
Phyca11 511049	HA<LA R & HA<LA S	PHYSODRAFT_352694	N	8
Phyca11 511180	HA<LA S	sulfate Permease Family	TRM	1
Phyca11 511216	HA<LA S	voltage-gated Ion Channel	N	1
Phyca11 511258	HA<LA S	choline dehydrogenase, putative putative GH30	N	7
Phyca11 511317	HA<LA R	glucocerebrosidase/glucosylceramidase precursor	N	4
Phyca11 511381	HA<LA R & HA<LA S	crinkler (CRN) family	N	8
Phyca11 511507	HA<LA S	regulator of rDNA transcription 8 (poor homology)	N	8
Phyca11 511538	HA<LA R	elicitin protein SOL2C-D-E	N	8
Phyca11 511957	HA<LA R & HA<LA S	2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase (ACMSD)	N	5

Phyca11 512156	HA<LA S	ATP-binding Cassette (ABC) superfamily	N	2
Phyca11 512176	HA<LA S	visinin 1	N	8
Phyca11 52352	HA<LA S	serine protease family	N	5
Phyca11 524942	HA>LA R	nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit	N	7
Phyca11 525199	HA<LA S	LRR-containing protein	N	8
Phyca11 525408	HA<LA S	macrophage migration inhibitory factor	N	8
Phyca11 525630	R>S HA	carbonic anhydrase, putative	Y	8
Phyca11 526043	HA>LA R	sulfate Permease (SulP) Family	TRM	1
Phyca11 526207	HA<LA R	trehalose-phosphatase	N	6
Phyca11 526290	HA<LA R	hypothetical protein PHYSODRAFT_483810	N	8
Phyca11 526320	HA<LA S	glucan endo-1 / glycoside hydrolase	N	6
Phyca11 526510	HA<LA S	ATP-binding Cassette (ABC) superfamily	N	2
Phyca11 526583	HA<LA R	p-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase	N	8
Phyca11 526839	HA>LA R	lysosomal beta glucosidase	Y	6
Phyca11 528012	HA<LA S	ABC transporter G family member 31	N	2
Phyca11 528137	R>S HA	hypothetical protein PPTG_14783	N	8
Phyca11 528225	HA>LA S	serine threonine phosphatase	N	8
Phyca11 528553	R>S HA	beta-glucan synthesis-associated protein, putative	Y	6
Phyca11 528642	HA<LA S	ketohexokinase	N	6
Phyca11 528924	HA<LA R & HA<LA S	hypothetical protein F443_05132	N	8
Phyca11 529711	R>S HA & HA>LA R	serine hydrolase (FSH1)	N	8
Phyca11 529795	HA<LA S	anthranilate synthase component	N	5
Phyca11 530074	HA<LA R & HA<LA S	GPN-loop GTPase	N	8
Phyca11 530571	HA<LA S	trafficking protein particle complex subunit 8	Y	8
Phyca11 531210	R>S HA	hypothetical protein PPTG_02870	N	8
Phyca11 531377	HA<LA S	dynein beta chain	N	8
Phyca11 532835	HA<LA S	equilibrative Nucleoside Transporter (ENT) Family	TRM	1
Phyca11 532971	HA<LA S	hypothetical protein L914_13642	N	8
Phyca11 533149	HA<LA R	MOTHER of FT and TF 1 protein (poor homology)	N	8
Phyca11 533648	HA>LA R & HA>LA S	NAD binding dehydrogenase, partial	N	8
Phyca11 533807	HA<LA R & HA<LA S	transcription elongation factor SPT6	N	8
Phyca11 533823	HA<LA R & HA<LA S	serine protease V8	N	5
Phyca11 533853	HA<LA S	DNA polymerase	N	7
Phyca11 534041	HA<LA S	rab 2a-like	N	8
Phyca11 534343	HA<LA S	hypothetical protein F443_01075	N	8
Phyca11 534459	HA<LA S	hypothetical protein PHMEG_0009671	N	8

Phyca11 534494	R<S HA	cytochrome P450 86A2	N	3
Phyca11 534663	R>S HA & HA>LA R	phospholipase D A	Y	4
Phyca11 534685	HA>LA S	aldehyde dehydrogenase	N	3
Phyca11 534911	HA>LA S	FOG: Ankyrin repeat	N	8
Phyca11 535211	HA>LA S	folate-Biopterin Transporter (FBT) Family	TRM	1
Phyca11 535315	HA<LA S	plectin	N	8
Phyca11 535340	HA<LA S	HECT E3 ubiquitin ligase	N	5
Phyca11 535517	R>S HA	carbonic anhydrase, putative	N	8
Phyca11 535522	HA>LA R & HA>LA S	deoxyhypusine synthase	N	8
Phyca11 535813	HA<LA S	ABC transporter A family member 1	N	2
Phyca11 535815	R>S HA & HA<LA S	ABC transporter A family member 1	N	2
Phyca11 536047	HA>LA R	cysteine desulfurase	N	5
Phyca11 536100	HA<LA R	monoterpene epsilon-lactone hydrolase / s-methyl-5-thioribose-1-phosphate isomerase	N	5
Phyca11 536157	HA>LA S	phosphoglycerate kinase	N	6
Phyca11 536512	R<S HA & HA>LA S	solute carrier family 2	TRM	1
Phyca11 536587	HA<LA S	GTP-binding protein Era	N	8
Phyca11 536934	R<S HA	beta-glucosidase, putative	N	6
Phyca11 537104	HA<LA S	ankyrin-like protein	N	8
Phyca11 537596	HA<LA S	phosphatidic acid phosphatase	Y	4
Phyca11 537800	HA<LA S	glycoside hydrolase	Y	6
Phyca11 537830	HA>LA S	cytochrome P450	N	3
Phyca11 537832	HA<LA R	ATP-binding Cassette (ABC) Superfamily	N	2
Phyca11 538166	HA<LA R	short chain dehydrogenase, putative	N	4
Phyca11 538596	HA>LA S	hypothetical protein PHYSODRAFT_565041	N	8
Phyca11 539610	R>S HA	ankyrin-2	N	8
Phyca11 540126	HA<LA S	cleavage induced serine protease family S33, putative	N	5
Phyca11 541292	HA<LA S	protein-L-isoaspartate O- methyltransferase	N	5
Phyca11 541456	HA<LA S	E3 ubiquitin-protein ligase SHPRH	N	5
Phyca11 541492	HA<LA S	temptin	Y	8
Phyca11 542314	HA>LA R	nucleolar GTP-binding 1	N	8
Phyca11 5425	HA>LA S	kelch-type beta propeller	Y	8
Phyca11 542873	R<S HA & HA<LA R	major Facilitator Superfamily (MFS)	TRM	1
Phyca11 543377	HA>LA S	GAF sensor protein	N	8
Phyca11 543490	R>S HA	small double cellulose binding domain	Y	6
Phyca11 543541	R<S HA	dimeric dihydrodiol dehydrogenase	N	8
Phyca11 543559	R>S HA	sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	TRM	1
Phyca11 544133	HA<LA S	multidrug resistance-associated 1	N	2

Phyca11 544167	HA<LA R	atlastin	N	8
Phyca11 544361	HA>LA S	programmed cell death protein 2, putative	N	8
Phyca11 544580	HA<LA R & HA<LA S	hypothetical protein PHYSODRAFT_330260	N	8
Phyca11 544673	R<S HA & HA>LA S	glycosyl hydrolase	Y	6
Phyca11 544885	HA<LA S	NPP1 protein	Y	8
Phyca11 5453	HA>LA S	hypothetical protein PPTG_06638	Y	8
Phyca11 546045	HA<LA S	G- beta subunit 1	N	8
Phyca11 546414	HA>LA R	zinc finger CCCH domain-containing protein 17	N	8
Phyca11 547310	R<S HA & HA<LA R	cytochrome P450 86A2	N	3
Phyca11 547425	HA<LA S	F-box/LRR-repeat protein 4	N	5
Phyca11 5479	HA>LA R	hypothetical protein L917_01295	N	8
Phyca11 548510	HA>LA R	berberine-like protein	Y	8
Phyca11 548715	HA<LA S	RCC1 and BTB domain-containing	N	8
Phyca11 548795	HA<LA S	monoacylglycerol lipase abhd6-A	N	4
Phyca11 549075	HA>LA R	beta-glucan synthesis-associated protein, putative	Y	6
Phyca11 549194	HA>LA R & HA>LA S	tartrate-resistant acid phosphatase type 5	Y	3
Phyca11 549221	HA<LA S	maltose O-acetyltransferase	N	8
Phyca11 549547	HA<LA S	pepsin A	N	5
Phyca11 549692	HA<LA S	conserved hypothetical protein	Y	8
Phyca11 550743	HA<LA S	serine protease family S28, putative	Y	5
Phyca11 551102	HA<LA S	clathrin heavy chain	N	8
Phyca11 551580	HA>LA S	isoflavone reductase P3	N	8
Phyca11 552045	R<S HA & HA<LA R	arabinogalactan endo-beta-1,4- galactanase	Y	6
Phyca11 552887	HA>LA R	RxLR128 (canonic RxLR)	Y	8
Phyca11 552973	HA<LA R & HA<LA S	putative GPI-anchored serine-threonine rich hypothetical protein	Y	8
Phyca11 553558	HA<LA S	sterol 3-beta-glucosyltransferase	N	4
Phyca11 553891	HA<LA R	retinol dehydrogenase 10-B	N	7
Phyca11 554766	HA>LA S	GST	Y	3
Phyca11 555787	HA<LA R	acyl-CoA dehydrogenase, putative	N	4
Phyca11 556776	HA<LA R	allantoicase	N	7
Phyca11 557029	HA>LA S	cytochrome P450	N	3
Phyca11 557249	HA<LA S	ankyrin-2	N	8
Phyca11 557462	HA>LA S	neutral zinc metallopeptidase, Zn- binding site	N	5
Phyca11 558097	HA>LA R	short chain dehydrogenase, putative (SDR)	N	8
Phyca11 558582	HA>LA S	zinc (Zn <sup>2+</sup> )-Iron (Fe <sup>2+</sup> ) Permease (ZIP) Family	TRM	1
Phyca11 558645	HA<LA R	elicitin	N	8
Phyca11 558971	HA<LA S	major Facilitator Superfamily (MFS)	TRM	1

Phyca11 559215	HA<LA S	inorganic phosphate	TRM	1
Phyca11 559569	HA<LA S	transmembrane protein	N	8
Phyca11 560093	HA<LA S	dna polymerase lambda-like protein	Y	8
Phyca11 561556	HA<LA S	hypothetical protein L915_20328	N	8
Phyca11 561911	HA<LA R & HA<LA S	crinkler (CRN) family	N	8
Phyca11 562156	HA<LA S	chitin synthase (Chitin-UDP- ac- transferase)	N	6
Phyca11 562574	HA<LA S	TKL kinase	Y	8
Phyca11 563500	HA>LA S	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	N	7
Phyca11 563754	HA>LA R	proton myo-inositol cotransporter, putative	TRM	1
Phyca11 563879	HA>LA S	P-type ATPase (P-ATPase) Superfamily	TRM	1
Phyca11 56419	HA<LA S	E3 ubiquitin- ligase HERC2	N	5
Phyca11 564706	HA<LA S	coiled-coil domain-containing protein	N	8
Phyca11 565086	HA<LA R	UDP-glucose 4-epimerase	N	6
Phyca11 566022	HA<LA S	folate-Biopterin Transporter (FBT) family	TRM	1
Phyca11 566216	HA<LA S	endoglucanase A	N	6
Phyca11 566651	R<S HA & HA<LA R	cation-transporting ATPase	TRM	1
Phyca11 567679	HA<LA S	ankyrin-1	Y	8
Phyca11 570151	R<S HA & HA<LA R	alpha-glucosidase	N	6
Phyca11 571873	HA<LA S	hypothetical protein L915_01842	N	8
Phyca11 572843	HA<LA S	ATP-binding Cassette (ABC) Superfamily	N	2
Phyca11 573963	HA<LA R	succinate semialdehyde dehydrogenase	N	3
Phyca11 574108	HA<LA S	diphthamide biosynthesis protein 1	N	5
Phyca11 574456	HA<LA S	creatine mitochondrial precursor	N	8
Phyca11 574695	HA>LA S	phosphoribosylaminoimidazolecarboxa mide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	N	7
Phyca11 575745	HA<LA S	RMD5 family protein	N	5
Phyca11 577113	R>S HA & HA<LA S	zinc-binding alcohol dehydrogenase domain-containing protein 2	N	3
Phyca11 577335	R<S HA & HA>LA S	lipase 1	Y	8
Phyca11 577618	HA<LA R	ferredoxin-dependent glutamate synthase	N	5
Phyca11 6029	HA<LA S	solute carrier family, facilitated glucose transporter, putative	TRM	1
Phyca11 63429	HA<LA R & HA<LA S	hypothetical protein PHYSODRAFT_416719, partial	N	8
Phyca11 66737	HA>LA S	p21-activated kinase-interacting 1	N	8
Phyca11 6911	HA<LA R	aquaporin, putative	TRM	1
Phyca11 73986	HA>LA R	ribosome biogenesis protein BMS1	N	8
Phyca11 74027	HA>LA R	glycoside hydrolase, putative	N	6
Phyca11 7415	R<S HA	glycoside hydrolase	Y	6

Phyca11 75839	HA>LA R	12-oxophytodienoate reductase 7	N	8
Phyca11 7941	HA>LA S	cysteine protease family C1A	Y	5
Phyca11 8261	HA<LA S	hypothetical protein PPTG_14735	Y	8
Phyca11 8285	R>S HA & HA>LA R	SPX domain-containing 1 (poor homology)	N	8
Phyca11 8970	R<S HA & HA>LA S	folate-Biopterin Transporter (FBT) Family	TRM	1
Phyca11 9247	HA<LA R	hypothetical protein PPTG_09295 (poor homology)	N	8
Phyca11 9358	HA>LA S	NPP1 protein	N	8
Phyca11 96465	HA<LA S	mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim22	N	8
Phyca11 97064	HA<LA S	kazal-like serine protease inhibitor domain-containing	Y	8
Phyca11 97196	HA<LA S	secreted effector peptide	Y	8
Phyca11 97806	R<S HA	lysosomal beta glucosidase	Y	6
CUST_17232_P1426518982	HA<LA S	RxLR effector protein	Y	8
CUST_14997_P1426518982	HA<LA S	AN	Y	8
CUST_19804_P1426518982	HA>LA R	AN	Y	8
CUST_14355_P1426518982	HA<LA S	AN	Y	8
CUST_16519_P1426518982	HA>LA R & HA>LA S	avirulence 1b	Y	8
CUST_1160_P1426518982	HA>LA R & HA>LA S	avirulence (Avh) protein	Y	8
CUST_883_P1426518982	HA>LA S	RxLR effector protein	Y	8
CUST_2407_P1426518982	R<S HA	secreted RxLR effector peptide protein, putative	Y	8
CUST_10940_P1426518982	HA>LA R	avirulence (Avh) protein	Y	8

Column 1: ID of the DEGs (Phyca11|Protein number for the genes from the PHYCA11 version of the *P. capsici* genome / Scaffold number\_Orientation\_Position on the scaffold -ID used by Jupe et al. 2013); Column 2: Transcriptomic profil summary (< and > give the sens in which the DEGs are more express); Column 3: Blastp-nr annotation: ID of the subject identified with blastp against the NCBI nr protein database with a length of alignment superior to 70% and an identity superior to 50%; Column 4 : Signal Peptide summary: SignalP 3.0 + InterPro Scan compilation; Column 5: Tag to classify the DEGs (1: Nutrient related transporters; 2: Detoxification related transporters; 3: Stress protection; 4: Lipid metabolism; 5: Protein metabolism; 6: Carbohydrate metabolism (with secreted cell wall degrading enzymes CWDEs and genes homolog to CWDE but lacking a signal peptide); 7: Other pathways of the metabolism ; 8: DEGs belonging to other categories not mention before + DEGs without annotation).



---

Chapitre 2 : Expression transitoire *in planta*  
d'effecteurs de *Phytophthora capsici* chez le piment

---

### Contribution des auteurs

Gaëtan Maillot<sup>1</sup>, Emmanuel Szadkowski<sup>1</sup>, Anne Blattes-Massire<sup>2</sup>, Alexandre Bachellez<sup>1</sup>, Dorine Achard<sup>1</sup>, Marion Szadkowski<sup>2</sup>, Ghislaine Nemouchi<sup>2</sup>, Mathieu Pierre<sup>2</sup>, Nasradin Touhami<sup>2</sup>, Véronique Lefebvre<sup>1</sup>

J'ai effectué la sélection des gènes candidats avec l'aide d'Emmanuel Szadkowski ainsi que les analyses préliminaires d'expression transitoire. Mathieu Pierre a participé à quelques tests d'expression transitoire pendant son stage. Alexandre Bachellez et Dorine Achard ont effectué les clonages ainsi que les criblages des accessions de piment. Anne Blattes-Massire a participé au re-séquençage des gènes candidats et Nasradin Touhami a participé au criblage des accessions de piment. Ghislaine Nemouchi et Marion Szadkowski ont participé aux test ELISA. J'ai effectué l'analyse des données et la rédaction du manuscrit avec l'aide de Véronique Lefebvre et d'Emmanuel Szadkowski.

## 2.1. Introduction

Les effecteurs favorisent le développement des maladies végétales en supprimant les mécanismes de défense mis en place par les plantes lorsqu'elles perçoivent les agents pathogènes (Jones and Dangl 2006; Dodds and Rathjen 2010). Ces effecteurs, lorsqu'ils sont reconnus directement ou indirectement par les récepteurs NLR de la plante, induisent des mécanismes de défense forts chez l'hôte conduisant souvent à sa résistance totale. La réponse hypersensible (HR) fait partie de ces mécanismes. Elle se caractérise par l'apparition d'une nécrose localisée et montre des similarités avec les réactions de mort cellulaire programmée (Greenberg and Yao 2004).

Les études génomiques ciblant les effecteurs ont permis d'accélérer l'étude des interactions plantes-pathogènes : ce sont les approches effectoromiques (Vleeshouwers et al. 2008). Pour étudier les effets des effecteurs sur les mécanismes physiologiques des plantes, on surexprime les effecteurs *in planta* grâce à des méthodes d'expression transitoire. Parmi ces approches, l'agroinfiltration se basant sur l'utilisation de la bactérie *Rhizobium radiobacter* (anciennement *Agrobacterium tumefaciens*) est la plus connue. Elle consiste à infiltrer dans les tissus de la plante des bactéries possédant un plasmide d'expression qui contient le gène codant l'effecteur à tester. L'effecteur est ensuite transcrit et traduit de façon transitoire par les cellules de la plante hôte. Chez la pomme de terre, la méthode de l'expression transitoire médiée par *Rhizobium radiobacter* a été employée afin d'identifier des gènes de résistance à *Phytophthora infestans* (Lokossou et al. 2009; Vleeshouwers et al. 2008).

Certaines plantes développent des défenses non-spécifiques aux méthodes d'expression transitoire *in planta* médiées par *Rhizobium radiobacter* (Du et al. 2014). Chez ces plantes, les

mécanismes de défense sont induits par la bactérie et non par le gène exprimé transitoirement. C'est vrai pour le piment, qui est connu pour sa faible compatibilité aux méthodes de transformation médiées par *R. radiobacter* (Lee et al. 2004). L'agro-infection, plus sensible que l'agroinfiltration, peut être employée dans ces cas-là. Les plantes sont alors inoculées par blessure avec des souches de *R. radiobacter* possédant un vecteur d'expression qui contient le génome du virus à ARN PVX et le gène codant l'effecteur à tester. S'ensuit la propagation du virus dans les cellules adjacentes à la blessure et l'expression du vecteur dans ces cellules. La multiplication du virus permet ainsi l'expression du gène codant l'effecteur (Du et al. 2014). La quantité de *R. radiobacter* utilisée est donc plus faible et la zone inoculée moins large qu'avec l'agroinfiltration ce qui permet de réduire les réponses non-spécifiques causées par la bactérie.

Trois équipes ont étudié les effecteurs de *Phytophthora capsici* en utilisant des méthodes d'expression transitoire *in planta*. L'agroinfiltration de 11 domaines C-terminaux d'effecteurs CRN couplés à la protéine fluorescente GFP chez *N. benthamiana* a révélé que les 11 effecteurs ciblent le noyau des cellules de l'hôte (Stam et al. 2013a). Parmi ces 11 domaines, 3 étaient responsables du développement de nécroses chez *N. benthamiana*. Les niveaux de nécroses induites variaient suggérant que ces domaines agissent sur différents processus physiologiques de la plante (Stam et al. 2013b). L'expression transitoire *in planta* par agroinfiltration de 11 gènes codant des effecteurs NLP chez *Capsicum annuum* et *N. benthamiana* a permis d'analyser leur activité nécrotique chez le piment (Feng et al. 2014). Des 11 effecteurs testés, 3 ont montré des niveaux d'expression élevés chez *P. capsici* et causaient des nécroses étendues suggérant que leur expression élevée est associée au développement des nécroses chez le piment. Une étude transcriptomique des différents stades de développement de *P. capsici* et des différentes phases de son interaction avec *Nicotiana benthamiana*, met en évidence plusieurs effecteurs différentiellement exprimés (DE) (Chen et al. 2013). L'agroinfiltration de deux effecteurs DE (Pc22053 et Pc506611) chez *N. benthamiana* a révélé qu'ils suppriment les réactions de défenses chez *N. benthamiana* suite à l'application de PAMP et d'effecteurs nécrotiques. Ces résultats suggèrent que la surexpression de ces effecteurs au stade précoce de l'interaction est cruciale au développement de *P. capsici*.

Les profils d'expression des gènes codant les effecteurs renseignent sur leur rôle pour le développement des agents pathogènes sur les plantes. Par exemple, des polymorphismes d'expression du gène d'avirulence *Avr1b-1* de *P. sojae* sont responsables de la virulence des isolats sur les plantes de soja contenant le gène de résistance *Rps1b* (Cui et al. 2012). L'expression de l'allèle *Avr1b-1* (II) et la perte d'expression des allèles *Avr1b-1* (I) et *Avr1b-1* (IV) sont associées à la virulence des isolats sur les génotypes de soja portant le gène de résistance *Rps1b* (Cui et al. 2012). Des résultats similaires ont été révélés par l'étude du gène *PiAVR2*, codant pour un effecteur RxLR chez *P. infestans*. Ce gène induit des mécanismes de défense chez les génotypes de pomme de terre

possédant le gène de résistance *R2* (Gilroy et al. 2011). Les auteurs ont identifié un gène homologue *PiAVR2-like* qui présente 25 SNP qui le différencie de *PiAVR2*. Treize des SNP induisent des changements de la séquence protéique de l'effecteur. L'analyse d'expression de *PiAVR2* et *PiAVR2-like* chez plusieurs isolats de *P. infestans* a révélé que leur virulence était associée à l'expression de *PiAVR2-like* et l'absence d'expression de *PiAVR2* lors de l'interaction avec les génotypes de pomme de terre possédant *R2* (Gilroy et al. 2011).

Plusieurs études ont montré que des polymorphismes d'expression de type présence/absence et des différentiels d'expression chez des effecteurs peuvent être responsables de contournements de résistance des plantes par les *Phytophthora* spp. (Cui et al. 2012; Gilroy et al. 2011). Chez *P. capsici*, le gène Pc22053 codant un effecteur RxLR est fortement exprimé dans les phases précoces de l'interaction. Ce différentiel d'expression est associé à une suppression des mécanismes de défenses chez *N. benthamiana* (Chen et al. 2013). Cependant, cette étude concerne l'interaction d'un seul isolat de *P. capsici* avec *Nicotiana benthamiana* et l'analyse d'un seul gène effecteur.

## 2.2. Objectifs

Notre objectif était d'analyser le lien, chez *Phytophthora capsici*, entre la régulation d'expression des gènes codant les effecteurs RxLR et leur capacité à induire les mécanismes de défense chez le piment. Pour remplir cet objectif, nous avons employé une stratégie en quatre étapes.

1. Nous avons tout d'abord testé une méthode d'agro-infection et une méthode d'inoculation mécanique sur quatre accessions de piment afin de retenir la mieux adaptée à notre objectif.
2. Dans un second temps, nous avons analysé la capacité d'un ensemble d'accessions de *C. annuum* à multiplier le virus PVX et leur compatibilité aux méthodes d'expression transitoire *in planta* médiées par *Rhizobium radiobacter*.
3. Les effecteurs RxLR candidats ont ensuite été sélectionnés sur la base de leur profil d'expression et de leur niveau de diversité chez deux isolats de *P. capsici* contrastés pour leur niveau d'agressivité sur le piment.
4. Enfin, nous avons criblé les accessions de *C. annuum* compatibles à l'expression transitoire *in planta* par agro-infection avec les effecteurs RxLR retenus.

## 2.3. Matériels et Méthodes

### 2.3.1. Matériels végétal et isolats de *Phytophthora capsici*.

Les isolats de *Phytophthora capsici* Pc107 et Pc273 (nommés HA pour 'Highly aggressive' et LA pour 'Lowly aggressive') qui ont eu leur profil d'expression comparés dans le chapitre 1, ont été utilisés. Pour les analyses d'expression transitoire *in planta*, nous avons utilisé une core-collection de 48 accessions de *Capsicum annuum* dont les profils de résistance à *P. capsici* avaient été déterminés avec un test artificiel d'inoculation sur tige (Cantet 2013). Parmi celles-ci, 37 accessions étaient partiellement résistantes et 11 accessions étaient sensibles (Tableau supplémentaire S2.1). Au total, 39 accessions avaient été génétiquement caractérisées avec 28 marqueurs microsatellites ou SSR (Nicolai et al. 2013) : 25 appartenaient au groupe génétique 1 (G1), une seule accession appartenait au groupe 2 (G2), 12 accessions appartenaient au groupe 3 (G3) et une accession présentait de l'admixture. Avec leur étude génétique, Nicolai et al. (2013) ont défini six groupes génétiques dont les trois premiers (G1, G2 et G3) comprenaient des accessions de l'espèce *Capsicum annuum* var. *annuum* tandis que les trois derniers comprenaient des accessions appartenant à d'autres espèces de *Capsicum*. Ces groupes ont été déterminés sur la base des profils observés sur les marqueurs SSR et 21 traits phénotypique incluant la résistance à des virus, bactéries et oomycètes (Sage-Palloix et al. 2007).

### 2.3.2. Extraction d'ADN génomique de *P. capsici*.

Les isolats ont été mis en culture pendant 10 jours dans du milieu petit-pois liquide supplémenté des antibiotiques adéquats (Ampicilline, 0,1 mg/mL ; Rifampicine, 0,025 mg/mL et Vancomycine, 0,05 mg/mL). Le mycélium a été récolté puis séché dans du papier stérile avant de le congeler à -20°C dans un tube falcon de 15 mL. Après broyage dans l'azote liquide, 100 mg de poudre de mycélium ont été récupérés dans un tube falcon de 15 mL. Les étapes suivantes ont été appliquées afin d'extraire l'ADN génomique :

- Ajout de 4 mL de tampon d'extraction (Tris HCL pH 8.0, 0,1M ; EDTA ; NaCl, 1M ; SDS à 1 % et protéinase K, 0,05 mg/mL),
- Incubation pendant 30 minutes à 65°C après vortexage,
- Centrifugation pendant 30 minutes à 4566g,
- Transfert du surnageant et ajout de 300 µL de chlorure de guanidine, 3 M,

- Incubation pendant 10 minutes à -20°C avant une centrifugation pendant 25 minutes à 4566g,
- Transfert du surnageant et ajout d'un volume égal d'isopropanol avant une incubation pendant 1 heure à -20°C,
- Après un mélange qui précipite l'ADN, centrifugation pendant 25 minutes à 4566g,
- Ajout d'éthanol puis centrifugation pendant 25 minutes à 4566g,
- Séchage du culot à l'air libre puis ajout de 100 µL de tampon TE (Tris-HCl, 10 mM, pH 8 ; EDTA, 1 mM).

### 2.3.3. Design des amorces Gateway

Les amorces Gateway ont été dessinées pour exclure le signal peptide en suivant la procédure « Primer Design for the GATEWAY attB primers » modifiée par Won Do Heo (<https://web.stanford.edu/~teruel1/Protocols/pdf/Primer%20design%20for%20the%20gateway%20system.pdf>). La détection du signal peptide a été réalisée avec signalP3.0 (Bendtsen et al. 2004).

Tableau 2.1 : Amorces Gateway utilisées pour les clonages

Gène	Amorces	Tm (°C)
Phyca11 97196	Forward GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAC CATGCTTCACTCCTCGTACAAGCTGCAA	62
	Reverse GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAC TACCGTTCGGTGATTGTAGGCAA	56
CUST_14997	Forward GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAC CATGTCCTTGGAGTTAGCCTCGG	56
	Reverse GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAT TACTTAGCGGTCTCCAGG	52
CUST_7690	Forward GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAC CATGGCTAACGCCCGACAAC	54
	Reverse GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAC TACGCCGACGAGAGG	49
CUST_16519	Forward GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAC CATGGCTACCACTGGTAACACTGTTGTA	61
	Reverse GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAC TACGAGAACCTGCCGTTTTG	53
CUST_1160	Forward GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAC CATGAGCGACACGGTTGCTGTT	55
	Reverse GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAC TAGCTTTTGTTCGCCATCA	52
CUST_2407	Forward GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAC CATGCTGTCGACACAAGCTGACG	56

Phyca11 129044	Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAT TAGTAAGGAAGTCCTTCTTGTTAAT	57
	Forward	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAC <b>CATG</b> GCTGCGACCTCCGCAA	53
CUST_5402	Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAC TACATATGCGCGTCCATGAACAA	56
	Forward	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAC <b>CATG</b> AAGCAGGCTCACACCGTAAA	57
CUST_17572	Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAT CAGTGGTAGAGGCGAGGG	51
	Forward	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAC <b>CATG</b> ATGTCGCTCCAGCAACC	55
CUST_15481	Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAT CACGTCATTCTGAGTAACATCG	55
	Forward	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAC <b>CATG</b> TTCTCTCTCAACAGTAGAGACG	61
	Reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAC TAGTTGGTTTGAGGTAAGTAACTGG	58

Les sites Gateway sont représentés en rouge ; les séquences complémentaires de l'effecteur sont en noir et le codon start est en gras sur les amorces Forward.

