



HAL
open science

**Dissection transcriptomique de la biologie de
Leptosphaeria maculans lors de ses interactions avec son
hôte (le colza) et avec un membre du complexe
d'espèces, Leptosphaeria biglobosa**

Elise Gay

► **To cite this version:**

Elise Gay. Dissection transcriptomique de la biologie de *Leptosphaeria maculans* lors de ses interactions avec son hôte (le colza) et avec un membre du complexe d'espèces, *Leptosphaeria biglobosa*. Phytopathologie et phytopharmacie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASB015 . tel-03191632

HAL Id: tel-03191632

<https://theses.hal.science/tel-03191632>

Submitted on 7 Apr 2021

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.

Dissection transcriptomique de la biologie de *Leptosphaeria maculans* lors de ses interactions avec son hôte (le colza) et avec un membre du complexe d'espèces, *Leptosphaeria biglobosa*

Transcriptomic dissection of the biology of *Leptosphaeria maculans* during its interactions with its host (oilseed rape) and with a member of the species complex *Leptosphaeria biglobosa*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 567 : Sciences du Végétal : du gène à l'écosystème (SEVE)

Spécialité de doctorat : biologie

Unité de recherche : INRA-AgroParisTech, UMR BIOGER, Avenue Lucien Brétignières
78850 Thiverval-Grignon, France

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 18 mars 2021, par

Elise GAY

Composition du Jury

Jacqui SHYKOFF

Directrice de recherche, CNRS, Université Paris-Saclay

Présidente du Jury

Claire VENEULT-FOURREY

Directrice de recherche, HDR, INRAE, Université de Lorraine

Rapporteuse &

Examinatrice

Daniel CROLL

Professeur, Université de Neuchatel

Rapporteur &

Examineur

Benjamin PETRE

Assistant professeur, INRAE, Université de Lorraine

Examineur

Sébastien FAURE

Chef de projet, Innolea

Examineur

Direction de la thèse

Marie-Hélène BALESDENT

Directrice de recherche, INRAE, Université Paris-Saclay

Directrice de thèse

Nicolas LAPALU

Ingénieur d'étude, INRAE, Université Paris-Saclay

Co-encadrant de thèse

Remerciements :

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux encadrants de thèse Marie-Hélène Balesdent et Thierry Rouxel pour m'avoir accueilli dans l'équipe EPLM et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Un grand merci pour votre disponibilité, votre bienveillance et les discussions parfois casse-tête mais très enrichissantes scientifiquement. Merci aussi de m'avoir fait confiance pour affronter et décortiquer ce gros jeu de données, en me laissant une part d'autonomie tout en apportant vos solutions et conseils dans les moments de doute. Et enfin, merci pour tous les extras, les sorties au champ, les formations, les congrès, et les pauses café dans la bonne humeur. Ceux-ci se sont fait plus rares en cette dernière année sous pandémie mais cela ne m'a pas empêché de me sentir épaulée.

Merci à mon co-encadrant de thèse, Nicolas Lapalu. Ta pédagogie, ton aide en bio-informatique, et tes formations Python m'ont fait beaucoup progresser sur les bonnes pratiques à adopter. Merci aussi pour ta disponibilité sur les questions scientifiques et les diverses relectures d'articles, de scripts ou chapitres de thèse.

Je voudrais remercier Daniel Croll et Claire Veneault-Fourrey d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse et Sébastien Faure, Jacqui Shykoff et Benjamin Petre d'avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance. Merci aussi aux membres de mon comité de thèse, Sébastien Duplessis, Guillem Rigail, Thomas Kroj, Sylvain Raffaele pour leur précieux conseils lors des comités de thèse et Guillem, pour ton aide sur les bonnes pratiques d'utilisation des packages R pour les analyses RNA-Seq.

Merci aux collaborateurs et copilotes du projet LeptoLife, aux membres de l'unité IGEPP à Rennes : Régine Delourme et Antoine Gravot pour votre aide et vos expertises précieuses sur les analyses des données côté plante. Merci aussi aux membres du Génoscope : Jean-Marc Aury, Corinne Cruaud, Corinne Da Silva et ex-membre Fabien Dutreux pour avoir réalisé tous les séquençages, et généré les données génomiques et transcriptomiques et pour avoir suivi mon travail au-delà de l'aspect purement technique.

Un grand merci à tous les membres permanents de l'équipe Lepto (Isabelle, Jessica, Bénédicte, Françoise, Michel, Laurent, Angélique, Noémie, Valérie, Anaïs et Thinh-Suong). Tout le monde et chacun dans son domaine est toujours disponible pour apporter un coup de main, un avis, participer à une réflexion, ou tout simplement apporter un soutien moral. Toujours dans la bonne humeur et l'entraide je n'ai pas vu passer ces quatre années en votre compagnie ! Merci à Valérie et Noémie pour leur aide très précieuse sur les aspects qPCR.

Remerciement spécial aux doctorants(es) Audren, Nacera (et ex-doctorant, Colin) de l'équipe pour avoir partagé à mes côtés l'aventure qu'est la thèse mais aussi d'autres très bons moments à BIOGER et ailleurs (jusque sur un autre continent !).

Je n'oublierai pas non plus les grandes discussions parfois houleuses et parfois loufoques mais, pour sûr, qui changent les idées, au cours des repas, des cafés et des sorties extra-biogeroises avec les membres de l'unité (anciens et nouveaux).

Un grand merci à tous les biogerois et biogeroises, les services communs, les membres des différents plateaux et les membres des différentes équipes pour votre accueil, votre disponibilité et pour votre aide technique et scientifique.

Enfin un grand merci à Joël, à ma famille et mes ami(e)s (du sud et du nord !) qui m'ont soutenu ces quatre années.

Table des matières

Introduction	16
1. Les stratégies de colonisation chez les champignons phytopathogènes	16
1.1. Biotrophie	19
1.2. Nécrotrophie	19
1.3. Hémibiotrophie	19
1.4. Saprotrophie.....	20
2. Variabilité et plasticité des types trophiques	21
3. Cas de <i>Leptosphaeria maculans</i> : un agent pathogène au cycle de vie complexe	22
4. Apport des données -omiques sur la compréhension des interactions plante-pathogène	24
4.1. Structure génomique des champignons phytopathogènes	24
4.2. Les déterminants génétiques de la pathogénie	27
4.3. La régulation transcriptionnelle au cours de l'infection	37
4.4. La régulation épigénétique de l'expression des gènes chez les champignons phytopathogènes	42
5. Les interactions biotiques lors de coinfections : cas des complexes d'espèces	45
5.1. Définition génétique et biologique des complexes d'espèces	45
5.2. Les interactions au sein des complexes d'espèces.....	52
5.3. Connaissances moléculaires inégales entre <i>Leptosphaeria maculans</i> et <i>Leptosphaeria biglobosa</i>	56
6. Projet de thèse	58
6.1. Le projet LeptoLife.....	58
6.2. Objectifs de la thèse.....	59

Chapitre I. Analyses préliminaires du matériel biologique, génomique et transcriptomique du projet LeptoLife

62

1 Résumé des caractéristiques des nouvelles versions des génomes de <i>Leptosphaeria maculans</i> 'brassicae' et <i>Leptosphaeria biglobosa</i> 'brassicae'	62
1.1. Comparaisons des caractéristiques génomiques entre les deux versions des génomes de <i>L. maculans</i> et <i>L. biglobosa</i>	63
1.2. Analyse comparative entre les deux espèces <i>L. maculans</i> et <i>L. biglobosa</i>	66
2 Analyses préliminaires des échantillons RNA-Seq LeptoLife.....	70

2.2.	Description des conditions de croissance <i>in vitro</i> de <i>L. maculans</i> et <i>L. biglobosa</i> ...	73
2.3.	Pourcentage de lectures assignées à <i>L. maculans</i> et <i>L. biglobosa</i> en conditions de co-inoculations et co-cultures <i>in vitro</i>	75
2.4.	Pourcentage de lectures assignées à <i>L. maculans</i> et <i>L. biglobosa</i> en conditions naturelles d'infection	77
2.5.	Choix des échantillons pour la description du cycle de vie de <i>L. maculans</i>	80
2.6.	Choix des échantillons pour l'analyse de l'interaction au sein du complexe d'espèce	81

Chapitre II. Analyses à grande échelle de la régulation transcriptomique au cours du cycle infectieux de *Leptosphaeria maculans*

1.	Démarche analytique.....	83
2.	Intégration du paysage chromatinien de <i>L. maculans</i> en conditions de croissance <i>in vitro</i>	84
3.	Article 1.....	86

Chapitre III. Etude de l'interaction entre *Leptosphaeria maculans* et *Leptosphaeria biglobosa*

1.	Méthodes descriptives de la co-infection du colza par le complexe <i>L. maculans</i> / <i>L. biglobosa</i>	161
2.	Article 2.....	163

Discussion.....

1.	Les vagues d'expression corrélées au cycle infectieux de <i>L. maculans</i>	220
1.1.	L'infection précoce hémibiotrophe	220
1.2.	Spécificité d'expression selon le mode de vie ou l'organe infecté.....	222
1.3.	Le mode de vie saprophyte	225
2.	Intégration des données transcriptomiques, structurales et fonctionnelles pour l'étude des effecteurs précoces chez <i>L. maculans</i>	226
3.	Modèle de régulation complexe des gènes chez <i>L. maculans</i>	227
3.1.	La régulation chromatinienne	228
3.2.	La détection des facteurs de transcription exprimés pendant l'infection	229
3.3.	Le double contrôle de la régulation transcriptionnelle	229

3.4. Bilan et limites du modèle de régulation	232
4. Décryptage des interactions biotiques entre <i>L. maculans</i> ‘brassicae’ et <i>L. biglobosa</i> ‘brassicae’	233
4.1. Détection des interactions au sein du complexe d’espèces par les analyses transcriptomiques	233
4.2. Variabilité de l’interaction selon les conditions d’infection.....	234
4.3. Influence potentielle de l’environnement biotique sur l’interaction	237
5. Mise en perspective de l’interaction avec les données épidémiologiques	238
Conclusions et perspectives	241
Références	243
Annexe 1	257
Annexe 2: Bilan d’activité	307

Liste des Figures

Introduction

Figure 1 : Schéma général des cycles de vie des champignons phytopathogènes.

Figure 2 : Catégorisation des modes trophiques chez les champignons phytopathogènes.

Figure 3 : Cycle de vie de *Leptosphaeria maculans* sur le colza d'hiver.

Figure 4 : Diversité des structures génomiques retrouvées chez les champignons phytopathogènes.

Figure 5 : Proportion de cinq catégories fonctionnelles parmi les gènes prédits au sein de 18 génomes de champignons phytopathogènes de l'ordre des Dothidéomycètes.

Figure 6 : Proportion des sous-ensembles de Carbohydre Active enZymes (CAZymes) chez les champignons phytopathogènes selon le type trophique.

Figure 7 : Les différents modes d'action et localisation des effecteurs sécrétés par les champignons phytopathogènes lors de l'infection d'une plante hôte.

Figure 8 : Exemples de pipelines de prédiction d'effecteurs candidats.

Figure 9 : Détection de vagues de gènes coexprimés selon le stade de développement de deux champignons phytopathogènes.

Figure 10 : Exemple de phénotypes de trois complexes d'espèces lors de l'infection d'une plante hôte ou en condition de croissance *in vitro*.

Figure 11 : Arbre phylogénétique de la classe des Ascomycètes détaillé pour le genre des Pléosporales.

Figure 12 : Coexistence et symptomatologie du complexe d'espèces composé de *Leptosphaeria biglobosa* et *Leptosphaeria maculans* au cours de leur cycle de vie durant une année culturale de colza d'hiver.

Figure 13 : Schéma représentatif de la répartition mondiale et de la propagation de *Leptosphaeria maculans* et de *Leptosphaeria biglobosa*.

Chapitre I

Figure 14: Analyses de la proportion, des tailles et de la localisation des régions riches en AT chez *L. maculans* et *L. biglobosa*.

Figure 15 : Description de l'échantillonnage et de la proportion de lectures assignées à *L. maculans* et *L. biglobosa* lors de cinétiques d'infections sur cotylédons, pétioles et tiges menées en conditions contrôlées.

Figure 16 : Description des différentes conditions de croissance *in vitro* de *L. maculans* ou *L. biglobosa* séquencées par RNA-Seq.

Figure 17 : Description de l'échantillonnage et de la proportion de lectures assignées à *L. maculans* et *L. biglobosa* lors de cinétiques de coinfections sur cotylédons, pétioles et lors de co-cultures *in vitro* menées en conditions contrôlées.

Figure 18 : Description de l'échantillonnage et de la proportion de lectures assignées à *L. maculans* et *L. biglobosa* au sein d'échantillons prélevés en conditions d'infection naturelle sur une année de culture de colza d'hiver.

Chapitre II

Article 1 : Figures principales

Fig 1. Conditions and samples used for the RNA-Seq study of the *Leptosphaeria maculans* life cycle.

Fig 2. Hierarchical clustering of *Leptosphaeria maculans* gene expression in 32 conditions representing the fungal life cycle.

Fig 3. Pipeline used to describe *Leptosphaeria maculans* genes overexpressed in at least one condition *in planta*.

Fig 4. Heatmap obtained by clustering the 1,207 *Leptosphaeria maculans* genes upregulated *in planta*.

Fig 5. Expression of known and putative effectors of *Leptosphaeria maculans* within the eight expression clusters.

Fig 6. Association of *Leptosphaeria maculans* genes upregulated *in planta* with the histone modification marks.

Fig 7. Identification of highly coregulated *Leptosphaeria maculans* genes based on mean SSP gene expression *in planta*.

Fig 8. Overview of the eight expression profiles detected during the infection cycle of *Leptosphaeria maculans*.

Figures supplémentaires

S1 Fig. Principal component analyses (PCA) of RNA-Seq replicates.

S2 Fig. Detection of Gene Ontology enrichment ("Biological Process" category) in each of the eight clusters containing the 1,207 *Leptosphaeria maculans* genes overexpressed in at least one set of conditions *in planta* relative to the 10 sets of *in vitro* conditions.

S3 Fig. Detection of Gene Ontology enrichment ("Molecular Function" category) in each of the eight clusters containing the 1,207 *Leptosphaeria maculans* genes overexpressed in at least one set of *in planta* conditions relative to the 10 sets of *in vitro* conditions.

S4 Fig. Detection of Gene Ontology enrichment (“Cellular Component” category) in each of the eight clusters containing the 1,207 *Leptosphaeria maculans* genes overexpressed in at least one set of conditions *in planta* relative to the 10 sets of conditions *in vitro*.

S5 Fig. Proportion of different classes of CAZymes and their substrates in the eight gene clusters.

S6 Fig. Details of the three *Leptosphaeria maculans* secondary metabolite biosynthesis gene clusters upregulated during rapeseed infection.

S7 Fig. Characteristics of the small secreted proteins (SSP) predicted from the *Leptosphaeria maculans* protein set.

S8 Fig. Expression of the 271 small secreted protein-encoding genes upregulated in at least one of the 22 sets of conditions *in planta*.

Chapitre III

Article 2 : Figures principales

Fig 1: Monitoring of *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ development during cotyledon infections of *Brassica napus* following Single Species Inoculation (SSI) or Mixed Species Inoculation (MSI).

Fig 2: Quantitative monitoring of *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ DNA following Single Species Inoculation (SSI) or following three different conditions of Mixed Species Inoculations (MSI).

Fig 3: Proportion of RNA-Seq reads assigned to *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ during Single Species Inoculation (SSI) or Mixed Species Inoculation (MSI) of *Brassica napus* cotyledons.

Fig 4: Relatedness of samples and detection of differentially expressed genes (DEGs) between Single Species Inoculation (SSI) and Mixed Species Inoculation (MSI) of cotyledons of *Brassica napus* by *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) or/and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

Fig 5: Expression profiles of the 2,310 genes differentially expressed (DEGs) in *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) between Single Species Inoculation (SSI) and Mixed Species Inoculation (MSI) of cotyledons of *Brassica napus*.

Fig 6: Relatedness of samples and detection of Differentially Expressed Genes (DEGs) of *Brassica napus* following Single Species Inoculation (SSI) or Mixed Species Inoculation (MSI)

of cotyledons by *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) or/and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

Fig 7: Expression profiles of the 26,852 genes of *Brassica napus* detected as differentially expressed following Single Species Inoculation (SSI) or Mixed Species Inoculation (MSI) of cotyledons by *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) or/and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

Figures supplémentaires

Fig S1: Monitoring of symptoms and fungal development following Mixed Species Inoculation (MSI) of *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb) on *Brassica napus* cotyledons with varying parameters.

Fig S2: Monitoring of fungal growth following Single Species Inoculation (SSI) of *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb) during individual growth or side by side growth on *in vitro* media.

Fig S3: Monitoring of fungal *in vitro* growth following SSI or MSI of *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb) with varying parameters.

Fig S4: Expression profiles of the 1,233 genes of *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb) detected as differentially expressed during the 15-days infection of *Brassica napus* cotyledons either following single species inoculation (SSI) or when inoculated as a mix (MSI) with *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’.

Fig S5: Detection of Gene Ontology enrichments (“Molecular Function” category) among *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ down-regulated gene set (green) or up-regulated gene set (red) during infection of cotyledons of *Brassica napus*.

Fig S6: Detection of Gene Ontology enrichments (“Biological process” category) among *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ down-regulated gene set (green) or up-regulated gene set (red) during infection of cotyledons of *Brassica napus*.

Fig S7: Detection of Gene Ontology enrichments (“Molecular Function” category) among *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) down-regulated gene set (green) or up-regulated gene set (red) during Mixed Species Inoculation (MSI) compared to Single Species Inoculation (SSI).

Fig S8: Detection of Gene Ontology enrichments (“Biological Process” category) among *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) down-regulated gene set (green) or up-regulated

gene set (red) during Mixed Species Inoculation (MSI) compared to Single Species Inoculation (SSI).

Fig S9: Detection of Gene Ontology enrichments (“Cellular Component” category) among *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) down-regulated gene set (green) or up-regulated gene set (red) during Mixed Species Inoculation (MSI) compared to Single Species Inoculation (SSI).

Fig S10: Top twenty enrichments of the Gene Ontology category “Biological Process” detected in the gene sets of *Brassica napus* up-regulated following inoculation with *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and/or *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

Fig S11: Top twenty enrichments of the Gene Ontology category “Molecular Function” detected in the gene sets of *Brassica napus* up-regulated following inoculation with *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and/or *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

Fig S12: Top twenty enrichments of the Gene Ontology category “Biological Process” detected in the gene sets of *Brassica napus* down-regulated following inoculation with *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and/or *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

Fig S13: Top twenty enrichments of the Gene Ontology category “Molecular Function” detected in the gene sets of *Brassica napus* down-regulated following inoculation with *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and/or *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

Discussion

Figure 19 : Vue d'ensemble des huit vagues d'expression détectées au cours du cycle d'infection de *Leptosphaeria maculans*.

Figure 20 : Bilan des données -omiques permettant de modéliser la régulation *in planta*, des gènes de la pathogénie chez *L. maculans*.

Figure 21 : Bilan des phénotypes observés dans les différentes conditions de co-inoculations testées *in vitro* et *in planta*.

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques génomiques et génétiques de *Leptosphaeria maculans* (isolat JN3) et de *Leptosphaeria biglobosa* (isolat b3.5) publiées par Grandaubert et al. (2014).

Chapitre I

Tableau 2 : Caractéristiques génomiques et annotations fonctionnelles de *Leptosphaeria maculans* et de *Leptosphaeria biglobosa* sur les V1 (Rouxel et al. 2011 ; Grandaubert et al. 2014) et V2 (Dutreux et al. 2018) des génomes.

Chapitre II

Article 1 : Tables supplémentaires

S1 Table. Results of the mapping parameters tested for distinguishing between reads from *L. maculans* and *L. biglobosa*.

S2 Table. Mapping results for the 102 samples subjected to RNA sequencing on the *L. maculans* and *L. biglobosa* genomes.

S3 Table. Detection and cluster distribution of PKS and NRPS genes among the 1,207 *Leptosphaeria maculans* genes upregulated *in planta*.

S4 Table. Description and cluster assignment of the 52 genes for which molecular studies have been performed.