### 2.3.4. Clonages

Les effecteurs RxLR ne présentant pas d'intron, ils ont été amplifiés à partir d'ADN génomique des isolats Pc107 et Pc273 avec la polymérase à haute fidélité « Taq polymérase Herculase II » (Catalog #600675, Agilent Technologie) dans un volume final de 50 µL. Les paramètres des réactions PCR sont donnés dans les tableaux 2.2 et 2.3.

Tableau 2.2 : Volume et quantité pour la PCR destinée au clonage

Réactifs	Produit PCR < 1kb	Produit PCR 1 - 10kb
ADN	100-300 ng d'ADN génomique ou 1-30ng du vecteur d'ADN	150- ng d'ADN génomique ou 15- 60ng du vecteur d'ADN
Tampon de reaction Herculase II (5X)	10 µL	10 µL
Mix de dNTPs (25mM de chaque dNTP)	0,5 µL	0,5 µL
Amorce Forward (10 µM)	1,25 µL	1,25 µL
Amorce Reverse (10 µM)	1,25 µL	1,25 µL
Polymérase Herculase II fusion	0,5 µL	0,5 µL
H2O	qsp 50µL	qsp 50µL
Volume Final	50µL	50µL

Tableau 2.3 : Conditions pour les cycles de PCR avec l'enzyme polymérase de type Herculase

Étapes	Nombre de cycles	Températures	Durées
Dénaturation initiale	1	95°C	2 mins
Dénaturation	30	95°C	10-20 secs
Hybridation		60°C	20 secs
Expansion		72°C	30 secs pour un produit PCR <1kb ou 30 secs par kb pour un produit PCR >1kb
Expansion finale	1	72°C	3 mins

Les clonages ont été réalisés en utilisant la technologie Gateway®. Les vecteurs d'entrée (pENTRY) ont été générés en clonant les effecteurs RxLR sélectionnés dans le vecteur pDONR (Gentamycine à 25 mg/mL) avec la réaction de BP qui correspond à la première étape du clonage (Tableau 2.4). Une incubation à 37°C avec 1 µL de protéinase K a permis de stopper la réaction après une heure d'incubation à 25°C. Au préalable de l'étape de LR (transfert du gène d'intérêt du vecteur d'entrée vers le vecteur d'expression), le vecteur d'expression pGR106 a été digéré par l'enzyme SmaI (Promega) avec une incubation pendant une nuit à 25°C afin d'augmenter l'efficacité du clonage. Les détails du mélange de digestion sont donnés dans le tableau 2.5. Le mélange a été incubé pendant 15 minutes à 65 °C afin de stopper la réaction. Les effecteurs ont ensuite été transférés dans le vecteur d'expression (pDEST) compatible avec la technologie Gateway® pGR106 (kanamycine 50 mg/mL) grâce à une réaction de LR (Figure 2.1).

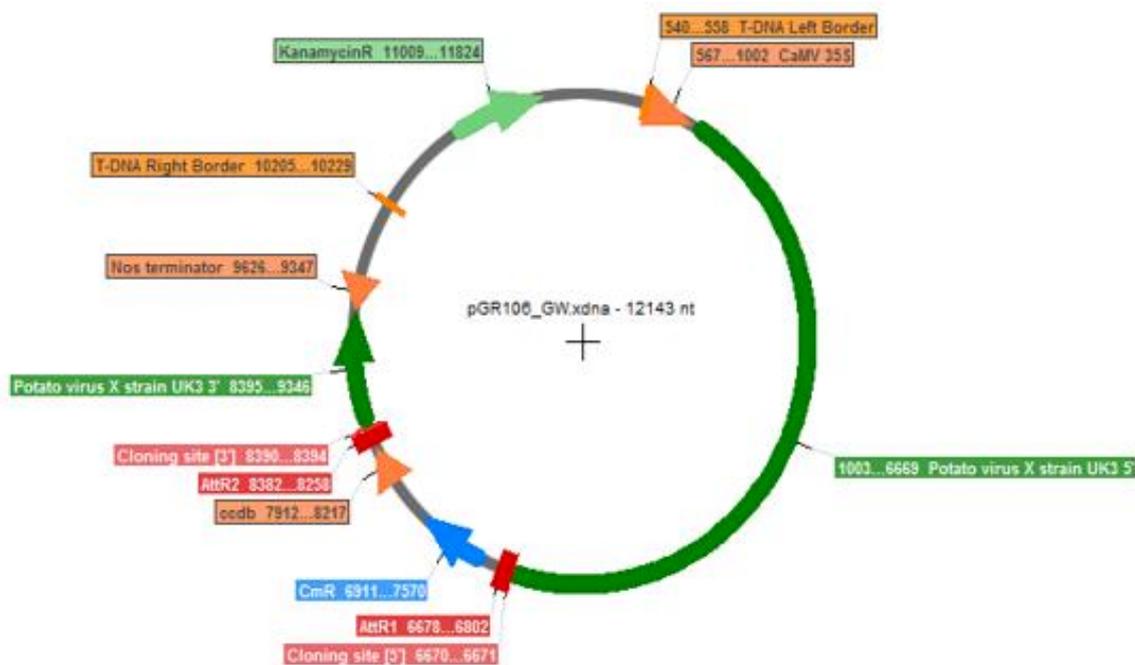


Figure 2.1 : Vecteur d'expression pGR106 compatible avec le clonage Gateway®. Les barres oranges représentent les bordures droite et gauche de l'ADN transféré (ADN-T) par les souches de Rhizobium radiobacter. L'ADN-T comprend les gènes viraux du PVX (schématisés en vert foncé) ainsi que le gène d'intérêt

à exprimer (gène codant un effecteur RxLR) qui sera cloné entre AttR1 et AttR2 à la place du gène toxique *ccdB*. *CamV 35S* : promoteur 35S du « *Cauliflower mosaic virus* ». Nos terminator : Séquence signalant la fin de la transcription. KanamycinR : gène de sélection conférant la résistance à la Kanamycine. *ccdB* : Code la protéine *ccdB* qui agit comme marqueur de sélection positif de clonage. *CmR* : gène de résistance au chloramphénicol. AttR1 et AttR2 : Séquences de recombinaison Gateway caractéristique du vecteur de destination.

La composition du mix LR est décrite dans le tableau 2.6. La réaction a été mise en incubation pendant une heure à 25°C puis arrêtée en ajoutant 1 µL de protéinase K et en incubant pendant 10 minutes à 37°C.

Tableau 2.4 : Mélange de réaction BP

Réactifs	Volumes et quantité
pDONR 207 (150 ng/µL)	1 µL
Produit PCR	15-150 ng de produit PCR
Tampon TE	Complété à 8µL
BP Clonase*	2 µL

\* Ajout de la BP Clonase après avoir mélangé les autres réactifs et complété à 8 µL avec le tampon TE

Tableau 2.5 : Digestion du vecteur pGR106 Gateway

Réactifs	Volumes et quantité
pGR106 Gateway (1 µg/µL)	1 µL
SmaI (10u/µL)	0.5 µL
Tampon J	2 µL
BSA	0.2 µL
H2O	Complété à 20 µL

Tableau 2.6 : Mélange de réaction LR

Réactifs	Volumes et quantité
pENTRY	15-150 ng du vecteur
pGR106 Gateway digéré (150 ng/µL)	1 µL
Tampon TE	Complété à 8µL
LR Clonase*	2 µL

\* Ajout de la LR Clonase après avoir mélangé les autres réactifs et complété à 8 µL avec le tampon TE

Des bactéries électro-compétentes de la souche DH5α d'*Escherichia coli* (*E. coli*) et de la souche GV3101 de *Rhizobium radiobacter* (*R. radiobacter*) ont été utilisées pour les clonages et les tests d'expression transitoire *in planta* respectivement. Les bactéries ont été placées avec les plasmides dans une cuvette d'électroporation stérile avant d'appliquer le mode EC2 (une impulsion à 2.5 kV) de l'électroporateur « MicroPulser™ Electroporator » (BioRad). Les bactéries ont ensuite été re-suspendues dans 150 µL de milieu liquide *lysogeny broth* (« LB » ; peptone, 10 g/L ; extrait de levure, 5 g/L ; NaCl, 10 g/L), transférées dans un tube eppendorf et mises sous agitation pendant une heure à 37°C pour *E. coli* ou pendant deux heures à 28°C pour *R. radiobacter*. Suite à l'incubation, 50 µL de *E. coli* ou 100 µL de *R. radiobacter* ont été étalés sur boîte de Pétri contenant du LB solide

supplémenté des antibiotiques adéquats (dépendant du plasmide pour *E. coli* et rifampicine, 50 mg/mL ; gentamycine, 25 mg/mL ; tétracycline, 5 mg/mL ; kanamycine, 50 mg/mL pour *R. radiobacter*). Suite à une incubation d'une nuit à 37°C pour *E. coli* ou 3 à 5 jours à 28°C pour *R. radiobacter* sur milieu sélectif, l'insertion des plasmides a été contrôlée. Les souches recombinantes ont été re-suspendues dans 10 mL de milieu liquide LB contenant les antibiotiques adéquats et incubées pendant la nuit à 37°C pour *E. coli* ou 2 jours à 28°C pour *R. radiobacter*.

Après les étapes de BP et de LR, nous avons vérifié la présence des gènes d'intérêt à l'aide de PCR sur colonies. Les colonies ont été récoltées avec un cône stérile et re-suspendues dans le mix PCR détaillé dans le tableau 2.7. Les paramètres PCR sont fournis dans le tableau 2.8. À la fin du clonage, nous avons aussi vérifié la présence des gènes d'intérêt en réalisant des PCR sur les plasmides (Mix et paramètres de PCR dans les tableaux 2.7 et 2.8). Les plasmides ont été extraits avec le kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA) en suivant le protocole QIAprep®.

Tableau 2.7 : Volumes et quantités pour les PCR sur colonies et plasmides

Réactifs	Produit PCR < 1kb
ADN	250 ng d'ADN génomique / une colonie isolée
Tampon de reaction GoTaq® (5X)	10 µL
MgCL2	1,5 µL
Mix de dNTPs (10mM de chaque dNTP)	1 µL
Amorce Forward (10 µM)	1 µL
Amorce Reverse (10 µM)	1 µL
GoTaq® (5u/µL)	0,2 µL
H2O	complété 25µL
Volume Final	25µL

Tableau 2.8 : Conditions pour les cycles de PCR avec la GoTaq®

Étapes	Nombre de cycles	Températures	Durées
Dénaturation initiale	1	95°C	2 mins
Dénaturation	30	95°C	30 secs à 1 min
Hybridation		Tm des Amorces	30 secs à 1 min
Expansion		72°C	1 min par kb
Expansion finale	1	72°C	5 mins

Tous les produits PCR ont été visualisés après une électrophorèse sur gel d'agarose contenant 1 % de tampon TAE à 1X (Tris-Acétate 0,04 M, EDTA 0,001 M ; pH final 8,0). Les produits

PCR ont été révélés par UV après un bain de 20 minutes dans du BET. Les séquençages ont été réalisés par l'entreprise GENEWIZ (France). La qualité des séquences et les alignements manuels ont été réalisés avec le logiciel d'alignement BioEdit (Hall 1999)

### **2.3.5. Expression transitoire *in planta* par agro-infection**

Nous avons utilisé des protocoles adaptés de ceux décrits par Du et al. (2014) et par Lee et al. (2014). L'agro-infection se base sur l'inoculation, par piqûre avec un cure-dent, de bactéries recombinantes possédant un vecteur viral qui porte le gène codant la protéine d'intérêt. Suite à l'inoculation par les Agrobactéries, l'ADN-T situé sur le plasmide pGR106 des bactéries est intégré à l'ADN des cellules végétales qui deviennent transformées. L'ADN-T peut être transcrit par les cellules végétales transformées. Comme l'ADN-T contient un promoteur 35S fort le vecteur viral PVX et le gène codant la protéine d'intérêt (un effecteur RxLR dans notre cas). Ceux-ci seront produits en forte quantité par les cellules végétales transformées. Le virus recombinant produit pourra se propager de cellule en cellule, amplifiant le nombre de cellules produisant l'effecteur. Les souches recombinantes de *R. radiobacter* récupérées de stocks glycérols ont été utilisées pour inoculer 10 mL de LB liquide contenant les antibiotiques adéquats et incubées à 28°C et 200 rpm pendant 1 à 2 jours. Des boîtes de Pétri contenant du milieu LB solide supplémenté avec les antibiotiques ont été inoculées avec 300 µL de culture puis incubées à 28°C pendant 1 à 2 jours. Les plantes ont été inoculées par piqûre avec un cure-dent trempé dans la culture de *R. radiobacter*. Au moins 3 plantes par accession âgées de 5 semaines ont été inoculées avec chaque clone recombinant pour un nombre total de points inoculés supérieur ou égal à 10. Les notations ont été effectuées 14 jours après inoculation. Les sites inoculés développant des réponses hypersensibles (HR) ont été comptés afin de déterminer les pourcentages de réponse. Pour les tests préliminaires, nous avons testé les souches de GV3101 contenant les vecteurs d'expression pGR106:*crn2* ('*Crinkling and necrosis 2*', Torto et al. 2003) et pGR106:PITG\_16240 (effecteur RxLR de *P. infestans* induisant des réponses hypersensibles chez le piment, Dr. Ingo Hein Communication personnelle). La souche GV3101 contenant pGR106:PITG\_16240 a ensuite été sélectionnée comme témoin positif lors des criblages. Nous avons utilisé la souche de GV3101 contenant le vecteur pGR106:GFP comme témoin négatif.

### **2.3.6. Expression transitoire *in planta* par inoculation mécanique**

Nous avons adapté le protocole publié par Lee et al. (2014). Cette méthode consiste à inoculer un vecteur viral qui porte le gène codant la protéine d'intérêt par frotti. L'inoculum a été préparé en infectant des plantes de *N. benthamiana* âgées de 4 à 5 semaines. La souche de GV3101 de *R. radiobacter* possédant le vecteur pGR106:GFP et la souche possédant le vecteur pGR106:*crn2* ont été utilisées comme témoins négatif et positif respectivement. Les feuilles systémiques présentant des symptômes de développement viral une semaine après agro-infection ont été prélevées, stockées dans des boîtes contenant du gel de silice, puis disposées dans une chambre froide à 4°C. Au moment de l'inoculation, 1 g de feuille a été broyé avec 80 mg de charbon et 80 mg de carborundum dans 4 mL de tampon d'extraction (Solution de DIECA à 0.2 %). Six plantes âgées de 5 semaines ont été inoculées avec les témoins pGR106:GFP et pGR106:*crn2* sur deux feuilles par accession pour un nombre total de 12 points d'inoculation. Le nombre de sites inoculés développant des réponses hypersensibles (HR) a été compté afin de déterminer les pourcentages de réponses.

### **2.3.7. Évaluation de l'accumulation virale du PVX par DAS-ELISA**

La core-collection a été semée en serre à raison de 6 plantes par accession afin d'évaluer la capacité des accessions de la core-collection à accumuler le virus PVX. Le virus a été inoculé, par agro-infection de la souche GV3101 contenant le vecteur pGR106:GFP, sur des feuilles de *N. benthamiana* et les feuilles systémiques présentant des viroses ont été utilisées comme inoculum. Une feuille par plante a été inoculée par frottis. Les feuilles inoculées ont été poolées par accession 14 jours après inoculation et 500 mg de tissus situés sous la zone inoculée ont été prélevés et broyés dans 2 mL de tampon phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,03 M ; diéthylthiocarbamate de sodium, 0,2%). Nous avons réalisé un DAS-ELISA qualitatif en suivant les étapes décrites par Ayme et al. (2006). Les plaques ELISA ont été incubées avec l'anticorps de coating (dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans du tampon de coating 1X) pendant 3 heures à 37°C puis une nuit à 4°C avec les échantillons dilués au 1/5<sup>ème</sup> dans du tampon phosphate. Après rinçage, les plaques ont été incubées avec l'anticorps conjugué dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans du tampon conjugué 1 X pendant 3 heures à 37°C. Après rinçage, les plaques ont été incubées à température ambiante avec le substrat (nPPP à 1mg/mL). La densité optique à 405 nm a été déterminée avec un lecteur de plaque (ThermoFisher Scientific du modèle Multiskan FC) 1, 3 et 24 heures après incubation. Les lectures ELISA sont considérées positives (accumulation virale) lorsque la densité optique mesurée après 24 heures d'incubation pour l'échantillon est 3 fois supérieure à celle du témoin négatif.

## 2.4. Résultats

### 2.4.1. Mise au point de l'expression transitoire *in planta* sur piment

Lors de tests d'agroinfiltration réalisés précédemment, notre équipe a montré que la souche AGL1 de *Rhizobium radiobacter* induit des réactions aspécifiques chez le piment et que ces réactions sont liées à la bactérie et non au gène exprimé. Elles se caractérisent par un jaunissement de la feuille agro-infiltrée à l'extérieur de la zone agro-infiltrée, suivie de l'abscision de celle-ci. Si une baisse de la concentration en bactéries limite l'émergence des symptômes (mesure d'absorbance à 600 nm inférieure à 0.1), l'analyse du niveau d'expression des gènes d'intérêt dans les tissus nécessiterait une réplication de points d'infiltration conséquente pour palier le nombre de faux négatifs. Nous avons donc cherché à adapter d'autres méthodes d'expression transitoire *in planta* afin de réaliser nos criblages. Nous avons testé la méthode d'agro-infection mise au point par Du et al. (2014) et celle d'expression transitoire par inoculation mécanique employée par Lee et al. (2014) sur quatre accessions de piment afin de développer une alternative à l'agroinfiltration pour nos criblages.

Quatre accessions de piment montrant différents niveaux de résistance à *P. capsici*, incluant une accession sensible (PM0031) et trois accessions partiellement résistantes (PM0217, PM0659 et PM0702) ont été inoculées avec les témoins positifs (pGR106:crn2 et pGR106:PITG\_16240). Au total, 45 et 12 points d'inoculation ont été réalisés pour chaque témoin avec les méthodes d'agro-infection et d'inoculation mécanique respectivement.

Globalement, les pourcentages de sites montrant des symptômes de mort cellulaire sont faibles après inoculation avec le témoin négatif pGR106:GFP (Tableau 2.9). Ces pourcentages varient entre 0 % et 9 % avec les deux méthodes indifféremment. En agro-infection, les pourcentages de sites montrant des phénotypes de HR varient entre 9 % et 38 % pour le témoin positif pGR106:PITG\_16240 et entre 4 % et 29 % pour le témoin positif pGR106:crn2. Les réactions causées par l'inoculation mécanique du témoin positif pGR106:crn2 sont plus importantes avec des pourcentages variant entre 8 % et 100 % de sites développant des symptômes de mort cellulaire.

Table n°2.9 : Efficacité des méthodes d'expression transitoire *in planta*.

Génotype	Profil de résistance à <i>P. capsici</i>	Contrôle	Nbre de points agro-infectés	Nombre de points développant une HR (%)	Nombre de points inoculés par frottis	Nombre de points développant une HR (%)
PM0031	S	GFP	45	0 (0)	12	0 (0)
		<i>crn2</i>	45	13 (29)	12	12 (100)
		PITG_16240	45	16 (36)	12	NA
PM0217	R	GFP	45	1 (2)	12	1 (8)
		<i>crn2</i>	45	12 (27)	12	11 (92)
		PITG_16240	45	17 (38)	12	NA
PM0659	R	GFP	45	4 (9)	12	0 (0)
		<i>crn2</i>	45	5 (11)	12	7 (58)
		PITG_16240	45	4 (9)	12	NA
PM0702	R	GFP	45	0 (0)	12	0
		<i>crn2</i>	45	2 (4)	12	1 (8)
		PITG_16240	45	14 (31)	12	NA

Les pourcentages de sites inoculés développant des symptômes de mort cellulaire 14 jours après agro-infection (Colonne 5) et 10 jours après inoculation mécanique (Colonne 7) ont été calculés sur 45 et 12 points respectivement. Tous les clones sont portés par le vecteur d'expression pGR106. GFP: Témoin négatif ; *crn2*: Induit des nécroses chez *N. benthamiana* (Torto et al. 2003), Témoin positif ; PITG\_16240: Induit des symptômes de mort cellulaire chez le piment, Témoin Positif ; NA : Non testé ; Les profils de résistance avaient été déterminés par Cantet (2013) ; R, accession partiellement résistante ; S, accession sensible.

Malgré un temps d'attente plus long pour l'observation des symptômes (14 jours pour l'agro-infection comparativement à 10 jours pour l'inoculation mécanique), l'agro-infection présente plusieurs avantages techniques comparativement à l'inoculation mécanique pour nos criblages. Avec l'agro-infection, la préparation de l'inoculum est rapide. De plus, elle permet d'inoculer un grand nombre de points sur une même feuille sans augmenter les risques de contaminations croisées. Pour ces raisons, l'agro-infection a été choisie afin d'analyser l'activité d'virulence des effecteurs RxLR de *P. capsici*. Pour 3 accessions sur 4, des pourcentages de sites développant des HR plus élevées ont été observés pour la méthode d'agro-infection avec le témoin positif pGR106:PITG\_16240 comparativement à pGR106:*crn2* (Tableau 2.9). La souche de GV3101 possédant le vecteur pGR106:PITG\_16240 a donc été sélectionnée comme témoin positif pour nos criblages.

#### 2.4.2. Sélection des accessions de piment pour le criblage

Les accessions de piment retenues pour les criblages des effecteurs candidats ont été sélectionnées sur deux critères : leur capacité à accumuler le virus PVX virale après inoculation mécanique (vecteur d'expression de l'agro-infection) et leur capacité à développer des HR après agro-infection par le témoin positif pGR106:PITG\_16240.

Dans une première étape, nous avons évalué l'accumulation virale du PVX par DAS-ELISA. Les valeurs de  $DO_{405nm}$  obtenues pour les témoins négatifs variaient entre 0,10 et 0,13 et celles obtenues pour les accessions variaient entre 0,11 et 5,5. Des 48 accessions testées, 34 présentaient une valeur de  $DO_{405nm}$  supérieure à 0,39 (3 fois la valeur du témoin négatif avec la  $DO_{405nm}$  la plus élevée) et ont été sélectionnées pour analyser leur compatibilité à *R. radiobacter* par agro-infection (Tableau supplémentaire S2.1). Dans une seconde étape, ces 34 accessions ont été agro-infectées avec le témoin négatif pGR106:GFP et le témoin positif pGR106:PITG\_16240. Les pourcentages de sites développant des HR variaient entre 0 % et 95 % pour le témoin positif pGR106:PITG\_16240 et aucun site n'a développé de réponses après agro-infection du témoin négatif pGR106:GFP (Tableau supplémentaire S2.1).

Parmi les 34 accessions testées, 24 avaient été caractérisées partiellement résistantes et 10 sensibles à *P. capsici* sur la base d'un test tige (Cantet 2013). Il n'y a pas de lien entre l'accumulation virale et le profil de résistance des accessions ou leur appartenance à un groupe génétique (Figure 2.2, Panel A et C ; t-test, p-valeur > 0,05). Les valeurs de DO observées varient entre 0,11 et 5,50 (Moyenne = 2,03) pour les accessions résistantes et entre 0,20 et 5,30 (Moyenne = 2,32) pour les accessions sensibles à *P. capsici* (Figure 2.1, Panel A). Des résultats similaires sont observables lorsque les accessions sont classées en fonction de leur appartenance aux groupes génétiques établis par Nicolaï et al. 2013 (Figure 2.1, Panel C). A l'inverse, on observe un lien entre la réponse à l'agro-infection et le profil de résistance des accessions ou leur appartenance à un groupe génétique (Figure 2.2, Panel B et D ; t-test, p-valeur < 0,05). En effet, les pourcentages de sites développant des HR après inoculation du témoin positif pGR106:PITG\_16240 sont plus élevés pour les accessions sensibles à *P. capsici* suggérant que la compatibilité à l'agro-infection et le niveau de résistance à *P. capsici* sont liés (Figure 2.2, Panel B). La même tendance est observée entre la compatibilité à l'agro-infection et l'appartenance à un groupe génétique (Figure 2.2, Panel D). Cependant, notre design expérimental déséquilibré ne nous permet pas de différencier l'effet du profil de résistance et de l'appartenance à un groupe génétique. Des 15 accessions sélectionnées pour leur accumulation virale et appartenant au groupe 1, 13 sont partiellement résistantes et deux sont sensibles.

Il n'y a pas de corrélation entre l'accumulation virale évaluée par DAS-ELISA et les pourcentages de sites développant des HR après agro-infection. Plusieurs accessions présentent des accumulations virales importantes mais des pourcentages de HR faibles et inversement (Figure 2.2, Panel E ; coefficient de corrélation de Pearson = 0.14, p-valeur > 0,05).

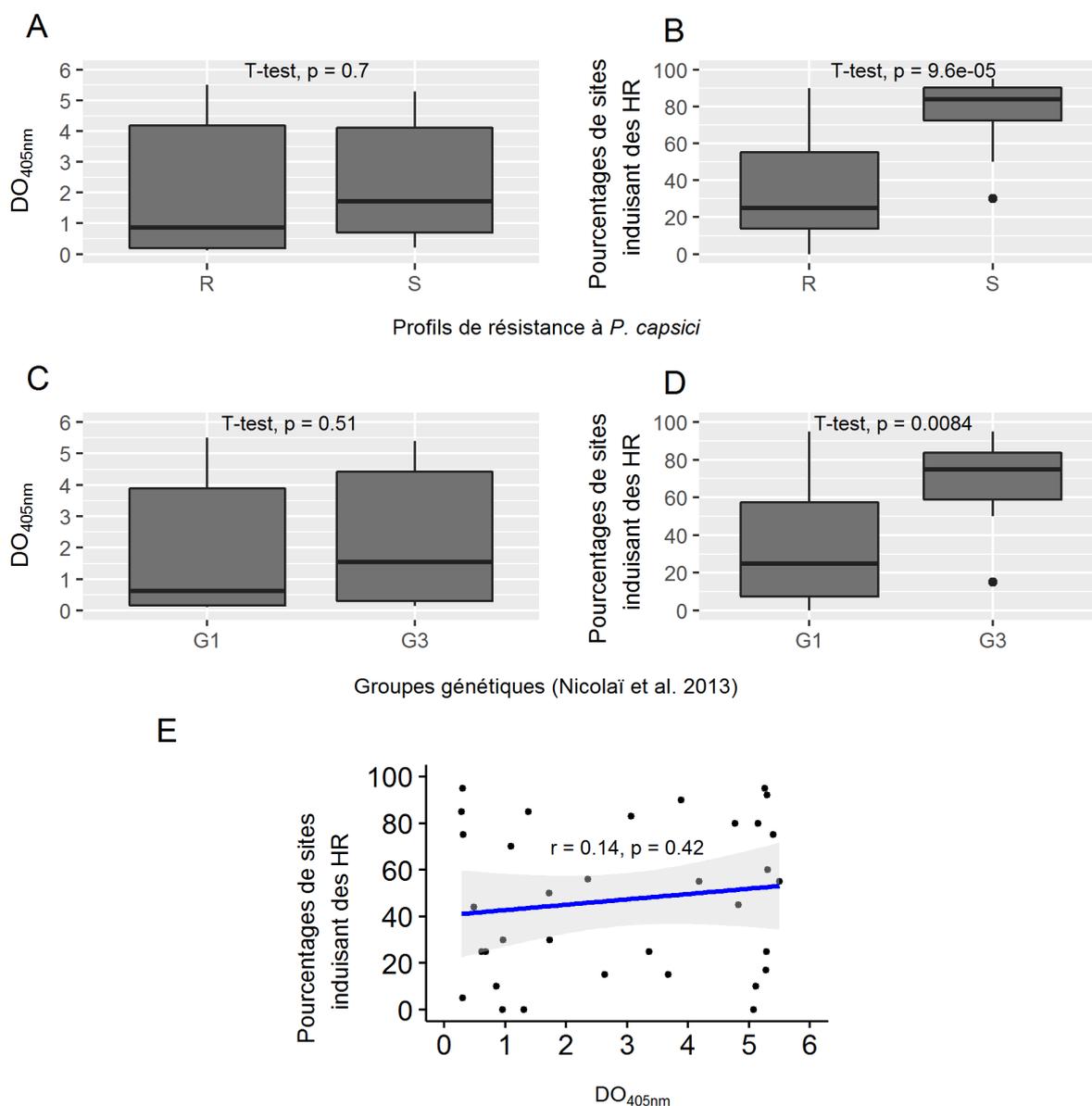


Figure 2.2 : Caractérisation de la réponse du piment aux méthodes d'expression transitoire *in planta* par agro-infection et inoculation mécanique du PVX. Panel A et C : Accumulation virale du PVX évaluée par DAS-ELISA après inoculation mécanique du témoin négatif pGR106:GFP. Les accessions sont classées selon leur profil de résistance à *P. capsici* dans le panel A (profils déterminés avec un test tige, Cantet 2013) et selon leur appartenance aux groupes génétiques décrits par Nicolai et al. (2013) dans le panel C. Panel B et D : Pourcentages de sites développant des réponses hypersensibles (HR) avec le témoin positif pGR106:PITG\_16240 (calculés sur 20 points inoculés). Les accessions sont classées selon leur profil de résistance à *P. capsici* dans le panel B (profils déterminés avec un test tige) et selon leur appartenance aux groupes génétiques décrits par Nicolai et al. (2013) dans le panel D. Panel E : Projection des pourcentages de sites agro-infectés induisant des HR en fonction de leur accumulation virale du PVX après inoculation mécanique du témoin négatif pGR106:GFP. Le coefficient de corrélation de Pearson et la p-valeur associée sont indiqués. R : Accessions partiellement résistantes à *P. capsici* ; S Accessions sensibles à *P. capsici* ; G1 : Groupe génétique 1 ; G3 : Groupe génétique 3 ; Les accessions non-caractérisées, celles appartenant au groupe génétique 2 (G2) et celle en admixture ne sont pas représentées ; DO<sub>405nm</sub> : Densité optique mesurée par DAS-ELISA à 405 nm 14 jours après inoculation. Les moyennes des différents groupes représentés dans les panels A à D ont été comparées avec un t-test et les p-valeurs associées sont indiquées.