S5 Table. Characteristics of the 1,070 genes encoding small secreted proteins (SSP).

S6 Table. Comparison of protein features and genomic localization between the small secreted protein (SSP) repertoire predicted from v2 genome annotation relative to the whole gene set with those obtained for the previously predicted SSP repertoire.

S7 Table. Genes with more than 10 reads in (A) at least one of the four replicates of samples at 24 h or 48 h after ascospore ejection on cotyledons (B) at least one of the nine replicates from the three samples of stem base tissues at 2, 3 or 5 months post sowing.

S8 Table. Conservation of the protein sequences encoded by highly co-expressed SSP genes.

Chapitre III

Article 2: Tables supplémentaires

Table S1: Results of read mapping from RNA-Seq of 71 samples corresponding to infection of cotyledons of Brassica napus by *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’, *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ and both species together.

Table S2: Correlation of gene expression between biological replicates following Single Species Inoculation of cotyledons of Brassica napus with *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb), *Leptosphaeria biglobosa* (Lbb) or following Mixed Species Inoculation of Lmb and Lbb.

Table S3 : Enrichment analyses of the proportion of genes encoding Small Secreted Proteins (SSP) in the DEGs sets detected in *Leptosphaeria biglobosa* ‘Brassicae’ during cotyledons infections.

Table S3: Impact of Mixed Species Inoculation (MSI) on the eight expression waves induced during the infectious cycle of *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb).

Abréviations

AA: Acides Aminés (Amino Acid)
AAs: Auxiliary Activities
ABA: Acide Abscissique (Abscisic Acid)
ADN (DNA): Acide DésoxyriboNucléique (Desoxyribo-Nucleic Acid)
ARN (RNA): Acide RiboNucléique (RiboNucleic Acid)
CAZymes: Carbohydate Active enZymes
CBM: Carbohydate Binding Module
CE: Carbohydate Esterase
ET (TE): Elément Transposable (Transposable Element)
ETI: Effector Tiggered Immunity
GH: Glycosyl Hydrolase
GT: Glycosyl Transferases
H3K4me2-3: Bi ou tri-methylation de la lysine 4 de l'histone H3
H3K27me3: Tri -methylation de la lysine 27 de l'histone H3
H3K9me3: Tri-methylation de la lysine 9 de l'histone H3
JPI (DPI): Jours Post-Inoculation (Days Post-Inoculation)
Lbb: *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae'
Lmb: *Leptosphaeria maculans* 'brassicae'
MB: MegaBase
NBS-LRR: Nucleotide Binding Site-Leucin Rich Repeat
NRPS: Non-Ribosomal Peptide Synthase
PCD: Programmed Cell Death
PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern
PTI: PAMP Tiggered Immunity
PKS: Polyketide Synthase
PL: Polysaccharides Lyases
PPS (SSP): Petite Protéine Sécrétée (Small Secreted Protein)
PRR: Pattern Recognition Receptors
RIP: Repeat Induced Point mutation
RLK: Receptor-Like Kinase
RLP: Receptor-Like Protein
ROS: Reactive Oxygen Species
RNA-Seq: RNA-sequencing
TS: Terpene Synthase

Introduction

1. Les stratégies de colonisation chez les champignons phytopathogènes

Dans tous les écosystèmes les micro-organismes jouent un rôle primordial dans l'équilibre des cycles biologiques (cycle de l'azote, du carbone, cycle de l'eau etc.). Parmi eux, les champignons forment un règne à part qui englobe des millions d'espèces (Hawksworth and Lücking, 2017) présentes dans toutes les niches écologiques (sol, air, organismes vivants, matière morte etc.). Ils établissent des relations très variées avec les organismes présents dans leur environnement et certains champignons dépendent même d'autres organismes vivants (organismes hôtes) pour accomplir leur cycle de vie. Ces interactions intimes entre un champignon et son hôte peuvent prendre différentes formes. On y trouve des interactions bénéfiques voire symbiotiques qui assurent aux deux partenaires des apports précieux (nutrition, protection). C'est par exemple le cas des champignons mycorrhiziens qui sont présents dans la majorité des sols et qui sont en interaction symbiotique avec plus de 80% des espèces végétales (Heijden et al., 2015). Au contraire, d'autres champignons sont néfastes et engendrent parfois la mort de l'organisme hôte. Ces champignons pathogènes peuvent causer des dommages sanitaires et économiques très importants. C'est le cas notamment des champignons pathogènes des plantes : les champignons phytopathogènes. En effet, à travers les siècles, des épidémies causées par des champignons phytopathogènes ont provoqué des dégâts considérables soit en anéantissant les récoltes comme cela a été le cas en 1850 sur les vignobles français touchés par l'oïdium ou en causant des intoxications alimentaires comme celles provoquées par l'ergot du seigle (*Claviceps purpurea*) qui a sévi dès le IX^{ème} siècle. Encore aujourd'hui, les maladies fongiques constituent l'une des principales menaces pour les plantes de grandes cultures à travers le monde (Fisher et al., 2012). Malgré les avancées dans la compréhension et la gestion des maladies fongiques, nombre d'entre elles ne sont pas encore maîtrisées et continuent de causer des pertes de rendement importantes sur des ressources alimentaires mondiales, comme le blé ou le riz sur lesquels *Puccinia* spp ou *Magnaporthe oryzae* sont responsables de 10% à 70% des pertes de rendement (Fisher et al., 2012). D'autres espèces comme *Botrytis cinerea* ou *Colletotrichum* spp sont quant à elle considérées comme des menaces importantes à cause de leurs larges spectres d'hôtes qui comptent plusieurs centaines d'espèces végétales cultivées (Dean et al., 2012). L'émergence de nouvelles maladies causées par des souches ou des espèces inconnues de champignons est aussi un sujet d'actualité. Des souches émergentes de *Puccinia graminis* causant la rouille noire ont provoqué des

épidémies dévastatrices sur le blé depuis la fin du XX^{ème} siècle et ces épidémies continuent de progresser dans le monde (Chen, 2020).

Les champignons phytopathogènes sont décrits dans toutes les classes de champignons et concentrent une diversité importante de modes d'action et de cycles de vie rendant complexe la compréhension des mécanismes associés à leur pathogénie. On peut cependant déduire un schéma général et simplifié des cycles de vie des champignons phytopathogènes (**Figure 1**). On retrouve en premier lieu la dissémination des structures reproductrices via différents vecteurs tels que le vent, les insectes ou la pluie. Au contact de l'hôte (feuilles, racines, graines etc.) les spores germent et pénètrent dans les tissus puis y développent des structures mycéliennes (Tucker and Talbot, 2001) (**Figure 1**). Lors de cette croissance, les champignons peuvent adopter différents types trophiques. C'est-à-dire que les ressources utilisées ainsi que les moyens mis en place pour se les procurer varient d'un agent pathogène à l'autre durant cette phase de colonisation des tissus hôtes. Dans un second temps, au sein de l'organe ainsi infecté, ils réalisent généralement une reproduction asexuée qui sera la cause d'infections dites secondaires (**Figure 1**). La reproduction sexuée quant à elle n'a pas été démontrée chez tous les champignons phytopathogènes et les conditions dans lesquelles elle a lieu en milieu naturel sont souvent méconnues. Chez certaines espèces, elle peut avoir lieu directement sur l'organe infecté alors que chez d'autres le passage sur un hôte secondaire ou le passage sur un nouveau milieu tel que le sol, ou sur les résidus de culture comme chez *Zymoseptoria tritici* (Suffert et al., 2011) ou *Leptosphaeria maculans*, est nécessaire (**Figure 1**).

Dans le domaine de la phytopathologie, le type trophique adopté par le champignon est étudié pour comprendre les interactions moléculaires entre un champignon pathogène et son hôte au cours de l'infection. A ce titre, le type trophique est largement utilisé pour catégoriser les champignons. On en distingue quatre grands types. Trois sont définis exclusivement chez les champignons pathogènes : les biotrophes, les nécrotrophes, les hémibiotrophes (**Figure 2**). Le quatrième type : les saprotrophes, sont plutôt des décomposeurs, mais certains champignons pathogènes présentent un mode trophique saprophyte dans certaines étapes de leur cycle de vie.

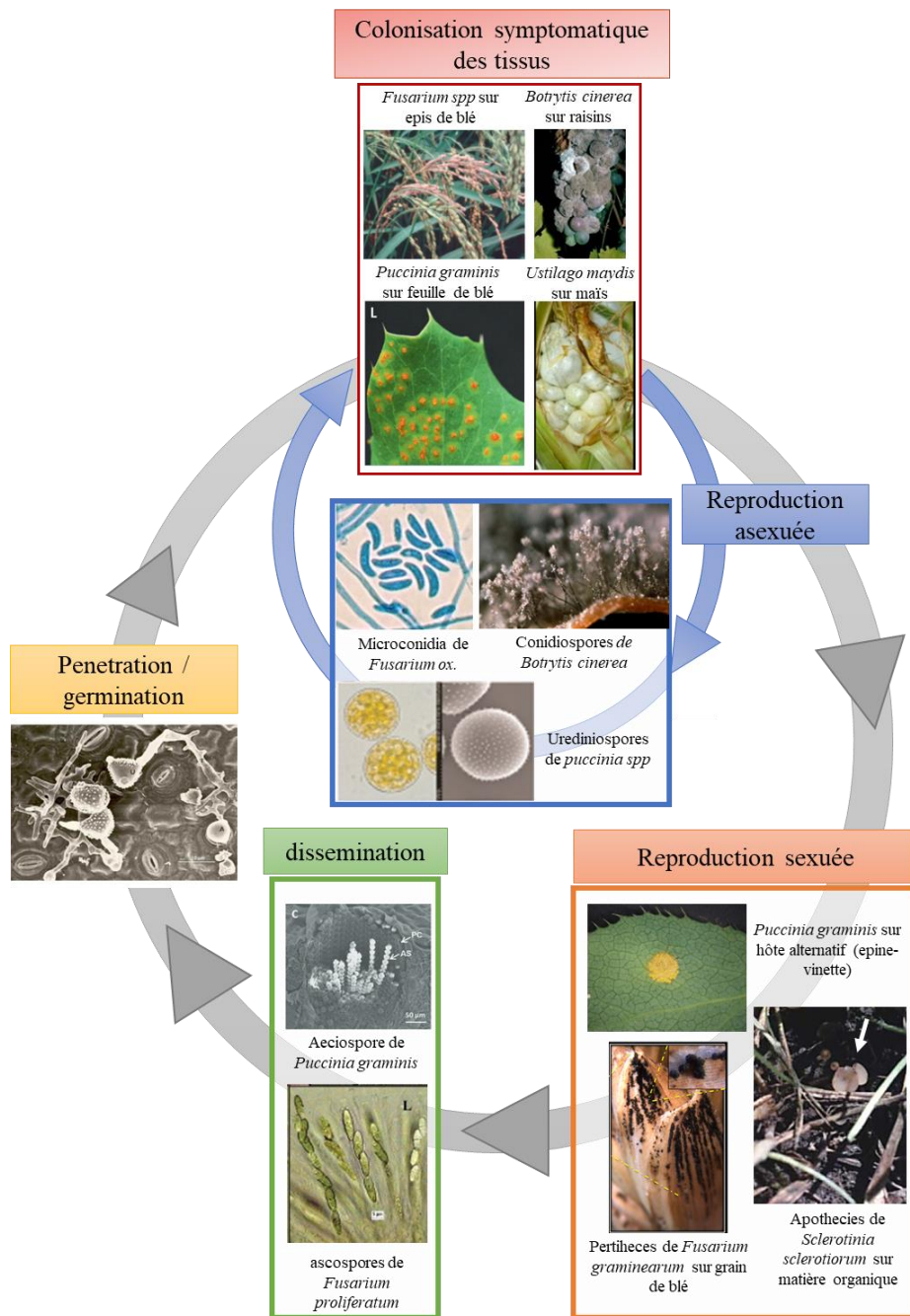


Figure 1 : Schéma général des cycles de vie des champignons phytopathogènes.

Quatre grandes étapes des cycles de vie des champignons phytopathogènes sont décrites. Pour chacune d'entre elles, les structures de développement de quelques champignons phytopathogènes modèles sont données en exemple. Le cycle commence par la germination des organes de multiplication (conidies ou spores issues de la reproduction sexuée) et la pénétration des hyphes dans les tissus hôtes. La colonisation des tissus se caractérise souvent par l'apparition des symptômes (exemple de la pourriture causée par *Botrytis cinerea* ; des tumeurs causées par *Ustilago maydis* sur maïs, de la fusariose ou de la rouille brune sur blé). Plusieurs cycles de reproduction asexuée peuvent avoir lieu au cours de la colonisation des tissus. La reproduction sexuée a lieu dans des conditions différentes selon les organismes (sur hôte secondaire chez *Puccinia* ou sur matière organique morte chez *Sclerotinia sclerotiorum*). Elle est suivie de la dissémination des structures de reproduction sur de nouveaux tissus sains.

1.1. Biotrophie

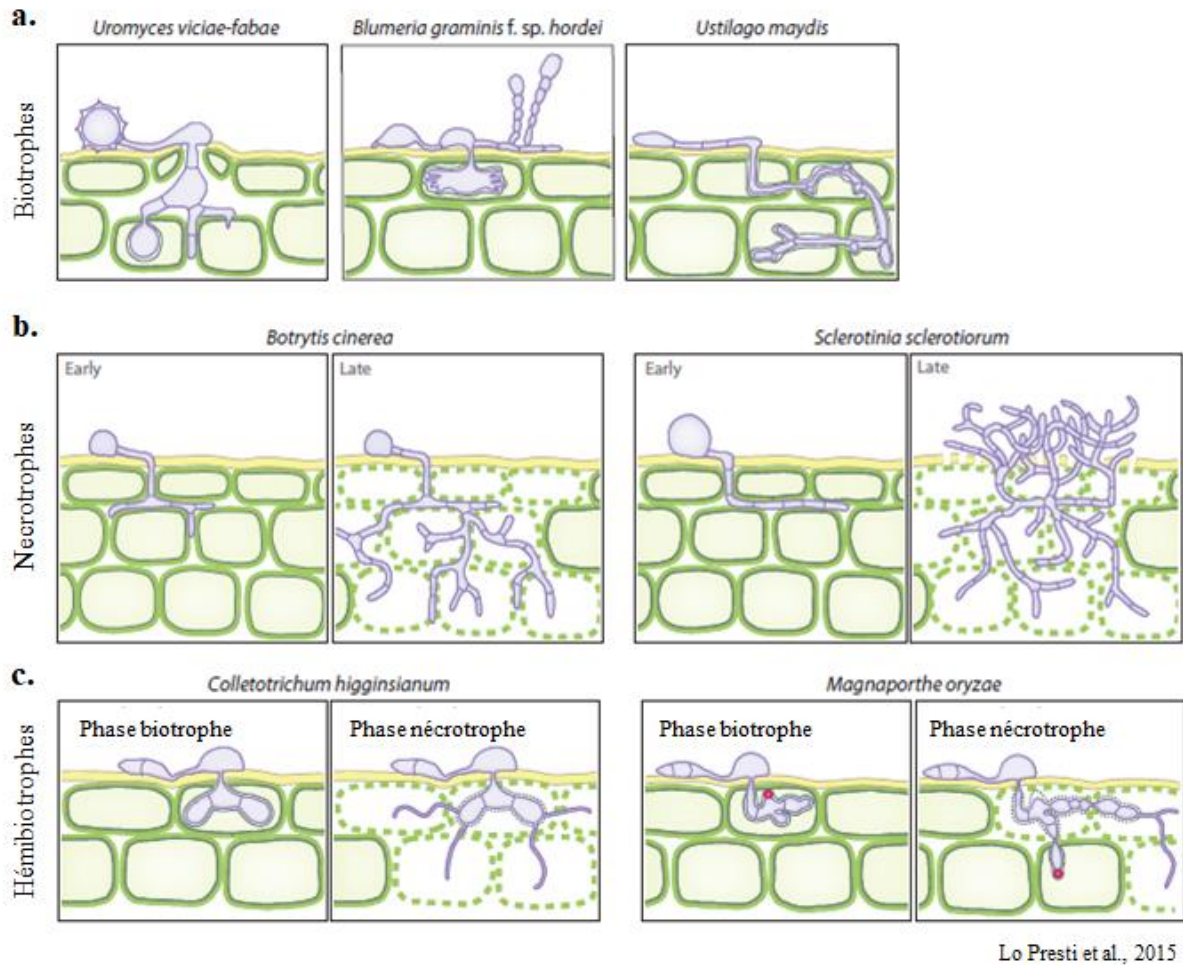
Les champignons dits biotrophes se développent de manière non destructrice dans les tissus vivants, notamment dans les espaces intracellulaires de l'hôte. La nutrition est alors effectuée par la mobilisation et le détournement des ressources issues du métabolisme primaire de l'hôte (**Figure 2a**). L'assimilation des nutriments par le champignon est réalisée à travers des structures spécialisées qui offrent une plus grande surface d'échange, telles que les haustoria retrouvés chez de nombreux agents pathogènes tels que *Blumeria graminis* ou *Puccinia* spp ou les arbuscules retrouvés chez les champignons symbiotiques mycorhiziens (Spanu and Panstruga, 2017). Lors de l'infection, les champignons biotrophes sécrètent des molécules qui ciblent et stoppent les défenses des plantes permettant de garder un environnement propice à leur développement.

1.2. Nécrotrophie

A l'opposé de la biotrophie, la nécrotrophie est un mode de vie durant lequel le champignon détruit les tissus de la plante hôte et se nourrit des molécules issues de cette dégradation (**Figure 2b**). Les nécrotrophes, tels que *Botrytis cinerea* ou *Alternaria* spp utilisent un arsenal d'enzymes dédiées à la dégradation de la paroi des cellules végétales pour se nourrir. Ils libèrent aussi des molécules toxiques comme les espèces réactives d'oxygène ou des métabolites secondaires (van Kan, 2006). Comparé aux biotrophes, certains nécrotrophes ont la particularité de profiter voire de provoquer l'activation de certains mécanismes de défense de l'hôte tel que la « mort cellulaire programmée » qui active une autodestruction des tissus végétaux et offre un environnement nécrosé propice à leur développement (**Figure 2b**).

1.3. Hémibiotrophie

L'infection par des champignons pathogènes hémibiotrophes est caractérisée par la succession d'une étape de colonisation biotrophe suivie par une étape de colonisation nécrotrophe (**Figure 2c**). Comme chez les champignons biotrophes stricts, la phase biotrophe se caractérise par un développement mycélien asymptomatique parfois associé au développement de structures spécialisées dans les échanges avec la plante. La durée de cette phase varie selon l'agent pathogène. Ainsi chez l'oomycète *Phytophthora infestans*, la transition biotrophie/nécrotrophie apparaît 4 jours après l'inoculation (Zuluaga et al., 2016) contre 40 heures chez *Colletotrichum higginsianum* (O'Connell et al., 2012) ou 9 jours chez *Leptosphaeria maculans* (Haddadi et al., 2016). La phase nécrotrophe est, elle, généralement concomitante à la reproduction asexuée et au développement d'un inoculum secondaire.



Lo Presti et al., 2015

Figure 2 : Catégorisation des modes trophiques chez les champignons phytopathogènes.

(a.) Les biotrophes (ex : *Uromyces viciae-fabae*, *Blumeria graminis* et *Ustilago maydis*) se développent dans les tissus de l'hôte de manière non-destructrice et réalisent leur nutrition par l'acquisition de nutriments produits par la plante via des structures spécialisées invaginées dans les cellules de l'hôte. (b.) Les nécrotrophes (ex : *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum*) dégradent les tissus de la plante hôte rapidement après la phase de pénétration. (c.) Les hémibiotrophes (exemples de *Colletotrichum higginsianum* ou *Magnaporthe oryzae*) présentent une première phase de colonisation biotrophe suivie par une phase nécrotrophe. D'après Lo Presti et al., 2015.

1.4. Saprotrophie

Enfin, les champignons saprotrophes ne sont pas considérés comme des agents pathogènes *stricto sensu* mais plutôt comme des décomposeurs. Ils se développent sur la matière végétale morte sans passer par les tissus sains de l'hôte. Ils possèdent des capacités de dégradation de la biomasse lignocellulosique grâce à la sécrétion de nombreuses enzymes lytiques. Nous nous intéressons à ce type trophique dans l'étude des champignons phytopathogènes car nombre

d'entre eux, possèdent dans leur cycle de vie, une phase de croissance sur des résidus de leur plante hôte, ou sur la matière organique du sol qui fait intervenir un mode de vie saprotrophe.

2. Variabilité et plasticité des types trophiques

Les types trophiques fongiques sont en grande partie déduits de la symptomatologie observée sur l'hôte majoritaire de l'agent pathogène et lors de l'étape de l'infection où les symptômes les plus dommageables apparaissent. En se focalisant sur les étapes infectieuses clés, d'autres étapes des cycles de vie restent peu documentées voire inconnues. Pourtant, certains champignons réalisent des phases asymptomatiques sur d'autres organes de l'hôte ou des phases saprophytes sur résidus de culture indispensables à l'accomplissement de leur cycle de vie (Kerdraon et al., 2019a). Il a été montré par exemple que des champignons endophytes prélevés sur des feuilles de *Magnolia liliifera* sont capables de proliférer sur des feuilles sénescents via la production d'enzymes de dégradation telles que des xylanase, des laccases ou des cellulases caractéristiques de la vie saprophyte (Promputtha et al., 2010). A l'inverse lorsque le saprophyte *Neurospora crassa* retrouvé généralement dans les sols forestiers est inoculé sur les jeunes pousses de pin sylvestre, il est capable de se développer dans les tissus de manière asymptomatique mais peut aussi causer de lourds symptômes (Kuo et al., 2014). Des phases de latence, parfois inconnues, peuvent aussi faire partie des cycles de vie. On retrouve par exemple des formes quiescentes de nombreux agents pathogènes sur les récoltes stockées, qui dans les conditions favorables réactiveront leur développement (Prusky et al., 2013).

Par ailleurs, certains agents pathogènes montrent une capacité d'adaptation aux variations biotiques ou abiotiques et modifient en conséquence le type trophique selon l'hôte ou l'environnement remettant parfois en cause le mode de vie qui leur était attribué. Les hémibiotrophes *Fusarium virguliforme* ou *Colletotrichum acutatum* par exemple peuvent se développer de manière asymptomatique lors d'un passage sur un nouvel hôte (Baetsen-Young et al., 2020 ; Peres et al., 2005). Il en est de même chez le champignon *Botrytis cinerea* dont la nécrotrophie stricte est aujourd'hui discutée car il peut présenter des phases de croissance asymptomatiques sur de nombreux hôtes (Van Kan, 2006).

La plasticité de l'interaction entre un agent pathogène et son hôte combinée à la description exhaustive de son cycle de vie sont donc des données primordiales pour mieux comprendre les interactions moléculaires, et les déterminants de la pathogénie chez une espèce donnée.

3. Cas de *Leptosphaeria maculans* : un agent pathogène au cycle de vie complexe

Leptosphaeria maculans est un champignon Dothidéomycète, agent pathogène du colza qui présente un cycle infectieux long et complexe. Le cycle d'infection du colza d'hiver en Europe est cependant bien décrit. Il commence par la colonisation hémibiotrophe des cotylédons ou des jeunes feuilles par les ascospores issues de la reproduction sexuée (**Figure 3**). La durée de la phase de colonisation biotrophe des feuilles de colza en conditions d'infection naturelle n'a jamais été mesurée mais elle dure de 5 à 9 jours après l'inoculation d'ascospores en condition d'infection contrôlées (Huang et al., 2006). Après cette phase de colonisation asymptomatique, *L. maculans* passe par une phase nécrotrophe au cours de laquelle des lésions nécrotiques se développent et où *L. maculans* réalise sa reproduction asexuée produisant un inoculum secondaire de pycnidiospores (**Figure 3**). Le champignon migre ensuite du pétiole à la tige pendant plusieurs mois de manière endophytique et asymptomatique (Hammond et al., 1985). Enfin, à la fin de la saison culturale, il passe de nouveau par un stade nécrotrophe et provoque une nécrose au collet causant une verse de la plante (**Figure 3**). Après ces stades infectieux sur des tissus végétaux vivants, *L. maculans* survit de manière saprophyte sur les résidus de culture où il développe des structures de reproduction sexuée, les pseudothèces, qui engendrent un nouvel inoculum d'ascospores pour la saison suivante (Huang et al., 2003 ; Toscano-Underwood et al., 2003).

Bien que les grandes étapes du cycle de vie de *L. maculans* soient connues, elles ne sont pas toutes décrites avec la même précision. La gestion de la maladie est principalement concentrée sur l'arrêt de la progression du champignon au stade précoce de l'infection (phase hémibiotrophe). Cette étape est facilement reproduite et miniaturisée en laboratoire ce qui a permis d'approfondir les interactions moléculaires avec la plante hôte à ce stade. Au contraire, les mécanismes biologiques déployés durant la phase de migration endophyte dans les pétioles et tiges, durant la phase nécrotrophe sur tige ou durant la vie saprophyte sont quant à eux, peu ou pas connus.

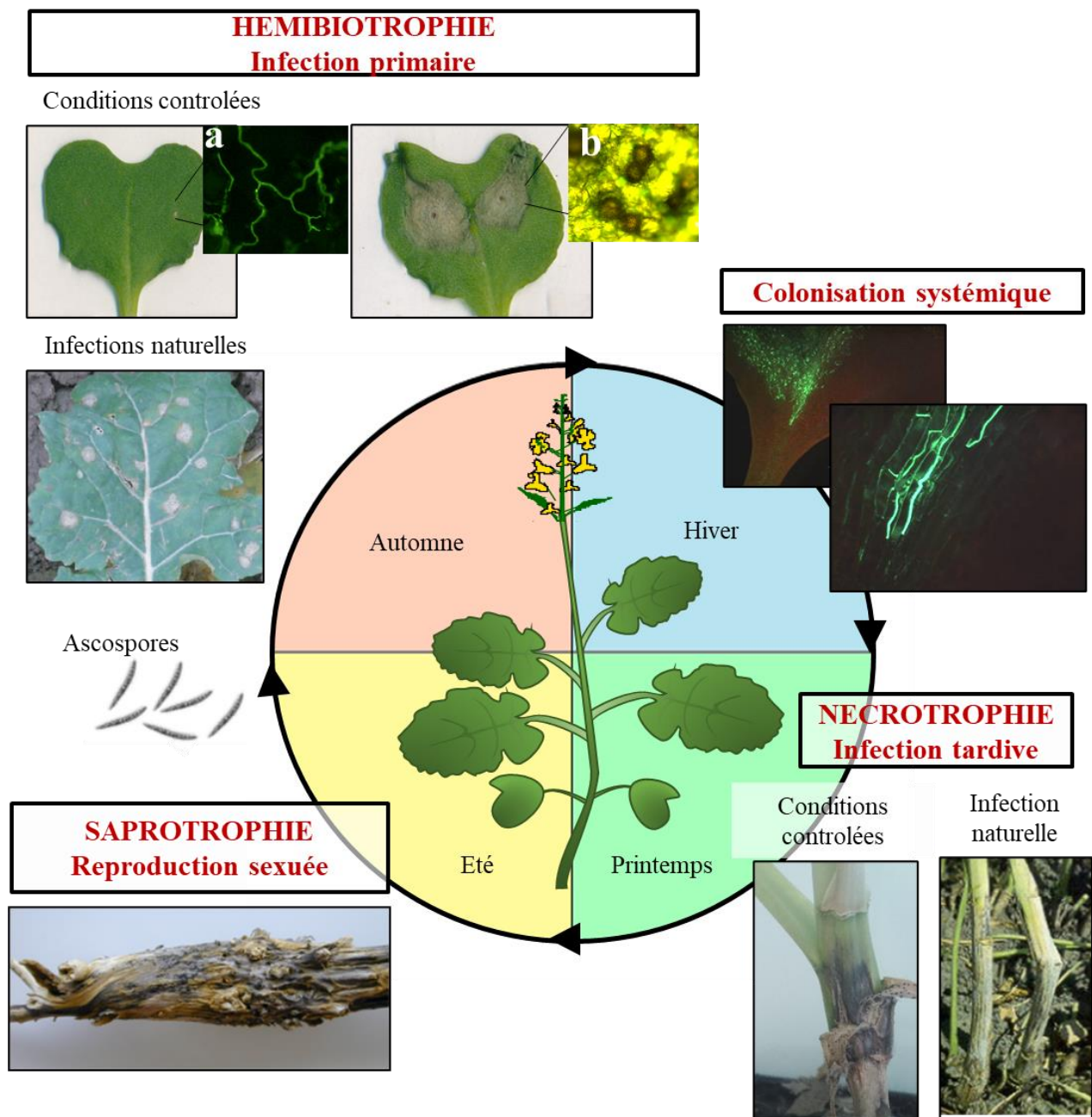


Figure 3 : Cycle de vie de *Leptosphaeria maculans* sur le colza d'hiver.

Le cycle de vie est représenté au cours d'une année culturale de colza, de la croissance des jeunes plantes (automne) au stade plante adulte (printemps/été) suivie par la transition entre deux cycles culturaux en été sur résidus de culture. La reproduction sexuée a lieu sur les résidus de culture, elle permet la génération de l'inoculum primaire composé d'ascospores. L'inoculum primaire est disséminé pendant plusieurs semaines et les hyphes colonisent de manière hémibiotrophe les feuilles des semis d'automne. Cette étape est composée d'une phase de développement asymptotique du mycélium dans les tissus apoplastiques (**a** : mycélium marqué par la GFP lors de la colonisation biotrophe) puis d'une phase de colonisation nécrotrophe siège de la reproduction asexuée où les pycnidiospores forment l'inoculum de l'infection secondaire (**b** : pycnides). Après cette infection primaire, *L. maculans* migre de manière asymptotique dans le pétiole puis la tige. Au printemps, sur plante adulte, *L. maculans* réactive un mode de vie nécrotrophe et cause des lésions nécrotiques pouvant engendrer une verse de la plante.

4. Apport des données -omiques sur la compréhension des interactions plante-pathogène

En phytopathologie, l'acquisition croissante de données -omiques issues de séquençages haut-débit, a permis de décrire à grande échelle des déterminants de la pathogénie à différents niveaux : génomique, génétique, transcriptomique et épigénétique.

4.1. Structures des génomes des champignons phytopathogènes

a) Taille des génomes

La taille des génomes peut varier de quelques dizaines de MégaBase (MB) comme chez le biotrophe *Ustilago maydis* (20 MB) à plusieurs centaines chez la rouille du caféier *Hemileia vastatrix* (547 MB) (Porto et al., 2019 ; Raffaele and Kamoun, 2012) (**Figure 4**). Si des exceptions existent, le schéma général est que les champignons non-pathogènes présentent des génomes de plus petite taille en moyenne que les champignons pathogènes (Plissonneau et al., 2017). Parmi ces derniers il n'y a pas de corrélation entre le mode infectieux et la taille du génome, excepté pour les champignons au cycle de vie très spécialisé et avec un spectre d'hôte réduit qui présenteraient un génome de plus grande taille comme par exemple chez les biotrophes obligatoires (ex chez un champignon responsable d'une rouille, *Puccinia graminis* (101 MB) ou responsables d'oïdium, *Erysiphe pisi* (151 MB) et *Blumeria graminis* (120 MB)).

b) Structures et compartiments génomiques

Les champignons phytopathogènes présentent une grande diversité de structures génomiques (Möller and Stukenbrock, 2017) et parfois une structuration du génome en compartiments génomiques. Ces structurations en compartiments génomiques ne sont pas communes à tous les champignons, ni à tous les champignons ayant par exemple un même mode de vie ou appartenant à un même phylum. On les retrouve néanmoins dans toutes les familles fongiques (Raffaele and Kamoun, 2012). Ainsi, même si leur présence n'est pas systématique, la forte occurrence de ces compartiments chez les champignons phytopathogènes souligne leur rôle potentiel dans les mécanismes infectieux.

L'expansion de la taille des génomes sus-citée chez certains champignons phytopathogènes est en fait, dans la majorité des cas, associée à une expansion en éléments transposables (ET). Chez certains champignons pathogènes on retrouve une compartimentation génomique avec d'un côté des régions variables riches en ET qui sont pauvres en gènes et de l'autre, des régions plus stables, pauvres en ET et riches en gènes. Lorsque de telles régions sont aussi caractérisées

par des variations de contenu en bases GC, elles sont nommées « isochores ». Leur taille et leur répartition au sein des génomes varient selon les espèces, comme chez *Leptosphaeria maculans* (Rouxel et al., 2011) (**Figure 4**) où 36,9% du génome est composé de 564 isochores riches en ET ou chez *Epichloe festucae* dont le génome comprend 31,4 MB d'isochores riches en ET (Winter et al., 2018). D'autres espèces au contraire, ne présentent pas de structures en isochore et les éléments transposables sont répartis le long des chromosomes comme chez *Melampsora larici-populina* (Duplessis et al., 2011a) ou chez *Blumeria graminis* (Spanu, 2012) qui contiennent respectivement 45% et 75% d'ET.

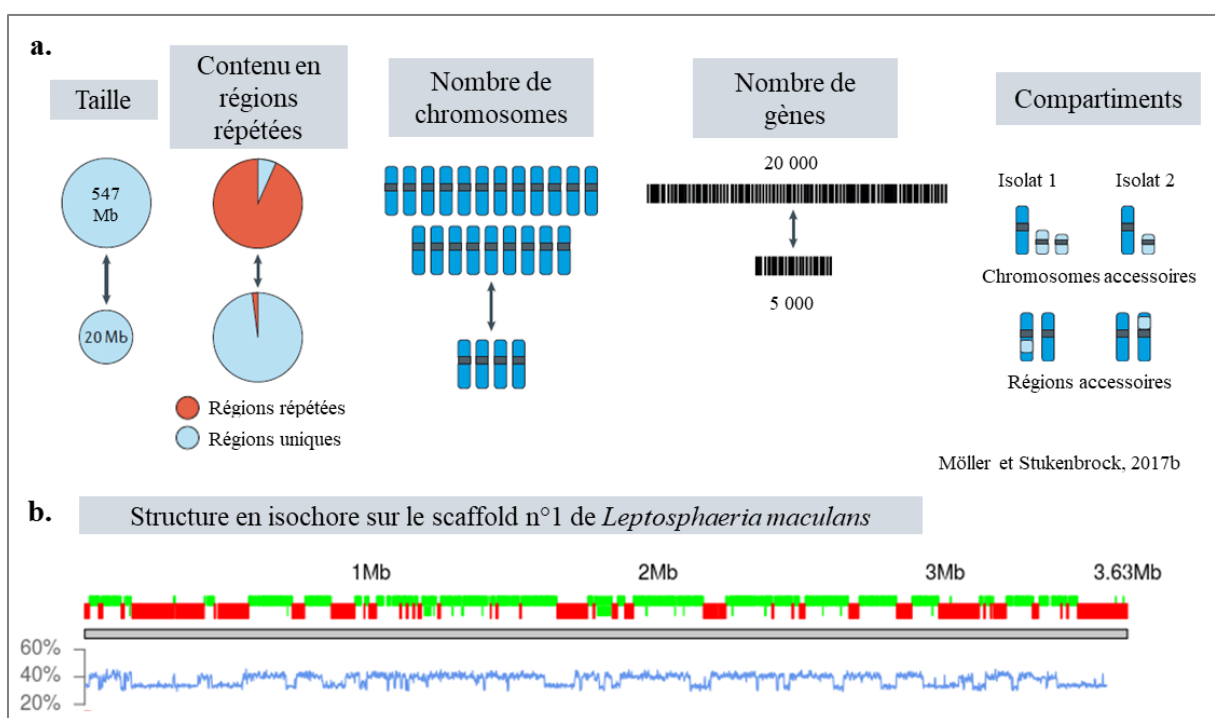


Figure 4 : Diversité des structures génomiques retrouvées chez les champignons phytopathogènes.

(a.) Exemple de la diversité des caractères génomiques retrouvés dans les génomes des champignons phytopathogènes (tailles des génomes, proportion de régions riches en bases A et T, nombre de chromosomes, nombre de gènes, présence de chromosomes ou de régions accessoires). D'après Möller and Stukenbrock, 2017. (b.) Répartition des isochores AT sur le scaffold n°1 (3,63 MegaBases) de *Leptosphaeria maculans* avec en vert la localisation des gènes, en rouge les régions annotées comme isochores AT, en bleu le pourcentage de GC le long du chromosome. Les isochores AT sont pauvres en gènes et ont un GC% de l'ordre de 34%, au contraire les isochores GC sont riches en gènes et ont un taux de GC% de l'ordre de 51%.

Ces régions sont soumises à un fort taux de mutations qui peuvent être de deux types. Le premier est le résultat de la mutagenèse insertionnelle qui a lieu lors de l'activité des transposons eux-mêmes. Ils sont la plupart du temps quiescents mais peuvent être déréprimés lors de la perception de différents stress (Fouché et al., 2020). Le deuxième résulte d'un mécanisme pré-méiotique : le RIP (Repeat-Induced Point Mutation) qui cause des mutations (CpA → TpA) spécifiquement dans ces régions répétées engendrant une surreprésentation de bases A et T. Ce phénomène de RIP a pour conséquence la dégénérescence et donc l'inactivation des éléments transposables qui subissent ces mutations. Le pouvoir mutagène dans ces régions ne provient donc plus du mouvement de ces transposons mais de mutations ponctuelles causées par le RIP.

Parmi les champignons phytopathogènes qui ont subi une expansion d'ET, on distingue ceux qui présentent, dans ces régions, un enrichissement en bases A et T (renommées « isochores AT ») qui est la signature du RIP (exemple chez *L. maculans* (**Figure 4b**), ou *Epichloe festucae* sus-citées) de ceux ayant dans ces régions riches en ET, un taux de GC constant et des éléments transposables majoritairement actifs comme chez *Zymoseptoria tritici* (Fouché et al., 2020).

Enfin, un dernier compartiment génomique dispensable est constitué de chromosomes accessoires (ou chromosomes B, ou mini-chromosomes), qui sont souvent spécifiques à un ou plusieurs isolats (**Figure 4a**). Ils se transmettent verticalement ou horizontalement, ils sont dispensables à la vie en dehors de l'hôte mais peuvent jouer un rôle dans la réussite de l'infection. Une preuve de concept a été apportée chez *Fusarium oxysporum* où le transfert horizontal de deux chromosomes dispensables qui portent tous les gènes codant les protéines 'SIX' (« Secreted in Xylem », impliquées dans l'agressivité lors de la colonisation des vaisseaux du xylème de la tomate) permet de rendre compatible une interaction avec une espèce végétale normalement non-hôte de la souche (Ma et al., 2010). Ils peuvent également être dupliqués ou perdus lors de la méiose, à des fréquences parfois élevées comme démontré chez *L. maculans* (Leclair et al., 1996).

Un autre événement de structuration concerne les structures chromosomiques. On distingue chez les champignons phytopathogènes la présence de réarrangements chromosomiques intra-espèces qui sont moteur d'adaptation et qui sont, dans ce cas aussi, intimement liés à la présence d'éléments transposables (**Figure 4a**). Ainsi, entre deux souches de *Verticillium dahliae* 11 réarrangements intra- et 17 réarrangements inter-chromosomiques ont été détectés dans ces régions toutes bordées de rétro-transposons (de Jonge et al., 2013). Ces réarrangements seraient générés lors de défaut de réparation après une insertion ou une

excision d'ADN liées à l'activité des retro-transposons (de Jonge et al., 2013). Ce phénomène génère la présence de régions spécifiques à un ou plusieurs isolats chez *V. dahliae* qui sont enrichies en gènes impliqués dans la pathogénie.

Ces différentes structures ne sont pas mutuellement exclusives. Les chromosomes dispensables contiennent généralement une forte proportion d'éléments transposables, comme c'est le cas chez *Fusarium poae* dont le chromosome dispensable contient 25% d'ET comparé à 2,5% d'ET au sein du core génome (Vanheule et al., 2016). Aussi, *L. maculans* cumule la présence d'isochore AT soumis au RIP et la présence d'un mini-chromosome dispensable, lui aussi fortement enrichi en ET ayant subi le RIP (Rouxel et al., 2011).