Pour les criblages, j'ai sélectionné les accessions présentant un pourcentage de sites développant des HR après l'agro-infection du témoin positif pGR106:PITG\_16240 supérieur ou égal à 25 %. Des 34 accessions sélectionnées pour leur accumulation virale, 25 (dont 15 accessions partiellement résistantes à *P. capsici*) ont montré des pourcentages supérieurs ou égaux à 25 % et ont été conservées pour les criblages avec les effecteurs RxLR de *P. capsici*.

### 2.4.3. Sélection des effecteurs RxLR pour le criblage

Dans le chapitre 2, nous avons observé que les isolats Pc107 et Pc273 montraient chez le piment plusieurs effecteurs RxLR différenciellement exprimés à 24 heures post inoculation (hpi) du piment. Nous avons sélectionné plusieurs effecteurs RxLR différenciellement exprimés (DE) afin d'analyser leur capacité à induire les mécanismes de défense chez le piment. Les effecteurs que nous avons clonés ont été sélectionnés avec deux critères : leur profil d'expression dans les conditions biologiques étudiées dans le chapitre 2 et leur niveau de diversité entre les isolats Pc107 et Pc273.

Tableau 2.10 : Profil d'expression des effecteurs RxLR retenus pour le clonage.

Identifiants	HA vs. LA   R	HA vs. LA   S	R vs. S   HA	Nombre de polymorphismes non-synonymes	Longueur des effecteurs (acides aminés)
Phyca11 97196*	HA < LA	HA < LA	NA	8	236
CUST_14997	HA < LA	HA < LA	NA	0	120
CUST_7690	NA	HA < LA	NA	0	277
CUST_16519*	HA > LA	HA > LA	NA	5	153
CUST_1160*	HA > LA	HA > LA	NA	0	133
CUST_2407	NA	NA	R < S	2	104
Phyca11 129044	NA	HA < LA	NA	0	473
CUST_5402*	HA > LA	NA	NA	0	98
CUST_17572*	HA > LA	NA	NA	0	59
CUST_15481	HA < LA	NA	NA	11	153

HA vs. LA | R : Comparaison des profils d'expression de HA et LA pendant leur interaction avec l'hôte partiellement résistant (R) ; HA vs. LA | S : Comparaison des profils d'expression de HA et LA pendant leur interaction avec l'hôte sensible (S) ; R vs. S | HA : Comparaison des profils d'expression de HA pendant son interaction avec l'hôte partiellement résistant (R) et l'hôte sensible (S) ; HA : Isolat agressif sur piment (Pc107) ; LA : Isolat faiblement agressif sur piment (Pc273) ; S : Génotype sensible utilisé pour l'analyse d'expression (Yolo Wonder, PM0031) ; R : Génotype partiellement résistant utilisé pour l'analyse d'expression (Criollo de Morelos 334, PM0702) ; \* : Les effecteurs sélectionnés pour le criblage des accessions de piments.

Parmi les 26 effecteurs RxLR DE (effecteur avec un  $|\log \text{ fold change} |$  supérieur à 1.5 et une p-value ajustée pour les tests multiples inférieure à 0.05), les 10 effecteurs RxLR montrant les différentiels d'expression les plus importants ont été retenus (Tableau 2.10). Parmi ces 10 effecteurs RxLR (Tableau 2.11), 6 sont conservés au niveau protéique entre Pc107 et Pc273 et 4 montrent du polymorphisme protéique entre les deux isolats (Tableau 2.10). Du fait de contraintes d'espace et de

temps, nous avons cherché à démontrer la faisabilité du criblage par agro-infection sur une sélection de 5 effecteurs parmi tous les gènes candidats : les 2 effecteurs RxLR CUST\_17572 et CUST\_1160, conservé entre les deux isolats et 3 effecteurs RxLR polymorphes, Phyca11|97196, CUST\_5402, et CUST\_16519. Pour ces 3 derniers, les allèles provenant des deux isolats ont été clonés pour les effecteurs RxLR polymorphes.

Tableau 2.11 : Séquences protéiques des effecteurs RxLR sélectionnés pour le re-séquençage Sanger

Éffecteur RxLR	Séquence protéique
Phyca11 97196	MSSLLVQAASDKLNSGR <b>RS</b> LR <b>IA</b> AGTGLEQ <b>DE</b> ER <b>GS</b> LITKIRTTFSKKARVDEWAKAEKSDDFVRKALKLENVAD DHLWAMKNYPYLRFLFLEKTEAKKINDWLIGDVPTYGAWVKLGLGSIDDIEKVKTAAFKTYEKFVKEYDDQAI ALWKDYKIPIVAKATSPTMNRMDILAAAKRGDDYAKKVLGLDNVTGSALISHVNYQYFEHYRRTVKRLQ DPKKKLNRLPTITER*
CUST_14997	MSLELASETKALDAVPRDR <b>RL</b> LR <b>AN</b> TEEGVDGTETQ <b>HE</b> ER <b>G</b> ITTKVGNLIKDWKIKQMFKNKGSFEEIFNKGV TSGDVWDAFKIAKLQNKMSLTDLQFNPKYANWFHYDVVYAWRTAK*
CUST_7690	MANAPTTNSGV <b>RR</b> LR <b>LA</b> VDVQ <b>EE</b> RG <b>IA</b> DALSGAITSVKAKFTTNSGKLV EGLKTS AQLSDDQAAKMAKILT PEKARAAFLVSDDEVARMSSTIVKKANAEAGVVDDDDVASLAKVFAAAQKSTKATDDQVVAIAKIMANAKKAE EAAKAADDEVLVSEMFKVATGRASGAAKFTDDEVAKLSKALVEAQKGAALTDNQVAKLVKMFTEAKHVSS LSDKQVAKLAKELVPVATKDKKSWSTMKKVVVGTGLVGTAGAAVIYAVVKLTS GPSTSSAAA*
CUST 16519	MATTGNTVVANAAMVISPLAPESQGR <b>RS</b> LR <b>LV</b> YDDEDDSADEKDEEEDSADK <b>VD</b> EE <b>RG</b> WLSDKMA <b>LT</b> SL ASKFVGKSTDEMGEVIK <b>KL</b> T <b>PA</b> QIDTIFDKGEDSIQKMLPGFYSGMDFQKFDLIRALPQEQQAVML <b>S</b> AYTK YLHQNGRFS*
CUST_1160	MSDTVAVATSNQAKISKMEQSPSQ <b>RL</b> LR <b>SN</b> HYPVKEEEDSEDSVDFE <b>ER</b> GF <b>TT</b> PDEEDLEERSPLSSATV <b>KK</b> L ENIAKGWGTTYSSVAMGTSSVSQTKAKALLALRDAYISGIKSEKNAAKMAILMANKS*
CUST_2407	MLSTQADATSR <b>HL</b> LR <b>SH</b> HQNTNTYDAEE <b>EE</b> ER <b>GL</b> DKSIVKSLPEQFKNMYKYPSNMENVLESWRTGLQSVDDAV MYMKSLGMDFDAISHFVDAYRKHINKGLPY*
Phyca11 129044	MAATSATTDIKVPRPAINLQPPPLVVG <b>RL</b> LR <b>TV</b> Q <b>DE</b> ER <b>GF</b> TLPGAGKLADLFESTALKLTQSARINTWLAKGTS TDDAFIKLELNTAGSRIFENPKLLTWAVYVTKVEKKNPEEILARLSKQFTEGSLAKMIASAKLDSKTEGLATILQA QQRQVWVDAGKSSDEVFKLLQLDEAGTKLFKNQQFSTWTSFVDAFNRYKPEEAVSIFSKLAKTYDDFTLWKM LEAAKVPKTEIIASKLQAQQIDAWLDAGKSTDEVFNLLKQRTGDKLKFNSQFLTWVSYVEKFNKKDPDQAIA IFSKLAGIYDQVTLSSMLEAAKHVPSTKRIASYLQGQQNQHWLADGKSTDDIFKLLKLNTPSLENLIGPRLDAWT SFMRAFNMANEGKETT <b>LI</b> ATLTTHYKDRGLAQLLQEGTKFASTK <b>KIA</b> EELQTAQFARWLQLGKTEEDIFALLK <b>L</b> LTTPTDPEAIVFYRYKLFMDA <b>HM</b> *
CUST_5402	MKQAHTVKN <b>TD</b> GK <b>RL</b> LR <b>SD</b> DY <b>EE</b> RG <b>FN</b> WPWLK <b>KIK</b> QLDETTA <b>IK</b> QLATDFADL <b>KSL</b> NREALDV <b>FH</b> LMREGG MSPK <b>KAT</b> YISN <b>LFA</b> KY <b>ME</b> NPRL <b>YH</b> *
CUST_17572	MMSLPATRTTFRTRMWSLTV <b>AH</b> RR <b>VL</b> RS <b>RP</b> AWPPATRTMPLRPTCPPATLTMLLR <b>MT</b> *
CUST_15481	MATTGNTVVANAAMVISPLAPESQGR <b>RS</b> LR <b>LV</b> YDDEDDSADEKDEEEDSADK <b>VD</b> EE <b>RG</b> WLSDKMA <b>LT</b> SL ASKFVGKSTDEMGEVIK <b>KL</b> T <b>PA</b> QIDTIFDKGEDSIQKMLPGFYSGMDFQKFDLIRALPQEQQAVML <b>S</b> AYTK YLHQNGRFS*

Les domaines RxLR et EER sont en gras lorsqu'ils sont présents dans les séquences. Les signals peptides ont été coupés.

#### 2.4.4. Étude de l'activité d'avirulence des effecteurs RxLR

L'activité d'avirulence des effecteurs a été étudiée avec 3 séries d'agro-infections indépendantes. Le nombre de points agro-infectés variaient entre 10 et 50 par effecteur (Tableau supplémentaire S2.2). L'agro-infection du témoin négatif pGR106:GFP n'a pas induit de HR chez 23

des 25 accessions criblées. Les deux accessions restantes, PM0807 et PM1490 ont quant à elles montré 3.3 % de sites présentant des réactions nécrotiques ressemblant à des HR 14 jours après inoculation (Figure 2.4). L'agro-infection du témoin positif pGR106:PITG\_16240 a systématiquement induit des HR (Figure 2.3) chez les 25 accessions cependant à des taux variants 20 à 90 % des sites inoculés (Figure 2.4).

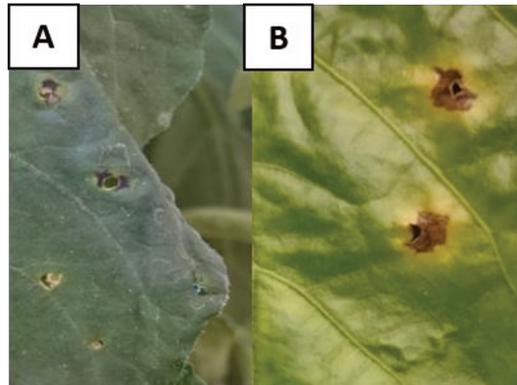


Figure 2.3 : Réponse hypersensible (HR) induite chez le piment 14 jours après agro-infection du témoin positif pGR106:PITG\_16240. Panel A : HR induites chez le génotype partiellement résistant à *P. capsici* (R), PM0892. Panel B : HR induites chez le génotype sensible à *P. capsici* (S), PM0972.

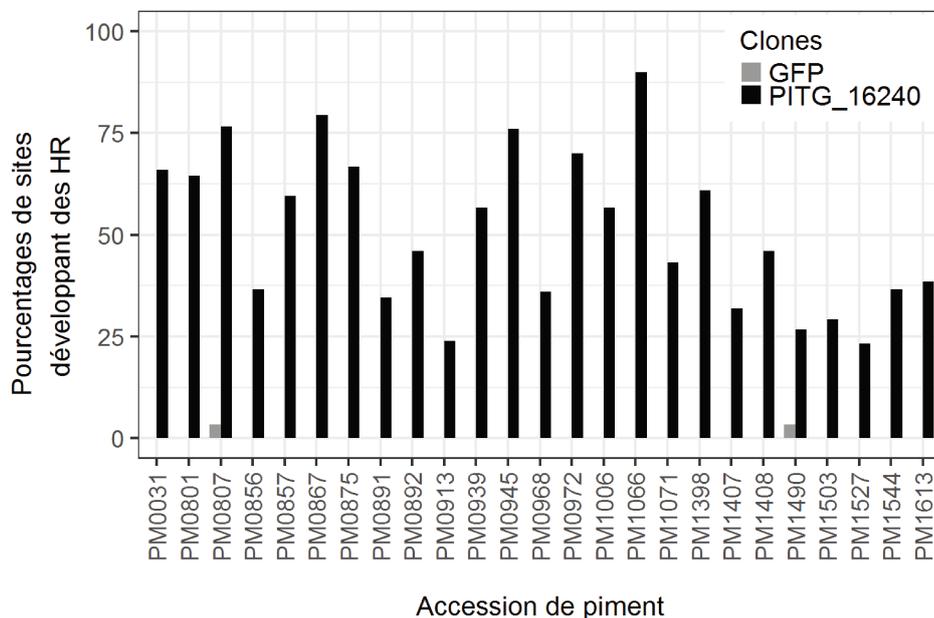


Figure 2.4 : Pourcentages de sites développant des réponses hypersensibles (HR) avec les constructions témoins portées par le vecteur d'expression pGR106 après agro-infection.. Construction PITG\_16240 : Témoin positif de HR ; construction GFP (« Green fluorescent protein ») : Témoin négatif.

Au total, les 25 accessions sélectionnées précédemment ont été criblées avec 8 effecteurs candidats. Des 9 accessions partiellement résistantes à *P. capsici* ayant induit des HR après agro-

infection, 4 accessions appartiennent au groupe génétique G1, 3 accessions appartiennent au groupe G3 et 2 accessions n'ont pas été catégorisées par Nicolai et al. (2013).

Des 9 accessions sensibles à *P. capsici* ayant induit des réponses après agro-infection, 2 accessions appartiennent au groupe génétique G1, 1 accession appartient au groupe G2, 4 appartiennent au groupe G3 et une n'a pas été catégorisée par Nicolai et al. (2013) (Tableau 2.12). Au total, 13 accessions sur 18 montrent des pourcentages de sites développant des symptômes après agro-infection inférieurs à 25 %. Nous avons donc considéré qu'une accession reconnaît l'effecteur agro-infecté lorsque le pourcentage de sites développant une HR est supérieur à celui observé avec l'agro-infection du témoin négatif pGR106:GFP. Pour chaque effecteur, 3 à 12 accessions déclenchent une HR (Tableau 2.12).

Tableau 2.12 : Matrice des résultats de criblage des accessions de *Capsicum annuum* par les effecteurs RxLR de *Phytophthora capsici*.

Accession	Groupe génétique	Profil de résistance à <i>P. capsici</i>									
			CUST_17572	CUST_1160	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	
PM0892	G1	R	+	-	-	-	-	-	-	-	
PM0968	G1		+	+	-	-	-	-	-	-	-
PM1066	G1		-	-	-	-	-	-	-	-	-
PM1071	G1		-	-	-	-	-	-	-	-	-
PM1490	G1		-	-	-	-	-	+	-	-	-
PM1503	G1		+	-	-	-	-	-	-	-	-
PM1544	G1		-	-	-	-	-	-	-	-	-
PM0875	G3		-	-	-	+	-	-	-	-	-
PM1398	G3		+	-	-	-	-	-	-	-	-
PM1408	G3		+	-	-	-	-	-	-	-	+
PM1527	Admixture		-	-	-	-	-	-	-	-	-
PM0891	AN		-	-	-	-	-	-	-	-	-
PM1006	AN		-	-	-	+	+	-	-	-	-
PM1407	AN		+	-	-	+	-	-	-	-	-
PM1613	AN		-	-	-	-	-	-	-	-	-
PM0801	G1		S	-	-	+	-	+	-	+	-
PM0807	G1	-		-	+	-	+	+	-	-	
PM0913	G2	+		-	-	-	-	-	-	-	
PM0031	G3	+		-	-	+	+	+	-	-	
PM0856	G3	-		-	-	-	-	-	-	-	
PM0867	G3	+		+	+	+	+	+	+	+	
PM0939	G3	-		-	-	-	-	-	-	-	
PM0945	G3	+		+	-	+	-	-	-	-	
PM0972	G3	-		-	+	+	+	+	+	+	
PM0857	AN	+		-	+	+	+	-	-	+	

+, Condition d'agro-infection (Accession x effecteur) montrant un développement de réponse hypersensible (HR) sur au moins un site inoculé ; -, Condition n'ayant pas développé de HR après agro-infection. Les profils de résistance avaient été déterminés avec un test tige (Cantet 2013). R : Accession partiellement résistante à *P. capsici*, S : Accession sensible à *P. capsici*. NA (colonne 2) : Accession non-classée dans l'étude génétique de Nicolaï et al. (2013)

L'effecteur RxLR CUST\_1160 induit des HR chez seulement 3 accessions. Nous avons observé des résultats similaires pour les allèles CUST\_5402<sup>Pc107</sup> et CUST\_5402<sup>Pc273</sup> qui induisent des réponses chez 3 et 4 accessions respectivement (Tableau 2.12). Des nombres plus importants d'accessions développant des HR ont été observés pour les autres effecteurs.

L'effecteur CUST\_17572 induit des HR chez 11 accessions dont 6 sont résistantes à *P. capsici* (Tableau 2.12). Il est plus exprimé chez l'isolat Pc107 (HA) que chez l'isolat Pc273 (LA) sur l'hôte résistant (R) et est conservé entre les deux isolats. Des nombres similaires d'accessions développant des HR ont été observées dans les groupes génétiques G1 et G3 avec 4 accessions (PM0801, PM0892, PM0968, PM1503) qui appartiennent au G1 et 5 qui appartiennent au G3 (PM0031, PM0867,

PM0945, PM1398 et PM1408). Des 3 dernières accessions, 2 n'ont pas été catégorisées (PM0857 et PM1407) et une appartient au groupe G2 (PM0913) (Figure 2.5, panel A et B).

Nous avons observé un lien entre les différences de profils d'expression des allèles des effecteurs RxLR Phyca11|97196 et CUST\_16519 et leur capacité d'induire des HR chez le piment. Phyca11|97196 est l'un des RxLR les plus exprimés par Pc273 (LA) sur l'hôte résistant et l'hôte sensible (HA vs. LA | R et HA vs. LA | S). Les deux isolats diffèrent par 8 polymorphismes non-synonymes pour cet effecteur. Au total, 8 accessions ont développé des HR avec au moins un des allèles de Phyca11|97196. Parmi celles-ci, 4 accessions sont sensibles à *P. capsici* et ont induit des HR avec les deux allèles Phyca11|97196<sup>Pc107</sup> et Phyca11|97196<sup>Pc273</sup> (PM0972, PM0867, PM0807 et PM0031). Un nombre plus important d'accessions ont développé des HR avec l'allèle Phyca11|97196<sup>Pc107</sup>, qui induit des HR chez 7 accessions, comparativement à l'allèle Phyca11|97196<sup>Pc273</sup>, qui induit des HR chez 5 accessions. Au total 3 accessions comprenant l'accession résistante à *P. capsici*, PM1006, ont développé des HR avec l'allèle Phyca11|97196<sup>Pc107</sup> mais pas avec Phyca11|97196<sup>Pc273</sup>. L'accession PM1490 résistante à *P. capsici* est la seule ayant développé des HR uniquement avec l'allèle Phyca11|97196<sup>Pc273</sup> (Figure 2.5, panel A et B).

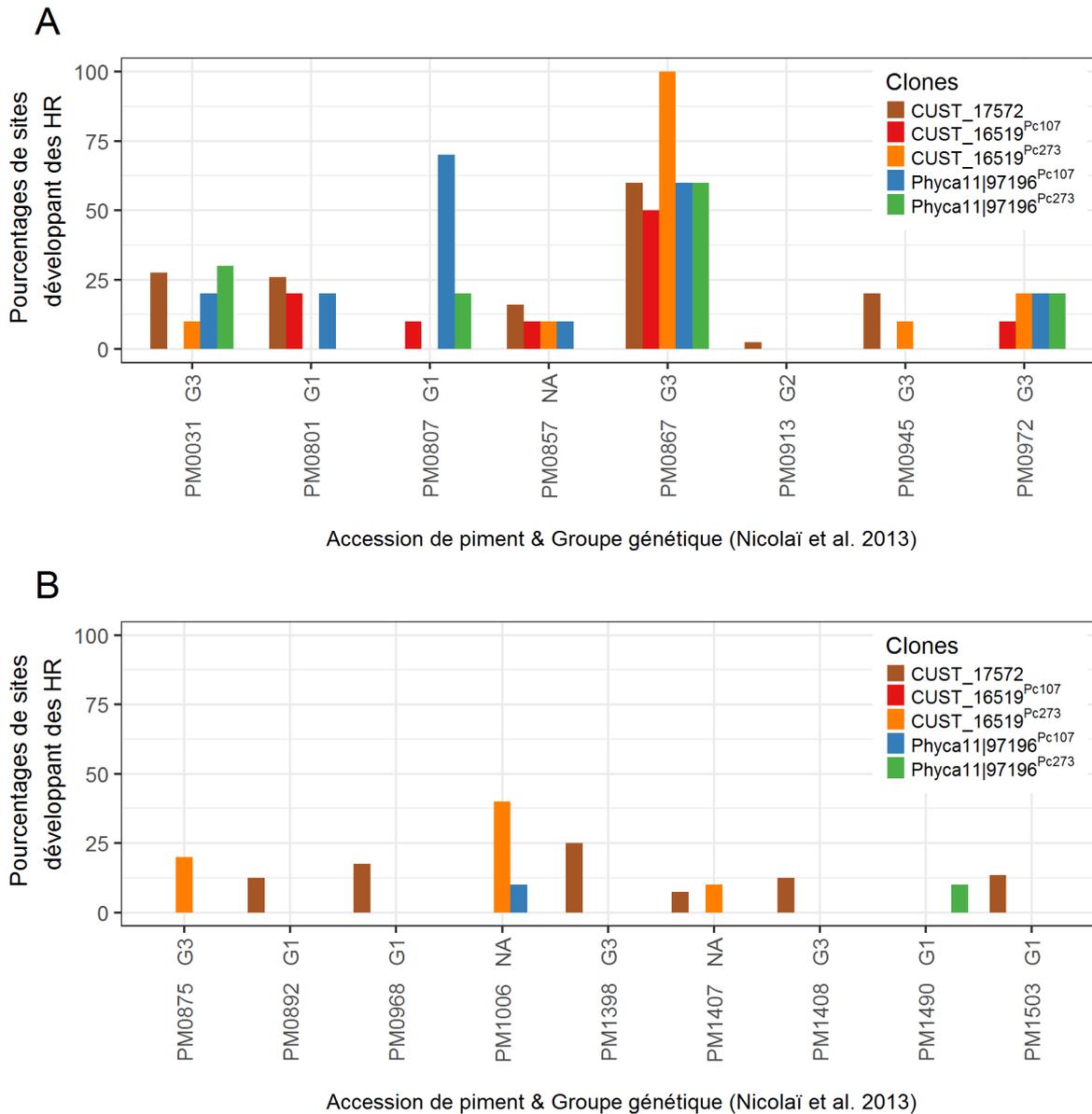


Figure 2.5 : Pourcentages de sites développant des réponses hypersensibles après agro-infection des effecteurs CUST\_17572, CUST\_16519<sup>Pc107</sup>, CUST\_16519<sup>Pc273</sup>, Phyca11|16519<sup>Pc107</sup> et Phyca11|16519<sup>Pc273</sup>. Panel A : Accessions de piments sensibles à *P. capsici*; Panel B : Accessions de piments partiellement résistants à *P. capsici*; G1 : Groupe génétique 1; G2 : Groupe génétique 2, G3 : Groupe génétique 3, NA : non-catégorisée dans l'étude de Nicolai et al. (2013)

De façon similaire, l'effecteur RxLR CUST\_16519 montre 5 SNP non-synonymes entre les deux isolats. L'allèle CUST\_16519<sup>Pc107</sup> est plus exprimé que CUST\_16519<sup>Pc273</sup> et induit des HR chez moins d'accessions. Au total, 10 accessions ont développé des HR avec au moins un des allèles de CUST\_16519. Parmi celles-ci, 3 accessions sensibles à *P. capsici* (PM0857, PM0867 et PM0972) ont développé des HR après l'agro-infection des deux allèles. Les accessions PM0801 et PM0857, sensibles à *P. capsici*, ont induit des HR avec l'allèle CUST\_16519<sup>Pc107</sup> mais pas avec l'allèle CUST\_16519<sup>Pc273</sup>. A l'inverse, 5 accessions ont développé des HR, dont 3 résistantes à *P. capsici*

(PM0875, PM1006 et PM1407), avec l'allèle CUST\_16519<sup>Pc273</sup> mais pas avec l'allèle CUST\_16519<sup>Pc107</sup> (Figure 2.5, panel A et B).

## 2.5. Discussion

Plusieurs études ont montré que des polymorphismes d'expression d'effecteurs RxLR pouvaient être à l'origine de contournements de résistance chez les plantes (Cui et al. 2012; Gilroy et al. 2011). Nous avons pour but d'analyser le lien, chez *Phytophthora capsici*, entre la régulation des gènes codant les effecteurs RxLR et leur capacité à induire les mécanismes de défense chez le piment. Dans cette étude, nous avons évalué la capacité de cinq effecteurs RxLR, dont trois avec deux allèles, à induire des réponses hypersensibles chez un panel d'accessions de piment contrastés pour leur résistance à *P. capsici*. Nous avons sélectionné des effecteurs présentant des changements de profils d'expression entre deux isolats contrastés par leur niveau d'agressivité sur piment et montrant différents niveaux de diversité entre les deux isolats.

### 2.5.1. Le piment présente des problèmes de compatibilité pour les méthodes d'expression transitoire *in planta* basées sur l'utilisation de *Rhizobium radiobacter*.

Le piment est réputé pour être récalcitrant aux méthodes de transformation stables médiées par *R. radiobacter*. Il présente un taux de transfert de gènes faible et variable selon les génotypes (Lee et al. 2004). Nos expériences préliminaires d'expression transitoire illustrent cette faible compatibilité du piment à *R. radiobacter*. Moins de 50 % des sites agro-infectés (45 points inoculés) avec les témoins positifs pGR106:*crn2* et pGR106:PITG\_16240 ont induit des réponses hypersensibles (HR) avec les 4 accessions PM0031 (Yolo wonder ou YW), PM0217 (Pi201234), PM0659 (Perennial ou Per) et PM0702 (Criollo de Morelos 334 ou CM334). De plus, l'agro-infection des témoins positifs et du témoin négatif n'ont pas induit de réponses différenciables chez l'accession PM0659. En moyenne, 10 % des sites agro-infectés avec les témoins positifs et le témoin négatif ont induit des HR montrant que l'accession PM0659 est récalcitrante à *R. radiobacter*. En utilisant un protocole d'inoculation mécanique, Lee et al. (2014) sont parvenus à outrepasser l'incompatibilité du piment à *R. radiobacter*. En appliquant ce protocole avec pGR106:*crn2* en témoin positif, nous avons observé des pourcentages de sites développant des symptômes de mort cellulaire supérieurs à 50 % avec les accessions PM0031, PM0217 et l'accession récalcitrante à l'agro-infection, PM0659. Cependant, l'accession PM0702 (Criollo de Morelos 334 ou CM334, génotype R du chapitre 2) n'a pas induit de

HR à cet effecteur. Cette absence de réaction pourrait être due à (i) un blocage de l'activité nécrotique de l'effecteur chez cette accession ou à (ii) l'induction de résistance au vecteur PVX causée par la concentration élevée de virus dans l'inoculum. En effet, le piment est connu pour posséder des gènes de résistance au PVX et la résistance de CM334 et Per ont été caractérisés par Shi et al. (2008). Chez Per, la résistance se manifeste par le développement de nécroses locales sur les feuilles inoculées 5 jours après infection alors que chez CM334, les feuilles inoculées restent sans symptômes visible jusqu'à 56 après infection.

Malgré les pourcentages de sites développant des HR élevés avec la méthode d'inoculation mécanique, nous avons sélectionné la méthode d'agro-infection afin de réaliser les criblages. L'inoculation mécanique est difficilement applicable pour des criblages de moyen à haut-débit à cause de deux aspects. Tout d'abord, l'inoculation mécanique nécessite de multiplier le virus chez *N. benthamiana* pour produire l'inoculum utilisé pour le criblage. De plus, la zone d'inoculation est large, limitant ainsi le nombre de sites pouvant être inoculés par feuille. Une densité trop élevée de points d'inoculations augmenterait considérablement le risque de contaminations croisées entre les effecteurs testés avec cette méthode.