Ces compartiments génomiques jouent donc un rôle important dans la pathogénie car, soumis à un fort taux de mutation, à des pertes, à des gains ou à des réarrangements chromosomiques et présentent un fort potentiel évolutif. Cette plasticité génère de nouvelles combinaisons génétiques qui permettent une adaptabilité à l'hôte ou à l'environnement.

4.2. Les déterminants génétiques de la pathogénie

La définition des gènes de la pathogénie peut varier selon les études et les techniques de détection. La définition la plus stricte comprend les gènes indispensables à la réalisation du cycle infectieux sur l'hôte mais dispensables à la réalisation du cycle de vie *in vitro* ou en conditions de vie saprophytique.

Les analyses expérimentales de biologie moléculaire permettent par exemple de discriminer les gènes spécifiquement nécessaires à l'infection via des analyses phénotypiques après inactivation ou silencing d'un gène d'intérêt. Cette stratégie a certaines limites et ne peut pas s'appliquer chez les parasites obligatoires ou chez les espèces pour lesquelles les conditions de croissance et de reproduction *in vitro* ne sont pas maîtrisées. Néanmoins, de nombreux gènes répondent à ces critères chez les espèces fongiques phytopathogènes et ont été décrits à toutes les étapes du cycle infectieux (Van de Wouw and Howlett, 2011). Une étude à très grande échelle de criblage d'une banque de 21 000 mutants chez *Magnaporthe oryzae* a montré que 559 des mutants étaient affectés lors de l'infection et parmi eux 32,4% présentaient une croissance *in vitro* normale. Les gènes causant cette combinaison de phénotypes *in planta* et *in vitro* lorsqu'ils sont délétés sont donc considérés comme gènes impliqués dans la pathogénie (Jeon et al., 2007).

La complexité des interactions entre gènes (pléiotropie, redondance) et la lourdeur des expérimentations ne permettent pas toujours de faire ces criblages moléculaires à grande

échelle. C'est pourquoi le recours à la prédiction *in silico* de gènes potentiellement impliqués dans la pathogénie est fréquent. Trois grandes classes de molécules sont considérées comme les déterminants majeurs de la pathogénie : les enzymes de dégradation, les métabolites secondaires et les petites protéines secrétées. La prédiction *in silico* de répertoires candidats de ces molécules permet d'émettre des hypothèses sur le mode de vie du champignon, de réaliser des analyses comparatives à grande échelle entre agents pathogènes (**Figure 5**) mais aussi de sélectionner des candidats en s'affranchissant de lourds criblages expérimentaux préalables.

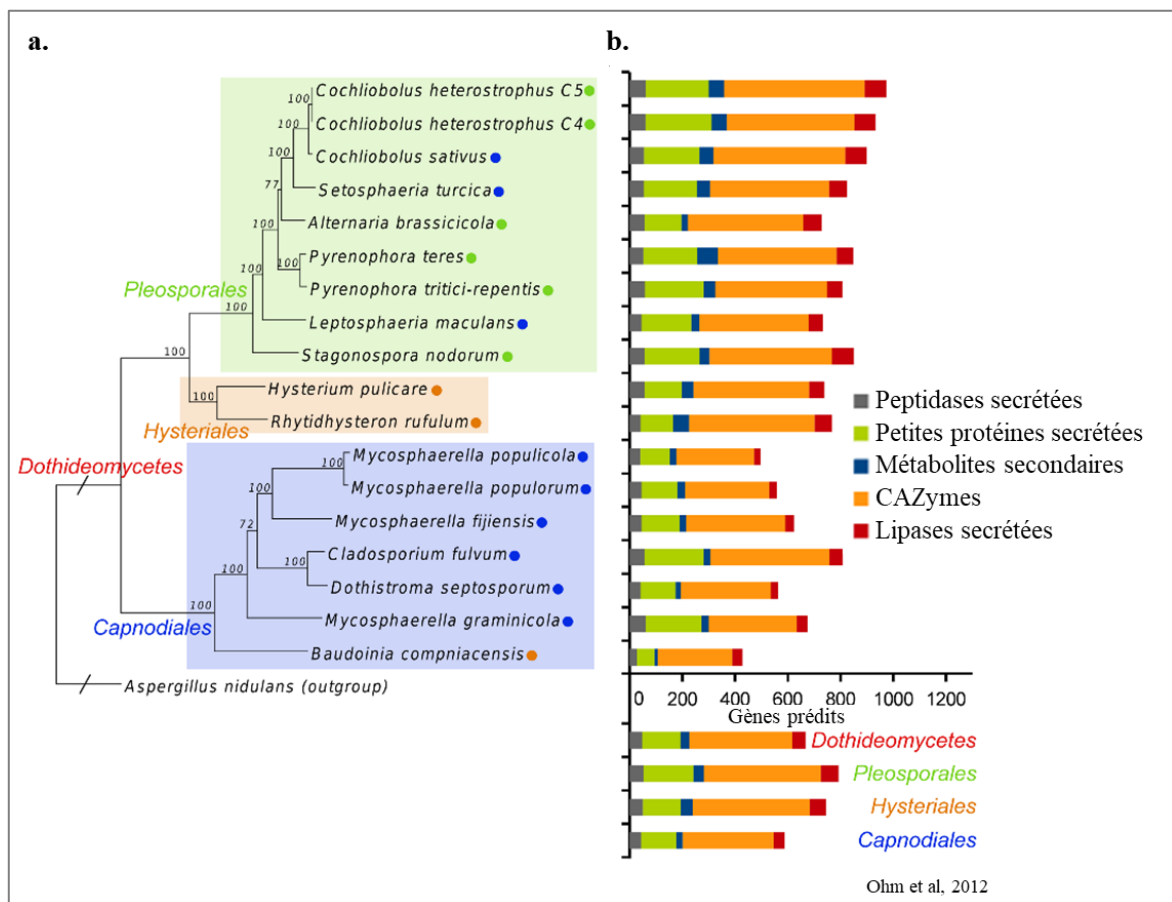


Figure 5 : Proportion de cinq catégories fonctionnelles parmi les gènes prédits au sein de 18 génomes de champignons phytopathogènes de l'ordre des Dothidéomycètes.

(a.) Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences de 51 protéines conservées chez 18 champignons appartenant à la classe des Dothidéomycètes répartis dans différents genres (Pleosporales, Hysteriales, Capnodiales). Les points verts, bleus, et orange représentent les modes infectieux des champignons analysés avec respectivement les nécrotrophes, les biotrophes/hémibiotrophes et les saprotrophes. (b.) Pour chaque champignon, différentes classes de protéines considérées comme des classes impliquées dans la pathogénie ont été annotées et répertoriées : les peptidase et les lipases secrétées, les petites protéines secrétées, les métabolites secondaires et les CAZymes. La proportion de chaque catégorie parmi le nombre total de gènes prédits dans chaque génome est présentée dans l'histogramme. D'après Ohm et al., 2012.

a) Les enzymes de dégradation

Les enzymes de dégradation jouent un rôle clé chez les champignons phytopathogènes, notamment chez les champignons comprenant une phase nécrotrophe dans les tissus de l'hôte. La dégradation des cellules végétales est caractérisée par le recrutement d'un arsenal d'enzymes dédié à la catalyse des composés glycosylés et des polysaccharides. Ces enzymes, nommées CAZymes (Carbohydrate Active EnZymes), sont regroupées dans une base de données qui est largement utilisée lors de l'annotation des gènes de la pathogénie (Lombard et al., 2014) et qui comprend six catégories : les Glycosyl Hydrolases (GH), les Carbohydrate Esterases (CE), les Glycosyl Transférases (GT), les Polysaccharides Lyases (PL), les Protéines Auxiliaires (AAs) et les protéines ayant un module de liaison aux carbohydrates (CBM). Des milliers de CAZymes y sont répertoriées. Parmi elles, on y retrouve celles spécifiques de la dégradation de la paroi végétale (plant cell-wall degrading enzymes : PCWDE) comprenant des enzymes de lyse des composés spécifiques des cellules des plantes tels que la pectine, les galacturonanes, les arabinanes etc.

D'après les annotations des CAZymes candidats au sein de différents génomes fongiques, en moyenne, plusieurs centaines de protéines sont prédites dans cette classe (427 en moyenne sur 18 Dothideomycètes, (**Figure 6**), (Zhao et al., 2013 ; Ohm et al., 2012)) et on observe une surreprésentation de CAZymes chez les hémibiotrophes et les nécrotrophes (Lyu et al., 2015 ; Zhao et al., 2013) (**Figure 6**).

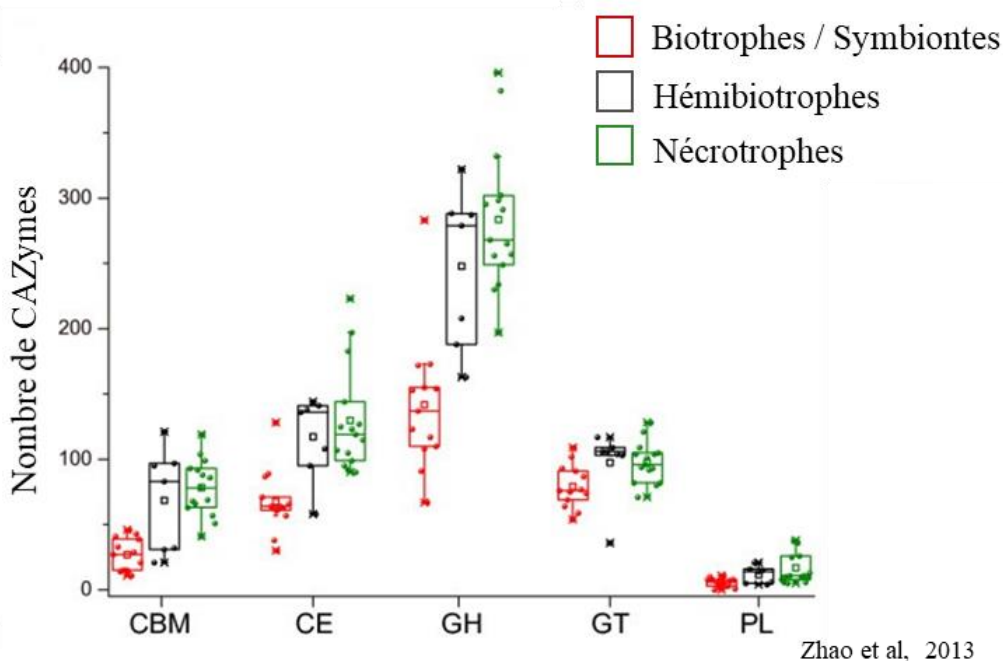


Figure 6 : Proportion des sous-ensembles de Carbohydre Active enZymes (CAZymes) chez les champignons phytopathogènes selon le type trophique.

Les analyses ont été réalisées sur un total de 103 espèces fongiques classées en trois modes nutritifs les biotrophes et les symbiontes (en rouge), les hémibiotrophes (en noir) et les nécrotrophes (en vert). Les cinq grandes catégories fonctionnelles regroupées dans les CAZymes ont été analysées : les protéines ayant un domaine de liaison aux carbohydrates (Carbohydrates Binding Modules : CBM); les Carbohydrate Esterases (CE), les Glycosyl hydrolases (GH), les Glycosyl Transferases (GT) et les Polysaccharide Lyases (PL). Le nombre de protéines annotées dans chaque catégorie est représenté séparément pour chaque mode infectieux. Les données sont représentées sous forme de diagramme en boîte. Adapté de Zhao et al., 2013.

b) Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules appartenant majoritairement à trois grandes familles de composés chimiques : les polycétides, les terpénoïdes et les peptides non ribosomiques. Durant la synthèse de ces molécules on retrouve de manière invariable l'implication d'enzymes 'clé' qui polymérisent le noyau moléculaire du métabolite et qui appartiennent à différentes familles selon la classe du métabolite produit : les polycétides synthases (PKS), les peptides synthases non-ribosomiques (NRPS) et les terpènes synthases (TS). Puis, différents sets d'enzymes sont impliqués dans la décoration de ce noyau produisant des dérivés moléculaires variés selon la voie de biosynthèse. Les gènes codant les enzymes de ces voies de biosynthèse sont regroupés en cluster dans les génomes fongiques et leur

expression est généralement régulée par un facteur de transcription commun permettant la co-expression de tous les gènes du cluster (Bok and Keller, 2004).

Malgré leur définition première, les métabolites secondaires sont impliqués dans de nombreux processus de fonctions primaires des métabolismes fongiques. La mélanine est par exemple impliquée principalement dans la protection contre les UV, d'autres sont impliqués dans le développement des formes de reproduction sexuée (Calvo et al., 2002) ou dans la (dé)toxification du milieu (Keller, 2019).

Les métabolites secondaires peuvent aussi être impliqués complètement ou partiellement dans la réussite de l'infection via des mécanismes très variés. La mélanine citée précédemment est nécessaire à la réussite de l'étape précoce de l'infection chez *M. oryzae* sur le riz en agissant à plusieurs niveaux : protection contre les UV, contre les ROS, et accumulation dans les parois pour aider à la pénétration (Belozerskaya et al., 2015). Chez *L. maculans*, la sirodesmine est une phytotoxine impliquée dans l'infection tardive de la tige du colza qui présente aussi des propriétés antifongiques et antivirales (Gardiner et al., 2004). Certains métabolites ciblent directement des protéines végétales impliquées dans les voies de défense de l'hôte (exemple de l'higginsianine B chez *Colletotrichum higginsianum* (Dallery et al., 2020).

La recherche *in silico* des gènes codant les différents types d'enzymes clé permet d'établir des répertoires candidats de clusters de gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires. D'après les annotations fonctionnelles des gènes d'un cluster candidat, il est parfois possible d'en déduire le métabolite produit s'il a par exemple déjà été caractérisé dans d'autres modèles, mais souvent, le répertoire des métabolites secondaires n'est pas disponible sans analyses métaboliques. Le nombre de clusters prédits chez les champignons varie beaucoup d'une espèce à l'autre. Ohm et al. (2012) ont détecté entre 2 PKS (*Baudoinia compniacensis*) et 34 PKS (*Rhizoglyphus mulleri*) parmi les 18 champignons analysés. Certaines espèces sont très spécialisées dans la production de métabolites secondaires comme les espèces d'*Aspergillus*. Une étude prédictive des clusters de métabolites chez quatre espèces d'*Aspergillus* a détecté entre 39 (*A. fumigatus*) et 81 (*A. niger*) clusters (Inglis et al., 2013).

Pour conclure, les métabolites secondaires ne sont pas exclusivement impliqués dans la réussite de l'infection mais la majorité des champignons pathogènes possède un ou plusieurs clusters codant des métabolites secondaires dont certains sont indispensables à la réussite de l'infection. C'est donc une classe de molécules d'intérêt lors de la recherche de gènes impliqués dans la pathogénie.

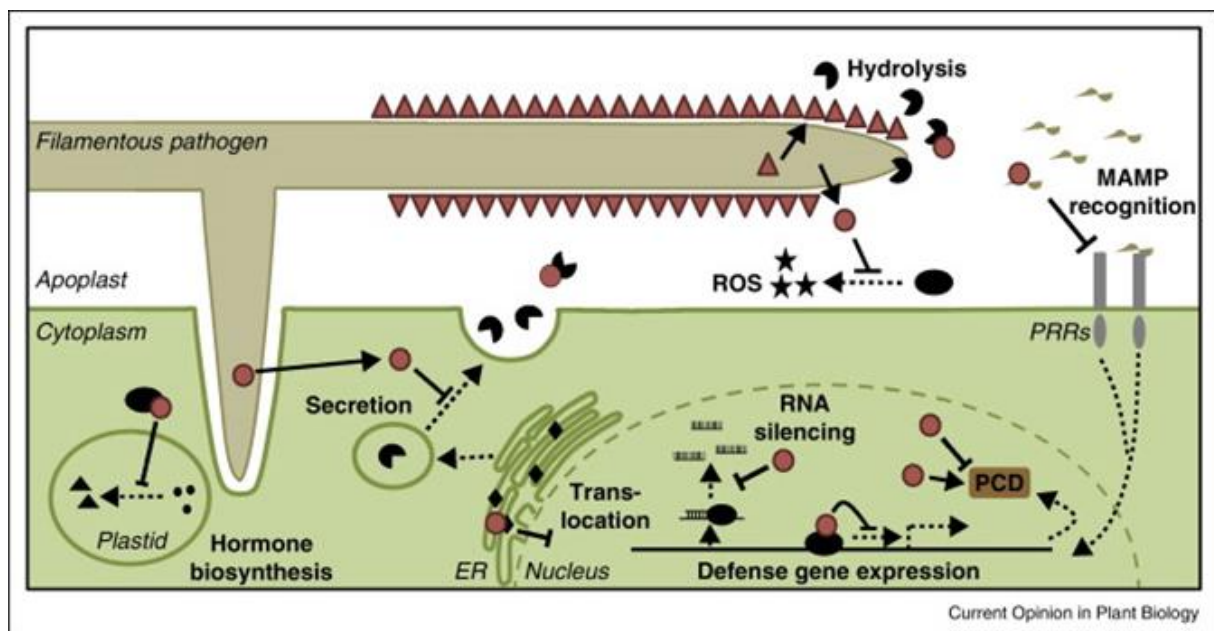
c) Les effecteurs protéiques

Un sécrétome correspond à toutes les molécules secrétées par un organisme dans une condition donnée. Chez les champignons pathogènes, au cours de l'interaction avec l'hôte, un dialogue moléculaire complexe intervient entre les molécules fongiques et les molécules végétales. Une forte proportion de molécules secrétées par le champignon est destinée à contourner ou inhiber les défenses des plantes et ainsi à favoriser la progression du champignon dans les tissus hôtes. Ce sous-ensemble du sécrétome, nécessaire à la réussite de l'infection est appelé l'effectome (composé d'effecteurs).

Grâce aux effecteurs identifiés et caractérisés ces dernières années, on sait aujourd'hui qu'ils présentent une grande diversité de modes d'action (Franceschetti et al., 2017 ; Lo Presti et al., 2015). Les effecteurs ne correspondent pas à une famille moléculaire ni à une famille fonctionnelle unique. Ils correspondent à au moins trois types de molécules différentes (protéines, métabolites secondaires, micro-ARN). Nous ne nous intéresserons dans ce chapitre qu'aux effecteurs protéiques qui sont majoritairement étudiés parmi les effecteurs.

i. Les fonctions des effecteurs protéiques

Les effecteurs protéiques ciblent toutes les étapes des processus de défense de l'hôte, de la perception de l'agent pathogène par la plante à l'activation de la réponse immunitaire de la plante (**Figure 7**). Par exemple, la première étape de détection de l'agent pathogène peut être contournée par le champignon grâce, par exemple, aux effecteurs LysM qui se lient à la chitine fongique, et en particulier aux oligomères de chitine résultant de la dégradation de la paroi fongique par les enzymes végétales, cachant ainsi la présence du champignon aux récepteurs de l'hôte (Sánchez-Vallet et al., 2015). Chez l'hôte, la transduction du signal qui suit la détection du champignon peut être inhibée par la manipulation des voies de signalisation hormonales végétales (**Figure 7**). Enfin, si les processus de défense des plantes parviennent à être activés, le déploiement d'inhibiteurs enzymatiques peut stopper les activités catalytiques de la plante (Jashni et al., 2015 ; Rose et al., 2002). Au contraire, chez les nécrotrophes, certains effecteurs fongiques, comme la famille des Peptides inducteurs de Nécrose et d'Ethylène (NEP), induisent des défenses végétales en activant le processus de mort cellulaire programmée de la plante (Friesen et al., 2008 ; Wolpert and Lorang, 2016) (**Figure 7**, PCD : programmed cell death). Ce phénomène existe aussi chez des symbiotes fongiques comme *Glomus intraradices* où l'effecteur SP7 induit les défenses végétales du maïs, ce qui permet l'augmentation de la résistance à l'invasion d'autres champignons pathogènes et favorise la colonisation biotrophique (Kloppholz et al., 2011).



Rovenich et al., 2014

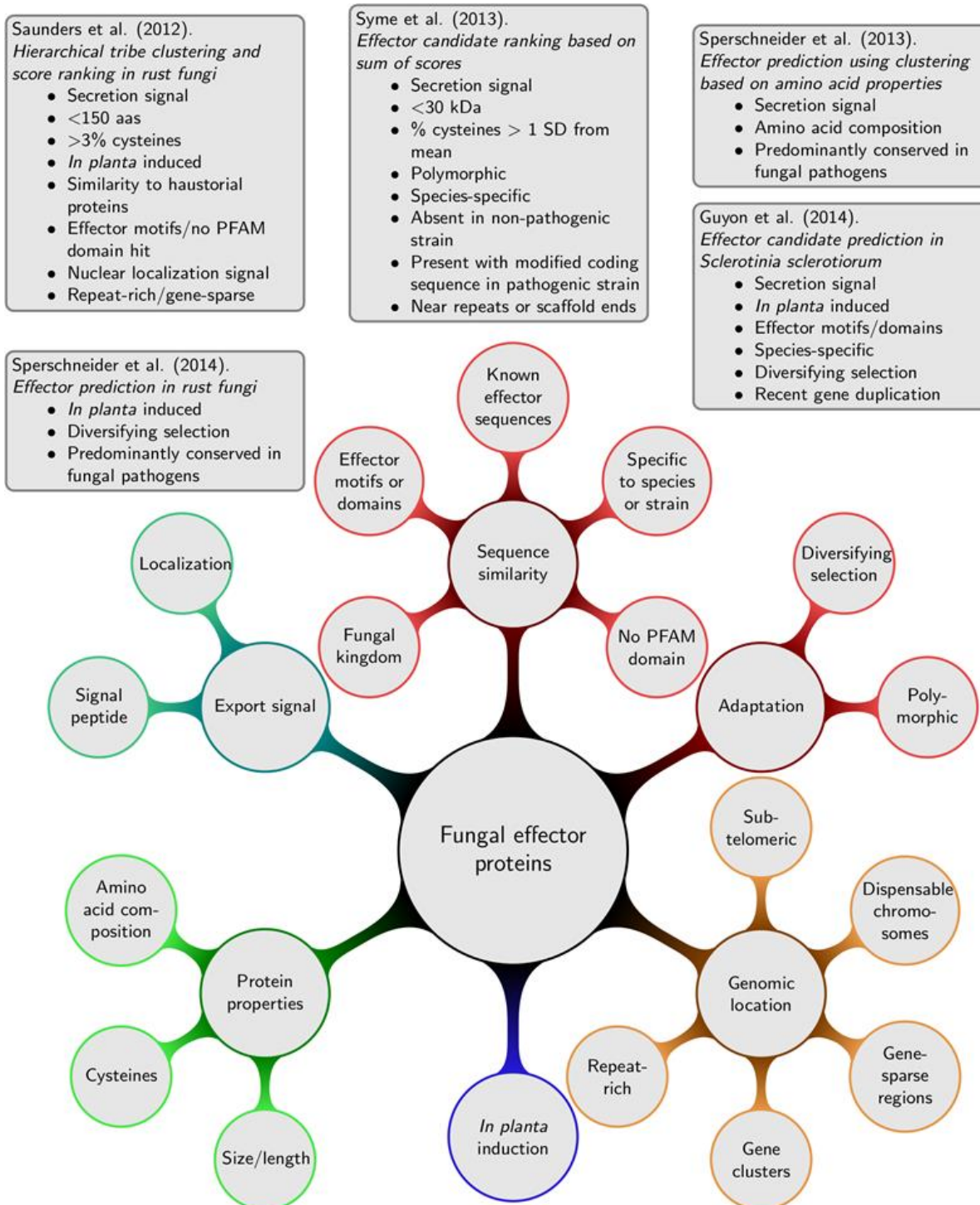
Figure 7 : Les différents modes d'action et localisations des effecteurs secrétés par les champignons phytopathogènes lors de l'infection d'une plante hôte.

Le schéma représente un hyphe fongique développé dans l'apoplasme des tissus végétaux au contact d'une cellule hôte. Les effecteurs secrétés sont représentés par les cercles rouges dans l'apoplasme, dans le cytoplasme et dans le noyau de la cellule végétale. Différents modes d'action sont représentés. Dans l'apoplasme les effecteurs peuvent inhiber la reconnaissance du champignon par la plante par la fixation de récepteurs végétaux tels que les PRRs (Pattern Recognition Receptors) inactivant ainsi la réponse basale de la plante. L'inhibition par les effecteurs de différentes voies de défense végétales est représentée : dans l'apoplasme par l'inhibition de l'hydrolyse ou l'inhibition de la production d'espèces réactives d'oxygène par la plante ; dans le cytoplasme par l'inhibition de la synthèse hormonale ou de la sécrétion d'enzymes de dégradation végétales ; dans le noyau par l'inhibition de la transcription de gènes de défense. D'après Rovenich et al., 2014.

ii. La prédiction *in silico* des répertoires de gènes codant les effecteurs protéiques

Les gènes codant les effecteurs sont présents dans tous les compartiments génomiques des champignons phytopathogènes y compris dans les régions variables pauvres en gènes (isochores AT, chromosomes dispensables). Les effecteurs présents dans ces régions variables sont donc soumis à un fort taux de mutation et à une évolution rapide. Ils n'ont pas ou peu de domaines conservés et sont souvent spécifiques d'un groupe d'isolats au sein même d'une espèce (Plissonneau et al., 2017). Par conséquent ces protéines ont peu ou pas d'homologie dans les bases de données et la recherche de domaines conservés n'est donc pas utilisée pour prédire l'ensemble des protéines effectrices candidates au sein d'un génome. Les outils

bioinformatiques et les pipelines développés ces dix dernières années sont en fait basés sur la prédiction de petites protéines sécrétées (PPS) (Jones et al., 2018). Les paramètres utilisés comprennent la prédiction d'un peptide signal, la prédiction de la localisation subcellulaire et la prédiction des domaines transmembranaires (**Figure 8**). Les pipelines de prédiction varient en fonction des filtres utilisés et de la définition donnée. Aussi, d'autres paramètres sont souvent ajoutés pour prédire un ensemble plus rigoureux et pertinent de petites protéines sécrétées, comme l'absence de domaine d'ancrage GPI (Verma et al., 2016), un filtre de taille (généralement de 300 acides aminés), l'absence d'homologues chez d'autres espèces pour ne garder que ceux spécifiques de l'espèce d'intérêt (O'Connell et al., 2012) ou une expression spécifiquement induite durant l'infection *in planta* (Guyon et al., 2014). Ainsi, la proportion d'effecteurs protéiques candidats au sein des génomes fongiques est de l'ordre de 5 à 12% des protéomes totaux (Soanes et al., 2008). De plus en plus de répertoires d'effecteurs fongiques sont aujourd'hui prédits et une quantité croissante d'entre eux sont validés expérimentalement. Par conséquent de nouvelles approches basées sur l'apprentissage automatique comme EffectorP (Sperschneider et al., 2016) ou ApoplastP (Sperschneider et al., 2018) ont été développées et cumulent les critères de prédiction des effecteurs en un seul outil et de manière entièrement automatisée.



Sperschneider et al., 2015

Figure 8 : Exemples de pipelines de prédiction d'effecteurs candidats.

La prédiction d'effecteurs candidats est basée sur différents critères selon les études. Quelques exemples sont donnés pour quatre analyses sur différents champignons pathogènes. Les critères (au centre des nœuds) régulièrement utilisés sont présentés sous forme de graphe. Ils comprennent : les propriétés des séquences protéiques, la présence d'un signal d'export, les similarités ou au contraire la variabilité entre séquences, la localisation génomique et l'expression *in planta*. Pour chaque critère différentes propriétés sont détaillées. D'après Sperschneider et al., 2015.

iii. La relation entre les effecteurs et les résistances variétales

Pour pallier à l'infection par les micro-organismes pathogènes, les plantes possèdent deux niveaux de défense. Le premier est une résistance basale : la « PTI » (PAMP Triggered Immunity) qui consiste en la reconnaissance par la plante de molécules très conservées chez les micro-organismes telles que la flagelline chez les bactéries ou la chitine chez les champignons. Ces motifs sont reconnus par des récepteurs nommés PRRs (Pattern Recognition Receptors) et entraînent l'activation de réponses basales variées comme un dépôt de callose, la fermeture des stomates, la production d'espèces réactives d'oxygène ou l'activation de voies de signalisation hormonales qui sont efficaces pour contrer la majorité des attaques par les micro-organismes pathogènes (Dodds and Rathjen, 2010 ; Tör et al., 2009).

Comme décrit précédemment (*i*) de nombreux effecteurs, sécrétés par les champignons phytopathogènes présentent des fonctions inhibitrices de la PTI (exemple des effecteurs LysM) permettant ainsi de contourner ou d'inhiber les barrières basales mises en place par la plante hôte. Face à cet effet délétère des effecteurs, les plantes ont développé un deuxième niveau de surveillance avec un système de reconnaissance spécifique des effecteurs eux-mêmes (l'ETI : « Effector-Triggered Immunity »). Cette reconnaissance des effecteurs est médiée par des familles de récepteurs membranaires (RLP, RLK) ou cytosoliques (NBS-LRR) possédant des domaines hypervariables qui permettent la reconnaissance spécifique d'un effecteur donné (Tör et al., 2009). L'effecteur ainsi reconnu par le récepteur de l'hôte est appelé protéine d'avirulence. Une fois les voies de l'ETI activées, une réponse immunitaire végétale rapide et efficace nommée « réponse hypersensible » est induite et consiste en une activation locale de la mort cellulaire programmée des cellules infectées (Balint-Kurti, 2019). Dans le contexte de l'ETI, la reconnaissance d'une seule protéine d'avirulence par un seul récepteur végétal peut suffire à stopper la progression du champignon, rendant l'interaction incompatible selon une interaction dite « gène-pour-gène ».

La lutte agronomique contre les épidémies fongiques est en partie basée sur la sélection et le déploiement au champ de variétés qui présentent une résistance spécifique médiée par un seul gène de résistance. Les résistances à caractère monogénique « gène-pour-gène » déployées au champ sont cependant considérées comme peu durables car elles appliquent une pression de sélection importante sur les populations du champignon pathogène ciblé. Cette pression de sélection peut s'avérer propice au déploiement d'une nouvelle version du gène d'avirulence ou à sa délétion complète ou partielle, permettant à l'agent pathogène de contourner la résistance spécifique. Ce phénomène a notamment été observé lors du déploiement de variétés possédant

le gène de résistance *Rlm1* qui a engendré la contre-sélection du gène d'avirulence *AvrLm1* chez *L. maculans* (Rouxel et al., 2003). Ce schéma évolutif est nommé modèle en zig-zag (Jones and Dangl, 2006).

Cependant, malgré l'utilisation massive des résistances spécifiques « gène-pour-gène » en agronomie, encore peu des mécanismes d'interaction entre gènes d'avirulence et gènes de résistance, ou entre effecteurs et cibles végétales, sont caractérisés au niveau moléculaire

d) Les gènes de la pathogénie chez *Leptosphaeria maculans*

Des dizaines de gènes ont été étudiés au niveau moléculaire chez *L. maculans* pour leur implication dans la pathogénie. Ces gènes sont plus largement décrits dans la table S4 de mon premier article composant le chapitre II de ma thèse. Ils appartiennent à différentes catégories fonctionnelles. On retrouve notamment l'implication de gènes codant des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la sirodesmine qui joue un rôle dans l'établissement de la nécrose de la tige en fin de cycle cultural (Elliott et al., 2007).

La catégorie des effecteurs d'avirulence, quant à elle, est la classe la mieux documentée chez *L. maculans* car la résistance variétale est le seul moyen de lutte adopté aujourd'hui dans la culture du colza, les traitements fongicides étant lourds et inefficaces. Au total, neuf gènes codant des effecteurs d'avirulence (gènes d'avirulence, appelés 'AvrLm') ont été clonés (Neik et al., 2020 ; Petit-Houdenot et al., 2019 ; Ghanbarnia et al., 2018 ; Plissonneau et al., 2016 ; Ghanbarnia et al., 2015 ; Balesdent et al., 2013 ; Van de Wouw et al., 2014 ; Parlange et al., 2009 ; Fudal et al., 2007 ; Gout et al., 2006). Ces gènes sont tous situés dans des régions variables, riches en AT, enrichies en éléments transposables dégénérés (Rouxel et al., 2011) et codent des PPS typiques sans ou avec peu de correspondances dans les bases de données et enrichies en cystéines (à l'exception d'*AvrLm1*). Par ailleurs, un premier répertoire de protéines effectrices prédit *in silico* a permis de définir 651 effecteurs candidats représentant 5,1% du protéome de *L. maculans* (Grandaubert et al., 2014 ; Rouxel et al., 2011).

4.3. La régulation transcriptionnelle au cours de l'infection

a) Décryptage des étapes infectieuses clefs par les analyses transcriptomiques

Un autre niveau de complexité est que les gènes de pathogénie prédits par une annotation génomique ne reflètent ni l'ensemble effectif des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène ni les spécificités des stades de transcription et de traduction de ces gènes. La technologie de séquençage de l'ARN à haut débit (RNA-Seq) a été adaptée avec succès chez de nombreux

agents pathogènes pour décrire les gènes activés ou réprimés lors de cinétiques d'infection en conditions contrôlées. De nombreuses expériences ont été menées sur des cinétiques d'infection de plantes par des champignons ayant différents cycles de vie. Cela a permis de détecter des gènes dont les profils d'expression sont spécifiques de certains stades infectieux et ainsi de consolider leur rôle potentiel durant l'infection (Bhat et al., 2019 ; Lanver et al., 2018 ; Lorrain et al., 2018 ; Brown et al., 2017 ; Copley et al., 2017 ; Dobon et al., 2016 ; Zuluaga et al., 2016 ; Dong et al., 2015 ; Kong et al., 2015 ; Jupe et al., 2013 ; Kawahara et al., 2012 ; Kleemann et al., 2012 ; O'Connell et al., 2012).

Ces analyses transcriptomiques sont très utilisées aujourd'hui mais nécessitent plusieurs prérequis. En premier lieu, le cycle infectieux de l'agent pathogène d'intérêt doit être bien connu pour pouvoir ajuster l'échelle temporelle à la question biologique. Certains champignons pathogènes ont un cycle infectieux très court. Ainsi le suivi des cinétiques d'infection par le biotrophe obligatoire *B. graminis*, l'hémibiotrophe *C. higginsianum* ou l'oomycète *P. capsici* (Hacquard et al., 2013 ; Jupe et al., 2013 ; O'Connell et al., 2012) a été mené sur de petites échelles de temps (24 à 70 heures environ) tandis que celui du biotrophe *U. maydis* a été mené sur deux semaines (Lanver et al., 2018).

Aussi, les étapes choisies doivent pouvoir être reproductibles en conditions contrôlées. En général, les champignons pathogènes hémibiotrophes ont un cycle infectieux qui est limité à un tissu (feuilles, tiges ou racines), ce qui permet de prélever facilement des échantillons de tissus infectés pendant tout le cycle infectieux en une seule expérience. Cependant chez les champignons ayant un cycle de vie complexe, les stades endophytes, ou saprophytes sont généralement exclus de l'analyse car ils sont difficilement reproductibles en conditions contrôlées et ne garantissent pas l'obtention d'une quantité suffisante de biomasse fongique.

Enfin la séquence génomique et les annotations des gènes doivent être disponibles et de bonne qualité. Selon la technologie de séquençage utilisée, l'assemblage du génome peut par exemple s'avérer être une étape limitante pour des génomes ayant beaucoup de régions répétées. La méthode d'annotation des gènes, basée sur des modèles de gènes préexistants, n'est souvent pas exhaustive et certains gènes atypiques peuvent en être exclus. Les données RNA-Seq peuvent néanmoins être aussi utilisées dans le but de compléter ou de confirmer ces annotations grâce à la détection de transcrits.

b) Complexité des vagues d'expression lors des cinétiques infectieuses

Pour détecter les gènes transcrits lors de cinétiques d'infection, différentes comparaisons statistiques sont adoptées dans la littérature. Certaines analyses se focalisent sur des comparaisons d'expression de gènes entre des conditions *in vitro*, ie des conditions de croissance mycélienne indépendantes de l'interaction avec l'hôte, avec des conditions d'infection *in planta*. Dans d'autres analyses, les comparaisons sont faites deux à deux entre toutes les dates de la cinétique d'infection. En général, des milliers de gènes sont détectés comme différentiellement exprimés. Une cinétique sur 21 jours après l'inoculation de *Zyoseptoria tritici* a été analysée par RNA-Seq en comparant toutes les dates à une condition de croissance *in vitro* révélant ainsi 3 048 gènes différentiellement exprimés, soit 28% des gènes totaux (Rudd et al., 2015). Chez le biotrophe obligatoire *U. maydis* 68% des gènes sont détectés différentiellement exprimés entre huit dates prélevées sur 12 jours d'infection sur le maïs (Lanver et al., 2018). Une étude comparative sur 23 publications a montré que le taux des gènes sur-exprimés durant l'infection toutes analyses confondues est de l'ordre de 10% à 46% avec une moyenne de 11% des gènes totaux (Petre et al., 2020). On ne sait pas si une réalité biologique serait la cause de ce recrutement de gènes en différentes proportions lors de l'infection car il est aussi probable que cette variabilité détectée soit due à la méthode utilisée, aux conditions testées ou à l'organisme étudié.

Ensuite, les méthodes de clustering, qui peuvent être aussi très variées selon les études, sont quasi-systématiquement utilisées pour classer ces milliers de gènes en clusters de gènes ayant les mêmes profils d'expression. Ces classifications permettent de traiter les gros ensembles de gènes, de les diviser en sous-sets d'intérêts et de détecter des gènes coexprimés lors d'une ou plusieurs étapes de l'infection. C'est ainsi que des sets de gènes impliqués dans la biotrophie chez *U. maydis* ou chez la rouille du peuplier *M. larici-populina* (Lanver et al., 2018 ; Duplessis et al., 2011b) ou ceux impliqués dans la necrotrophie chez *B. cinerea* (Kong et al., 2015) ont été mis en évidence. Aussi, ces analyses ont permis de montrer des régulations transcriptionnelles plus fines, par exemple le passage de la biotrophie à la nécrotrophie chez *Z. tritici* sur le blé (**Figure 9a**), ou chez *P. infestans* sur la tomate (Palma-Guerrero et al., 2016 ; Zuluaga et al., 2016). D'autres études permettent de répondre à des questions plus spécifiques sur l'expression d'un ensemble de gènes d'intérêt préalablement sélectionnés. Des vagues d'expression spécifiques des gènes codant les effecteurs candidats ou celles des gènes codant les enzymes de biosynthèse des métabolites secondaires (**Figure 9b**) ont été décrites chez l'agent pathogène à large spectre *C. higginsianum* (Dallery et al., 2017 ; Kleemann et al., 2012).