Nous avons utilisé un panel de 48 accessions de *Capsicum annuum*, déjà caractérisées pour leur profil de résistance à *P. capsici* à l'aide d'un test sur tige. Parmi ces accessions, 37 accessions étaient partiellement résistantes et 11 accessions étaient sensibles à *P. capsici*. Nous avons caractérisé ces accessions pour leur accumulation virale et leur capacité à développer des HR avec l'agro-infection d'un témoin positif afin d'éliminer celles qui seraient récalcitrantes à la méthode d'agro-infection. L'analyse de l'accumulation virale du témoin pGR106:GFP par DAS-ELISA a permis de sélectionner 34 accessions montrant une accumulation du virus PVX après inoculation mécanique et qui sont donc supposées dénuées de facteurs majeurs de résistance au virus. Dans un second temps, les réponses induites par l'agro-infection du témoin négatif pGR106:GFP et du témoin positif pGR106:PITG\_16240 ont été notées afin d'évaluer la compatibilité des 34 accessions à *R. radiobacter*. L'analyse des pourcentages de sites développant des HR (sur 20 sites agro-infectés) a révélé des pourcentages plus élevés chez les accessions sensibles à *P. capsici* comparativement aux accessions résistantes. Cela suggère l'existence d'un lien entre le profil de résistance à *P. capsici* et l'induction des mécanismes de défense du piment par l'agro-infection du témoin positif.

La tendance similaire observée avec la distribution des accessions en fonction de leur appartenance aux groupes génétiques décrit par Nicolaï et al. (2013), montre que ces différences peuvent aussi être dues à la structure génétique dans notre panel d'accession.

L'absence de corrélation entre l'accumulation du PVX et les pourcentages de sites développant des HR après agro-infection des témoins montre que la HR n'est pas liée à la charge

virale dans les feuilles mais bien à l'expression du gène d'intérêt. Ces résultats suggèrent que les faibles pourcentages de réponses observés seraient dus à l'incompatibilité des accessions à *R. radiobacter*. Afin d'éliminer les accessions de piment récalcitrantes à l'agro-infection, j'ai sélectionné les accessions à cribler sur la base de leur réponse à l'agro-infection du témoin positif pGR106:PITG\_16240 et du témoin négatif pGR106:GFP et leur accumulation virale après inoculation mécanique du témoin négatif pGR106:GFP. Des 34 accessions de *Capsicum annuum* montrant une multiplication du virus PVX, 25 avaient des pourcentages de réponses à l'agro-infection du témoin positif pGR106:PITG\_16240 supérieurs au seuil de 25 % et ont été sélectionnées. Cette proportion est similaire à celle rapportée par Lee et al. 2014, qui ont observé 45 sur 100 accessions de *Capsicum annuum* développant des symptômes de mort cellulaire après inoculation avec leur témoin positif PexRD2.

### **2.5.2. Le niveau d'expression des effecteurs RxLR entre isolats serait potentiellement lié à leur capacité à induire des mécanismes de défense chez le piment.**

Les 25 accessions sélectionnées ont été agro-infectées avec 8 effecteurs candidats. De ces 200 interactions « accessions x effecteurs », 46 développent une HR. Les huit effecteurs candidats ont induit des HR chez au moins une accession. Le nombre d'accessions développant ces symptômes variaient entre 3 et 12 par effecteur. Au total, 18 des 25 accessions, dont 9 sont résistantes et 9 sont sensibles à *P. capsici*, ont développé des HR après agro-infection.

Les résultats obtenus avec les effecteurs RxLR CUST\_16519 et Phyca11|97196 semble indiquer un lien entre le niveau d'expression de chaque allèle et leur capacité à induire les mécanismes de défense chez le piment. Les comparaisons des profils d'expression entre HA et LA ont révélé que l'effecteur RxLR CUST\_16519 est plus fortement exprimé chez HA comparativement à LA pendant leur interaction avec l'hôte résistant et l'hôte sensible (HA vs. LA | R et HA vs. LA | S). Le re-séquençage Sanger a révélé plusieurs polymorphismes non-synonymes sur cet effecteur entre les deux isolats Pc273 (LA) et Pc107 (HA). L'agro-infection de l'allèle de Pc273 (CUST\_16519<sup>Pc273</sup>) a induit des HR chez plus d'accessions de piment comparativement à l'allèle de Pc107 (CUST\_16519<sup>Pc107</sup>). De plus, seul l'allèle CUST\_16519<sup>Pc273</sup> a induit des HR chez des accessions résistantes à *P. capsici*. Une tendance similaire a été observée avec l'effecteur RxLR Phyca11|97196 qui est aussi polymorphe entre les deux isolats mais dont l'allèle provenant de l'isolat Pc273 (Phyca11|97196<sup>Pc273</sup>) est plus exprimé par rapport à celui de l'isolat Pc107 (Phyca11|97196<sup>Pc107</sup>) pendant leur interaction avec les deux hôtes. L'agro-infection de l'effecteur Phyca11|97196<sup>Pc273</sup> induit des HR chez plus d'accessions

que l'agro-infection de l'effecteur Phyca11|97196<sup>Pc107</sup>. Ces résultats suggèreraient que la faible expression des effecteurs Phyca11|97196<sup>Pc107</sup> et CUST\_16519<sup>Pc273</sup> permettrait d'éviter l'induction du système immunitaire de l'hôte. Wang et al. 2011 ont observé des résultats similaires avec l'effecteur Avh238 de *Phytophthora sojae* qui est fortement exprimé au cours des phases précoces de l'interaction de *P. sojae* et du soja. Ce même effecteur est polymorphe entre différents isolats. L'allèle de P6497 induit des symptômes de mort cellulaire alors que l'allèle de P7076 supprime les réponses de mort cellulaire induit par l'expression transitoire du PAMP INF1 chez *N. benthamiana*. Ils ont montré que l'infection réduite d'hypocotyles de soja par les isolats de *P. sojae*, surexprimant l'allèle P6497, a révélé le lien existant entre les niveaux d'expression de cet effecteur RxLR et la capacité de cet agent pathogène à se développer sur le soja.

De façon surprenante, j'ai observé la tendance inverse pour l'effecteur RxLR CUST\_17572 qui est conservé entre les deux isolats et est plus exprimé par HA comparativement à LA. En se basant sur l'hypothèse que les effecteurs les moins exprimés évitent leur reconnaissance par le système immunitaire de la plante, on s'attend à ce que CUST\_17572 n'induit pas ou peu de HR chez la plante. Or, c'est l'effecteur qui a induit des HR chez le plus d'accessions selon nos résultats. De plus, des 12 accessions développant des HR avec cet effecteur, 6 accessions sont résistantes à *P. capsici*. Je suppose qu'un autre effecteur RxLR, exprimé en amont pendant l'interaction de *P. capsici* avec le piment, empêcherait l'induction des mécanismes de défense par CUST\_17572. Wang et al. 2011 ont classé les effecteurs de *P. sojae* en fonction de leur capacité à supprimer les HR induites par des effecteurs, BAX et le PAMP INF1. Ils ont aussi identifié des effecteurs agissant en cascade afin de supprimer la HR induite par le PAMP INF1. C'est le cas d'Avh171 qui supprime la HR déclenchée par Avh238. Ils ont montré grâce à des tests d'expression transitoire *in planta* que l'action d'Avh171 est nécessaire afin de permettre à Avh238 d'inhiber la HR induite par INF1. Il est tentant de supposer que CUST\_17572, plus exprimé par l'isolat agressif, participe à une cascade similaire chez *P. capsici*.

Notre étude a permis d'identifier plusieurs effecteurs RxLR de *P. capsici* capables d'induire les mécanismes de défense chez des accessions de piment. Bien que les réponses induites par ces effecteurs fussent généralement faibles en pourcentage, nous avons observé une relation entre les contrastes des profils d'expression de certains d'entre eux avec leur capacité à induire des HR. La confirmation des tendances décrites nécessitera la mise en place de plusieurs tests complémentaires. Tout d'abord, l'utilisation de la méthode d'inoculation mécanique nous permettrait, comme précédemment montré par Lee et al. 2014, de passer outre les problèmes de compatibilité du piment à *R. radiobacter*. De plus, des analyses protéiques par Western Blot permettraient de contrôler la stabilité des effecteurs *in planta*. Enfin, l'utilisation de nos effecteurs en système hétérologue chez *N. benthamiana* permettrait d'étudier leur localisation subcellulaire

(Stam et al. 2013a) et leur capacité à supprimer les mécanismes de défense ou à favoriser l'infection (Wang et al. 2011). Du fait de contraintes techniques nous avons cherché à démontrer la faisabilité de cette approche sur une sélection d'effecteurs candidats. Le clonage des autres effecteurs RxLR identifiés et leur analyse par expression transitoire restent à faire. Enfin, ce criblage a été réalisé en se basant sur les profils d'expression de deux isolats et un panel de 48 accessions de *Capsicum annuum*. L'étude de l'expression et de la diversité des RxLR chez plus d'isolats permettraient d'avoir une vision plus large et d'augmenter le nombre de candidats. Pour une perspective à plus long terme, ces effecteurs pourraient être utilisés dans des analyses génétiques afin de faciliter la cartographie des facteurs de résistance du piment à *P. capsici* ou dans des criblages de type double hybride afin d'identifier les cibles protéiques chez la plante.

## 2.6. Suppléments

Tableau supplémentaire S2.1 : Test de compatibilité de 48 accessions de piment pour le protocole d'agro-infection

Accession	Groupe Génétique	Résistance à <i>P. capsici</i>	Accumulation virale (Densité optique à 405nm)	Pourcentage de réponse à PITG_16240	Accession criblée avec les effecteurs de <i>P. capsici</i>
PM0031	G3	S	1,09	70	X
PM0217	G1	R	5,28	17	
PM0608	G3	R	3,67	15	
PM0613	G1	R	5,12	10	
PM0659	G1	R	0,46	5	
PM0687	G1	R	0,15	NA	
PM0701	G1	R	0,14	NA	
PM0702	G1	R	0,96	0	
PM0801	G1	S	3,06	83	X
PM0807	G1	S	0,43	95	X
PM0829	G1	R	1,30	0	
PM0830	G1	R	5,08	0	
PM0831	G1	R	0,11	NA	
PM0837	G1	R	0,25	NA	
PM0846	NA	R	2,63	15	
PM0847	NA	R	0,86	10	
PM0856	G3	S	1,72	50	X
PM0867	G3	S	1,38	85	X
PM0857	NA	S	5,29	92	X
PM0875	G3	R	0,42	75	X
PM0891	NA	R	0,48	44	X
PM0892	G1	R	5,50	55	X
PM0913	G2	S	1,73	30	X
PM0934	G3	S	0,20	NA	
PM0939	G3	S	0,49	85	X
PM0945	G3	S	5,15	80	X
PM0968	G1	R	3,36	25	X
PM0972	G3	S	5,27	95	X
PM1006	NA	R	4,78	80	X
PM1066	G1	R	3,89	90	X
PM1071	G1	R	5,31	60	X
PM1398	G3	R	5,40	75	X
PM1407	NA	R	5,29	25	X
PM1408	G3	R	4,18	55	X
PM1409	G3	R	0,14	NA	
PM1441	G1	R	0,13	NA	
PM1481	NA	R	0,19	NA	
PM1484	G1	R	0,14	NA	

Suite tableau S2.1

Accession	Groupe Génétique	Résistance à <i>P. capsici</i>	Densité optique à 405nm	Pourcentage de réponse à PITG_16240	Accession criblée avec les effecteurs de <i>P. capsici</i>
PM1490	G1	R	0,68	25	X
PM1493	NA	R	0,14	NA	
PM1503	G1	R	0,62	25	X
PM1527	Admixture	R	0,97	30	X
PM1544	G1	R	4,83	45	X
PM1584	G1	R	0,15	NA	
PM1588	G1	R	0,20	NA	
PM1613	NA	R	2,36	56	X
PM1640	G1	R	0,22	NA	
PM1648	G1	R	0,16	NA	

Les profils de résistance avaient été déterminés par Cantet (2013) ; R, accession partiellement résistante ; S, accession sensible. Entre 15 et 20 sites ont été inoculés avec le témoin pGR106 :PITG\_16240.

Les accessions de piment pour lesquelles une accumulation virale a été confirmée par DAS-ELISA sont surlignées en jaune (Densité optique mesuré à 405 nm 14 jours après inoculation mécanique du clone viral pGR106:GFP 3 fois supérieure à celle du témoin négatif) ; NA (colonne 2) : Accessions non-classées dans l'étude génétique de Nicolăi et al. 2013 ; NA (Colonne 5): Accession non testée par agro-infection.

Tableau supplémentaire S2.2 : Tableau supplémentaire : Résumé des tests d'agro-infection.

Numéros d'accèsion	Clones	Nombre de point agro-infectés	Nombre de points développant une HR	Pourcentages de points développant une HR
PM0031	GFP	50	0	0
	PITG_16240	50	33	66
	CUST_17572	40	11	28
	CUST_1160	40	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	1	10
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	2	20
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	3	30
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM0801	GFP	48	0	0
	PITG_16240	48	31	65
	CUST_17572	20	0	0
	CUST_1160	20	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	2	20
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	2	20
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	1	10
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM0807	GFP	30	1	3
	PITG_16240	30	23	77
	CUST_17572	20	0	0
	CUST_1160	20	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	1	10
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	7	70
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	2	20
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM0856	GFP	30	0	0
	PITG_16240	30	11	37
	CUST_17572	20	0	0
	CUST_1160	20	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM0857	GFP	42	0	0
	PITG_16240	42	25	60
	CUST_17572	32	5	16
	CUST_1160	32	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	1	10
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	1	10
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	1	10
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	1	10	

Suite du tableau S2.2

Numéros d'accèsion	Clones	Nombre de point agro-infectés	Nombre de points développant une HR	Pourcentages de points développant une HR
PM0867	GFP	42	0	0
	PITG_16240	44	35	80
	CUST_17572	40	24	60
	CUST_1160	40	6	15
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	2	1	50
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	2	2	100
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	6	60
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	6	60
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	1	10
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	2	20	
PM0875	GFP	30	0	0
	PITG_16240	30	20	67
	CUST_17572	20	0	0
	CUST_1160	20	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	2	20
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM0891	GFP	26	0	0
	PITG_16240	26	9	35
	CUST_17572	18	0	0
	CUST_1160	18	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	8	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	8	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	9	0	0	
PM0892	GFP	50	0	0
	PITG_16240	50	23	46
	CUST_17572	40	5	13
	CUST_1160	40	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	8	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	8	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM0913	GFP	50	0	0
	PITG_16240	50	12	24
	CUST_17572	40	1	3
	CUST_1160	40	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	

Suite du tableau S2.2

Numéros d'accèsion	Clones	Nombre de point agro-infectés	Nombre de points développant une HR	Pourcentages de points développant une HR
PM0939	GFP	30	0	0
	PITG_16240	30	17	57
	CUST_17572	20	0	0
	CUST_1160	20	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM0945	GFP	50	0	0
	PITG_16240	50	38	76
	CUST_17572	40	8	20
	CUST_1160	40	2	5
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	1	10
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM0968	GFP	50	0	0
	PITG_16240	50	18	36
	CUST_17572	40	7	18
	CUST_1160	40	2	5
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM0972	GFP	30	0	0
	PITG_16240	30	21	70
	CUST_17572	20	0	0
	CUST_1160	20	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	1	10
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	2	20
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	2	20
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	2	20
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	1	10
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	1	10	
PM1006	GFP	30	0	0
	PITG_16240	30	17	57
	CUST_17572	20	0	0
	CUST_1160	20	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	4	40
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	1	10
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	

Suite du tableau S2.2

Numéros d'accession	Clones	Nombre de point agro-infectés	Nombre de points développant une HR	Pourcentages de points développant une HR
PM1066	GFP	20	0	0
	PITG_16240	20	18	90
	CUST_17572	20	0	0
	CUST_1160	20	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	NA	NA	NA
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	NA	NA	NA
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	NA	NA	NA
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	NA	NA	NA
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	NA	NA	NA
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	NA	NA	NA	
PM1071	GFP	30	0	0
	PITG_16240	30	13	43
	CUST_17572	20	0	0
	CUST_1160	20	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM1398	GFP	46	0	0
	PITG_16240	46	28	61
	CUST_17572	40	10	25
	CUST_1160	40	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	6	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	6	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	8	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	8	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	8	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	8	0	0	
PM1407	GFP	50	0	0
	PITG_16240	50	16	32
	CUST_17572	40	3	8
	CUST_1160	40	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	1	10
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM1408	GFP	50	0	0
	PITG_16240	50	23	46
	CUST_17572	40	5	13
	CUST_1160	40	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	1	10	

Suite du tableau S2.2

Numéros d'accession	Clones	Nombre de point agro-infectés	Nombre de points développant une HR	Pourcentages de points développant une HR
PM1490	GFP	30	1	3
	PITG_16240	30	8	27
	CUST_17572	20	0	0
	CUST_1160	20	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	1	10
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM1503	GFP	48	0	0
	PITG_16240	48	14	29
	CUST_17572	36	5	14
	CUST_1160	36	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM1527	GFP	30	0	0
	PITG_16240	30	7	23
	CUST_17572	20	0	0
	CUST_1160	20	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM1544	GFP	30	0	0
	PITG_16240	30	11	37
	CUST_17572	20	0	0
	CUST_1160	20	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	
PM1613	GFP	26	0	0
	PITG_16240	26	10	39
	CUST_17572	16	0	0
	CUST_1160	16	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	CUST_16519 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
	Phyca11 97196 <sup>Pc273</sup>	10	0	0
	CUST_5402 <sup>Pc107</sup>	10	0	0
CUST_5402 <sup>Pc273</sup>	10	0	0	

Les effecteurs candidats sont tous inclus dans le vecteur d'expression pGR106 compatible avec la technologie Gateway®. L'isolat d'origine des allèles est indiqué en exposant pour les effecteurs RxLR polymorphes entre les isolats Pc107 (agressif sur piment) et Pc 273 (peu agressif sur piment). NA (colonne 3 à 5) : Clones non testé en agro-infection



---

## Chapitre 3 : Caractérisation du répertoire d'effecteurs RxLR exprimés de *P. capsici*

---

### Contribution des auteurs

Gaëtan Maillot<sup>1</sup>, Emmanuel Szadkowski<sup>1</sup>, Dylan Storey<sup>2</sup>, Kurt Lamour<sup>2</sup>, Véronique Lefebvre<sup>1</sup>

Dylan Storey a produit les ARN et effectué des analyses préliminaires sous la supervision de Kurt Lamour. Emmanuel Szadkowski a effectué les mappings et la détection des polymorphismes. J'ai analysé les données bio-informatiques et rédigé le manuscrit avec l'aide d'Emmanuel Szadkowski et Véronique Lefebvre.

## 3.1. Introduction

*Phytophthora capsici* est un pathogène tellurique destructeur avec un spectre d'hôte large. Des infections par *P. capsici* ont été reportées sur 72 espèces appartenant à plus de 25 familles de plantes comprenant les Solanacées, les Cucurbitacées et les Fabacées (Granke et al. 2012). Des infections causées par *P. capsici* ont été observées sur tous les continents (Barchenger et al. 2018). Des études de génétique des populations ont révélé un niveau d'hétérozygotie élevé et une diversité génétique qui varie grandement en fonction de la localisation géographique. Ces différences sont attribuées au mode de reproduction sexuée, qui favorise l'émergence de nouveaux variants dans les régions géographiques où il est prédominant. Ainsi, des niveaux élevés de diversité sont observés aux USA, en Afrique du Sud et du Nord, au Sud de la Chine, au Mexique et dans la forêt amazonienne du Pérou, où la reproduction sexuée est dominante (Castro-Rocha et al. 2016; Dunn et al. 2010; Gobena et al. 2012; Hu et al. 2013; Hurvey et al., 2011; Meitz et al. 2010). A l'inverse, les populations se composent principalement de lignées clonales dans les régions où la reproduction asexuée est majoritaire. C'est le cas de la côte du Pérou, de l'Argentine, de l'Europe et des régions Est, Ouest et centrale de la Chine (Gobena et al. 2012; Hu et al. 2013; Hurtado-González et al. 2008; Silvar et al. 2006).

La plupart des variétés commerciales étant sensibles ou partiellement résistantes à *P. capsici*, la gestion des épidémies de cet agent pathogène est majoritairement médiée par l'emploi de fongicides (Barchenger et al. 2018; Hausbeck and Lamour 2004; Lamour et al. 2012b). L'utilisation de ces fongicides a rapidement provoqué l'émergence et la propagation d'isolats résistants dans les populations de *P. capsici* (Barchenger et al. 2018; Lamour et al. 2012b). L'identification de nouveaux géniteurs porteurs de résistances efficaces dans le temps et contre des populations diverses de *P. capsici* est donc un enjeu crucial pour réduire les dégâts causés par cet agent pathogène.

L'effectoromique, étude génomique ciblant les effecteurs, pourrait représenter une solution prometteuse (Vleeshouwers et al. 2008). L'expression transitoire d'effecteur de *P. infestans* chez la pomme de terre a conduit à l'identification de gènes de résistance (Lokossou et al. 2009;

Vleeshouwers et al. 2008). L'approche effectoromique peut permettre la prédiction de l'efficacité des gènes de résistance identifiés et la mise en place de schémas efficaces de gestion des résistances déployées en champ (Vleeshouwers and Oliver 2014a). Cela nécessite d'approfondir notre connaissance des répertoires d'effecteurs déployés par *P. capsici* pendant l'interaction afin d'identifier les « core-effecteurs ». Dangl et al. (2013) ont défini les « core-effecteurs » comme étant largement distribués au sein des populations d'un agent pathogène donné et contribuant substantiellement à la virulence de celui-ci. Ils ont émis l'hypothèse que l'effet d'un gène de résistance serait vraisemblablement durable si l'effecteur qu'il reconnaît est déployé pendant l'interaction, conservé au sein des populations de l'agent pathogène et important pour la virulence de celui-ci.

Chez *Phytophthora infestans*, Yin et al. (2017) sont parvenus à identifier des core-effecteurs potentiels et ont montré leur importance pour la virulence de celui-ci grâce à des tests d'expression transitoire *in planta* chez *Nicotiana benthamiana* et la pomme de terre. L'analyse des polymorphismes existant entre 5 isolats génétiquement diverses et de l'expression des effecteurs RxLR leur a permis d'identifier 18 core-effecteurs RxLR candidats. Au total, 9 de ces core-effecteurs contribuaient positivement à la virulence de *P. infestans* sur *N. benthamiana* et 4 d'entre-eux supprimaient les symptômes de mort cellulaire causées par l'expression transitoire de PAMP et d'effecteurs RxLR connus pour induire des réponses hyper-sensibles (HR) (Wang et al. 2011).

## 3.2. Objectifs du chapitre

Nous avons pour objectif de caractériser le répertoire d'effecteurs déployés par *P. capsici* durant l'interaction avec la tomate pour identifier les « core-effecteurs » potentiels. Pour ce faire, nous avons étudié 33 isolats de *P. capsici* collectés sur des Cucurbitacées, des Solanacées et une Fabacées qui provenaient de 5 origines géographiques différentes.

Dans un premier temps, nous avons étudié la diversité génétique des 33 isolats afin d'analyser leur structure génétique. Dans un second temps, nous avons analysé l'expression des gènes codant les effecteurs RxLR chez 33 isolats de *P. capsici* afin de sélectionner ceux qui sont exprimés par tous, supposément importants pour promouvoir le développement du pathogène. Enfin, nous avons étudié les polymorphismes des effecteurs RxLR pour identifier ceux qui sont conservés chez les 33 isolats.

### 3.3. Matériels et Méthodes

#### 3.3.1 Isolats de *P. capsici* et test d'infection

Dans cette étude, j'ai réutilisé un jeu de données RNAseq produit par Storey (2014). Pour produire ce jeu de données RNAseq, 33 isolats de *P. capsici* collectés sur différents hôtes et provenant de différentes régions géographiques ont été utilisés. Des 33 isolats, 14 ont été collectés sur des Cucurbitacées, 18 sur des Solanacées et un isolat a été collecté sur une Fabacée. Au total, 5 pays ont été échantillonnés : les États-Unis, l'Argentine, le Mexique, la France et la Chine (Tableau S3.1).

Le géotype de *Solanum lycopersicum* sensible à *P. capsici*, MoneyMaker, a été utilisé. Du mycélium de chaque isolat a été mis dans du milieu V8-PARP agar liquide (V8 liquide, 160 mL ; 3g de CaCO<sub>3</sub>, 3 g ; ddH<sub>2</sub>O, 960 mL ; pimarin, 0,025 mg/mL ; rifampicin, 0,025 mg/mL ; PCNB, 0,025 mg/mL ; ampicillin, 0,100 mg/mL) puis incubé à température ambiante sous lumière fluorescente. Après 3 jours d'incubation, des plugs mycélium ont été récoltés avec un emporte-pièce de 6 mm de diamètre et placés (mycélium vers le bas) sur la face inférieure de folioles de tomate provenant de plantes âgées de 6 semaines (Géotype MoneyMaker). Au total, 4 plugs de mycélium ont été utilisés pour infecter chaque foliole. Les tissus foliaires directement en contact avec les plugs ont été prélevés à 24 et 72 heures après inoculation et conservés dans de l'azote liquide. Les extractions d'ARN ont été réalisées avec un kit RNA-easy en suivant les recommandations du fabricant (Quiagen) puis traités avec de la DNase (Ambion). La qualité des ARN a été évaluée avec un NanoDrop ND-100 et une migration sur gel d'agarose (1.5 %). Les ARN ont été séquencés avec la technologie Illumina HiSeq2000 par l'entreprise GENEWIZ (South Plainfield, NJ, USA ; Voir Storey (2014)).

#### 3.3.2 Mapping

Pour l'alignement, une base de données contenant les 12 chromosomes de la version SL3.0 du génome de *Solanum lycopersicum* ([https://solgenomics.net/organism/Solanum\\_lycopersicum/genome](https://solgenomics.net/organism/Solanum_lycopersicum/genome)) et les 917 scaffolds de la version Phyca11 du génome de *Phytophthora capsici* (<http://genome.jgi.doe.gov/Phyca11/Phyca11.home.html> (Lamour et al. 2012a)) ont été utilisés. Les reads ont été mappés avec le paramètre "end to end" du logiciel hisat2, un pourcentage de mismatch de 4 (--score-min L,0,-0.24) et une taille d'intron maximale de 10 000 paires de base (--max-intronlen 10 000) (Kim et al. 2015). Nous avons éliminé les « PCR duplicates » avec la fonction

« MarkDuplicates » de la suite d'outils « Picard Tools » (version 2.5.0, <http://broadinstitute.github.io/picard/>).

### **3.3.3 Détection des polymorphismes et analyse de la structure génétique**

Les positions polymorphes (SNP pour 'Single Nucleotide Polymorphism) ont été identifiées en suivant le guide des 'Best Practices' du logiciel GATK (Van der Auwera et al. 2013). Nous avons appliqué plusieurs filtres afin de sélectionner les SNP bi-alléliques. Pour chaque position de nucléotide, seules ont été sélectionnées les positions supportées par au moins 20 reads (lectures) et présentant au moins un variant ont été sélectionnées. Les SNP montrant une fréquence allélique comprise entre 20 % et 80 % étaient considérés comme hétérozygotes et les SNP avec une fréquence allélique supérieure à 80 % étaient considérés comme étant homozygotes. Enfin, les allèles rares ont été filtrés (fréquence allélique inférieure à 20 %).

La structure génétique au sein des 33 isolats a été inférée en utilisant la méthode bayésienne du logiciel STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). Un sous-set de SNP a été sélectionné en échantillonnant 100 SNP au hasard sur les 917 scaffolds du génome Phyca11. La totalité des SNP identifiés ont été utilisés pour les scaffolds présentant moins de 100 SNP. Le modèle d'admixture a été utilisé avec 50 000 réplicats pour burn-in suivi de 50 000 réplications. Au total, 5 valeurs de groupes (K : 1 à 5) ont été testées avec 5 simulations chacune. La valeur de K optimal a été estimée avec la méthode Evanno de Structure Harvester (Earl and vonHoldt 2012; Evanno et al. 2005). Une analyse de positionnement multidimensionnelle ou MDS a été réalisée sur la base d'une matrice de distance produite avec le logiciel TASSEL 5.2.45 et la totalité des SNP sélectionnés après le 'SNP calling' (Bradbury et al. 2007). La projection a été réalisée avec le package 'ggplot2' du logiciel R (R Core Team 2016; Wickham 2016).

### **3.3.4 Génération d'un fichier d'annotations customisé**

Postérieurement à la publication du génome Phyca11 de *P. capsici*, les familles d'effecteurs cytoplasmiques ont été ré-annotées (Jupe et al. 2013). La fonction « intersect » de la suite d'outil BEDTools (Quinlan and Hall 2010) a été employée afin d'éliminer les redondances entre les annotations du génome Phyca11 et celles issues de ré-annotation. Plusieurs redondances ont été observées entre les annotations du génome Phyca11 et les celles publiées par Jupe et al. (2013). Les annotations de Jupe et al. (2013) ont été conservées lorsque des redondances ont été observées. Au

total, 19968 annotations non-redondantes ont été retenues. Parmi celles-ci, 498 correspondent à des gènes RxLR (111 annotations provenant de Phyc11 et 387 provenant de Jupe et al. (2013)).

### **3.3.5 Analyse de l'expression et des polymorphismes chez *P. capsici***

Les paires de reads mappés ont été comptées à l'aide du package « Feature Counts » (Liao et al. 2014) du logiciel R (R Core Team 2016) en utilisant le mode « Intersection\_nonempty ». Les reads des échantillons à 24 et 72 hpi ont été comptés séparément afin de pouvoir analyser l'expression aux deux temps. Les gènes présentant au moins 20 reads (nombre minimal de read pour détecter les SNP) ont été considérés comme exprimés. Les SNP ont été annotés afin d'identifier leur effet sur les séquences codantes de *P. capsici* avec le logiciel SnpEff 4.3 (Cingolani et al. 2012).

## 3.4. Résultats

### 3.4.1. Statistiques de mapping

Entre 18,9 et 51,9 millions de reads ont été mappés sur les scaffolds de la tomate et de *Phytophthora capsici* pour les 66 échantillons (33 isolats x 1 génotype de tomate x 2 temps ; Tableau S3.1). Les pourcentages de reads comptés sur les 19 998 annotations de *P. capsici* variaient entre 5,5 % et 53,5 % pour les échantillons de 24 heures post inoculation (hpi) et entre 48,9 % et 56,5 % pour les échantillons de 72 hpi (Figure 3.1, Panel A). Les pourcentages de reads plus élevés reflètent les différences de développement de *P. capsici* aux deux temps. Il ne semble pas y avoir de lien entre la famille des plantes sur laquelle les isolats ont été collectés et le pourcentage de reads à 24 hpi (Figure 3.1, Panel B ; T-test, p-valeur > 0.05). Les pourcentages variaient entre 13,2 % et 50,0 % pour les 14 isolats collectés sur des Cucurbitacées et entre 5,5 % et 53,5 % pour les 18 isolats collectés sur des Solanacées. De plus, les isolats collectés sur tomate ne sont pas ceux qui présentent les pourcentages les plus élevés. LT3 et LT6755 présentaient 18,6 % et 27,3 % de reads respectivement à 24 hpi (Figure 3.1)).

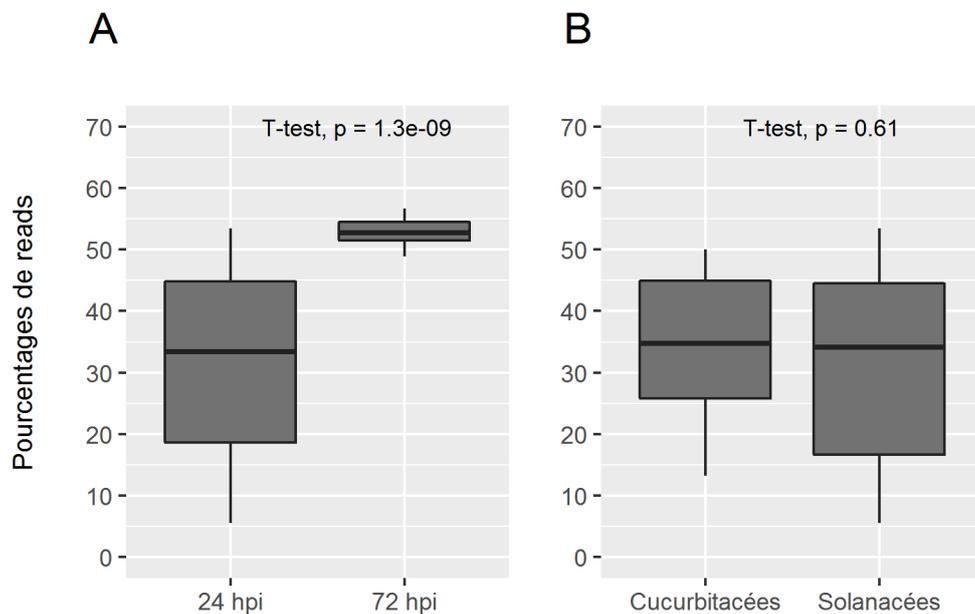


Figure 3.1 : Distribution des pourcentages de reads comptés sur les annotations de *Phytophthora capsici* pour les 33 isolats. Panel A : Pourcentages des reads en fonction des heures après inoculation (hpi). Panel B : Pourcentages des reads à 24 hpi en fonction de la famille de plantes sur lesquelles les isolats ont été collectés. Les moyennes des différents groupes représentés dans les panels A à B ont été comparées avec un t-test et les p-valeurs associées sont indiquées.

### 3.4.2. Description de la diversité des 33 isolats.

Au total, 202 117 SNP bi-alléliques ont été détectés sur les scaffolds de *P. capsici* parmi les 33 isolats. Le nombre de SNP par isolat varie entre 60 794 et 156 431 (Tableau 3.1). Des niveaux élevés d'hétérozygotie ont été observés chez les isolats. Les pourcentages d'hétérozygotie (Nombre de SNP hétérozygote / Nombre total de SNP chez un isolat donné) variaient entre 47 % et 96 %. Pour l'isolat LT1534 qui a été séquencé et son parent récurrent LT263, des nombres de SNP relativement faibles ont été observés.

Tableau 3.1 : Statistiques de SNP calling et métadonnées des 33 isolats.

Isolats	Hôte	Pays d'origine	Nombre total de SNP	Nombre de SNP homozygotes	Nombre de SNP hétérozygotes	Pourcentage d'hétérozygotie
LT6745	Piment	Argentine	144 535	33 372	111 163	77
LT9118	Piment	Chine	131 457	52 707	78 750	60
LT9123	Piment	Chine	146 764	42 628	104 136	71
LT9236	Piment	Chine	155 385	36 856	118 529	76
LT9245	Piment	Chine	136 021	47 407	88 614	65
LT9275	Piment	Chine	156 431	35 406	121 025	77
LT9397	Piment	Chine	129 142	56 529	72 613	56
LT9807	Piment	Chine	154 391	32 693	121 698	79
LT253	Citrouille	États-Unis	115 655	29 736	85 919	74
LT263	Citrouille	États-Unis	88 662	5 038	83 624	94
LT10204	Concombre	États-Unis	115 682	49 952	65 730	57
LT10296	Concombre	États-Unis	126 449	44 136	82 313	65
LT10297	Concombre	États-Unis	128 264	42 524	85 740	67
LT123	Concombre	États-Unis	117 488	40 012	77 476	66
LT51	Concombre	États-Unis	108 570	47 354	61 216	56
LT9381	Concombre	États-Unis	118 672	42 832	75 840	64
LT10203	Courge	États-Unis	126 349	38 764	87 585	69
LT10214	Courge	États-Unis	111 465	47 496	63 969	57
LT6503	Courge	États-Unis	106 249	56 348	49 901	47
LT6535	Haricot	États-Unis	128 102	48 001	80 101	63
LT7395	Pastèque	États-Unis	126 530	43 135	83 395	66
LT5473	Piment	États-Unis	129 552	50 158	79 394	61
LT5474	Piment	États-Unis	126 131	55 217	70 914	56
LT5475	Piment	États-Unis	127 859	48 532	79 327	62
LT62	Piment	États-Unis	114 262	57 762	56 500	49
LT3	Tomate	États-Unis	128 532	43 942	84 590	66
LT7	Piment	France	128 123	37 623	90 500	71
LT1534	LS	LS	60 794	2 578	58 216	96
LT6755	Concombre	Mexique	124 332	39 980	84 352	68
LT6751	Piment	Mexique	121 002	53 431	67 571	56
LT6795	Piment	Mexique	128 903	45 543	83 360	65
LT6	Piment	Mexique	131 523	43 363	88 160	67
LT6756	Tomate	Mexique	121 895	47 684	74 211	61

Le pourcentage d'hétérozygotie a été calculé sur le nombre de SNP bi-alléliques par isolat (Colonne 6 / Colonne 4). LS : Correspond à l'isolat séquencé par Lamour et al. (2012a) (Lignée issue de backcross entre deux isolats collectés sur cucurbitacées, LT263 et OP97)

L'isolat impliqué dans le séquençage (LT1534) et son parent de rétrocroisement (LT263) ont montré un nombre de SNP faible mais un pourcentage d'hétérozygotie élevé comparativement au reste des isolats avec 60 794 et 88 662 SNP identifiés et des pourcentages d'hétérozygotie supérieurs à 90 % (Lamour et al. 2012a).

La structure génétique des 33 isolats a été inférée avec le logiciel STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) sur la base de 11 910 SNP répartis sur les 917 scaffolds du génome Phyca11 (Voir M&M pour les modalités de sélection). Le nombre de clusters optimal d'après la correction d'Evanno et al. (2005) était égal à 2 (Figure 3.2, Panel A).

Les analyses de positionnement multidimensionnelle (MDS), réalisées avec une matrice de distance calculée par le logiciel TASSEL 5.2.45 (Bradbury et al. 2007) sur la base des 202 117 SNP bi-alléliques, ont confirmé l'existence des deux groupes (Figure 3.2, Panel B et C). Le premier se composait des isolats collectés sur des Cucurbitacées, des Solanacées et une Fabacées dans différentes régions géographiques excluant la Chine. Le deuxième groupe comprenait uniquement les 7 isolats chinois collectés sur le piment. Ces résultats indiquent que les groupes génétiques s'expliquent principalement par l'origine géographique.

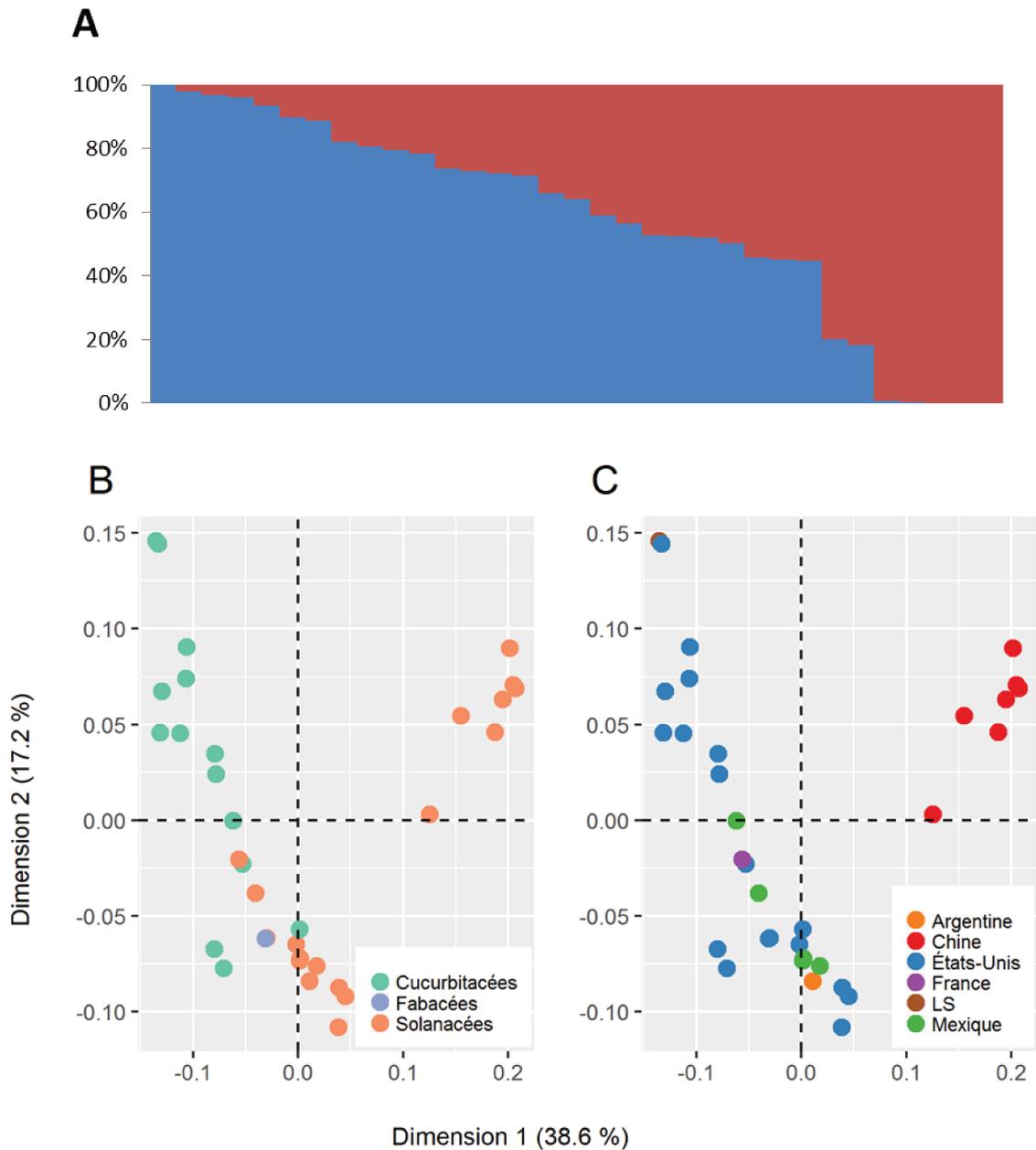


Figure 3.2 : Structure génétique des 33 isolats. Panel A : Classification des isolats selon le logiciel STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard et al. 2000) sur la base de 11 910 SNP répartis sur les 917 scaffolds du génome Phyca11. Chaque barre verticale représente un isolat, leurs coordonnées sont indiquées dans le tableau supplémentaire S3.2. Panel B et C : Analyses de positionnement multidimensionnelle réalisées sur la base d'une matrice de distance calculée par le logiciel TASSEL 5.2.45 (Bradbury et al. 2007) avec les 202 117 SNP bi-alléliques. Les isolats sont colorés en fonction de la famille de plantes sur laquelle ils ont été collectés (Panel B) ou le pays de collecte (Panel C). LS : Lignée séquencée (Lamour et al. 2012a).

### 3.4.3. Description du répertoire des effecteurs RxLR déployé par *P. capsici* pendant l'interaction avec la tomate

Deux aspects ont été analysés afin d'identifier les potentiels core-effecteurs de *P. capsici* : leur expression durant l'interaction avec la tomate et leur niveau de diversité entre les isolats.

Nous avons tout d'abord analysé l'expression des 498 gènes codant des RxLR à 24 et 72 heures après inoculation (hpi). Parmi ceux-ci, 428 effecteurs RxLR ont montré au moins 20 read mappés pour au moins un isolat à 24 hpi ou à 72 hpi. Pour chaque isolat, entre 143 et 242 étaient exprimés à 24 hpi et entre 200 et 268 RxLR étaient exprimés à 72 hpi (Tableau supplémentaire S3.3). Au total, 141 effecteurs RxLR ont été détectés comme étant exprimés par tous les isolats à 24 ou à 72 hpi suggérant qu'ils jouent un rôle important pour la virulence de *P. capsici* pendant l'infection (Figure 3.3).

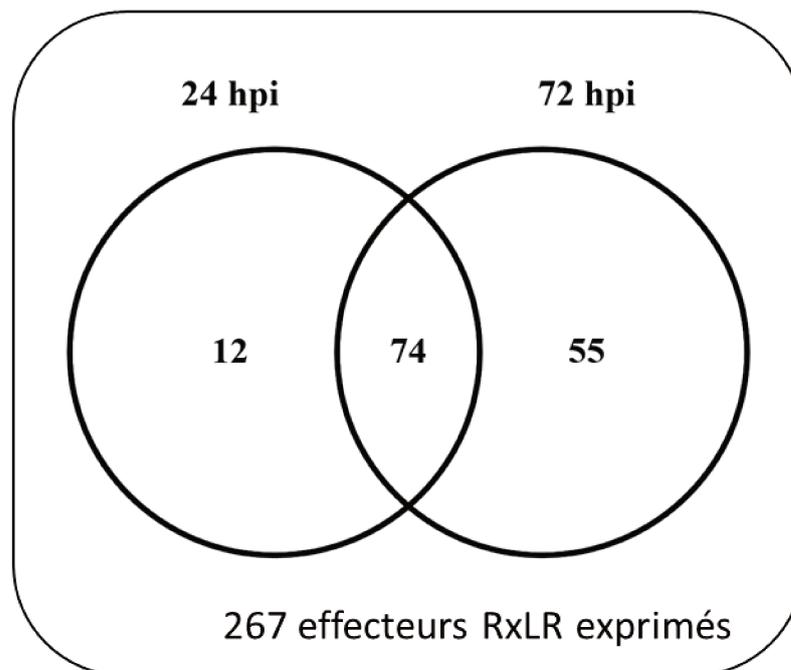


Figure 3.3 : Diagramme de Venn montrant les recouvrements entre les effecteurs exprimés par tous les isolats à 24 et à 72 heures post inoculation (hpi). Les 267 effecteurs en dehors des cercles correspondent aux effecteurs qui montrent de l'expression chez au moins un isolat sur les 33 analysés mais n'étant pas exprimés chez tous.

Nous avons ensuite analysé les polymorphismes des effecteurs RxLR exprimés afin d'identifier ceux qui étaient potentiellement conservés. Au total, 1 010 SNP ont été identifiés sur 113 effecteurs RxLR dont 396 SNP non-synonymes ont été révélés (39.2 %). Des 141 effecteurs RxLR exprimés par tous les isolats à 24 et/ou à 72 hpi, 32 ne montraient aucun SNP et 21 ne présentaient que des SNP synonymes.

En conclusion, nous avons identifié 53 effecteurs RxLR exprimés par tous les isolats aux deux temps qui sont potentiellement conservés. Ces effecteurs pourraient être utilisés dans des criblages d'expression transitoire *in planta* afin de rechercher de nouveaux géniteurs résistants à *P. capsici* (Tableau 3.2).

Tableau 3.2 : Profil d'expression des 53 effecteurs conservés chez les 33 isolats

Gène	Longueur du gène (nucléotides)	Nombre de SNP synonymes	Nombre de SNP non-synonymes	Profil d'expression
Phyca11 12887	867	0	0	72 hpi
Phyca11 14359	1353	0	0	72 hpi
Phyca11 15179	1111	5	0	24 & 72 hpi
Phyca11 16635	1639	15	0	24 & 72 hpi
Phyca11 18443	894	0	0	24 hpi
Phyca11 19194	754	0	0	24 hpi
Phyca11 53838	4156	0	0	72 hpi
Phyca11 57917	1385	0	0	72 hpi
Phyca11 107349	483	1	0	24 hpi
Phyca11 121073	1899	0	0	72 hpi
Phyca11 126301	351	1	0	24 hpi
Phyca11 502546	502	0	0	72 hpi
Phyca11 502865	1558	2	0	24 & 72 hpi
Phyca11 505125	389	1	0	24 & 72 hpi
Phyca11 509974	420	0	0	72 hpi
Phyca11 534866	2657	15	0	24 & 72 hpi
Phyca11 537080	1136	0	0	72 hpi
Phyca11 542968	1564	13	0	24 & 72 hpi
f_1_CUST_10316_PI426518982	225	0	0	24 & 72 hpi
f_1_CUST_4680_PI426518982	2445	2	0	24 & 72 hpi
f_2_CUST_7675_PI426518982	291	5	0	24 & 72 hpi
f_2_CUST_936_PI426518982	309	0	0	24 & 72 hpi
f_2_CUST_9573_PI426518982	231	0	0	72 hpi
f_3_CUST_12028_PI426518982	228	1	0	72 hpi
f_3_CUST_16823_PI426518982	1230	0	0	72 hpi
f_3_CUST_18366_PI426518982	330	2	0	24 & 72 hpi
f_3_CUST_2969_PI426518982	282	0	0	24 & 72 hpi
f_3_CUST_6946_PI426518982	276	1	0	72 hpi
f_3_CUST_8923_PI426518982	216	0	0	72 hpi
r_4_CUST_19861_PI426518982	315	0	0	24 & 72 hpi
r_4_CUST_2078_PI426518982	897	1	0	72 hpi
r_4_CUST_2407_PI426518982	366	0	0	72 hpi
r_4_CUST_3104_PI426518982	264	0	0	72 hpi
r_4_CUST_4112_PI426518982	294	1	0	72 hpi
r_5_CUST_11790_PI426518982	699	0	0	72 hpi
r_5_CUST_15387_PI426518982	270	0	0	72 hpi
r_5_CUST_19152_PI426518982	405	0	0	72 hpi
r_5_CUST_20527_PI426518982	468	0	0	72 hpi
r_5_CUST_8345_PI426518982	567	0	0	24 & 72 hpi

Suite du tableau 3.2

Gène	Longueur du gène (nucléotides)	Nombre de SNP synonymes	Nombre de SNP non-synonymes	Profil d'expression
r_6_CUST_10831_PI426518982	228	2	0	24 & 72 hpi
r_6_CUST_11074_PI426518982	270	0	0	72 hpi
r_6_CUST_11458_PI426518982	1494	1	0	72 hpi
r_6_CUST_11854_PI426518982	1194	0	0	24 hpi
r_6_CUST_1519_PI426518982	213	0	0	72 hpi
r_6_CUST_18708_PI426518982	1572	1	0	72 hpi
r_6_CUST_19650_PI426518982	459	0	0	24 hpi
r_6_CUST_19933_PI426518982	402	0	0	24 hpi
r_6_CUST_2751_PI426518982	525	1	0	24 hpi
r_6_CUST_3236_PI426518982	618	4	0	24 & 72 hpi
r_6_CUST_3509_PI426518982	2358	0	0	24 & 72 hpi
r_6_CUST_4014_PI426518982	864	0	0	72 hpi
r_6_CUST_5444_PI426518982	618	0	0	72 hpi
r_6_CUST_9530_PI426518982	600	7	0	72 hpi

Les SNP ont été annotés avec le logiciel SnpEff 4.3 (Cingolani et al. 2012). Les profils d'expression indiquent les effecteurs exprimés par tous les isolats à 24 heures post inoculation (24 hpi), à 72 heures post inoculation (72 hpi) et aux deux temps (24 & 72 hpi).

### 3.5. DISCUSSION

Avec cette étude, nous avons pour objectif de caractériser le répertoire d'effecteurs RxLR déployé par *Phytophthora capsici* pendant l'interaction avec la plante hôte. Une approche RNAseq a été employée pour étudier l'expression et les polymorphismes de séquence des effecteurs RxLR chez 33 isolats de *P. capsici* provenant de différentes régions géographiques et collectés sur des hôtes appartenant à différentes familles de plantes.

Au total, les ARN des 33 isolats ont été séquencés 24 et 72 heures après inoculation d'un génotype tomate sensible à *P. capsici* (Storey 2014). Le mapping que nous avons refait sur les scaffolds de *P. capsici* et de la tomate a révélé en moyenne 15 millions de reads mappés (entre 2,8 et 23,3 millions de reads par échantillon, Tableau S3.1). Une proportion conséquente de ces reads a été mappée sur les annotations de *P. capsici* résultant en des pourcentages variant entre 5,5 % et 56,5 % dans les échantillons. En comparaison, les pourcentages observés dans les études RNAseq de l'interaction d'autres Oomycètes avec leur hôte sont généralement inférieurs à 10 % (Meyer et al. 2016; Zuluaga et al. 2015). Cette différence est vraisemblablement due au dispositif expérimental employé pour produire les échantillons. Les plugs mycéliens utilisés comme inoculum ont été placés sur la face inférieure de feuilles d'un génotype sensible de tomate, favorisant ainsi la colonisation des tissus de l'hôte. De plus, Storey (2014) a réduit l'effet de dilution des ARN de *P. capsici* dans ceux de la plante hôte en prélevant uniquement les tissus végétaux en contact direct avec le plug mycélien. Comme montré par Zuluaga et al. (2015) avec l'analyse RNAseq de l'interaction de *P. infestans* avec

la tomate, nous avons observé des pourcentages de reads plus élevés à 72 hpi qu'à 24 hpi montrant que la quantité de tissus du pathogène était plus importante à ce temps (Figure 3.1, Panel A).

### **3.5.1 La structure génétique des 33 isolats s'explique partiellement par l'origine géographique**

*P. capsici* est connu pour présenter des populations très diverses et des niveaux d'hétérozygotie élevés (Barchenger et al. 2018). De façon non surprenante, nous avons observé des nombres élevés de SNP lorsque les 33 isolats ont été comparés au génome de référence avec 202 117 positions polymorphes identifiées sur les séquences codantes. Une proportion importante de ces SNP était hétérozygote. En effet, des pourcentages de SNP hétérozygotes variant entre 47 % et 96 % par isolat ont été observés. Conformément à ce qu'on pouvait attendre, LT1534 (isolat séquencé par (Lamour et al. 2012a)) et son parent LT263, sont ceux qui ont montré le moins de SNP avec le génome Phyca11 et plus de 90 % de ceux-ci étaient hétérozygotes.

Les 33 isolats ont été collectés sur des hôtes appartenant aux Cucurbitacées, aux Solanacées et aux Fabacées dans 5 pays différents incluant les États-Unis, le Mexique et la Chine. L'analyse Bayésienne que nous avons réalisée sur la base de 11 910 SNP répartis sur l'ensemble du génome de *P. capsici* a révélé deux groupes génétiques (Figure 3.2, panel A). Ces groupes ont été confirmés avec l'analyse de positionnement multidimensionnelle (Figure 3.2, panel C) qui a montré que les clusters sont expliqués par l'origine géographique des isolats avec d'une part les 7 isolats chinois et d'autre part les isolats provenant des 4 autres pays.

### **3.5.2. Les isolats de *P. capsici* possèdent des effecteurs conservés parmi ceux qui sont exprimés.**

Utilisant les reads mappés sur les annotations de *P. capsici* et les SNP détectés sur les effecteurs RxLR, nous avons analysé le répertoire d'effecteurs déployés par *P. capsici* pendant l'interaction avec un génotype sensible dans le but d'identifier les core-effecteurs potentiels.

L'analyse d'expression a identifié 428 effecteurs RxLR exprimés par au moins un isolat à 24 ou à 72 heures post inoculation (hpi). Au total, 32,9 % d'entre eux étaient exprimés chez tous les 33 isolats de *P. capsici*. Cette proportion importante est surprenante étant donné le nombre élevé d'isolats que nous avons étudié avec notre analyse.

Avec l'analyse de la diversité des isolats, 1010 SNP ont été détectés sur 113 effecteurs RxLR parmi les 141 exprimés par tous les isolats. Au total, nous avons identifié 53 effecteurs potentiellement

conservés dont 32 ne montraient pas de polymorphismes et 21 ne présentaient que des polymorphismes synonymes

Nous sommes parvenus, à l'aide d'une analyse d'expression des gènes RxLR et des polymorphismes que montrent 33 isolats provenant de 6 pays et collectés sur des Cucurbitacées, des Solanacées et une Fabacée, à identifier des core-effecteurs potentiels. Nous avons identifié 53 core-effecteurs potentiels qui étaient exprimés et conservés chez tous les isolats de *P. capsici*. Cependant, ces résultats sont préliminaires et nécessitent des analyses complémentaires. Pour être définis comme core-effecteurs, les RxLR doivent contribuer à la virulence de *P. capsici* (Dangl et al. 2013). Des analyses d'expression transitoire *in planta* seront nécessaires pour identifier ceux qui, parmi les 53, promeuvent le développement de *P. capsici* et/ou suppriment les réactions de défense chez les plantes hôtes.

### 3.6. Suppléments

Tableau supplémentaire S3.1 : Statistiques de mapping et de comptage.

Isolats	Hôte	Pays d'origine	Nombre total de reads mappés à 24 hpi	Nombre de reads de <i>P. capsici</i> à 24 hpi (%)	Nombre total de reads mappés à 72 hpi	Nombre des reads de <i>P. capsici</i> à 72 hpi (%)
LT10203	Courge	États-Unis	38 921 621	9 757 845 (25,1)	31 429 020	16 485 824 (52,5)
LT10204	Concombre	États-Unis	41 782 199	13 957 756 (33,4)	28 903 835	15 734 959 (54,4)
LT10214	Courge	États-Unis	41 353 351	5 439 016 (13,2)	43 055 498	23 226 221 (53,9)
LT10296	Concombre	États-Unis	35 331 988	16 209 917 (45,9)	27 568 281	15 341 699 (55,6)
LT10297	Concombre	États-Unis	33 082 068	14 926 605 (45,1)	31 340 816	16 343 473 (52,1)
LT123	Concombre	États-Unis	36 855 173	14 230 131 (38,6)	18 786 453	10 382 494 (55,3)
LT1534	LS	LS	41 017 040	6 208 411 (15,1)	40 137 237	19 623 099 (48,9)
LT253	Citrouille	États-Unis	42 294 745	21 155 650 (50,0)	26 389 804	14 914 444 (56,5)
LT263	Citrouille	États-Unis	47 062 291	21 071 317 (44,8)	38 707 400	19 271 747 (49,8)
LT3	Tomate	États-Unis	36 476 207	9 956 660 (27,3)	38 398 965	19 768 525 (51,5)
LT51	Concombre	États-Unis	35 800 489	7 299 237 (20,4)	36 505 705	19 326 112 (52,9)
LT5473	Piment	États-Unis	43 384 938	4 721 709 (10,9)	28 639 416	16 070 437 (56,1)
LT5474	Piment	États-Unis	38 610 143	17 177 103 (44,5)	30 208 375	15 029 088 (49,8)
LT5475	Piment	États-Unis	36 389 246	6 784 843 (18,6)	33 445 608	17 842 679 (53,3)
LT62	Piment	États-Unis	50 457 809	4 603 321 (9,1)	45 531 282	23 315 075 (51,2)
LT6503	Courge	États-Unis	38 008 960	10 528 910 (27,7)	31 930 564	17 409 139 (54,5)
LT6535	Haricot	États-Unis	43 949 321	3 433 960 (7,8)	41 487 479	22 607 681 (54,5)
LT6745	Piment	Argentine	28 428 352	14 165 069 (49,8)	32 103 270	17 574 471 (54,7)
LT6751	Piment	Mexique	24 151 373	9 465 566 (39,2)	33 377 456	17 953 579 (53,8)
LT6755	Concombre	Mexique	36 613 687	13 232 761 (36,1)	35 408 554	18 662 042 (52,7)
LT6756	Tomate	Mexique	44 851 868	7 133 530 (15,9)	28 748 203	14 449 278 (50,3)
LT6795	Piment	Mexique	34 721 500	18 559 409 (53,5)	37 439 546	19 209 830 (51,3)
LT6	Piment	Mexique	33 991 825	13 116 660 (38,6)	38 499 951	20 104 364 (52,2)
LT7395	Pastèque	États-Unis	39 678 651	17 841 129 (45,0)	33 308 862	17 046 673 (51,2)
LT7	Piment	France	37 931 824	7 470 170 (19,7)	35 341 173	18 492 025 (52,3)
LT9118	Piment	Chine	40 631 385	18 112 021 (44,6)	40 447 028	20 820 885 (51,5)
LT9123	Piment	Chine	24 744 322	12 294 730 (49,7)	43 306 249	22 341 907 (51,6)
LT9236	Piment	Chine	49 312 300	7 754 081 (15,7)	38 053 485	20 338 823 (53,4)
LT9245	Piment	Chine	34 969 959	14 551 243 (41,6)	34 231 901	19 415 500 (56,7)
LT9275	Piment	Chine	51 907 276	2 871 406 (5,5)	36 875 481	20 249 599 (54,9)
LT9381	Concombre	États-Unis	36 111 448	11 397 089 (31,6)	34 889 537	17 372 924 (49,8)
LT9397	Piment	Chine	42 564 365	12 625 158 (29,7)	35 758 185	18 707 046 (52,3)
LT9807	Piment	Chine	42 694 260	20 014 347 (46,9)	33 166 778	18 377 081 (55,4)

Les reads correspondent aux paires de reads mappés sur les scaffolds du génome de *Phytophthora capsici* et de la tomate avec le software hisat2 (Kim et al. 2015) après filtre des 'PCR Duplicate' (voir M&M). Le nombre de reads de *P. capsici* a été compté avec l'option « Intersection\_nonempty » du package feature counts (Liao et al. 2014). LS : Correspond à l'isolat séquencé par Lamour et al. (2012a) (Lignée issue de backcross entre deux isolats collectés sur cucurbitacées, LT263 et OP97).