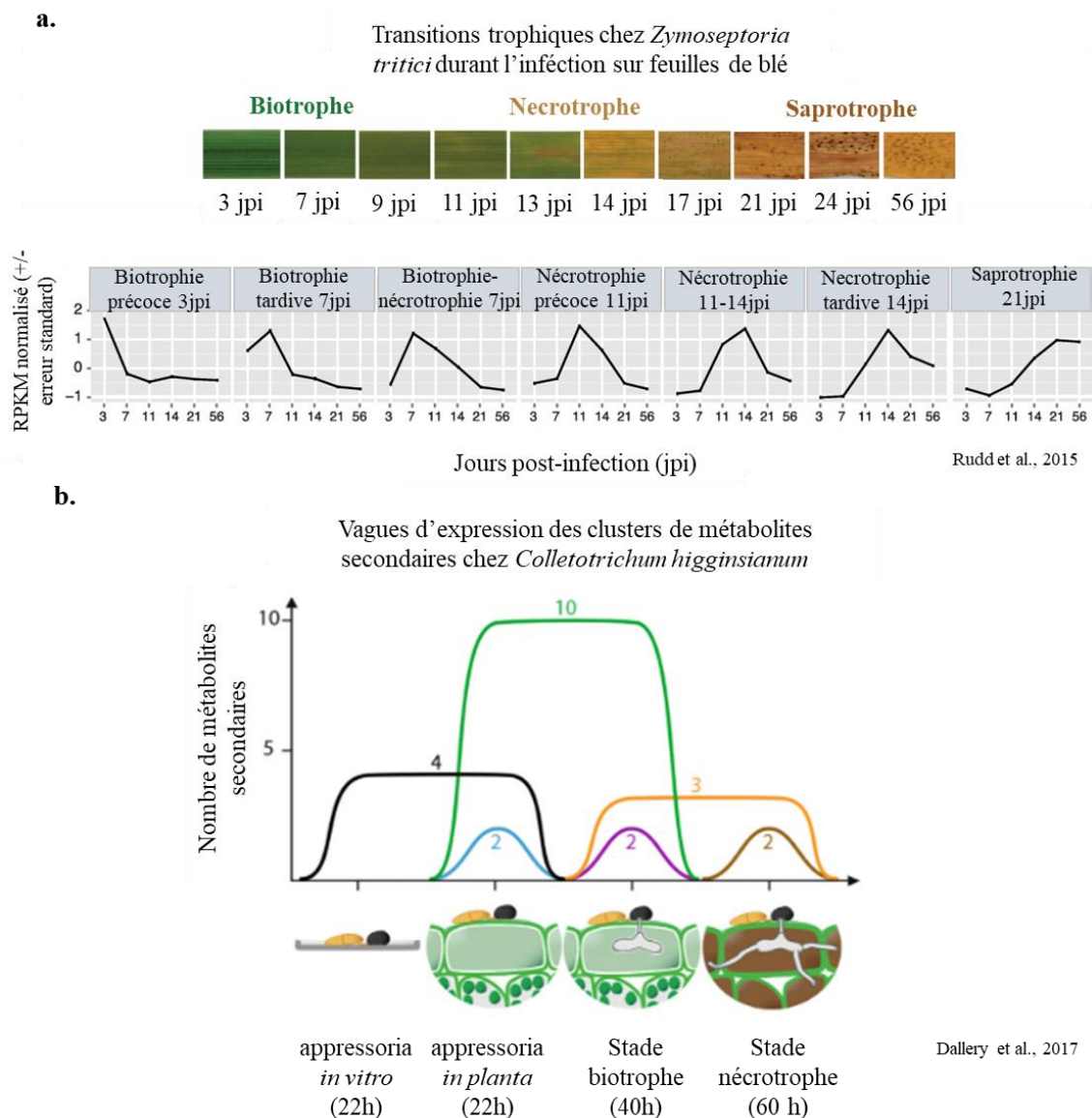


Figure 9 : Détection de vagues de gènes coexprimés selon le stade de développement de deux champignons phytopathogènes.

(a.) Suivi phénotypique et transcriptomique d'une cinétique d'infection de *Z. tritici* sur feuille de blé. Les différents phénotypes associés aux trois grandes étapes de la colonisation de *Z. tritici* sur blé (biotrophie, nécrotrophie, saprotrophie) sont décrits. Les profils moyens d'expression de sept ensembles de gènes détectés comme coexprimés par clustering sont représentés. Dans chaque cluster, la moyenne de l'expression de 800 à 1700 gènes coexprimés est représentée à six dates consécutives au cours de l'infection. (3, 7, 11, 14, 21, 56 jours). Chaque courbe d'expression est nommée selon le stade auquel un pic d'expression du cluster est détecté. D'après Rudd et al., 2015. (b.) Schéma du profil d'expression des gènes codant les enzymes clés de synthèse des métabolites secondaires chez *C. higginsianum* durant l'infection d'*Arabidopsis thaliana*. Les quatre grandes étapes de l'infection de *C. higginsianum* prélevées pour les analyses RNA-Seq sont décrites. Le nombre de gènes surexprimés codant ces enzymes dans chaque cluster est détaillé. La hauteur du pic correspond au nombre de gènes détectés. D'après Dallery et al., 2017.

Enfin, en plus de la description à grande échelle des différentes étapes du cycle infectieux, l'analyse transcriptomique est un bon moyen de cribler un grand set de gènes pour discriminer parmi eux des gènes d'intérêt grâce à leur profil d'expression. La combinaison de la fonction prédite d'un gène, de sa localisation génomique et de son expression *in planta* sont des critères de sélection de gènes d'intérêts pour de futures études moléculaires et fonctionnelles.

c) Expression des gènes de *Leptosphaeria maculans* lors de l'infection

Chez *Leptosphaeria maculans*, le stade précoce de l'infection se reproduit facilement dans un environnement contrôlé. Ainsi plusieurs analyses transcriptomiques ont décrit les gènes de *L. maculans* impliqués spécifiquement dans le stade biotrophe ou nécrotrophe de l'infection primaire sur cotylédons (Haddadi et al., 2016 ; Lowe et al., 2014 ; Sonah et al., 2016). Une validation fonctionnelle de quelques-uns d'entre eux a montré par exemple qu'un gène inducteur de nécrose (Necrosis-Like Protein) était impliqué dans le développement des symptômes en phase nécrotrophe (Haddadi et al., 2016). Ces données ont par la suite été réutilisées dans d'autres études dans le but de réaliser des analyses fonctionnelles sur des gènes d'intérêt préalablement sélectionnés par leur profil d'expression. Les gènes codant le cluster de biosynthèse de l'acide abscissique (ABA) (Darma et al., 2019) ainsi que neuf gènes de fonction inconnue (Urquhart and Idnurm, 2019), tous fortement surexprimés durant le stade biotrophe de la colonisation des cotylédons, ont été sélectionnés pour leur potentielle importance dans l'établissement de l'infection précoce. Leur inactivation n'a cependant pas entraîné de défaillance de colonisation chez les mutants générés montrant aussi les limites du criblage de gènes impliqués dans la pathogénie par les approches transcriptomiques.

i. Les vagues d'expression des effecteurs chez *L. maculans*

Avant la généralisation des analyses RNA-Seq, il a été montré pour un set restreint de gènes codant les effecteurs, plus spécifiquement pour les effecteurs d'virulence validés et clonés, que leur transcription était activée lors de la phase biotrophe de l'infection précoce. Puis, grâce à des analyses d'expression par micro-array (Rouxel et al., 2011), l'hypothèse qu'un set d'effecteurs plus conséquent serait coexprimé sous forme de vague d'expression durant l'infection précoce des feuilles a été formulée. Cette hypothèse fût par la suite confortée grâce à la détection de l'expression de plusieurs dizaines d'effecteurs candidats à 7JPI (jours post-inoculation) durant la phase biotrophe de l'infection dans différentes analyses RNA-seq (Haddadi et al., 2016 ; Sonah et al., 2016).

Le stade d'infection tardif de la tige a, quant à lui, aussi fait l'objet de recherche de l'implication d'effecteurs, nommés « effecteurs tardifs ». Contrairement aux effecteurs précoces, les analyses RNA-Seq de l'infection tardive de la tige ont précédé les analyses expérimentales de validation fonctionnelle de gènes candidats. En premier lieu, une étude RNA-Seq a été menée en 2017 pour explorer l'expression des gènes dans la tige 24 jours après l'infection et a permis d'y détecter l'expression d'effecteurs candidats (Gervais et al., 2017). L'exploration fonctionnelle de certains d'entre eux est en cours et fait l'objet d'un article en cours de soumission (A. Jiquel et al., soumis).

L'hypothèse selon laquelle plusieurs vagues d'expression de sous-sets d'effecteurs seraient coexprimés à différents stades (infection précoce et infection tardive sur tige) est formulée depuis plusieurs années maintenant. Cependant, ces expérimentations RNA-Seq sur cotylédons ou sur tiges ont été menées à deux dates après l'infection précoce et à une seule date après l'infection tardive. Les profils d'expression sont donc peu précis et la co-expression au sein des clusters identifiés est moins rigoureuse car elle couvre trop peu de points d'infection. Par ailleurs, l'expression des gènes de *L. maculans* dans les autres stades de son cycle de vie complexe a été très peu étudiée et on ne sait pas si des vagues d'expression d'effecteurs sont impliquées ou non dans la saprotrophie ou l'endophytisme. Aussi, d'autres catégories de gènes, moins étudiés chez *L. maculans*, pourraient être coexprimées avec les effecteurs ou même présenter des profils d'expression inconnus.

Les analyses RNA-Seq au cours de l'infection sont donc une source importante d'informations pour mieux comprendre l'implication des gènes dans les différentes étapes d'un cycle de vie connu, et potentiellement pour détecter de nouveaux gènes d'intérêt fondamental ou agronomique.

4.4. La régulation épigénétique de l'expression des gènes chez les champignons phytopathogènes

Plusieurs analyses mettent en corrélation la localisation génomique, la régulation épigénétique et la régulation transcriptionnelle chez les champignons phytopathogènes, notamment chez *L. maculans*.

Pour bien comprendre comment la régulation épigénétique influence la transcription des gènes, il est important de revenir sur le concept fondamental de la dynamique de la compaction chromatinienne. La chromatine est le complexe structural que forment les brins d'ADN liés physiquement à des complexes protéiques nommés histones dans le noyau des cellules. On

distingue deux formes de chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'hétérochromatine correspond à un état condensé des brins d'ADN enroulés autour des histones. L'euchromatine, au contraire, correspond à un état relâché des brins d'ADN. Dans une configuration d'euchromatine, l'ADN, libéré des liaisons avec les histones devient alors accessible aux facteurs de transcription qui initialisent l'expression des gènes présents dans ces régions d'ADN relâché. La condensation ou la décondensation de la chromatine est donc un processus dynamique qui favorise ou limite l'accès de la machinerie transcriptionnelle aux régions d'ADN (Kouzarides, 2007).

L'état de condensation de la chromatine n'est pas figé et varie dans le temps mais aussi selon les régions du génome. Cette dynamique est régie par des modifications biochimiques des histones. Elles peuvent subir des méthylation ou des acétylation qui, en étant déposées ou retirées des histones, modulent leur état de liaison avec l'ADN (Dubey and Jeon, 2017). Plusieurs marques de méthylation d'histone sont décrites chez les champignons phytopathogènes dont trois sont particulièrement étudiées. Deux d'entre elles sont responsables de la formation d'hétérochromatine : la tri-méthylation de la Lysine 9 ou de la Lysine 27 de l'Histone 3 (H3K9me₃, H3K27me₃). La première (H3K9me₃) est une marque d'hétérochromatine dite constitutive car elle est impliquée dans le maintien de l'intégrité du génome et est considérée comme stable (peu modifiée lors du développement). La deuxième (H3K27me₃) est une marque d'hétérochromatine dite facultative qui peut être retirée ou déposée de manière plus dynamique notamment lors de la perception de certains stress (Freitag, 2017).

Ces deux marques répressives ne sont pas réparties aléatoirement dans le génome, elles sont associées à des compartiments génomiques qui diffèrent selon l'organisme étudié. La marque H3K9me₃ a pour l'instant toujours été décrite associée aux régions comprenant des éléments transposables comme dans les régions télomériques chez *Neurospora crassa* (Smith et al., 2008) ou celles de *Z. tritici* (Schotanus et al., 2015). On retrouve la marque H3K27me₃ dans des régions plus diverses notamment à proximité des clusters de métabolites secondaires (Connolly et al., 2013), mais aussi, comme la marque H3K9me₃, dans les régions riches en ET comme dans les chromosomes accessoires de *Z. tritici* (Schotanus et al., 2015). Un autre niveau de complexité est que ces marques d'hétérochromatine ne sont pas toujours mutuellement exclusives et peuvent co-localiser dans certaines régions.

La troisième marque est celle associée à l'euchromatine, qui est une marque stable, caractérisée par la di- ou tri-méthylation de la Lysine 4 de l'Histone 3 (H3K4me₂₋₃) et présente

dans les régions de forte expression génique où sont notamment localisés des gènes exprimés constitutivement (Gacek-Matthews et al., 2016).

La régulation transcriptionnelle des gènes de pathogénie chez les champignons semble intimement liée à leur localisation génomique et à leurs marques épigénétiques associées. En effet, les marques d'hétérochromatine facultative ou constitutive sont colocalisées *in vitro* avec une forte proportion de gènes impliqués dans la pathogénie et répriment l'expression de ceux-ci en dehors du cycle infectieux (Soyer et al., 2019 ; Chujo and Scott, 2014 ; Connolly et al., 2013). Dans certaines études, il a été démontré que la dérèpression *in planta* de gènes impliqués dans la pathogénie comme les effecteurs (Soyer et al., 2019) ou les clusters de métabolites secondaires (Chujo and Scott, 2014) était associée à un retrait des marques hétérochromatiniennes.

Chez *L. maculans*, comme décrit précédemment (paragraphe 4.2.), une première version du génome de *L. maculans* a été publié en 2011 (Rouxel et al., 2011) rendant compte du génome à 'deux vitesses' de *L. maculans*. Les gènes présents dans les régions riches en AT sont enrichis en effecteurs candidats et contiennent tous les effecteurs 'AvrLm' validés chez *L. maculans*. Par ailleurs, ces derniers sont spécifiquement exprimés durant l'infection biotrophe de la feuille et complètement éteints lors de la croissance *in vitro*. Une hypothèse a été élaborée selon laquelle les effecteurs (validés mais aussi élargis à ceux prédits) présents dans ces régions subiraient une régulation transcriptionnelle dépendante de leur localisation et potentiellement des marques épigénétiques qui y sont associées.

Pour tester cette hypothèse, l'expression de deux protéines indispensables à la triméthylation H3K9me3 a été réduite par silencing chez *L. maculans*, et 41% des gènes codant des effecteurs localisés en isochores AT ont été détectés exprimés *in vitro* (Soyer et al., 2014). Cela suggère, d'une part, que la marque de méthylation H3K9me3 est associée à une partie des isochores AT dans les conditions de croissance *in vitro* et, d'autre part, qu'elle contribue à la répression de l'expression de 41% des effecteurs localisés dans ces régions. Par extrapolation, cela suggère aussi que ces marques seraient retirées pour permettre l'expression de ces gènes lors de la phase biotrophe de l'infection précoce *in planta*, ce qui n'a pas encore été démontré expérimentalement.

5. Les interactions biotiques lors de coinfections : cas des complexes d'espèces

Les maladies fongiques majeures, discutées dans les chapitres précédents sont généralement étudiées comme une interaction bipartite entre un champignon pathogène et son hôte. Cependant dans les conditions naturelles, les plantes sont coinfectées par plusieurs agents pathogènes en même temps. Ils colonisent différents tissus, parfois à différents stades développementaux de la plante mais coexistent quasi-systématiquement avec d'autres micro-organismes de manière transitoire ou plus pérenne. Une étude de metabarcoding sur différents organes de l'olivier et à différentes périodes a révélé que la diversité fongique variait de 37 à 117 taxons au cours d'une année (Abdelfattah et al., 2015). Un des cas particuliers de coinfection est la coinfection par des espèces proches qui sont les agents causaux d'une seule et même maladie. Ce constat a conduit au concept de « complexes de maladies » (Taylor et al., 2000 ; Tollenaere et al., 2016) qui sont généralement composés d'espèces relativement proches regroupées dans un même phylum, connues sous le nom de « complexes d'espèces ». Ils sont largement étudiés chez les bactéries ou les virus pathogènes mais encore peu étudiés dans le domaine des maladies fongiques, alors qu'un grand nombre de maladies de plantes de grande culture sont causées par des complexes d'espèces à l'échelle mondiale (Ex : *Magnaporthe* spp, *Colletotrichum* spp, *Botrytis* spp, *Fusarium* spp).

5.1. Définition génétique et biologique des complexes d'espèces

a) Des critères de définition morphologique et biochimique variés

Les complexes d'espèces fongiques ont d'abord été définis phénotypiquement. Les analyses morphologiques ou biochimiques ont dévoilé que certaines maladies résultaient de l'infection par différentes espèces proches, initialement indiscernables par leurs phénotypes *in planta*. Sans définition exacte, les critères utilisés pour distinguer ces espèces variaient beaucoup d'un complexe à l'autre. Chez le complexe d'espèces *Fusarium* spp, l'un des plus riches chez les champignons pathogènes des plantes, 65 espèces ont d'abord été décrites via l'analyse des caractéristiques phénotypiques de colonies ou conidies sur milieu *in vitro*, alors que d'autres études ont plus tard été basées sur la compatibilité végétative (Aoki et al., 2014). D'autres critères portaient sur des analyses biochimiques, ainsi la production de différents métabolites secondaires a également été utilisée pour différencier les espèces du complexe d'espèces *Fusarium fujikuroi* (Niehaus et al., 2016) ou chez les espèces du complexe de *Rhizoctonia solani* (Aliferis et al., 2013).

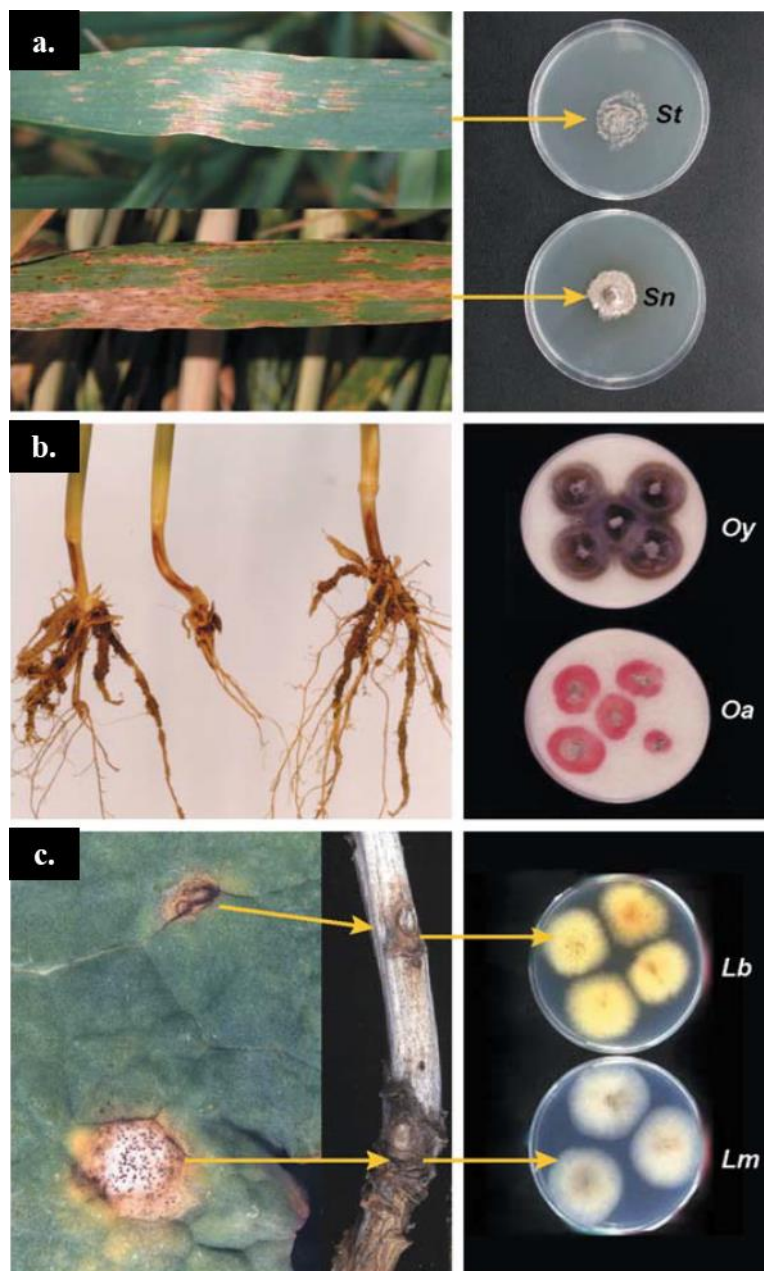
b) Impact des critères phylogénétiques sur la définition des complexes d'espèces

L'utilisation accrue des analyses de criblage de population par des marqueurs génomiques a permis de discriminer plus finement les espèces au sein d'un complexe. Cela a entraîné une réorganisation de leur classification et une augmentation accrue du nombre d'espèces au sein des différents complexes. Quatre complexes d'espèces, comprenant au total plus de 300 espèces, sont désormais décrits chez les espèces de *Fusarium* spp (Aoki et al., 2014). De même chez les espèces de *Colletotrichum* spp, 189 espèces sont divisées en 11 sous-clades (Baroncelli et al., 2017).

Cependant, cette définition strictement phylogénétique a entraîné un élargissement du concept de complexe d'espèces en ne tenant plus compte de la similarité des modes infectieux et des cycles de vie de ces espèces proches. Ainsi, nombre d'entre eux incluent des espèces qui diffèrent largement par leurs gammes d'hôtes ou leurs modes de vie, ce qui suggère qu'elles ne coexistent pas au cours de leur cycle de vie. Dans le complexe d'espèces *Magnaporthe* spp, *M. oryzae* est un agent pathogène du riz et de plusieurs autres graminées, tandis que *M. grisea* est uniquement un agent pathogène isolé sur la graminée *Digitaria* (Couch and Kohn, 2002). Les espèces au sein d'un complexe défini phylogénétiquement peuvent aussi fortement diverger par leur mode de vie pendant la colonisation comme dans le complexe *Colletotrichum* dans lequel *Colletotrichum tofieldiae* est considéré comme un endophyte asymptomatique des racines d'*Arabidopsis thaliana* alors que son parent *Colletotrichum incanum* cause de sévères lésions (Hacquard et al., 2016). Dans de nombreux cas, les espèces au sein d'un complexe ne sont donc pas des composants de la même maladie, elles ne co-existent pas au sein de l'hôte et ont des niches écologiques distinctes.

c) Les complexes d'espèces aux cycles infectieux similaires

Nous utiliserons ici une définition plus stricte en ne prenant en compte que les espèces qui, en plus d'être étroitement liées phylogénétiquement, cumulent des similarités dans leur cycle épidémiologique, leur spectre d'hôte et leur pouvoir pathogène renforçant l'idée qu'elles coexistent dans l'espace et le temps. C'est le cas des agents causaux de la maladie de l'anthracnose chez le pois, comprenant 3 espèces dont deux (*Mycosphaerella pinodes* et *Ascochyta pisi*) sont des espèces du genre des Didymellaceae et difficilement distinguables morphologiquement (May et al., 2009). Parmi d'autres exemple on trouve les agents causaux de la maladie du piétin-verse sur le blé : *Oculimacula yallundae* et *O. aciformis* (**Figure 10**) (Walsh et al., 2005), ou les espèces biotrophes du genre *Erysiphe* pathogènes et agents causaux de l'oïdium sur chêne (Mougou-Hamdane et al., 2010).



fitt et al., 2006

Figure 10 : Exemple de phénotypes de trois complexes d'espèces lors de l'infection d'une plante hôte ou en condition de croissance *in vitro*.

(a.) Taches foliaires causées par *Zymoseptoria tritici* (St ; tache foliaire mouchetée) et *Parastagonospora nodorum* (Sn ; tache foliaire) sur feuilles de blé. (b.) *Oculimacula yallundae* (Oy) et *Oculimacula aciformis* (Oa) sur les tiges de blé. (c.) Nécroses causées par *Leptosphaeria biglobosa* (Lb) et *Leptosphaeria maculans* (Lm) sur feuille et tige de colza. Le phénotype de croissance mycélienne *in vitro* de chacune des espèces est aussi illustré. D'après Fitt et al. (2006a).

d) Le complexe *Leptosphaeria maculans* / *Leptosphaeria biglobosa*

L. maculans fait partie d'un complexe d'espèces qui n'a été décrit qu'au début des années 2000 grâce à des analyses phylogénétiques (Mendes-Pereira et al., 2003). Auparavant, une dizaine d'isolats de *Leptosphaeria* « *maculans* » avaient été discriminés et classés en sept sous-groupes selon différents critères (phénotype *in planta*, RFLP (Johnson and Lewis, 1990) ; diversité des isozymes (Balesdent et al., 1992) ; production de métabolites secondaires (Koch et al., 1989)). Parmi ces « groupes » on distinguait les souches dites « agressives » et « Tox⁺ » (causant des symptômes très dommageables et produisant de la sirodesmine lors de l'infection de la tige) et des souches dites « non-agressive » et « Tox⁰ » (moins agressives et non productrices de sirodesmine). Par la suite des analyses phénotypiques et moléculaires ont permis de démontrer que ces deux « pathotypes » étaient deux espèces différentes : *Leptosphaeria biglobosa* correspondant aux souches moins agressives et *Leptosphaeria maculans* à l'espèce la plus agressive (Mendes-Pereira et al., 2003 ; Shoemaker and Brun, 2001).

Les caractérisations moléculaires de collections mondiales effectuées sur tous les continents et sur différentes *Brassicaceae* ont révélé une complexité encore plus grande, permettant de distinguer des « sous clades » au sein des espèces *L. maculans* ou *L. biglobosa*. Ainsi quatre sous-clades chez les espèces de *L. biglobosa* : `brassicae`, `canadensis`, `australensis`, `thlaspii`, et deux sous-clades chez les *L. maculans* spp : `brassicae` et `lepidii` ont été répertoriées. Les deux espèces (*maculans* et *biglobosa*) auraient divergé il y a environ 22 millions d'années (Grandaubert et al., 2014) (**Figure 11**). Au sein de ces deux espèces, il est maintenant admis que chaque sous-clade correspond à une espèce à part entière, compte tenu du polymorphisme nucléotidique observé entre les souches types de chaque sous-clade (Grandaubert et al., 2014) (**Figure 11**). Dans cette étude nous nous concentrerons plus particulièrement sur les deux espèces *L. maculans* 'brassicae' et *L. biglobosa* 'brassicae', seules espèces retrouvées en France sur les cultures de colza (nommées *L. maculans* et *L. biglobosa* mais spécifiées par 'brassicae' si nécessaire pour la compréhension).

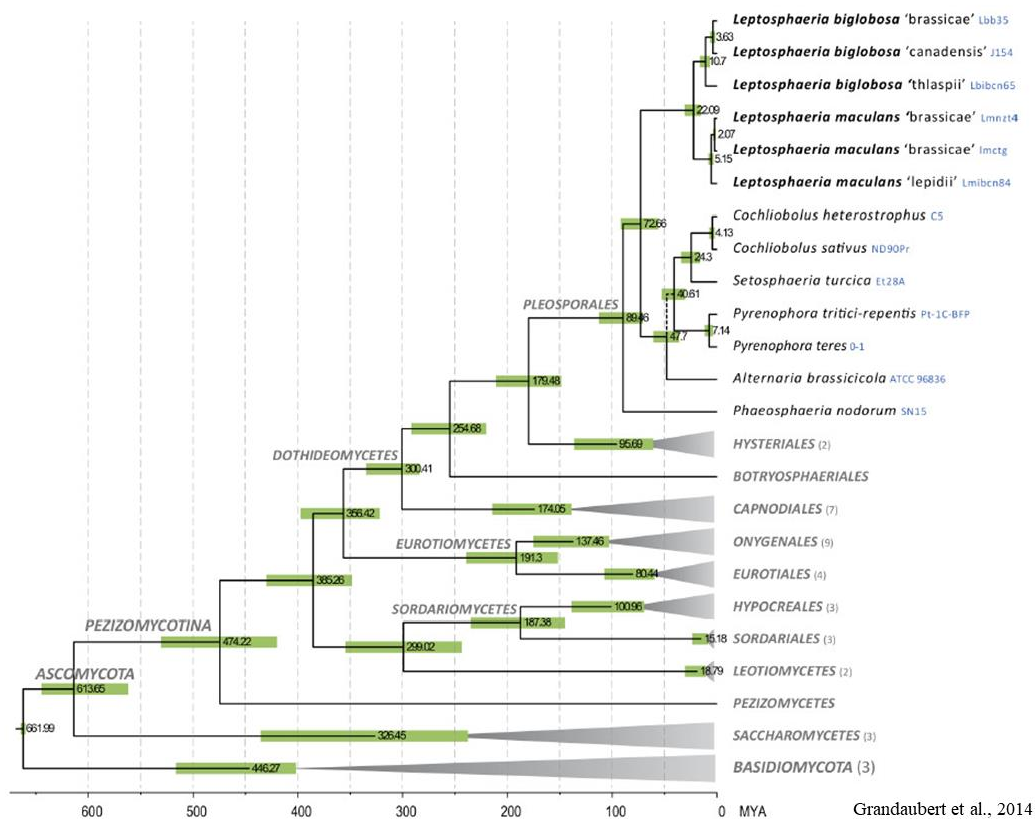


Figure 11 : Arbre phylogénétique de la classe des Ascomycètes détaillé pour le genre des Pléosporales.

L'analyse phylogénétique a été effectuée à partir de 19 protéines conservées. Les différentes espèces de *Leptosphaeria* sont décrites ainsi que les sous-clades ('brassicae', 'canadensis', 'thlaspii', et 'lepidii') et le nom des isolats séquencés est indiqué (Lbb35 ; J154 ; Lbibcn65 ; Lmnzt4 ; Lmctg ; Lmibcn84). Les espèces et genres des autres classes, à partir du genre des Hysteriales, ne sont pas détaillés. Le chiffre entre parenthèse indique le nombre de souches utilisées pour la construction de l'arbre. Le nombre en vert au niveau des nœuds indique l'âge moyen du nœud en millions d'années et l'amplitude du rectangle indique l'incertitude sur la datation de la divergence. Une ligne pointillée indique un placement incertain dans l'arbre phylogénétique. D'après Grandaubert et al. (2014).

Les études épidémiologiques couplées à des caractérisations moléculaires ont montré que *L. maculans* et *L. biglobosa* coexistent sur leur hôte tout au long du cycle de vie du colza : sur les feuilles et sur différentes parties de la tige (Jacques et al., 2020 ; West et al., 2001) (**Figure 12**). Les deux champignons présentent donc le même cycle de vie, mais différent par les symptômes causés. Lors de la colonisation précoce des feuilles en automne/hiver *L. maculans* a un mode de vie hémibiotrophe alors que *L. biglobosa* est considéré comme un nécrotrophe strict (**figure 12a**). Au début de l'été, alors que *L. maculans* provoque une nécrose au collet, *L. biglobosa* moins agressif, provoque des lésions sur la partie supérieure de la tige (**Figure 12c**).

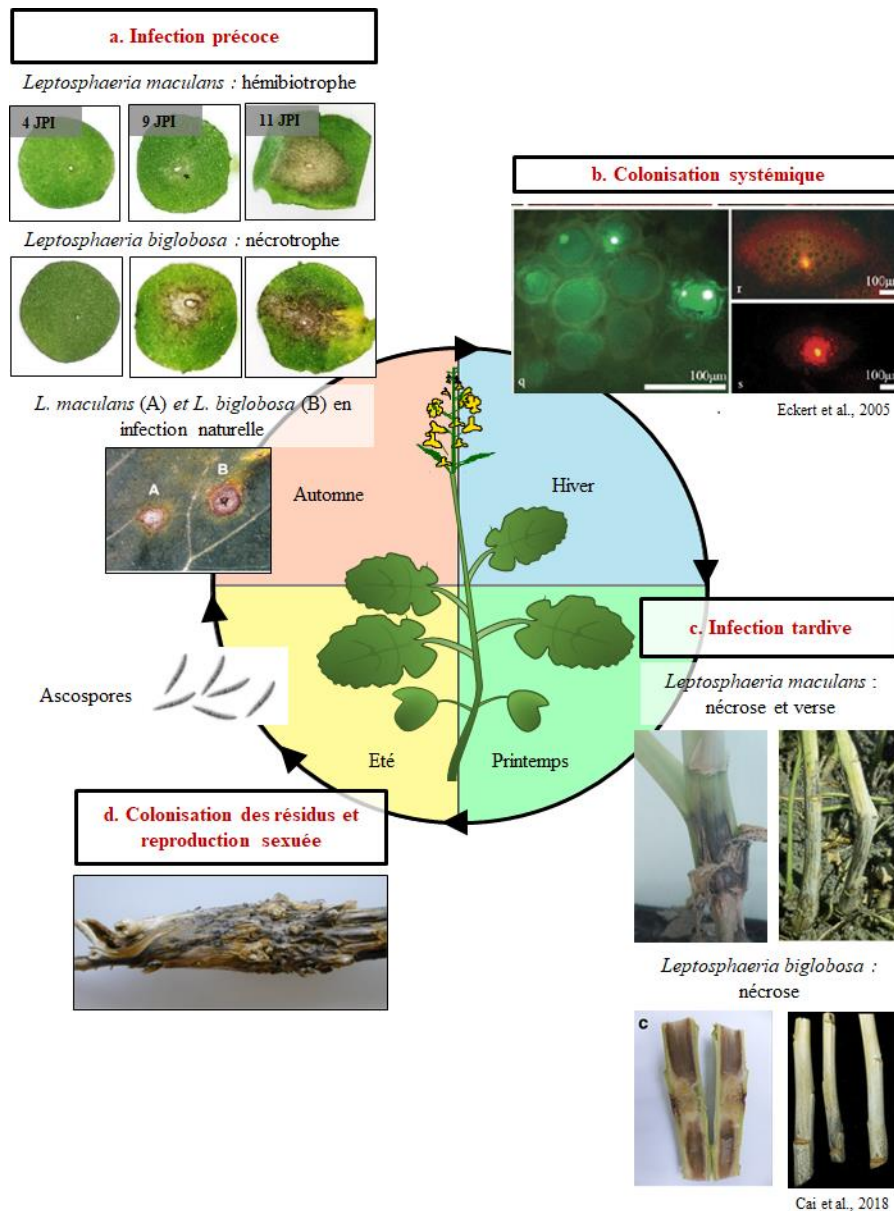


Figure 12 : Coexistence et symptomatologie du complexe d'espèces composé de *Leptosphaeria biglobosa* et *Leptosphaeria maculans* au cours de leur cycle de vie durant une année culturale de colza d'hiver.

(a.) Les deux espèces peuvent être inoculées séparément en condition contrôlée sur cotylédons. Au cours cette étape d'infection précoce *L. maculans* présente un mode de vie hémibiotrophe et *L. biglobosa* un mode de vie nécrotrophe (JPI : jours post-inoculation). Les deux espèces sont aussi détectées en coinfection sur les feuilles en conditions naturelles d'infection. (b.) La colonisation systémique sur pétiole a été observée uniquement en co-inoculation en conditions contrôlées par Eckert et al. 2005, avec deux souches ayant un gène rapporteur fluorescent (*L. maculans* en vert (GFP) et *L. biglobosa* en rouge (DsRed)). (c.) La colonisation des tiges est le lieu d'une nouvelle transition vers la nécrotrophie chez chacune des espèces avec une nécrose importante et dommageable causée par *L. maculans* pouvant engendrer une verse de la plante et une nécrose moins sévère causée par *L. biglobosa* (Cai et al., 2018). (d.) Les deux espèces survivent sur résidus selon un mode de vie saprophyte. C'est aussi le lieu de la reproduction sexuée engendrant la production d'un nouvel inoculum primaire d'ascospores.

e) Epidémiologie mondiale de *Leptosphaeria maculans* et *Leptosphaeria biglobosa*

Différentes analyses épidémiologiques ont été menées sur le complexe d'espèces, principalement pour recenser les différentes proportions des espèces au sein du complexe mais aussi pour détecter l'impact des facteurs climatiques et géographiques sur la proportion des différentes espèces de *L. maculans* spp et *L. biglobosa* spp en lien avec la sévérité de la maladie (Mazáková et al., 2017 ; Dawidziuk et al., 2012a ; Stonard et al., 2010 ; West et al., 2001).

L. biglobosa spp et *L. maculans* spp sont retrouvés ensemble en Amérique, en Europe et en Australie (**Figure 13**). A travers ces différents continents où les deux espèces sont présentes elles sont retrouvées dans différentes proportions avec une prévalence de *L. maculans* spp sur le continent américain, en Australie et en Europe de l'Ouest (Sprague et al., 2018 ; Dilmaghani et al., 2009 ; Fitt et al., 2006b) et une prévalence de *L. biglobosa* 'brassicae' en Europe de l'est. En Asie, *L. biglobosa* 'brassicae' est la seule espèce du complexe présente et cause environ 5% de pertes de rendement (Cai et al., 2018) confirmant qu'en étant le seul agent infectieux, *L. biglobosa* spp est moins dommageable que *L. maculans* spp (Cai et al., 2018 ; Mazáková et al., 2017 ; Liu et al., 2014) (**Figure 13**).

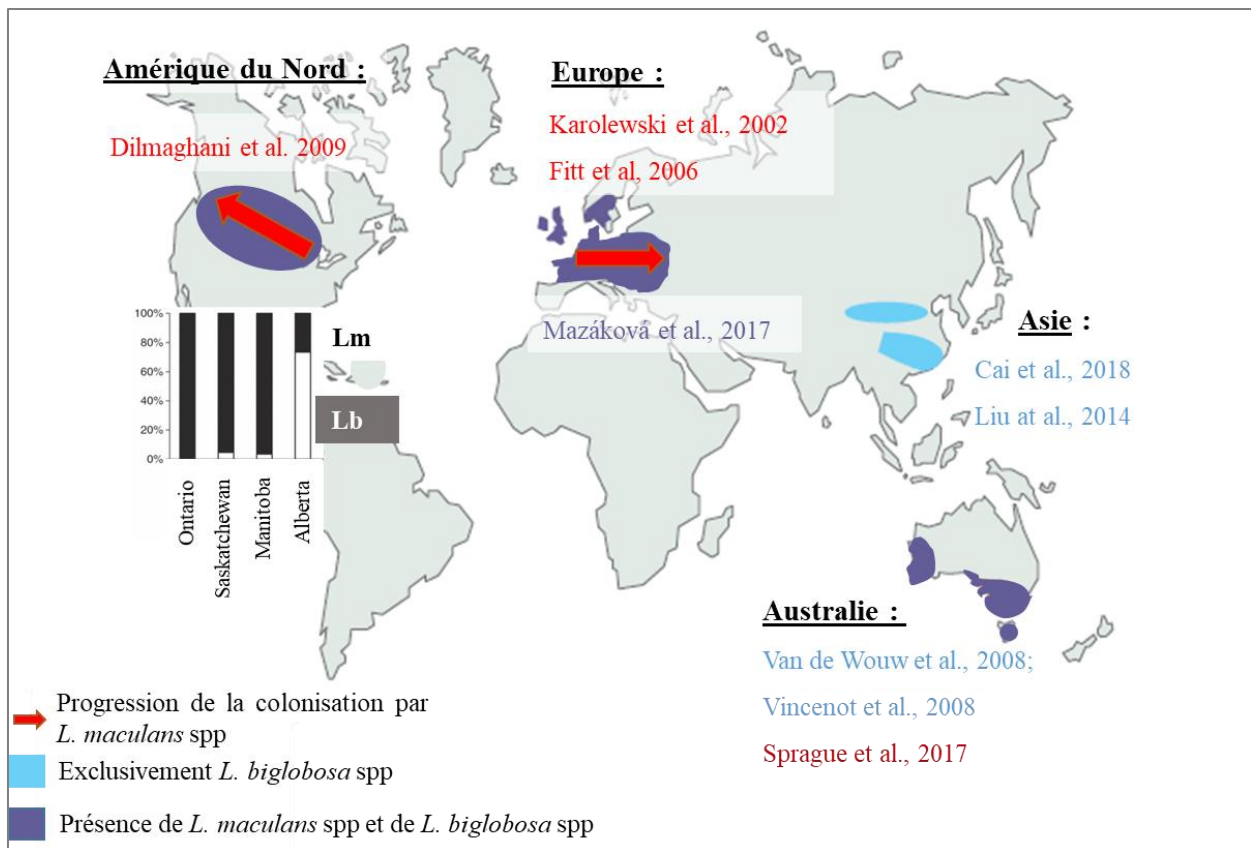


Figure 13 : Schéma représentatif de la répartition mondiale et de la propagation de *Leptosphaeria maculans* et de *Leptosphaeria biglobosa*.

La répartition des deux espèces est décrite sur les continents producteurs de colza (Amérique du Nord, Europe, Asie et Australie). La répartition des deux espèces est basée sur l'analyse de neuf études de criblages de populations naturelles entre 2002 et 2018 (citées sur la carte). Les territoires sur lesquels sont présentes les deux espèces sont en violet, et le territoire comprenant uniquement du *L. biglobosa* est en bleu (Asie). Les flèches rouges représentent la progression de *L. maculans* spp sur le territoire au cours des trente dernières années. Au Canada, une étude de 2009 (Dilmaghani et al., 2009) détecte une prévalence de *L. maculans* spp dans la province d'Alberta à l'est (Lm, en blanc dans l'histogramme) et une prévalence de *L. biglobosa* spp dans les provinces de l'ouest (Lb, histogramme noir). En Europe de l'est, *L. biglobosa* 'brassicae' était prédominant avant la forte progression de *L. maculans* (Karolewski et al., 2002 cité par Fitt et al., 2006). En Australie, *L. maculans* est prédominant (Sprague et al., 2018) mais *L. biglobosa* spp ont été détectés à moindre fréquence sur *Brassica juncea* (Van de Wouw et al., 2008) et sur *B. napus* (Vincenot et al., 2008). Inspiré de Fitt et al. (2006b).