Tableau S3.2 : Coordonnées des 33 isolats de *Phytophthora capsici* basées sur l'analyse de structure et l'analyse de positionnement multidimensionnelle.

Isolat	Cluster 1	Cluster 2	MDS 1	MDS 2
LT10203	0,7366	0,2634	-0,052706774	-0,022931818
LT10204	0,9674	0,0326	-0,112268515	0,045409873
LT10214	0,8062	0,1938	-0,07782572	0,023858778
LT10296	0,7934	0,2066	-0,079593636	-0,0672722
LT10297	0,785	0,215	-0,07053175	-0,077409
LT123	0,9344	0,0656	-0,1313275	0,04557003
LT1534	0,9788	0,0212	-0,13499947	0,14598523
LT253	0,8872	0,1128	-0,1058539	0,090405606
LT263	0,9604	0,0396	-0,13293625	0,1442027
LT3	0,6586	0,3414	-0,02977263	-0,061643083
LT51	0,8982	0,1018	-0,106438585	0,07384914
LT5473	0,4512	0,5488	0,045122467	-0,09201083
LT5474	0,456	0,544	0,038638327	-0,10812719
LT5475	0,4454	0,5546	0,0388949	-0,08760679
LT6	0,588	0,412	-0,0015231986	-0,06510159
LT62	0,9988	0,0012	-0,12951036	0,06725862
LT6503	0,6408	0,3592	-0,030663384	-0,061891492
LT6535	0,526	0,474	0,01103634	-0,08403404
LT6745	0,5236	0,4764	0,0019047848	-0,0723397
LT6751	0,7282	0,2718	-0,061776016	-4,2887346E-4
LT6755	0,715	0,285	-0,04040451	-0,038065717
LT6756	0,501	0,499	0,017919198	-0,07630605
LT6795	0,5194	0,4806	0,0016224784	-0,07357072
LT7	0,5628	0,4372	0,001508405	-0,057078432
LT7395	0,7218	0,2782	-0,055985678	-0,0205862
LT9118	0,0008	0,9992	0,20145957	0,08963916
LT9123	0,0084	0,9916	0,18760854	0,046061847
LT9236	0,0008	0,9992	0,20731312	0,06881713
LT9245	0,2014	0,7986	0,12526186	0,002822104
LT9275	0,0014	0,9986	0,20502383	0,07060379
LT9381	0,8196	0,1804	-0,07895272	0,034562428
LT9397	0,0008	0,9992	0,19474286	0,06297331
LT9807	0,1842	0,8158	0,1550139	0,054383986

Les colonnes 2 et 3 indiquent les pourcentages d'appartenance aux deux clusters identifiés après la correction d'Evanno et al. (2005) des résultats produits par le logiciel STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) sur la base de 11 910 SNP répartis sur l'ensemble du génome de *Phytophthora capsici*. Les colonnes 4 et 5 indiquent les coordonnées des isolats obtenus sur la base de la matrice de distance calculée avec le logiciel TASSEL 5.2.45 sur la base des 202 117 SNP détectés entre les 33 isolats.

Tableau supplémentaire S3.3: Nombre d'effecteurs RxLR exprimé par isolat.

Isolat	Nombre d'effecteur RxLR exprimé à 24 hpi	Nombre d'effecteur RxLR exprimé à 72 hpi
LT10203	211	227
LT10204	205	209
LT10214	156	251
LT10296	212	200
LT10297	217	225
LT123	242	210
LT1534	219	266
LT253	208	236
LT263	226	226
LT3	214	248
LT51	204	249
LT5473	179	251
LT5474	211	218
LT5475	159	210
LT6	193	263
LT62	203	225
LT6503	181	244
LT6535	197	247
LT6745	192	238
LT6751	212	267
LT6755	189	210
LT6756	221	216
LT6795	186	211
LT7	208	233
LT7395	172	204
LT9118	227	245
LT9123	209	226
LT9236	201	254
LT9245	200	243
LT9275	143	242
LT9381	228	256
LT9397	213	268
LT9807	220	235

Un gène était considéré exprimé lorsque 20 reads y étaient comptés. Heures post inoculation (hpi)



---

## Discussion générale

---

Les effecteurs sont les outils des agents pathogènes leur permettant de perturber la physiologie et de court-circuiter les mécanismes de défense de leur plante hôte (Dodds and Rathjen 2010). Les études moléculaires ont révélé les fonctions de plusieurs effecteurs et apporté de la lumière sur les mécanismes grâce auxquels les agents pathogènes manipulent leur plante hôte (Asai and Shirasu 2015). Cependant, le nombre d'effecteurs dont la fonction est connue reste assez faible comparativement aux nombres d'effecteurs putatifs qui ont pu être identifiés dans les génomes. C'est le cas des oomycètes du genre *Phytophthora*, pour qui une quinzaine d'effecteurs ont été étudiés au niveau moléculaire (Bozkurt et al. 2012; Giraldo and Valent 2013; Sharpee and Dean 2016) alors que les familles d'effecteurs cytoplasmiques, comme les RxLR, peuvent contenir des centaines de candidats putatifs. L'utilisation des approches génomiques appliquées aux agents pathogènes ou 'pathogénomique' a permis de relever le défi de l'étude de la fonction de ces effecteurs pendant l'infection (Pais et al. 2013). L'emploi de criblage effectoromique a révélé qu'une grande partie de ces effecteurs contribuent positivement à l'infection en supprimant les réactions de mort cellulaire chez l'hôte ou les dépôts de callose qui sont associés aux mécanismes de défense des plantes (Fabro et al. 2011; Wang et al. 2011). Ces criblages permettent aussi de rechercher de nouvelles sources de résistance et d'identifier les gènes codant des RxLR induisant les mécanismes de défense de la plante. Les criblages utilisant une banque d'effecteurs RxLR clonés ont permis d'identifier et d'accélérer le clonage de gènes de résistance chez des espèces du genre *Solanum* à *P. infestans* (Oh et al. 2009; Vleeshouwers et al. 2008, 2011).

En 2013, Dangl et al. ont émis l'hypothèse que des effecteurs exprimés pendant l'interaction, conservés dans les populations d'agents pathogènes et contribuant positivement à la virulence, pourraient permettre de rechercher des résistances plus durables, qui seraient basées sur la reconnaissance d'un tel effecteur.

Cependant, les effecteurs RxLR sont localisés dans des régions dynamiques des génomes, riches en éléments répétés et montrant une évolution rapide, expliquant ainsi la capacité de contournement rapide des gènes de résistance que montrent les espèces de *Phytophthora* (Vleeshouwers and Oliver 2014b). Des mutations, des pertes d'expression et des régulations d'expression différentielles font parties des mécanismes pouvant être à l'origine de ces contournements. Il est donc crucial d'avoir connaissance des profils d'expression des effecteurs et de leur niveau de diversité au sein des populations des agents pathogènes afin de sélectionner ceux à employer pour rechercher des résistances.

*P. capsici* est un agent pathogène destructeur réparti mondialement et attaquant un spectre d'hôtes large. Quelques gènes de résistance ont été identifiés chez la tomate et le piment. Cependant, on

en sait peu sur les facteurs de virulence de cet agent pathogène (Barchenger et al. 2018; Granke et al. 2012; Lamour et al. 2012b). Les fonctions moléculaires de ces effecteurs putatifs caractérisés en grand nombre restent en effet peu connues. L'utilisation de criblages effectoromiques permettrait d'identifier les effecteurs contribuant à la virulence de *P. capsici* ou induisant les mécanismes de défense chez la tomate et le piment.

Cette thèse s'articulait autour de deux objectifs. Le premier objectif était d'étudier l'impact du génotype de l'hôte piment et de l'agressivité des isolats de *P. capsici* sur l'expression des gènes du pathogène pendant leur interaction avec l'hôte. Pour répondre à cet objectif, l'expression des gènes de deux isolats *P. capsici* contrastés par leur niveau d'agressivité sur le piment a été analysée pendant leur interaction avec deux génotypes de piment ayant des profils de résistances contrastés. Plusieurs effecteurs RxLR ont été révélés différenciellement exprimés entre les isolats. Certains d'entre eux ont été testés avec un pipeline effectoromique afin d'étudier le lien entre la régulation de l'expression des gènes effecteurs chez *P. capsici* et leur capacité à induire les mécanismes de défense chez le piment. Un deuxième objectif était de caractériser le répertoire d'effecteurs RxLR exprimés par *P. capsici* pendant l'interaction de 33 isolats avec la tomate afin d'identifier des core-effecteurs candidats pouvant aider à rechercher de nouveaux génotypes résistants à *P. capsici*. Pour ce faire, une analyse de l'expression des effecteurs RxLR à 24 et 72 heures après inoculation d'un génotype sensible de tomate a été réalisée. Puis, les polymorphismes de séquences ont été détectés sur les RxLR des 33 isolats afin d'identifier ceux qui sont conservés.

## **Étude transcriptomique de l'effet du génotype de l'hôte et de l'isolat sur l'expression des gènes de *P. capsici***

Dans le chapitre 1, nous avons étudié l'effet du génotype de l'hôte et de l'isolat sur l'expression des gènes de *P. capsici*. Pour cela, nous avons comparé quatre conditions biologiques où deux isolats contrastés par leur niveau d'agressivité (« Agressif », HA ; « Faiblement agressif », LA) interagissaient avec deux génotypes de piment contrastés par leur niveau de résistance à *P. capsici* (« Sensible », S ; « Résistant », R). Nous disposions de 12 échantillons collectés à 24 heures et de 12 échantillons collectés à 72 heures après inoculation pour lesquels nous avons effectué le mapping et le comptage des reads sur les annotations de *P. capsici*. La quantité de reads séquencés est dépendante de la quantité d'ARN initiale. Généralement, les pourcentages de reads mappés sur les génomes des agents pathogènes sont faibles dans les tissus de plantes infectées qui sont collectés en début d'interaction à cause de la faible quantité de tissus de l'agent pathogène. L'étude de

l'interaction de *P. infestans* avec le génotype sensible de tomate Money Maker a révélé des pourcentages de reads mappés sur le génome de l'agent pathogène à 0,3% à 48 et de 6% à 96 heures après inoculation (Zuluaga et al. 2015). Sonah et al. (2016) ont observé une tendance similaire avec 0,42 %, 0,50 % et 1,11 % de reads mappés sur le génome de *Leptosphaeria maculans* 24, 72 et 120 jours après inoculation du génotype sensible de Colza, Topas.

Nous avons observé des variations importantes entre nos conditions d'interactions.

Les pourcentages de reads étaient nettement plus élevés dans la condition biologique SxHA (varient entre 5,4 % et 9,4 %) comparativement aux conditions RxHA, SxLA et RxLA (varient entre 0,16 % et 2,95 %). Cette différence révèle des contrastes de croissance de *P. capsici* dans les différentes conditions testées. Ces résultats suggèreraient qu'à 24 heures après inoculation, ce qui correspond à la phase biotrophe de développement (Jupe et al. 2013), le développement de *P. capsici* est déjà fortement contrasté entre les différentes conditions. Malgré ces variations, les pourcentages de reads observés restent supérieurs à ce qui a été reporté dans la littérature (Sonah et al. 2016; Zuluaga et al. 2015). Ceci s'explique par notre design expérimental qui visait à favoriser le développement de l'agent pathogène. En posant l'inoculum sur des tiges de piment dont l'apex a été coupé, la progression de l'agent pathogène a été facilitée, permettant ainsi d'obtenir des quantités d'ARN de *P. capsici* plus importantes. Nous avons observé des pourcentages de reads encore plus faibles pour les conditions RxHA, SxLA et RxLA et des variations encore plus importantes pour les conditions d'interaction à 72 heures post inoculation. Nous avons décidé de les exclure afin de faciliter les étapes de normalisation des comptages et l'analyse différentielle de l'expression des gènes *P. capsici*.

Étant donné les faibles pourcentages de reads comptés et les variations importantes observés entre eux, nous avons focalisé l'analyse sur les échantillons collectés à 24 heures post inoculation pour lesquels les contrastes de quantité de données étaient moins marqués. De plus, une attention particulière a été portée aux étapes de normalisations et de détection des gènes différentiellement exprimés (DEG). Suivant les recommandations de Lin et al. (2016), nous avons implémenté une étape de bootstrap et évalué la robustesse des profils d'expression aux facteurs de normalisation.

Sur les 7307 gènes que nous avons analysés, seulement 361 gènes différentiellement exprimés ('DEGs') ont été identifiés dans au moins une des quatre comparaisons en paire. Cet effectif paraît faible par rapport aux études transcriptomiques précédentes focalisées sur *P. capsici*. En effet, Jupe et al. (2013) ont identifié approximativement 800 gènes DEGs entre les différentes phases de développement de *P. capsici* associées à l'hémibiotrophie. En comparant les phases précoces de l'infection (zoospores, cyst en germination et mycélium), Chen et al. (2013) ont observé plusieurs milliers de DEGs. Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de ces différences. Bien que nous ayons

tenté de réduire les biais potentiels apportés par les variations de quantité de reads entre les conditions biologiques, nous avons tout de même perdu de la puissance statistique. De plus, nous avons appliqué des filtres stringents afin d'éviter les faux positifs. Enfin, nous avons comparé des conditions biologiques à 24 hpi. Une explication possible est que les profils d'expression chez *P. capsici* varient relativement peu à ce moment de l'interaction.

Parmi les 361 DEGs identifiés, seuls 48 gènes ont été identifiés différemment exprimés par les comparaisons des profils d'expression des gènes chez HA et LA pendant leur interaction avec les deux hôtes (RxHA vs SxHA et RxLA vs. SxLA). Cela suggère que le génotype de l'hôte a peu d'impact sur l'expression des gènes de *P. capsici*. Des résultats similaires ont été observés lors de la comparaison de l'interaction entre le champignon *Zymoseptoria tritici* avec soit un hôte compatible (blé) soit un hôte incompatible (*Brachypodium distachyon*). Dans cette étude, seulement 40 gènes étaient différemment exprimés (Kellner et al. 2014).

L'étude des fonctions moléculaires associées au DEG a révélé que *P. capsici* utiliserait des mécanismes moléculaires différents suivant les conditions biologiques. Des gènes associés au transport de nutriments et à la biosynthèse de molécules étaient plus exprimés par *P. capsici* dans la condition SxHA, suggérant que celle-ci serait plus favorable au développement de l'agent pathogène. A l'inverse, des transporteurs ABC impliqués dans la détoxification et des gènes associés au catabolisme des molécules en situation de stress et de carence, étaient plus exprimés par *P. capsici* dans les conditions RxHA, SxLA et RxLA, suggérant que ces conditions seraient défavorables au développement de l'agent pathogène.

Les effecteurs RxLR sont différemment exprimés dans le temps (Chen et al. 2013; Jupe et al. 2013). Parmi les 7307 gènes que nous avons étudiés, 97 gènes codant des effecteurs RxLR étaient présents. Nous avons observé un enrichissement en effecteurs RxLR au sein du pool de gènes DE ( $p$ -value < 0,05, Test Fisher). Au total, 13 gènes codant des effecteurs RxLR étaient DE. De ces 13 gènes, 12 étaient DE avec les comparaisons des isolats (HA vs. LA). De façon intéressante, 8 effecteurs étaient plus exprimés par l'isolat agressif HA contre 4 qui étaient plus exprimés par l'isolat peu agressif LA. La comparaison des profils transcriptomiques de 4 isolats de *Zymoseptoria tritici* pendant l'infection d'un génotype de blé sensible a révélé que les gènes de virulence présentaient une régulation de leur expression isolat-spécifique (Palma-Guerrero et al. 2017). On peut aussi supposer dans notre cas, que les différentiels d'expression observés entre HA et LA à 24 hpi contribuent à l'agressivité de ces isolats.

Chen et al. (2013) ont montré avec des tests d'expression transitoire chez *Nicotiana benthamiana* que l'effecteur RxLR Pc22053, qui était fortement induit avec leur analyse transcriptomique, supprime les symptômes de mort cellulaire démontrant ainsi que la régulation de l'expression de ce gène contribue à la virulence de *P. capsici*. Le test des 13 effecteurs que nous avons identifiés avec les comparaisons chez *P. capsici*, par expression transitoire *in planta* devrait permettre de révéler leur rôle *in planta*.

### **La régulation de l'expression des effecteurs RxLR, observée entre les isolats HA et LA, semble corrélée à leur activité d'avirulence.**

Dans le chapitre 2, nous avons tenté d'en apprendre plus sur la fonction de certains effecteurs différentiellement exprimés entre les isolats HA et LA. Les gènes codant les effecteurs ont été sélectionnés en se basant sur leur profil d'expression et leur niveau de diversité entre les isolats. Des 10 effecteurs RxLR, cinq ont été sélectionnés. Parmi ceux-ci, deux effecteurs (CUST\_17572 et CUST\_1160) étaient plus exprimés par HA et ne présentaient pas de polymorphisme entre les deux isolats, deux effecteurs étaient plus exprimés par HA et présentaient du polymorphe entre les deux isolats (CUST\_5402 et CUST\_16519) et un effecteur (Phyca11|97196) était plus exprimé par LA et présentait du polymorphisme entre les deux isolats. Nous avons sélectionné 48 accessions de piment, dont les profils de résistance avait été caractérisés avec un test tige artificiel (Cantet 2013), pour réaliser les criblages. Notre but était de voir si les effecteurs différentiellement exprimés par les isolats induisent des réponses hypersensibles chez les accessions résistantes à *P. capsici*. Des 48 accessions, seulement 25 ont été criblées avec nos effecteurs en raison des réponses aspécifiques de certaines accessions. Le piment est réputé pour être récalcitrant aux méthodes de transformation médiée par *R. radiobacter* (Lee et al. 2004). De plus, certaines accessions peuvent présenter de la résistance au virus PVX (Shi et al. 2008). En utilisant les réponses induites chez les accessions après agro-infection avec nos témoins (témoin négatif : pGR106:GFP ; témoin positif : pGR106:PITG\_16240) et en évaluant leur capacité à accumuler le virus PVX après inoculation mécanique, nous avons sélectionné les accessions présentant une accumulation virale et induisant des réponses hypersensibles avec le témoin positif pGR106:PITG\_16240. De façon surprenante, nous avons observé que tous les effecteurs induisent des HR chez au moins une accession après agro-infection. En effet, l'induction du phénotype de mort cellulaire est censée être plutôt rare. Fabro et al. (2011) n'ont observé qu'une induction de réponse hypersensible après avoir criblé 12 écotypes d'*Arabidopsis thaliana* avec 60 effecteurs RxLR de *Hyaloperonospora arabidopsidis*. De façon

similaire, l'expression transitoire de 18 effecteurs RxLR chez 83 écotypes d'*A. thaliana* n'a révélé qu'une seule interaction induisant les mécanismes de défense (Goritschnig et al. 2012). Toutes les accessions ayant induit des réponses hypersensibles avec nos effecteurs n'ont pas développé de symptômes après agro-infection du témoin négatif pGR106:GFP, rendant peu vraisemblable la possibilité que ces réponses soient dues à des réactions aspécifiques à *R. radiobacter* ou au virus PVX.

De plus, des tendances très marquées ont été observées avec les effecteurs RxLR Phyca11|97196 et CUST\_16519.

L'effecteur Phyca11|97196 était plus exprimé chez l'isolat LA (Pc273). Mais c'est l'allèle Phyca11|P97196<sup>Pc107</sup> qui a induit des HR chez le plus d'accessions après agro-infection. Des résultats similaires ont été observés avec l'effecteur CUST\_16519 qui était plus exprimé par l'isolat HA (Pc107). C'est l'allèle provenant de l'isolat Pc273 (CUST\_16519<sup>Pc273</sup>) qui a induit des HR chez le plus d'accessions de piment après agro-infection. Sur la base de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la régulation de l'expression de ces effecteurs par silencing chez les isolats leur permettrait d'éviter le déclenchement des mécanismes de défense chez le piment. Bien qu'obtenu sur un nombre limité de tests, ces résultats semblent indiquer qu'un nombre important d'effecteurs détectés différemment exprimés avec notre analyse, peuvent induire les mécanismes de défense chez le piment.

Un problème majeur que nous avons rencontré concerne les pourcentages relativement faibles de sites inoculés ayant développés des HR, notamment dans le cas du contrôle positif de HR. En effet, la plupart des pourcentages de sites inoculés par agro-infection étaient inférieures à 25 % pour les 5 effecteurs RxLR, rendant difficile toute comparaison quantitative. Nous avons vu, avec des analyses préliminaires, que les tests effectués par inoculation mécanique permettaient d'obtenir des pourcentages de sites inoculés développant des HR beaucoup plus élevés comparativement à l'agro-infection. Il sera nécessaire d'utiliser cette méthode afin de confirmer les phénotypes observés par agro-infection.

### ***Phytophthora capsici* possède un répertoire de core-effecteurs conséquent.**

La totalité des gènes d'avirulence identifiés chez *P. infestans* et *P. sojae* appartiennent à la famille des effecteurs RxLR. Pour tous ces effecteurs, des contournements ont pu être reportés (Vleeshouwers et al. 2014). Parmi les mécanismes responsables de ces contournements, des modifications des séquences protéiques, des régulations différentielles d'expression et des pertes d'expression ont été décrites. Pour qu'une résistance soit *a priori* durable, le gène d'avirulence responsable du déclenchement des défenses doit être exprimé et conservé dans la population de

l'agent pathogène. Avec l'analyse différentielle (Chapitre 1) et nos tests d'expression transitoire *in planta* chez le piment (Chapitre 2), nous avons vu que les effecteurs RxLR différentiellement exprimés entre les isolats induisent les mécanismes de défense chez l'hôte. Cependant, cette analyse est restée restreinte aux gènes exprimés par seulement deux isolats, HA et LA.

Utilisant un jeu de données RNAseq, nous avons étendu notre analyse de l'expression des effecteurs RxLR chez *P. capsici* à 33 isolats. Le mapping des reads produits par le RNAseq de ces 33 isolats interagissant avec un génotype sensible de tomate à 24 et 72 heures post inoculation a révélé 38,6 millions de reads mappés en moyenne (entre 18,9 et 51,9 millions). Les pourcentages de ces reads comptés sur les annotations de *P. capsici*, variant entre 5,5 et 56,5 %, étaient beaucoup plus élevés que ce qui ont été observés dans la littérature pour d'autres pathosystèmes similaires (Sonah et al. 2016; Zuluaga et al. 2015). Nous avons supposé que cette différence était due à la spécificité du design expérimental employé visant à réduire les risques de dilution des ARN du pathogène dans ceux de la plante. L'analyse des polymorphismes des 33 isolats a révélé 202 117 positions polymorphes et 124 702 SNP par isolats en moyenne (entre 60 794 et 156 431). Nous n'avons pas observé de structuration des isolats en fonction de la famille de plante de l'hôte d'origine mais une séparation en deux groupes avec les isolats chinois d'une part et ceux provenant des 4 autres pays d'autre part.

Nous avons utilisé l'expression des effecteurs RxLR afin d'identifier ceux qui seraient potentiellement des core-effecteurs. En ne sélectionnant que ceux qui présentaient au moins 20 reads comptés sur tous les isolats, nous nous sommes assurés de ne pas garder d'effecteurs présentant des polymorphismes de présence/absences qui pourraient être à l'origine de contournement de résistance. Au total, 141 effecteurs RxLR ont été identifiés comme étant exprimés chez les 33 isolats à 24 hpi et/ou à 72 hpi. Parmi ceux-ci 74 étaient exprimés aux deux temps, 12 étaient spécifiques à 24 hpi et 55 étaient spécifiques à 72 hpi. Nous avons supposé que cette expression partagée était un indice que ces effecteurs sont importants pour la virulence de *P. capsici*. L'analyse des polymorphismes a révélé 1010 SNP sur 113 effecteurs RxLR. Des 141 effecteurs exprimés chez tous les isolats analysés, 32 ne présentaient aucun SNP et 21 ne présentaient que des SNP synonymes. Au total, nous avons identifié 53 effecteurs RxLR exprimés et conservés chez 33 isolats de *P. capsici* qui sont des core-effecteurs potentiels. Dans une étude similaire réalisée sur *P. infestans*, Yin et al. (2017) ont identifié 18 effecteurs RxLR fortement exprimés et ne présentant pas de polymorphismes non synonymes chez cinq isolats. Ils ont montré que ces effecteurs contribuent potentiellement à la virulence de l'agent pathogène et suppriment la PTI et l'ETI induites chez *Nicotiana benthamiana*. Bien que nous n'ayons pas pu tester le rôle de nos 53 effecteurs pendant l'interaction, ils sont des candidats de choix afin de rechercher des résistances *a priori* plus durables.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur l'effet de différents facteurs sur l'expression des gènes de *P. capsici* pendant l'infection du piment. Nous sommes parvenus à identifier des gènes différentiellement exprimés malgré les contrastes importants de quantité de données entre les conditions faiblement compatibles et la condition compatible pour le développement de *P. capsici*. En utilisant l'agro-infection comme méthode d'expression transitoire *in planta*, nous avons mis en évidence que certains effecteurs RxLR différentiellement exprimés induisent les mécanismes de défense chez le piment à des taux variables. Cependant, ces résultats restent préliminaires et nécessiteraient davantage de tests, ou de développer une méthode d'expression transitoire *in planta* plus efficace, garantissant un taux élevé d'induction de HR avec le contrôle positif. Une solution envisageable serait d'utiliser l'inoculation mécanique comme méthode d'expression transitoire. Nous avons observé précédemment que les pourcentages de sites développant des réponses hypersensibles étaient plus élevés après inoculation mécanique des témoins positifs. L'emploi de cette méthode permet aussi de cribler les accessions présentant des résistances à *R. radiobacter*. Bien sûr, la confirmation de ces résultats correspond à la première étape. Il serait nécessaire d'aller plus loin afin de mieux comprendre la fonction de ces effecteurs et d'identifier leurs cibles chez la plante. Plusieurs questions subsistent : est-ce que ces effecteurs différentiellement exprimés contribuent positivement à l'infection en supprimant la mort cellulaire induite par des PAMPs et/ou des effecteurs ? Est-ce que les effecteurs non-différentiellement exprimés induisent les mêmes réponses chez le piment ? Nous sommes aussi parvenus à sélectionner des effecteurs conservés et exprimés pendant l'interaction de *P. capsici* avec la tomate. Ces effecteurs pourront servir de candidats afin de cribler la diversité du piment et de la tomate dans la recherche de géniteurs induisant des réponses hypersensibles. Enfin, ce travail de thèse s'est focalisé sur l'expression des gènes de *P. capsici*. L'exploitation des données RNAseq produites dans le chapitre 1 pourrait permettre d'identifier les gènes différentiellement exprimés chez le piment lorsque la condition d'interaction est favorable ou défavorable pour le développement de l'agent pathogène. Ces informations permettraient d'identifier les gènes potentiels à l'origine de la résistance du piment.



## Références bibliographiques

- Abrahamian, M., Ah-Fong, A. M. V., Davis, C., Andreeva, K., and Judelson, H. S. 2016. Gene Expression and Silencing Studies in *Phytophthora infestans* Reveal Infection-Specific Nutrient Transporters and a Role for the Nitrate Reductase Pathway in Plant Pathogenesis. *PLoS Pathog.* 12
- Ah-Fong, A. M. V., Kim, K. S., and Judelson, H. S. 2017a. RNA-seq of life stages of the oomycete *Phytophthora infestans* reveals dynamic changes in metabolic, signal transduction, and pathogenesis genes and a major role for calcium signaling in development. *BMC Genomics.* 18:198
- Ah-Fong, A. M. V., Shrivastava, J., and Judelson, H. S. 2017b. Lifestyle, gene gain and loss, and transcriptional remodeling cause divergence in the transcriptomes of *Phytophthora infestans* and *Pythium ultimum* during potato tuber colonization. *BMC Genomics.* 18:764
- Amaro, T. M. M. M., Thilliez, G. J. A., Motion, G. B., and Huitema, E. 2017. A Perspective on CRN Proteins in the Genomics Age: Evolution, Classification, Delivery and Function Revisited. *Front. Plant Sci.* 8:1–12
- Ammar, G. A., Tryono, R., Doñl, K., Karlovsky, P., Deising, H. B., and Wirsel, S. G. R. 2013. Identification of ABC transporter genes of *Fusarium graminearum* with roles in azole tolerance and/or virulence. *PLoS One.* 8:1–13
- Anderson, R. G., Deb, D., Fedkenheuer, K., and Mcdowell, J. M. 2015. Recent Progress in RXLR Effector Research. *Mol Plant Microbe Interact.* 28:1063–1072
- 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
- Armstrong, M. 2005. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proc. ....* 146942
- Asai, S., and Shirasu, K. 2015. Plant cells under siege: Plant immune system versus pathogen effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 28:1–8
- Attard, A., Evangelisti, E., Kebdani-Minet, N., Panabières, F., Deleury, E., Maggio, C., Ponchet, M., and Gourgues, M. 2014. Transcriptome dynamics of *Arabidopsis thaliana* root penetration by the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *BMC Genomics.* 15:538
- Van der Auwera, G. A., Carneiro, M. O., Hartl, C., Poplin, R., Del Angel, G., Levy-Moonshine, A., Jordan, T., Shakir, K., Roazen, D., Thibault, J., and others. 2013. From FastQ data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 43:10–11

- Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadoeuf, J., Palloix, A., and Moury, B. 2006. Different mutations in the genome-linked protein VPg of potato virus Y confer virulence on the pvr2(3) resistance in pepper. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19:557–63
- Babadoost, M., and Pavon, C. 2013. Survival of oospores of *Phytophthora capsici* in soil. *Plant Dis.* 97:1478–1483
- Badel, J. L., Piquerez, S. J. M., Greenshields, D., Rallapalli, G., Fabro, G., Ishaque, N., and Jones, J. D. G. 2013. In Planta Effector Competition Assays Detect *Hyaloperonospora arabidopsidis* Effectors That Contribute to Virulence and Localize to Different Plant Subcellular Compartments. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26:745–757
- Bailey, B. a, Jennings, J. C., and Anderson, J. D. 1997. The 24-kDa protein from *Fusarium oxysporum* f.sp. *erythroxyli*: occurrence in related fungi and the effect of growth medium on its production. *Can. J. Microbiol.* 43:45–55
- Barbary, A., Palloix, A., Fazari, A., Marteu, N., Castagnone-Sereno, P., and Djian-Caporalino, C. 2014. The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes Me1 and Me3. *Theor. Appl. Genet.* 127:499–507
- Barchenger, D. W., Lamour, K. H., and Bosland, P. W. 2018. Challenges and strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Front. Plant Sci.* 9:1–16
- Bardgett, R. D. 2005. *The Biology of Soil: A community and ecosystem approach*. Oxford University Press.
- Bari, R., and Jones, J. D. G. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69:473–488
- Baxter, L., Baxter, L., Tripathy, S., Ishaque, N., Boot, N., Cabral, A., Kemen, E., Thines, M., Ah-fong, A., Anderson, R., Badejoko, W., Bittner-eddy, P., Boore, J. L., Chibucos, M. C., Coates, M., Minx, P., Morris, P., Nelson, J., Phuntumart, V., Qutob, D., Rehmany, A., Rougon-cardoso, A., Ryden, P., Torto-alalibo, T., Studholme, D., Wang, Y., Win, J., Wood, J., Clifton, S. W., Rogers, J., Ackerveken, G. Van Den, and Jones, J. D. G. 2010. Signatures of Adaptation to Obligate *arabidopsidis* Genome. 330:36–39
- Beakes, G. W., Glockling, S. L., and Sekimoto, S. 2012. The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi.” *Protoplasma.* 249:3–19
- Bebber, D. P., and Gurr, S. J. 2015. Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security. *Fungal Genet. Biol.* 74:62–64
- Bebber, D. P., Holmes, T., and Gurr, S. J. 2014. The global spread of crop pests and pathogens. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 23:1398–1407
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von Heijne, G., and Brunak, S. 2004. Improved prediction of signal

peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340:783–795

- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing Author ( s ): Yoav Benjamini and Yosef Hochberg Source : *Journal of the Royal Statistical Society . Series B ( Methodological )*, Vol . 57 , No . 1 Published by : J. R. Stat. Soc. Ser. B. 57:289–300
- Bhattacharjee, S., Hiller, N. L., Liolios, K., Win, J., Kanneganti, T. D., Young, C., Kamoun, S., and Haldar, K. 2006. The malarial host-targeting signal is conserved in the irish potato famine pathogen. *PLoS Pathog.* 2:453–465
- Birch, P. R. J., Armstrong, M., Bos, J., Boevink, P., Gilroy, E. M., Taylor, R. M., Wawra, S., Pritchard, L., Conti, L., Ewan, R., Whisson, S. C., Van West, P., Sadanandom, A., and Kamoun, S. 2009. Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *J. Exp. Bot.* 60:1133–1140
- Blackman, L. M., Cullerne, D. P., Torreña, P., Taylor, J., and Hardham, A. R. 2015. RNA-Seq analysis of the expression of genes encoding cell wall degrading enzymes during infection of lupin (*Lupinus angustifolius*) by *Phytophthora parasitica*. *PLoS One.* 10:1–30
- 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
- Bos, J. I. B., Armstrong, M. R., Gilroy, E. M., Boevink, P. C., Hein, I., Taylor, R. M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R. R., Harrower, B., Dixelius, C., Bryan, G., Sadanandom, A., Whisson, S. C., Kamoun, S., and Birch, P. R. J. 2010. *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:9909–9914
- Bos, J. I. B., Kanneganti, T.-D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M. R., Birch, P. R. J., and Kamoun, S. 2006. The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 48:165–76
- Bourget, R., Chaumont, L., Durel, C. E., and Sapoukhina, N. 2015. Sustainable deployment of QTLs conferring quantitative resistance to crops: First lessons from a stochastic model. *New Phytol.* 206:1163–1171
- Bowers, J., Sonoda, R., and Mitchell, D. 1990. Path coefficient analysis of the effect of rainfall variables on the epidemiology of *Phytophthora* blight of pepper caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology.* 80:1439–1446
- Bozkurt, T. O., Schornack, S., Banfield, M. J., Kamoun, S., Ronald, P. C., and Shirasu, K. 2012. Oomycetes, effectors, and all that jazz This review comes from a themed issue on Biotic

- interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:483–492
- Bozkurt, T. O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M., Oliva, R., Cano, L. M., Jones, A. M. E., Huitema, E., van der Hoorn, R. A. L., and Kamoun, S. 2011. *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:20832–20837
- Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y., and Buckler, E. S. 2007. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics.* 23:2633–2635
- Bradley, D. J., Gilbert, G. S., and Parker, I. M. 2003. Susceptibility of clover species to fungal infection: The interaction of leaf surface traits and environment. *Am. J. Bot.* 90:857–864
- Brown, J. K. M. 2015. Durable Resistance of Crops to Disease: A Darwinian Perspective. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53:513–539
- Brown, P. J., Billington, K. J., Bumstead, J. M., Clark, J. D., and Tomley, F. M. 2000. A microneme protein from *Eimeria tenella* with homology to the Apple domains of coagulation factor XI and plasma pre-kallikrein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 107:91–102
- Brun, H., Chèvre, A. M., Fitt, B. D., Powers, S., Besnard, A. L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M., and Andrivon, D. 2010. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol.* 185:285–299
- Caffier, V., Le Cam, B., Al Rifai, M., Bellanger, M. N., Comby, M., Denancé, C., Didelot, F., Expert, P., Kerdraon, T., Lemarquand, A., Ravon, E., and Durel, C. E. 2016. Slow erosion of a quantitative apple resistance to *Venturia inaequalis* based on an isolate-specific Quantitative Trait Locus. *Infect. Genet. Evol.* 44:541–548
- Caffier, V., Lasserre-Zuber, P., Giraud, M., Lascostes, M., Stievenard, R., Lemarquand, A., van de Weg, E., Expert, P., Denancé, C., Didelot, F., Le Cam, B., and Durel, C. E. 2014. Erosion of quantitative host resistance in the apple × *Venturia inaequalis* pathosystem. *Infect. Genet. Evol.* 27:481–489
- Caillaud, M. C., Piquerez, S. J. M., Fabro, G., Steinbrenner, J., Ishaque, N., Beynon, J., and Jones, J. D. G. 2012. Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility. *Plant J.* 69:252–265
- Cantet, M. 2013. Variation phénotypique de la résistance quantitative à *Phytophthora capsici* dans la diversité naturelle du piment, et diversité moléculaire et profil d'évolution du QTL majeur Pc5.1. Thèse, Montpellier SupAgro.
- Castro-Rocha, A., Shrestha, S., Lyon, B., Grimaldo-Pantoja, G. L., Flores-Marges, J. P., Valero-Galván, J., Aguirre-Ramírez, M., Osuna-Ávila, P., Gómez-Dorantes, N., Ávila-Quezada, G., de Jesús Luna-Ruiz, J., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S. P., and Lamour, K. 2016. An initial assessment of genetic diversity for *Phytophthora capsici* in northern and central Mexico. *Mycol.*

Prog. 15:1–12

- Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T., Dodds, P. N., Wise, R., and States, U. 2014. A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs : the “ integrated decoy ” hypothesis. 5:1–10
- Chen, X.-R., Xing, Y.-P., Li, Y.-P., Tong, Y.-H., and Xu, J.-Y. 2013. RNA-Seq Reveals Infection-Related Gene Expression Changes in *Phytophthora capsici*. PLoS One. 8:e74588
- Chen, Y., Liu, Z., and Halterman, D. A. 2012. Molecular determinants of resistance activation and suppression by *phytophthora infestans* effector IPI-O. PLoS Pathog. 8
- Chinchilla, D. 2006. The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception. Plant Cell Online. 18:465–476
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., Felix, G., and Boller, T. 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. Nature. 448:497–500
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S. J., Lu, X., and Ruden, D. M. 2012. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. Fly (Austin). 6:80–92
- Coleman, J. J., White, G. J., Rodriguez-Carres, M., and Vanetten, H. D. 2011. An ABC transporter and a cytochrome P450 of *Nectria haematococca* MPVI are virulence factors on pea and are the major tolerance mechanisms to the phytoalexin pisatin. Mol. Plant. Microbe. Interact. 24:368–76
- Couto, D., and Zipfel, C. 2016. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. Nat. Rev. Immunol. 16:537–552
- Cowger, C., and Mundt, C. C. 2002. Effects of Wheat Cultivar Mixtures on Epidemic Progression of *Septoria Tritici* Blotch and Pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola*. Phytopathology. 92:617–23
- 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
- Cui, L., Yin, W., Dong, S., and Wang, Y. 2012. Analysis of polymorphism and transcription of the effector gene *Avr1b* in *Phytophthora sojae* isolates from China virulent to *Rps1b*. Mol. Plant Pathol. 13:114–122
- Dagdas, Y. F., Beihaj, K., Maqbool, A., Chaparro-Garcia, A., Pandey, P., Petre, B., Tabassum, N., Cruz-Mireles, N., Hughes, R. K., Sklenar, J., Win, J., Menke, F., Findlay, K., Banfield, M. J., Kamoun, S., and Bozkurt, T. O. 2016. An effector of the irish potato famine pathogen antagonizes a host autophagy cargo receptor. Elife. 5:1–23
- Damasceno, C. M. B., Bishop, J. G., Ripoll, D. R., Win, J., Kamoun, S., and Rose, J. K. C. 2008. Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from *phytophthora* species suggests coevolution with plant endo-beta-1,3-glucanases. Mol. Plant. Microbe. Interact. 21:820–30

- Dangl, J. L., Horvath, D. M., and Staskawicz, B. J. 2013. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science* (80-. ). 341:746–51
- Dangl, J. L., and Jones, J. D. G. 2001. defence responses to infection. 411
- Delmas, C. E. L., Fabre, F., Jolivet, J., Mazet, I. D., Richart Cervera, S., Delière, L., and Delmotte, F. 2016. Adaptation of a plant pathogen to partial host resistance: Selection for greater aggressiveness in grapevine downy mildew. *Evol. Appl.* 9:709–725
- Delmotte, F., Mestre, P., Schneider, C., Kassemeyer, H. H., Kozma, P., Richart-Cervera, S., Rouxel, M., and Delière, L. 2014. Rapid and multiregional adaptation to host partial resistance in a plant pathogenic oomycete: Evidence from European populations of *Plasmopara viticola*, the causal agent of grapevine downy mildew. *Infect. Genet. Evol.* 27:500–508
- Derevnina, L., Dagdas, Y. F., De Concepcion, J. C., Kellner, R., Petre, B., Domazakis, E., Du, J., Wu, C., Lin, X., Aguilera-galvez, C., Cruz-Mireles, N., Vleeshouwers, V. G. A. A., and Kamoun, S. 2016a. Tansley insight Nine things to know about elicitors. *New Phytol.* 212:888–895
- Derevnina, L., Petre, B., Kellner, R., Dagdas, Y. F., Sarowar, M. N., Giannakopoulou, A., De la Concepcion, J. C., Chaparro-Garcia, A., Pennington, H. G., van West, P., and Kamoun, S. 2016b. Emerging oomycete threats to plants and animals. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371:20150459
- Dixon, R. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature.* 411:843–847
- Dodds, P. N., and Rathjen, J. P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11:539–548
- Dou, D., Kale, S. D., Wang, X., Chen, Y., Wang, Q., Wang, X., Jiang, R. H. Y., Arredondo, F. D., Anderson, R. G., Thakur, P. B., McDowell, J. M., Wang, Y., and Tyler, B. M. 2008a. Conserved C-Terminal Motifs Required for Avirulence and Suppression of Cell Death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. *Plant Cell Online.* 20:1118–1133
- Dou, D., Kale, S. D., Wang, X., Jiang, R. H. Y., Bruce, N. A., Arredondo, F. D., Zhang, X., and Tyler, B. M. 2008b. RXLR-Mediated Entry of *Phytophthora sojae* Effector Avr1b into Soybean Cells Does Not Require Pathogen-Encoded Machinery. *Plant Cell Online.* 20:1930–1947
- Du, J., Rietman, H., and Vleeshouwers, V. G. A. A. 2014. Agroinfiltration and PVX Agroinfection in Potato and *Nicotiana benthamiana*; *J. Vis. Exp.* :1–7
- Dunn, A. R., Milgroom, M. G., Meitz, J. C., McLeod, A., Fry, W. E., McGrath, M. T., Dillard, H. R., and Smart, S. D. 2010. Population Structure and Resistance to Mefenoxam of *Phytophthora capsici* in New York State. *Plant Dis.* 94:1461–1468
- Earl, D. A., and vonHoldt, B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4:359–361
- Eulgem, T., and Somssich, I. E. 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling.

Curr. Opin. Plant Biol. 10:366–371

- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol. Ecol.* 14:2611–2620
- Fabro, G., Steinbrenner, J., Coates, M., Ishaque, N., Baxter, L., Studholme, D. J., Körner, E., Allen, R. L., Piquerez, S. J. M., Rougon-Cardoso, A., Greenshields, D., Lei, R., Badel, J. L., Caillaud, M. C., Sohn, K. H., van den Ackerveken, G., Parker, J. E., Beynon, J., and Jones, J. D. G. 2011. Multiple candidate effectors from the oomycete pathogen *hyaloperonospora arabidopsidis* suppress host plant immunity. *PLoS Pathog.* 7
- FAO. 2017. *The future of food and agriculture - Trends and challenges.*
- Fawke, S., Doumane, M., and Schornack, S. 2015. Oomycete Interactions with Plants: Infection Strategies and Resistance Principles. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79:263–280
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., and Boller, T. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18:265–276
- Feng, B.-Z., Zhu, X.-P., Fu, L., Lv, R.-F., Storey, D., Tooley, P., and Zhang, X.-G. 2014. Characterization of necrosis-inducing NLP proteins in *Phytophthora capsici*. *BMC Plant Biol.* 14:126
- Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-fob-gene concept. :275–296
- Fournet, S., Kerlan, M. C., Renault, L., Dantec, J. P., Rouaux, C., and Montarry, J. 2013. Selection of nematodes by resistant plants has implications for local adaptation and cross-virulence. *Plant Pathol.* 62:184–193
- Frederickson Matika, D. E., and Loake, G. J. 2014. Redox Regulation in Plant Immune Function. *Antioxid. Redox Signal.* 21:1373–1388
- French, E., Kim, B. S., and Iyer-Pascuzzi, A. S. 2016. Mechanisms of quantitative disease resistance in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* 56:201–208
- Fry, W. 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Mol. Plant Pathol.* 9:385–402
- Fry, W. E., Birch, P. R. J., Judelson, H. S., Grünwald, N. J., Danies, G., Everts, K. L., Gevens, A. J., Gugino, B. K., Johnson, D. A., Johnson, S. B., McGrath, M. T., Myers, K. L., Ristaino, J. B., Roberts, P. D., Secor, G., and Smart, C. D. 2015. Five Reasons to Consider *Phytophthora infestans* a Reemerging Pathogen. *Phytopathology.* 105:966–981
- Fu, Z. Q., and Dong, X. 2013. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:839–863
- Gaulin, E., Drame, N., Lafitte, C., Torto-Alalibo, T., Martinez, Y., Ameline-Torregrosa, C., Khatib, M., Mazarguil, H., Villalba-Mateos, F., Kamoun, S., Mazars, C., Dumas, B., Bottin, A., Esquerré-Tugayé, M.-T., and Rickauer, M. 2006. Cellulose Binding Domains of a *Phytophthora* Cell Wall Protein Are Novel Pathogen-Associated Molecular Patterns. *Plant Cell.* 18:1766–1777
- Gijzen, M., Ishmael, C., and Shrestha, S. D. 2014. Epigenetic control of effectors in plant pathogens.

- Gilroy, E. M., Breen, S., Whisson, S. C., Squires, J., Hein, I., Kaczmarek, M., Turnbull, D., Boevink, P. C., Lokossou, A., Cano, L. M., Morales, J., Avrova, A. O., Pritchard, L., Randall, E., Lees, A., Govers, F., van West, P., Kamoun, S., Vleeshouwers, V. G. A. A., Cooke, D. E. L., and Birch, P. R. J. 2011. Presence/absence, differential expression and sequence polymorphisms between PiAVR2 and PiAVR2-like in *Phytophthora infestans* determine virulence on R2 plants. *New Phytol.* 191:763–76
- Giraldo, M. C., and Valent, B. 2013. Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:800–814
- Gómez-Gómez, L., and Boller, T. 2000. FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell.* 5:1003–1011
- Goritschnig, S., Krasileva, K. V., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B. J. 2012. Computational prediction and molecular characterization of an oomycete effector and the cognate *Arabidopsis* resistance gene. *PLoS Genet.* 8
- Granke, L. L., Quesada-ocampo, L., and Hausbeck, M. K. 2012. Advances in Research on *Phytophthora capsici* on Vegetable Crops in The United States. *Plant Dis.* 95:1588–1600
- Grant, J. J., and Loake, G. J. 2000. Update on Signaling Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance 1. *Plant Mol. Biol.* 124:21–29
- Greenberg, J. T., and Yao, N. 2004. The role of regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 6:201–211
- Gust, A. A., Pruitt, R., and Nürnberger, T. 2017. Sensing Danger : Key to Activating Plant Immunity. 22:779–791
- Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H., Handsaker, R. E., Cano, L. M., Grabherr, M., Kodira, C. D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T. O., Ah-Fong, A. M., Alvarado, L., Anderson, V. L., Armstrong, M. R., Avrova, A., Baxter, L., Beyno, P., J., Phuntumart, V., Wawra, S., Weide, R., Win, J., and Young, C., Zhou, S., Fry, W., Meyers, B. C., van West, P., Ristaino, J., Govers, F., Birch, P. R., Whisson, S. C., Judelson, H. S., and Nusbaum, C. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature.* 461:393–398
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98
- Hausbeck, M. K., and Lamour, K. H. 2004. Research Progress and Management Challenges *Phytophthora capsici* on Vegetable Crops : *Plant Dis.* 88:1292–1303
- Haverkort, A. J., Boonekamp, P. M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L. A. P., Kessel, G. J. T., Visser, R. G. F., and Van Der Vossen, E. A. G. 2008. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Res.* 51:47–57

- Heese, A., Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A. M. E., He, K., Li, J., Schroeder, J. I., Peck, S. C., and Rathjen, J. P. 2007. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104:12217–12222
- Hématy, K., Cherk, C., and Somerville, S. 2009. Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:406–413
- Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A. L., Terauchi, R., and Kamoun, S. 2009. Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:115–122
- Hoorn, R. A. L. Van Der, and Kamoun, S. 2008. From Guard to Decoy : A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. 20:2009–2017
- Hu, J., Diao, Y., Zhou, Y., Lin, D., Bi, Y., Pang, Z., Fryxell, R. T., Liu, X., and Lamour, K. 2013. Loss of heterozygosity drives clonal diversity of *Phytophthora capsici* in China. *PLoS One.* 8:28–30
- Hurtado-González, O., Aragon-Caballero, L., Apaza-Tapia, W., Donahoo, R., and Lamour, K. 2008. Survival and spread of *Phytophthora capsici* in Coastal Peru. *Phytopathology.* 98:688–694
- Jacob, F., Vernaldi, S., and Maekawa, T. 2013. Evolution and conservation of plant NLR functions. *Front. Immunol.* 4:1–16
- Jiang, R. H. Y., Tripathy, S., Govers, F., and Tyler, B. M. 2008. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:4874–4879
- Jiang, R. H. Y., and Tyler, B. M. 2012. Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50:295–318
- Johal, G., and Briggs, S. 1992. Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. *Science (80- ).* 258:985–987
- Jones, J. D. G., Vance, R. E., and Dangl, J. L. 2016. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science (80- ).* 354
- Jones, J., and Dangl, J. 2006. The plant immune system. *Nature.* 444:323–329
- Judelson, H. S., Ah-Fong, A. M. V, Aux, G., Avrova, A. O., Bruce, C., Cakir, C., da Cunha, L., Grenville-Briggs, L., Latijnhouwers, M., Ligterink, W., Meijer, H. J. G., Roberts, S., Thurber, C. S., Whisson, S. C., Birch, P. R. J., Govers, F., Kamoun, S., van West, P., and Windass, J. 2008. Gene expression profiling during asexual development of the late blight pathogen *Phytophthora infestans* reveals a highly dynamic transcriptome. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 21:433–447
- 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
- Kamoun, S. 2006. A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:41–60

- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J. D. G., Judelson, H. S., Ali, G. S., Dalio, R. J. D., Roy, S. G., Schena, L., Zambounis, A., Panabières, F., Cahill, D., Ruocco, M., Figueiredo, A., Chen, X.-R., Hulvey, J., Stam, R., Lamour, K., Gijzen, M., Tyler, B. M., Grünwald, N. J., Mukhtar, M. S., Tomé, D. F. A., Tör, M., Van den Ackerveken, G., McDowell, J., Daayf, F., Fry, W. E., Lindqvist-Kreuzer, H., Meijer, H. J. G., Petre, B., Ristaino, J., Yoshida, K., Birch, P. R. J., and Govers, F. 2014. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 16:413–34
- Kaschani, F., Shabab, M., Bozkurt, T., Shindo, T., Schornack, S., Gu, C., Ilyas, M., Win, J., Kamoun, S., and van der Hoorn, R. A. L. 2010. An Effector-Targeted Protease Contributes to Defense against *Phytophthora infestans* and Is under Diversifying Selection in Natural Hosts. *Plant Physiol.* 154:1794–1804
- Kasuga, T., and Gijzen, M. 2013. Epigenetics and the evolution of virulence. *Trends Microbiol.* 21:575–582
- Katagiri, F., and Tsuda, K. 2010. Understanding the plant immune system. *Mol. plant-microbe Interact. MPMI.* 23:1531–1536
- Kellner, R., Bhattacharyya, A., Poppe, S., Hsu, T. Y., Brem, R. B., and Stukenbrock, E. H. 2014. Expression Profiling of the Wheat Pathogen *Zymoseptoria tritici* Reveals Genomic Patterns of Transcription and Host-Specific Regulatory Programs. *Genome Biol. Evol.* 6:1353–1365
- Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S. L. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat. Methods.* 12:357
- Kim, S., Park, M., Yeom, S.-I., Kim, Y.-M., Lee, J. M., Lee, H.-A., Seo, E., Choi, J., Cheong, K., Kim, K.-T., Jung, K., Lee, G.-W., Oh, S.-K., Bae, C., Kim, S.-B., Lee, H.-Y., Kim, S.-Y., Kim, M.-S., Kang, B.-C., Jo, Y. D., Yang, H.-B., Jeong, H.-J., Kang, W.-H., Kwon, J.-K., Shin, C., Lim, J. Y., Park, J. H., Huh, J. H., Kim, J.-S., Kim, B.-D., Cohen, O., Paran, I., Suh, M. C., Lee, S. B., Kim, Y.-K., Shin, Y., Noh, S.-J., Park, J., Seo, Y. S., Kwon, S.-Y., Kim, H. A., Park, J. M., Kim, H.-J., Choi, S.-B., Bosland, P. W., Reeves, G., Jo, S.-H., Lee, B.-W., Cho, H.-T., Choi, H.-S., Lee, M.-S., Yu, Y., Do Choi, Y., Park, B.-S., van Deynze, A., Ashrafi, H., Hill, T., Kim, W. T., Pai, H.-S., Ahn, H. K., Yeam, I., Giovannoni, J. J., Rose, J. K. C., Sørensen, I., Lee, S.-J., Kim, R. W., Choi, I.-Y., Choi, B.-S., Lim, J.-S., Lee, Y.-H., and Choi, D. 2014. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nat. Genet.* 46:270–278
- King, S. R. F., McLellan, H., Boevink, P. C., Armstrong, M. R., Bukharova, T., Sukarta, O., Win, J., Kamoun, S., Birch, P. R. J., and Banfield, M. J. 2014. *Phytophthora infestans* RXLR Effector PexRD2 Interacts with Host MAPKKK to Suppress Plant Immune Signaling. *Plant Cell.* 26:1345–1359
- Kopylova, E., Noé, L., and Touzet, H. 2012. SortMeRNA: Fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics.* 28:3211–3217

- Kourelis, J., and van der Hoorn, R. A. L. 2018. Defended to the Nines: 25 years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *Plant Cell*. 30:tpc.00579.2017
- Kushalappa, A. C., Yogendra, K. N., and Karre, S. 2016. Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci*. 35:38–55
- Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., Van Esse, H. P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B. P. H. J., Staskawicz, B., Jones, J. D. G., and Zipfel, C. 2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nat. Biotechnol*. 28:365–369
- Laloi, G., Vergne, E., Durel, C. E., Le Cam, B., and Caffier, V. 2017. Efficiency of pyramiding of three quantitative resistance loci to apple scab. *Plant Pathol*. 66:412–422
- Lamour, K. H., and Hausbeck, M. K. 2003. Effect of crop rotation on the survival of *Phytophthora capsici* and sensitivity to mefenoxam. *Plant Dis*. 12:841–845
- Lamour, K. H., Mudge, J., Gobena, D., Hurtado-Gonzales, O. P., Schmutz, J., Kuo, A., Miller, N. A., Rice, B. J., Raffaele, S., Cano, L. M., Bharti, A. K., Donahoo, R. S., Finley, S., Huitema, E., Hulvey, J., Platt, D., Salamov, A., Savidor, A., Sharma, R., Stam, R., Storey, D., Thines, M., Win, J., Haas, B. J., Dinwiddie, D. L., Jenkins, J., Knight, J. R., Affourtit, J. P., Han, C. S., Chertkov, O., Lindquist, E. A., Detter, C., Grigoriev, I. V., Kamoun, S., and Kingsmore, S. F. 2012a. Genome Sequencing and Mapping Reveal Loss of Heterozygosity as a Mechanism for Rapid Adaptation in the Vegetable Pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 25:1350–1360
- Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., and Huitema, E. 2012b. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant Pathol*. 13:329–337
- Lapin, D., and Van den Ackerveken, G. 2013. Susceptibility to plant disease: More than a failure of host immunity. *Trends Plant Sci*. 18:546–554
- Lee, H.-A., Kim, S.-Y., Oh, S.-K., Yeom, S.-I., Kim, S.-B., Kim, M.-S., Kamoun, S., and Choi, D. 2014. Multiple recognition of RXLR effectors is associated with nonhost resistance of pepper against *Phytophthora infestans*. *New Phytol*. 203:926–38
- Lee, J., Eschen-Lippold, L., Lassowskat, I., Bottcher, C., and Scheel, D. 2015. Cellular reprogramming through mitogen-activated protein kinases. *Front Plant Sci*. 6:940
- Lee, Y. H., Kim, H. S., Kim, J. Y., Jung, M., Park, Y. S., Lee, J. S., Choi, S. H., Her, N. H., Lee, J. H., Hyung, N. I., Lee, C. H., Yang, S. G., and Harn, C. H. 2004. A new selection method for pepper transformation: Callus-mediated shoot formation. *Plant Cell Rep*. 23:50–58
- Lefebvre, V., and Palloix, A. 1996. Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: A case study , the interaction pepper - *Phytophthora capsici* Leonian. *Theor. Appl. Genet*. 93:503–511
- Lévesque, C. A., Brouwer, H., Cano, L., Hamilton, J. P., Holt, C., Huitema, E., Raffaele, S., Robideau, G.

- P., Thines, M., Win, J., Zerillo, M. M., Beakes, G. W., Boore, J. L., Busam, D., Dumas, B., Ferriera, S., Fuerstenberg, S. I., Gachon, C. M. M., Gaulin, E., Govers, F., Grenville-Briggs, L., Horner, N., Hostetler, J., Jiang, R. H. Y., Johnson, J., Krajaejun, T., Lin, H., Meijer, H. J. G., Moore, B., Morris, P., Phuntmart, V., Puiu, D., Shetty, J., Stajich, J. E., Tripathy, S., Wawra, S., van West, P., Whitty, B. R., Coutinho, P. M., Henrissat, B., Martin, F., Thomas, P. D., Tyler, B. M., De Vries, R. P., Kamoun, S., Yandell, M., Tisserat, N., and Buell, C. R. 2010. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biol.* 11
- Liao, Y., Smyth, G. K., and Shi, W. 2014. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 30:923–930
- Lin, Y., Golovkina, K., Chen, Z.-X., Lee, H. N., Negron, Y. L. S., Sultana, H., Oliver, B., and Harbison, S. T. 2016. Comparison of normalization and differential expression analyses using RNA-Seq data from 726 individual *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics.* 17:28
- Links, M. G., Holub, E., Jiang, R. H. Y., Sharpe, A. G., Hegedus, D., Beynon, E., Sillito, D., Clarke, W. E., Uzuhashi, S., and Borhan, M. H. 2011. De novo sequence assembly of *Albugo candida* reveals a small genome relative to other biotrophic oomycetes. *BMC Genomics.* 12
- Liu, T., Ye, W., Ru, Y., Yang, X., Gu, B., Tao, K., Lu, S., Dong, S., Zheng, X., Shan, W., Wang, Y., and Dou, D. 2011. Two Host Cytoplasmic Effectors Are Required for Pathogenesis of *Phytophthora sojae* by Suppression of Host Defenses. *Plant Physiol.* 155:490–501
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods.* 25:402–408
- Loake, G., and Grant, M. 2007. Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:466–472
- Lodha, T. D., and Basak, J. 2012. Plant-pathogen interactions: What microarray tells about it? *Mol. Biotechnol.* 50:87–97
- Lokossou, A. A., Park, T., van Arkel, G., Arens, M., Ruyter-Spira, C., Morales, J., Whisson, S. C., Birch, P. R. J., Visser, R. G. F., Jacobsen, E., and van der Vossen, E. A. G. 2009. Exploiting Knowledge of *R/Avr* Genes to Rapidly Clone a New LZ-NBS-LRR Family of Late Blight Resistance Genes from Potato Linkage Group IV. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:630–641
- Malinovsky, F. G., Fangel, J. U., and Willats, W. G. T. 2014. The role of the cell wall in plant immunity. *Front. Plant Sci.* 5:1–12
- Mallard, S., Cantet, M., Massire, A., Bachellez, A., Ewert, S., and Lefebvre, V. 2013. A key QTL cluster is conserved among accessions and exhibits broad-spectrum resistance to *Phytophthora capsici*: A valuable locus for pepper breeding. *Mol. Breed.* 32:349–364

- McCarthy, D. J., Chen, Y., and Smyth, G. K. 2012. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* 40:4288–4297
- McDonald, B. A., and Linde, C. 2002. Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential, And Durable Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:349–379
- McLellan, H., Boevink, P. C., Armstrong, M. R., Pritchard, L., Gomez, S., Morales, J., Whisson, S. C., Beynon, J. L., and Birch, P. R. J. 2013. An RxLR Effector from *Phytophthora infestans* Prevents Re-localisation of Two Plant NAC Transcription Factors from the Endoplasmic Reticulum to the Nucleus. *PLoS Pathog.* 9
- Meijer, H. J. G., Hassen, H. H., and Govers, F. 2011. *Phytophthora infestans* has a plethora of phospholipase D enzymes including a subclass that has extracellular activity. *PLoS One.* 6:1–12
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S. Y. 2006. Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell.* 126:969–980
- Meyer, F. E., Shuey, L. S., Naidoo, S., Mamni, T., Berger, D. K., Myburg, A. A., van den Berg, N., and Naidoo, S. 2016. Dual RNA-Sequencing of *Eucalyptus nitens* during *Phytophthora cinnamomi* Challenge Reveals Pathogen and Host Factors Influencing Compatibility. *Front. Plant Sci.* 7:1–15
- Moore, J. W., Loake, G. J., and Spoel, S. H. 2011. Transcription Dynamics in Plant Immunity. 23:2809–2820
- Mukhtar, M. S., Carvunis, A., Dreze, M., Epple, P., Steinbrenner, J., Moore, J., Tasan, M., Galli, M., Hao, T., Nishimura, M. T., Pevzner, S. J., Donovan, S. E., Ghamsari, L., Santhanam, B., Romero, V., Poulin, M. M., Gebreab, F., Gutierrez, B. J., Tam, S., Monachello, D., Boxem, M., Harbort, C. J., McDonald, N., Gai, L., Chen, H., He, Y., Union, E., Consortium, E., Vandenhoute, J., Roth, F. P., Hill, D. E., Ecker, J. R., Vidal, M., and Beynon, J. 2011. Plant Immune System Network. *Science* (80-. ). :596–601
- Mundt, C. C. 2014. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. *Infect. Genet. Evol.* 27:446–455
- Na, R., and Gijzen, M. 2016. Escaping Host Immunity: New Tricks for Plant Pathogens. *PLoS Pathog.* 12:1–6
- Navarro, L., Navarro, L., Zipfel, C., Zipfel, C., Rowland, O., Rowland, O., Keller, I., Keller, I., Robatzek, S., Robatzek, S., Boller, T., Boller, T., Jones, J. D. G., and Jones, J. D. G. 2004. The Transcriptional Innate Immune Response to g22. Interplay and Overlap with Avr Gene-Dependent Defense Responses and Bacterial Pathogenesis. *Plant Physiol.* 135:1113–1128
- Nespoulous, C., Gaudemer, O., Huet, J. C., and Pernollet, J. C. 1999. Characterization of elicitor-like phospholipases isolated from *Phytophthora capsici* culture filtrate. *FEBS Lett.* 452:400–406
- Nicolaï, M., Cantet, M., Lefebvre, V., Sage-Palloix, A. M., and Palloix, A. 2013. Genotyping a large collection of pepper (*Capsicum* spp.) with SSR loci brings new evidence for the wild origin of

- cultivated *C. annuum* and the structuring of genetic diversity by human selection of cultivar types. *Genet. Resour. Crop Evol.* 60:2375–2390
- 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
- Oh, S.-K., Young, C., Lee, M., Oliva, R., Bozkurt, T. O., Cano, L. M., Win, J., Bos, J. I. B., Liu, H.-Y., van Damme, M., Morgan, W., Choi, D., Van der Vossen, E. A. G., Vleeshouwers, V. G. A. A., and Kamoun, S. 2009. In Planta Expression Screens of *Phytophthora infestans* RXLR Effectors Reveal Diverse Phenotypes, Including Activation of the *Solanum bulbocastanum* Disease Resistance Protein Rpi-blb2. *Plant Cell Online.* 21:2928–2947
- Ospina-Giraldo, M. D., Griffith, J. G., Laird, E. W., and Mingora, C. 2010. The CAZyme of *Phytophthora* spp.: a comprehensive analysis of the gene complement coding for carbohydrate-active enzymes in species of the genus *Phytophthora*. *BMC Genomics.* 11:525
- Pais, M., Win, J., Yoshida, K., Etherington, G. J., Cano, L. M., Raffaele, S., Banfield, M. J., Jones, A., Kamoun, S., and Go Saunders, D. 2013. From pathogen genomes to host plant processes: the power of plant parasitic oomycetes. *Genome Biol.* 14:211
- Palloix, A., Ayme, V., and Moury, B. 2009. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytol.* 183:190–199
- Palma-Guerrero, J., Ma, X., Torriani, S. F. F., Zala, M., Francisco, C. S., Hartmann, F. E., Croll, D., and McDonald, B. A. 2017. Comparative Transcriptome Analyses in *Zymoseptoria tritici* Reveal Significant Differences in Gene Expression Among Strains During Plant Infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 30:231–244
- Papaïx, J., Goyeau, H., Du Cheyron, P., Monod, H., and Lannou, C. 2011. Influence of cultivated landscape composition on variety resistance: An assessment based on wheat leaf rust epidemics. *New Phytol.* 191:1095–1107
- Parlevliet, J. E. 2002. Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica.* 124:147–156
- Pel, M. J. C., Wintermans, P. C. A., Cabral, A., Robroek, B. J. M., Seidl, M. F., Bautor, J., Parker, J. E., Van den Ackerveken, G., and Pieterse, C. M. J. 2014. Functional Analysis of *Hyaloperonospora arabidopsidis* RXLR Effectors. *PLoS One.* 9:e110624
- Pemberton, C. L., and Salmond, G. P. C. 2004. The Nep1-like proteins - A growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Mol. Plant Pathol.* 5:353–359
- Pilet-Nayel, M.-L., Moury, B., Caffier, V., Montarry, J., Kerlan, M.-C., Fournet, S., Durel, C.-E., and Delourme, R. 2017. Quantitative Resistance to Plant Pathogens in Pyramiding Strategies for Durable Crop Protection. *Front. Plant Sci.* 8:1–9

- 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
- 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
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155:945–959
- Qiao, Y., Liu, L., Xiong, Q., Flores, C., Wong, J., Shi, J., Wang, X., Liu, X., Xiang, Q., Jiang, S., Zhang, F., Wang, Y., Judelson, H. S., Chen, X., and Ma, W. 2013. Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors. *Nat. Genet.* 45:330
- Qiao, Y., Shi, J., Zhai, Y., Hou, Y., and Ma, W. 2015. *Phytophthora* effector targets a novel component of small RNA pathway in plants to promote infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112:5850–5855
- Quesada-Ocampo, L. M., and Hausbeck, M. K. 2010. Resistance in Tomato and Wild Relatives to Crown and Root Rot Caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology.* 100:619–627
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., and Lopez, R. 2005. InterProScan: Protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.* 33:116–120
- Quinlan, A. R., and Hall, I. M. 2010. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 26:841–842
- Quinn, L., O’Neill, P. A., Harrison, J., Paskiewicz, K. H., Mccracken, A. R., Cooke, L. R., Grant, M. R., and Studholme, D. J. 2013. Genome-wide sequencing of *Phytophthora lateralis* reveals genetic variation among isolates from Lawson cypress (*Chamaecyparis lawsoniana*) in Northern Ireland. *FEMS Microbiol. Lett.* 344:179–185
- R Core Team. 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Raffaele, S., and Kamoun, S. 2012. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nat. Rev. Microbiol.* 10:417–430
- Rajput, N. A., Zhang, M., Ru, Y., Liu, T., Xu, J., Liu, L., Mafurah, J. J., and Dou, D. 2014. *Phytophthora sojae* effector PsCRN70 suppresses plant defenses in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One.* 9
- Rehmany, A. P. 2005. Differential Recognition of Highly Divergent Downy Mildew Avirulence Gene Alleles by RPP1 Resistance Genes from Two Arabidopsis Lines. *Plant Cell Online.* 17:1839–1850
- Richards, T. A., Dacks, J. B., Jenkinson, J. M., Thornton, C. R., and Talbot, N. J. 2006. Report Evolution of Filamentous Plant Pathogens : Gene Exchange across Eukaryotic Kingdoms. :1857–1864
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 26:139–140
- Roesch, L. F. W., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K. M., Kent, A. D., Daroub, S. H., Camargo, F. A. O., Farmerie, W. G., and Triplett, E. W. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* 1:283–290

- Rose, J. K., Ham, K. S., Darvill, A. G., and Albersheim, P. 2002. Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell*. 14:1329–1345
- Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balagué, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., Roby, D., and Raffaele, S. 2014. Resistance to phytopathogens e tutti quanti: Placing plant quantitative disease resistance on the map. *Mol. Plant Pathol.* 15:427–432
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovsky, F. G., Tör, M., de Vries, S., and Zipfel, C. 2011. The *Arabidopsis* Leucine-Rich Repeat Receptor–Like Kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 Are Required for Innate Immunity to Hemibiotrophic and Biotrophic Pathogens. *Plant Cell*. 23:2440–2455
- Sage-Palloix, A. M., Jourdan, F., Phaly, T., Nemouchi, G., Lefebvre, V., Palloix, A., and others. 2007. Analysis of diversity in pepper genetic resources: distribution of horticultural and resistance traits in the INRA pepper germplasm. Pages 33–42 in: *Progress in research on capsicum and eggplant. Proceedings of the XIIIth EUCARPIA Meeting, Warsaw, Poland, 5-7 September 2007*,
- Sapoukhina, N., Paillard, S., Dedryver, F., and de Vallavieille-Pope, C. 2013. Quantitative plant resistance in cultivar mixtures: Wheat yellow rust as a modeling case study. *New Phytol.* 200:888–897
- Savory, E. A., Adhikari, B. N., Hamilton, J. P., Vaillancourt, B., Buell, C. R., and Day, B. 2012. MRNA-seq analysis of the *Pseudoperonospora cubensis* transcriptome during cucumber (*Cucumis sativus* L.) infection. *PLoS One*. 7
- Schorneck, S., van Damme, M., 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
- Schorneck, S., Huitema, E., Cano, L. M., Bozkurt, T. O., Oliva, R., Van Damme, M., Schwizer, S., Raffaele, S., Chaparro-Garcia, A., Farrer, R., Segretin, M. E., Bos, J., Haas, B. J., Zody, M. C., Nusbaum, C., Win, J., Thines, M., and Kamoun, S. 2009. Ten things to know about oomycete effectors. *Mol. Plant Pathol.* 10:795–803
- Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A. K., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., Felix, G., and Chinchilla, D. 2010. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J. Biol. Chem.* 285:9444–9451
- Séjalon-Delmas, N., Mateos, F. V., Bottin, a, Rickauer, M., Dargent, R., and Esquerré-Tugayé, M. T. 1997. Purification, Elicitor Activity, and Cell Wall Localization of a Glycoprotein from *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, a Fungal Pathogen of Tobacco. *Phytopathology*. 87:899–909
- Seybold, H., Trempel, F., Ranf, S., Scheel, D., Romeis, T., and Lee, J. 2014. Ca<sup>2+</sup> signalling in plant

- immune response: From pattern recognition receptors to Ca<sup>2+</sup> decoding mechanisms. *New Phytol.* 204:782–790
- Sharma, R., Xia, X., Cano, L. M., Evangelisti, E., Kemen, E., Judelson, H., Oome, S., Sambles, C., van den Hoogen, D. J., Kitner, M., Klein, J., Meijer, H. J. G., Spring, O., Win, J., Zipper, R., Bode, H. B., Govers, F., Kamoun, S., Schornack, S., Studholme, D. J., Van den Ackerveken, G., and Thines, M. 2015. Genome analyses of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii* provide insights into effector evolution in downy mildews and *Phytophthora*. *BMC Genomics.* 16:741
- Sharpee, W. C., and Dean, R. A. 2016. Form and function of fungal and oomycete effectors. *Fungal Biol. Rev.* 30:62–73
- 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
- Shi, J., Choi, D., Kim, B. D., and Kang, B. C. 2008. Study on inheritance of potato virus X resistance in *Capsicum annuum*. *Plant Pathol. J.* 24:433–438
- Silvar, C., Merino, F., Díaz, J., Animal, D. D. B., Vexetal, B., and Campus, C. 2006. Diversity of *Phytophthora capsici* in Northwest Spain : Analysis of Virulence , Metalaxyl Response , and Molecular Characterization. *Plant Dis.* 90:1135–1142
- Sohn, K. H., Lei, R., Nemri, A., and Jones, J. D. G. 2007. The Downy Mildew Effector Proteins ATR1 and ATR13 Promote Disease Susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Online.* 19:4077–4090
- Sonah, H., Zhang, X., Deshmukh, R. K., Borhan, M. H., Fernando, W. G. D., and Bélanger, R. R. 2016. Comparative Transcriptomic Analysis of Virulence Factors in *Leptosphaeria maculans* during Compatible and Incompatible Interactions with Canola. *Front. Plant Sci.* 7
- St.Clair, D. A. 2010. Quantitative Disease Resistance and Quantitative Resistance Loci in Breeding. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:247–268
- Stam, R., Jupe, J., Howden, A. J. M., Morris, J. A., Boevink, P. C., Hedley, P. E., and Huitema, E. 2013a. Identification and Characterisation CRN Effectors in *Phytophthora capsici* Shows Modularity and Functional Diversity. *PLoS One.* 8:e59517
- Stam, R., Motion, G. B., and Boevink, P. C. 2013b. A conserved oomycete CRN effector targets and modulates tomato TCP14-2 to enhance virulence. *bioRxiv.* :001248
- Stefanato, F. L., Abou-Mansour, E., Buchala, A., Kretschmer, M., Mosbach, A., Hahn, M., Bochet, C. G., Métraux, J. P., and Schoonbeek, H. J. 2009. The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* exports camalexin and is a virulence factor on *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 58:499–510
- Storey, D. B. 2014. World Wide Diversity of *Phytophthora capsici*. Univ. Tennessee.
- Sun Y., Li L., Macho A. P., Han Z., Hu Z., Zipfel C., Zhou J.-M., C. J. 2013. Structural Basis for flg22-Induced Activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 Immune Complex. *Science (80- ).* 342:624–

- T. Y. Toruño, I. S., and Coaker, G. 2016. HHS Public Access. *Annu. Rev. Phytopathol.* 14:419–441
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., and Katagiri, F. 2003. Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell.* 15:317–30
- Thabuis, A., Palloix, A., Pflieger, S., Daubèze, A. M., Caranta, C., and Lefebvre, V. 2003. Comparative mapping of *Phytophthora* resistance loci in pepper germplasm: Evidence for conserved resistance loci across Solanaceae and for a large genetic diversity. *Theor. Appl. Genet.* 106:1473–1485
- Thines, M. 2014. Phylogeny and evolution of plant pathogenic oomycetes—a global overview. *Eur. J. Plant Pathol.* 138:431–447
- Thomma, B. P. H. J., Nürnberger, T., and Joosten, M. H. A. J. 2011. Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *Plant Cell.* 23:4–15
- Tian, M., Benedetti, B., and Kamoun, S. 2005. A Second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiol.* 138:1785–93
- Tian, M., Huitema, E., Da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., and Kamoun, S. 2004. A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J. Biol. Chem.* 279:26370–26377
- Tian, M., Win, J., Song, J., van der Hoorn, R., van der Knaap, E., and Kamoun, S. 2006. A *Phytophthora infestans* Cystatin-Like Protein Targets a Novel Tomato Papain-Like Apoplastic Protease. *Plant Physiol.* 143:364–377
- Torres, M. A., Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141:373–378
- Torto, T. a, Li, S., Styer, A., Huitema, E., Testa, A., Gow, N. a R., West, P. Van, Gow, a R., and Kamoun, S. 2003. EST Mining and Functional Expression Assays Identify Extracellular Effector Proteins From the Plant Pathogen *Phytophthora* EST Mining and Functional Expression Assays Identify Extracellular Effector Proteins From the Plant Pathogen *Phytophthora*. Cold Spring Harb. Lab. Press. :1675–1685
- Truong, H. T. H., Kim, K. T., Kim, D. W., Kim, S., Chae, Y., Park, J. H., Oh, D. G., and Cho, M. C. 2012. Identification of isolate-specific resistance QTLs to phytophthora root rot using an intraspecific recombinant inbred line population of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Pathol.* 61:48–56
- Tsuda, K., and Katagiri, F. 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13:459–465
- Tsuda, K., Mine, A., Bethke, G., Igarashi, D., Botanga, C. J., Tsuda, Y., Glazebrook, J., Sato, M., and

- Katagiri, F. 2013. Dual Regulation of Gene Expression Mediated by Extended MAPK Activation and Salicylic Acid Contributes to Robust Innate Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 9
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., and Katagiri, F. 2009. Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet.* 5
- Tyler, B. M., Tripathy, S., Zhang, X. M., Dehal, P., Jiang, R. H. Y., Aerts, A., Arredondo, F. D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J. L., Chapman, J., Damasceno, C. M. B., Dorrance, A. E., Dou, D. L., Dickerman, A. W., Dubchak, I. L., Garbelotto, M., G, J. L. 2006. *Phytophthora* Genome Sequences Uncover Evolutionary Origins and Mechanisms of Pathogenesis. *Science* (80-. ). 313:1261–1266
- Tyler, B. M. 2006. *Phytophthora* Genome Sequences Uncover Evolutionary Origins and Mechanisms of Pathogenesis. *Science* (80-. ). 313:1261–1266
- Underwood, W., Zhang, S., and He, S. Y. 2007. The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 52:658–672
- Vega-Arreguín, J. C., Jalloh, A., Bos, J. I., and Moffett, P. 2014. Recognition of an Avr3a Homologue Plays a Major Role in Mediating Nonhost Resistance to *Phytophthora capsici* in *Nicotiana* Species. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 27:770–80
- Vleeshouwers, V. G. A. A., and Oliver, R. P. 2014a. Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27:196–206
- Vleeshouwers, V. G. A. A., and Oliver, R. P. 2014b. Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* MPMI. 27:196–206
- Vleeshouwers, V. G. A. A., Raffaele, S., Vossen, J. H., Champouret, N., Oliva, R., Segretin, M. E., Rietman, H., Cano, L. M., Lokossou, A., Kessel, G., Pel, M. A., and Kamoun, S. 2011. Understanding and Exploiting Late Blight Resistance in the Age of Effectors. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:507–531
- Vleeshouwers, V. G. A. A., Rietman, H., Krenek, P., Champouret, N., Young, C., Oh, S.-K., Wang, M., Bouwmeester, K., Vosman, B., Visser, R. G. F., Jacobsen, E., Govers, F., Kamoun, S., and Van der Vossen, E. A. G. 2008. Effector Genomics Accelerates Discovery and Functional Profiling of Potato Disease Resistance and *Phytophthora infestans* Avirulence Genes. *PLoS One.* 3:e2875
- 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
- Wang, Y., and Wang, Y. 2018. Trick or Treat: Microbial Pathogens Evolved Apoplastic Effectors

- Modulating Plant Susceptibility to Infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 31:6–12
- Wasternack, C., and Hause, B. 2013. Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* 111:1021–1058
- Wawra, S., Belmonte, R., Löbach, L., Saraiva, M., Willems, A., and van West, P. 2012. Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* 15:685–691
- Weßling, R., Epple, P., Altmann, S., He, Y., Yang, L., Henz, S. R., McDonald, N., Wiley, K., Bader, K. C., Gläßer, C., Mukhtar, M. S., Haigis, S., Ghamsari, L., Stephens, A. E., Ecker, J. R., Vidal, M., Jones, J. D. G., Mayer, K. F. X., Ver Loren Van Themaat, E., Weigel, D., Schulze-Lefert, P., Dangl, J. L., Panstruga, R., and Braun, P. 2014. Convergent targeting of a common host protein-network by pathogen effectors from three kingdoms of life. *Cell Host Microbe.* 16:364–375
- Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., Armstrong, M. R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I. K., Pritchard, L., and Birch, P. R. J. 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature.* 450:115–118
- Wickham, H. 2016. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer.
- Win, J., Chaparro-Garcia, a, Belhaj, K., Saunders, D. G. O., Yoshida, K., Dong, S., Schornack, S., Zipfel, C., Robatzek, S., Hogenhout, S. a, and Kamoun, S. 2012. Effector Biology of Plant-Associated Organisms: Concepts and Perspectives. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 77:235–47
- Win, J., and Kamoun, S. 2007. Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Plant Signal. Behav.* 3:251–253
- Wirthmueller, L., Zhang, Y., Jones, J. D. G., and Parker, J. E. 2007. Nuclear Accumulation of the Arabidopsis Immune Receptor RPS4 Is Necessary for Triggering EDS1-Dependent Defense. *Curr. Biol.* 17:2023–2029
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., De Luca, V., and Després, C. 2012. The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Rep.* 1:639–647
- Yaeno, T., Li, H., Chaparro-Garcia, A., Schornack, S., Koshiba, S., Watanabe, S., Kigawa, T., Kamoun, S., and Shirasu, K. 2011. Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108:14682–14687
- Yamaguchi, Y., and Huffaker, A. 2011. Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14:351–357
- Ye, W., Wang, X., Tao, K., Lu, Y., Dai, T., Dong, S., Dou, D., Gijzen, M., and Wang, Y. 2011. Digital gene expression profiling of the *Phytophthora sojae* transcriptome. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*

- Yi, M., and Valent, B. 2013. Communication Between Filamentous Pathogens and Plants at the Biotrophic Interface. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:587–611
- Yin, J., Gu, B., Huang, G., Tian, Y., Quan, J., Lindqvist-Kreuze, H., and Shan, W. 2017. Conserved RXLR Effector Genes of *Phytophthora infestans* Expressed at the Early Stage of Potato Infection Are Suppressive to Host Defense. *Front. Plant Sci.* 8:1–11
- Yoo, H. S., and Cooper, T. G. 1991. Sequences of two adjacent genes, one (DALZ) encoding allantoinase nitrogen-catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* and another (DCGI) sensitive to. *Gene.* 104:55–62
- Zenbayashi-Sawata, K., Fukuoka, S., Katagiri, S., Fujisawa, M., Matsumoto, T., Ashizawa, T., and Koizumi, S. 2007. Genetic and Physical Mapping of the Partial Resistance Gene, *Pi34*, to Blast in Rice. *Phytopathology.* 97:598–602
- Zhan, J., Thrall, P. H., Papaïx, J., Xie, L., and Burdon, J. J. 2015. Playing on a Pathogen's Weakness: Using Evolution to Guide Sustainable Plant Disease Control Strategies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53:19–43
- Zhang, D., Burroughs, A. M., Vidal, N. D., Iyer, L. M., and Aravind, L. 2016. Transposons to toxins: The provenance, architecture and diversification of a widespread class of eukaryotic effectors. *Nucleic Acids Res.* 44:3513–3533
- Zhang, M., and Coaker, G. 2017. Harnessing Effector-Triggered Immunity for Durable Disease Resistance. *Phytopathology.* 107:912–919
- Zhang, M., Li, Q., Liu, T., Liu, L., Shen, D., Zhu, Y., Liu, P., Zhou, J.-M., and Dou, D. 2015. Two Cytoplasmic Effectors of *Phytophthora sojae* Regulate Plant Cell Death via Interactions with Plant Catalases. *Plant Physiol.* 167:164–175
- Zhang, Y., Lubberstedt, T., and Xu, M. 2013. The Genetic and Molecular Basis of Plant Resistance to Pathogens. *J. Genet. Genomics.* 40:23–35
- Zhao, J. 2015. Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defence response: From protein-protein and lipid-protein interactions to hormone signalling. *J. Exp. Bot.* 66:1721–1736
- Zheng, X., McLellan, H., Fraiture, M., Liu, X., Boevink, P. C., Gilroy, E. M., Chen, Y., Kandel, K., Sessa, G., Birch, P. R. J., and Brunner, F. 2014. Functionally redundant RXLR effectors from *Phytophthora infestans* act at different steps to suppress early flg22-triggered immunity. *PLoS Pathog.* 10:e1004057
- Zipfel, C. 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35:345–351
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G., and Boller, T. 2004. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature.* 428:764–767
- Zuluaga, A. P., Vega-Arregu??n, J. C., Fei, Z., Matas, A. J., Patev, S., Fry, W. E., and Rose, J. K. C. 2016.

Analysis of the tomato leaf transcriptome during successive hemibiotrophic stages of a compatible interaction with the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Pathol.* 17:42–54

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. 2015. Transcriptional dynamics of *Phytophthora infestans* during sequential stages of hemibiotrophic infection of tomato. *Mol. Plant Pathol.* :n/a-n/a



## **Identification et exploitation des effecteurs de *Phytophthora capsici* pour accélérer le développement de résistances variétales durables chez le piment**

Les plantes ont développé des mécanismes de défense complexes pour se prémunir de l'attaque des agents pathogènes. Ces mécanismes conduisent à des résistances pouvant être partielles ou totales. Les agents pathogènes codent des effecteurs de pathogénicité qui perturbent ces mécanismes et permettent ainsi leur développement au sein de la plante. Les effecteurs sont des protéines diverses, souvent à évolution rapide et à l'origine du contournement des résistances. Les approches de pathogénomiques, telles que les études transcriptomiques et les criblages à haut-débit de plantes par des effecteurs, renseignent sur les fonctions assurées par les effecteurs et leur rôle dans le contournement des résistances. Les résistances quantitatives sont supposées être plus durables, même si des événements de contournement ont été décrits dans la littérature. Cette thèse, centrée sur l'étude des effecteurs de *Phytophthora capsici* vis-à-vis du piment (*Capsicum annuum*) et de la tomate (*Solanum lycopersicum*), s'articule autour de 3 chapitres de résultats. Le Chapitre I traite des effets du génotype de l'hôte sur les mécanismes moléculaires déployés par *Phytophthora capsici*. J'ai comparé les profils transcriptomiques de deux isolats de *P. capsici*, contrastés par leur niveau d'agressivité sur le piment, pendant leur interaction avec deux génotypes de piment, contrastés par leur niveau de résistance. Ces comparaisons ont révélé des différentiels d'expression pour des gènes associés au transport et au métabolisme et pour des gènes codant des effecteurs. Dans le Chapitre II, l'activité d'avirulence des effecteurs cytoplasmiques détectés différemment exprimés dans le chapitre précédent a été testée. Le criblage des effecteurs *via* un pipeline d'expression transitoire *in planta* a révélé le lien entre les différences d'expression et leur capacité à induire les réponses immunitaires des plantes. Le Chapitre III s'intéresse à l'analyse de la diversité des effecteurs. J'ai utilisé des données transcriptomiques issues du séquençage d'ARN de 33 isolats, provenant de différentes régions géographiques et collectés sur différents hôtes, prélevés à 24 et 72 heures après infection d'un génotype de tomate sensible. Les effecteurs montrent des niveaux élevés de diversité mais les isolats ne se structurent pas significativement selon l'hôte sur lequel ils ont été collectés. Cette étude transcriptomique a révélé 53 effecteurs « core » exprimés. Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse permettent d'approfondir notre connaissance de l'interaction entre *P. capsici* et le piment ou la tomate, et fournissent des outils aux sélectionneurs pour développer des résistances plus durables.

**Mots clés :** effecteurs – transcriptomique – expression transitoire *in planta* – *Phytophthora capsici* – *Capsicum annuum* – *Solanum lycopersicum*