5.2. Les interactions au sein des complexes d'espèces

Les interactions entre agents pathogènes lors de coinfections d'un même hôte ont été étudiées sur un grand panel d'organismes, que ce soit les interactions entre espèces éloignées voire appartenant à des règnes différents, ou au contraire entre des isolats d'une même espèce. Ces interactions peuvent prendre différentes formes, comme une synergie aboutissant à une

augmentation globale de la gravité de la maladie (Lamichhane and Venturi, 2015) ou une compétition qui au contraire engendre une diminution du pouvoir pathogène global. Ces interactions peuvent aussi être directes ou indirectes par l'intermédiaire par exemple de la réponse de l'hôte ou des conditions abiotiques qui (dé-)favorisent l'une des espèces présentes (Tollenaere et al., 2016 ; Fitt et al., 2006a).

a) Méthodes de détection des interactions par criblage moléculaire de populations naturelles ou par des tests de coinfection

La détection de ces interactions au sein des complexes d'espèces est généralement réalisée par un criblage moléculaire qui révèle des différentiels de proportions au sein d'un complexe à différents stades infectieux. Ces détections sont parfois associées à la mesure de paramètres environnementaux afin de détecter une corrélation entre la prévalence d'une espèce et les facteurs abiotiques (interaction indirecte). Cela a permis de détecter une interaction potentielle au sein du complexe d'espèces de *Fusarium* car la présence de *F. graminearum* serait positivement corrélée à la présence de *F. culmorum* en Pologne (Kuzdraliński et al., 2014). Dans ces conditions d'infection naturelle, les facteurs abiotiques comme le climat (exemples chez les espèces de *Fusarium* (Xu et al., 2007a) ou chez l'oïdium du chêne (Marçais et al., 2016)) ou l'utilisation de fongicides (exemple sur les deux espèces *Alternaria solani* et *A. alternata* (Tymon and Johnson, 2014)) peuvent également modifier la proportion de chaque espèce au sein d'un complexe et ainsi augmenter ou diminuer la gravité de la maladie. Cependant, la nature et la dynamique de ces interactions sont encore mal connues et des analyses plus approfondies nécessitent des tests en conditions contrôlées pour valider pleinement l'interaction déduite des analyses sur le terrain.

Les tests de co-inoculation ou d'inoculation séquentielle sont utilisés, lorsque c'est possible, pour décrire plus finement la dynamique de ces interactions par des mesures phénotypiques ou moléculaires. Par exemple, la co-inoculation de quatre espèces de *Fusarium* entraîne une diminution de la biomasse fongique globale et une augmentation de la quantité globale de métabolites secondaires produits suggérant une compétition entre ces différentes espèces du complexe (Xu et al., 2007b). L'influence de la coinfection de *Mycosphaerella pinodes* et *Phoma medicaginis* var. *pinodella* sur l'infection du pois a, quant à elle, montré des résultats très contrastés selon le test (May et al., 2009). La co-inoculation simultanée a un fort impact négatif sur la taille finale des lésions et sur la production de pycnides, alors qu'un impact positif sur le développement des symptômes causés par *M. pinodes* a été détecté lorsque les feuilles sont pré-inoculées par *P. medicaginis* var. *pinodella*. Ces résultats montrent dans ce cas

que l'interaction positive ou négative peut être dépendante de la séquence de l'inoculation (Marchetto and Power, 2018).

b) Les mécanismes sous-jacents des interactions détectées lors de coinfections

Le déterminisme biologique et moléculaire des interactions au sein des complexes d'espèces est rarement élucidé. Cependant le recensement des interactions élargies aux organismes distants mais partageant une même niche écologique offre une vision plus exhaustive des différents types d'interactions que l'on peut trouver. On distingue notamment deux grandes catégories : les interactions indirectes et les interactions directes.

i. *Les interactions indirectes*

Parmi les intermédiaires impliqués dans les interactions indirectes on retrouve les facteurs abiotiques qui peuvent favoriser une espèce par rapport à une autre. Chez deux agents pathogènes compétiteurs qui coinfectent le maïs, *Aspergillus flavus* et *Fusarium verticillioides*, il a été montré que l'augmentation de la température autour de 30°C est une condition optimale pour l'absorption des sources de carbone par *F. verticillioides*, alors que pour *A. flavus* cette température optimale est d'environ 25°C, ce qui entraîne une prédominance de *F. verticillioides* les années de forte chaleur (Giorni et al., 2009). Au sein du complexe d'espèces des *Leptosphaeria* spp, des tests en conditions contrôlées ont montré que la germination des ascospores et le taux de pénétration des hyphes dans les stomates augmentent plus rapidement chez *L. maculans* lorsque la température augmente (de 5°C à 20°C) (Huang et al., 2003). Aussi, des données au champ combinées à des données expérimentales en conditions contrôlées suggèrent que le temps nécessaire à la maturation des périthèces (enfermant les asques) est plus long à basse température chez *L. biglobosa* que chez *L. maculans* (Toscano-Underwood et al., 2003). Cela peut suggérer que les deux espèces présentent une sensibilité différente à certains paramètres abiotiques en conditions naturelles et que ces différences pourraient engendrer une prévalence de l'une ou l'autre espèce selon les années. Cependant, aucune expérience n'a été réalisée pour étudier la germination et le taux de pénétration en co-culture ou en coinfection dans le cadre de l'analyse de l'interaction entre les deux espèces.

Un autre type d'interaction indirecte est celui impliquant la réponse de la plante hôte. Un agent pathogène peut entraîner l'activation des défenses végétales dont les autres espèces ne peuvent se prémunir mais peut aussi, au contraire, engendrer la répression de ces défenses favorisant alors la progression des agents pathogènes les plus sensibles. Par exemple, la pré-inoculation d'une souche virulente de *F. oxysporum* favorise l'infection consécutive d'une autre

souche de *F. oxysporum* initialement avirulente sur la variété testée (Ravensdale et al., 2014). Au contraire certaines espèces activent des voies de défenses qui limitent ainsi les nouvelles coinfections. C'est le cas de nombreux organismes bénéfiques et notamment des organismes symbiotiques (Van der Ent et al., 2009). Un champignon bénéfique du sol, *Trichoderma virens*, secrète un éliciteur (Smr1) des défenses systémiques du maïs lors de la colonisation des racines. Une fois activées, ces défenses sont efficaces contre une infection secondaire de *Colletotrichum graminicola* sur des tissus foliaires distants (Djonovic et al., 2007).

Enfin, la disponibilité en ressources nutritives peut aussi jouer un rôle dans l'interaction indirecte. La production de molécules de séquestration peut limiter l'accès à certaines ressources vitales pour les autres organismes présents. Ainsi, la chélation du fer par des sidérophores est une cause probable de l'antagonisme détecté entre le champignon hémibiotrophe *M. oryzae* et la bactérie endophyte *Streptomyces sporocinereus* (Zeng et al., 2018).

ii. Les interactions directes

Les interactions directes, *ie* lorsque l'un des partenaires cible directement un compétiteur et porte atteinte à sa progression ou à son intégrité cellulaire, sont, pour la plupart, décrites lors d'interaction antagonistes consécutives à la production de molécules antibiotiques. Chez les champignons, la production de métabolites secondaires est connue pour jouer un rôle majeur dans la compétition, notamment entre les champignons du sol (Boddy and Hiscox, 2017). La production de métabolites secondaires, spécifiquement activée en présence d'espèces fongiques concurrentes, a été démontrée par spectrométrie de masse chez le décomposeur *Stereum hirsutum* en co-culture avec deux concurrents *Coprinus disseminatus* et *C. micaceus* (Peiris et al., 2007). Aussi, un effet inhibiteur de l'acide nonanoïque produit par *Trichoderma harzianum* a été montré sur la germination de deux champignons pathogènes du cacao (Aneja et al., 2005).

Enfin, on retrouve aussi parmi les interactions directes, la formation de barrières physiques. Chez les bactéries, la production de biofilm a montré des fonctions protectrices contre d'autres agents bactériens (exemple chez l'agent de biocontrôle *Bacillus subtilis* contre *Pseudomonas syringae* (Bais et al., 2004)). Chez les champignons, certains saprophytes présentent un mycélium compartimenté qui forme une barrière physique pigmentée permettant de limiter les contacts en présence de compétiteur (Boddy and Hiscox, 2017).

Chez *L. maculans* et *L. biglobosa* des études antérieures par des tests de coinfection dans des conditions contrôlées suggèrent qu'une compétition à la fois directe et indirecte se produit

entre les deux espèces. Une pré-inoculation de *L. biglobosa* réduit de manière significative la taille des lésions causées par *L. maculans* inoculé soit sur la même feuille (interaction directe) soit sur des feuilles distantes (interaction indirecte) (Liu et al., 2007 ; Chen and Fernando, 2006 ; Liu et al., 2006). Cependant les mécanismes moléculaires ou physico-chimiques sous-jacents à ces interactions ne sont pas déterminés.

5.3. Connaissances moléculaires inégales entre *Leptosphaeria maculans* et *Leptosphaeria biglobosa*

a) Génomique comparative au sein du complexe

Le génome de *L. biglobosa* ‘brassicae’ a été séquencé en 2014, avec ceux d’autres espèces du complexe (Grandaubert et al., 2014) (**Tableau 1**). Cette étude avait pour objectif de réaliser une analyse comparative des différentes espèces du complexe incluant *L. maculans* ‘lepidii’, *L. maculans* ‘brassicae’, *L. biglobosa* ‘canadensis’, *L. biglobosa* ‘brassicae’ et *L. biglobosa* ‘thalpsii’. Les alignements génomiques deux à deux entre les génomes des cinq espèces ont révélé une plus forte divergence entre *L. maculans* spp et *L. biglobosa* spp (en moyenne 8,4 MB alignées) qu’entre les sous-clades de *L. maculans* (24,2 MB alignées) ou entre les sous-clades de *L. biglobosa* (19,2 MB alignées). Par ailleurs, parmi les espèces du complexe, seul *L. maculans* ‘brassicae’ présente un génome à deux vitesses comprenant de grandes régions riches en AT qui constituent 35,5% du génome contre 4,4% dans le génome de *L. biglobosa* (**Tableau 1**). Cela suggère une invasion récente et spécifique d’éléments transposables chez *L. maculans* ‘brassicae’.

b) Gènes impliqués dans la pathogénie

Si de nombreux aspects moléculaires et génomiques liés à la pathogénie sont décrits chez *L. maculans*, au contraire peu de choses sont connues chez *L. biglobosa*. Les modes de vie différents de *L. maculans* et de *L. biglobosa* lors de l’infection des feuilles (hémibiotrophe vs. nécrotrophe) et des tiges (agent causal du chancre de la tige vs. lésions nécrotiques moins dommageables) peuvent suggérer la présence/absence de différents ensembles de gènes entre les deux espèces. Un core protéome a été établi en 2014 montrant que 6735 protéines sont orthologues entre les cinq espèces citées précédemment et que 4,8% à 10,7% des gènes étaient spécifiquement retrouvés chez une seule espèce dont 2 513 gènes uniques à *L. biglobosa* ‘brassicae’ et 4 074 gènes uniques à *L. maculans* ‘brassicae’ (Grandaubert et al., 2014). Cependant plus de 90% d’entre eux n’ont pas de fonctions prédites limitant la détection de fonctions spécifiquement liées au cycle infectieux de chaque espèce. Le nombre de gènes

prédits au sein des petites protéines secrétées et au sein des enzymes clefs du métabolisme secondaire est similaire entre toutes les espèces du complexe donc y compris entre Lmb et Lbb (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques génomiques et génétiques de *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (isolat JN3) et de *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (isolat b3.5) publiées par Grandaubert et al. (2014).

	<i>L. maculans</i> ‘brassicae’ (isolat JN3)	<i>L. biglobosa</i> ‘brassicae’ (isolat b3.5)
Taille des génomes (MB)	45,1	31,8
% de régions riches en AT	35,5	4,4
Nombre de gènes	12 543	11 390
Nombre de gènes orthologues	7 380	7 380
Nombre de CAZymes prédites	427	nd ¹
Nombre de petites protéines secrétées prédites	651	621
Nombre de PKS/NRPS prédites	29	26
Nombre de gènes dans les régions riches en AT	627	Nd

¹Nd. Non déterminé

Au niveau transcriptomique, plusieurs analyses ont été menées pour décrire l’infection précoce sur cotylédons de *L. maculans* (Becker et al., 2017 ; Haddadi et al., 2016 ; Sonah et al., 2016) mais une seule étude compare l’expression des gènes chez *L. biglobosa* ‘canadensis’ et de *L. maculans* ‘brassicae’ lors de l’infection primaire sur cotylédons à 7 jpi et 14 jpi (Lowe et al., 2014). Cette analyse transcriptomique, focalisée sur l’expression des enzymes de dégradation, montre que *L. biglobosa* ‘canadensis’ active une proportion plus importante de protéases et d’hydrolases et plus précocement (dès 7 jpi) que chez *L. maculans*, reflétant au niveau transcriptionnel le type trophique nécrotrophe de *L. biglobosa*.

6. Projet de thèse

De nombreux aspects de la pathogénie de *L. maculans* sont étudiés au sein de mon équipe d'accueil « Effecteurs et Pathogénèse chez *Leptosphaeria maculans* ; EPLM » (génétique, génomique, épigénétique, moléculaire, et des aspects évolutifs au sein des populations naturelles). L'accumulation de données dans ces différents champs biologiques en a fait une espèce modèle grâce aux analyses de ses effecteurs mais aussi grâce à la découverte de son génome à deux vitesses et de la régulation épigénétique qui y est associée. Une partie des déterminants de la pathogénie sont donc bien décrits chez *L. maculans* mais beaucoup de questions persistent. La cinétique de colonisation systémique du pétiole et de la tige et la vie saprophyte sur résidus ainsi que les mécanismes moléculaires qui y sont associés ne sont pas ou peu décrits chez *L. maculans*.

L'analyse de la maladie de la nécrose du collet est aussi régulièrement étudiée par le prisme du complexe d'espèces *L. maculans* / *L. biglobosa*, pour lequel des données épidémiologiques existent mais qui manque de données moléculaires. On dispose aujourd'hui d'une étude génomique comparant la composition du génome de *L. biglobosa* 'brassicae' et de *L. maculans* spp (Grandaubert et al., 2014) et d'une étude transcriptomique comparant l'expression des gènes chez *L. biglobosa* 'canadensis' et de *L. maculans* 'brassicae' lors de l'infection primaire sur cotylédons. *L. biglobosa* n'a été que partiellement décrit, et les mécanismes impliqués dans l'interaction entre les deux espèces, notamment lors de coinfections, n'ont jamais été décrits.

6.1. Le projet LeptoLife

L'équipe EPLM en association avec l'UMR IGEPP (INRAE Rennes) et la plateforme de séquençage du Génomètre ont élaboré un projet de séquençage haut-débit en 2013 visant à retracer toutes les étapes du cycle de vie de *L. maculans* au champ, en conditions contrôlées ou *in vitro* et en interaction ou non avec *L. biglobosa* (projet « LeptoLife »). Ainsi 420 échantillons ont été séquencés par RNA-Seq d'après un échantillonnage aiguillé selon trois grands objectifs : (i) Détecter de manière très fine les gènes impliqués dans des étapes maîtrisées en conditions contrôlées (infection précoce sur cotylédons et tardive sur tiges) qui sont usuellement utilisées pour l'analyse d'un ou plusieurs gènes de la pathogénie et d'en faire ressortir, au contraire, des profils et des sets de gènes d'intérêt à plus grande échelle. (ii) Décrire l'infection au champ sur une année culturale, sur feuilles, tiges et résidus pour explorer les cinétiques de colonisation en conditions naturelles et, quand c'est possible, corrélérer ces résultats aux conditions d'infection contrôlées. (iii) Étudier les gènes impliqués dans les phases de vie indépendantes de l'hôte grâce

à la maîtrise du cycle de vie *in vitro* permettant de reproduire des conditions de germination, de reproduction sexuée et de croissance mycélienne.

Aussi, un re-séquençage des génomes par Nanopore ainsi que les données transcriptomiques issues du projet LeptoLife ont permis de générer deux nouvelles versions améliorées des génomes (assemblage et annotation des gènes) de *L. maculans* ‘brassicae’ et *L. biglobosa* ‘brassicae’ (Dutreux et al., 2018).

6.2. Objectifs de la thèse

L’exploitation des données de séquençage du projet LeptoLife constitue un point central de mon projet de thèse. A mon arrivée dans l’équipe EPLM en stage de M2, avant de débiter ma thèse, les données brutes de séquençage des 420 échantillons RNA-Seq étaient disponibles. Avant d’analyser ces données, j’ai réalisé des analyses préliminaires nécessaires à la validation et à la sélection des données à traiter (présentées dans le chapitre I). Puis, j’ai réalisé l’analyse de ces données de séquençage selon deux grandes questions biologiques qui sont traitées dans deux articles inclus dans les chapitres II et III.

i. Génération des données à partir des données brutes (chapitre I.)

Préalablement aux analyses axées sur les deux questions biologiques de ma thèse, j’ai réalisé les analyses préliminaires sur les données brutes de séquençage RNA-Seq qui sont décrites dans le premier chapitre. J’ai mis en place les paramètres optimaux de mapping sur les nouveaux génomes des deux espèces, ce qui m’a permis de générer les tableaux d’expression des gènes sur les 420 échantillons. Ces données m’ont apporté des informations précieuses concernant la présence et l’abondance des lectures RNA-Seq assignées à *L. maculans* ou *L. biglobosa* dans tous les échantillons. Par ailleurs les génomes nouvellement séquencés de *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (isolat JN3) et *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (isolat G12-14) utilisés comme génomes de référence, n’avaient pas encore été exploités lors d’analyses génétiques ou génomiques approfondies. Des annotations fonctionnelles issues de la base de données Gene Ontology étaient disponibles, et j’ai complété ces annotations par des prédictions de différentes catégories de gènes : les petites protéines secrétées, les CAZymes et les enzymes clefs du métabolisme secondaire.

ii. Exploration de la dynamique transcriptomique chez L. maculans au cours de son cycle de vie complexe (chapitre II.)

Un premier objectif de ma thèse était de retracer au niveau transcriptomique le cycle de vie de *L. maculans* en conditions contrôlées mais aussi lors d’infections naturelles au champ. Ces

analyses, sans *a priori*, de la transcription des gènes au cours de cinétiques d'infection de *L. maculans* ont pour objectif d'apporter une vision générale des grandes fonctions activées/réprimées selon le stade de vie en comparaison avec les phases de vie non-infectieuses du champignon (croissance, germination et reproduction *in vitro*). J'ai pu détecter les gènes surexprimés en conditions d'infection et explorer l'expression génique au cours des stades tardifs, endophytes et saprophytes. J'ai pu aussi mettre en évidence des vagues d'expression fines grâce aux différents échantillonnages réalisés sur différentes temporalités (de deux à dix prélèvements après l'initiation de l'infection et étalés de 48h à 10 mois de suivi selon la cinétique). Enfin la description de ces vagues d'expression couvrant tout le cycle de vie de *L. maculans* m'a permis de détecter des ensembles de gènes coexprimés, notamment les gènes coexprimés avec les effecteurs déjà validés.

Par ailleurs l'intégration d'une carte épigénétique répertoriant les localisations de trois marques différentes de méthylation d'histone sur tout le génome dans une condition de croissance *in vitro* (Soyer et al., 2020) m'a permis d'associer la localisation génomique, les marques épigénétique *in vitro* et les profils d'expression *in planta* pour obtenir une vision globale de la régulation des gènes surexprimés dans les conditions d'infection.

Tous ces résultats sont décrits et discutés dans le second chapitre de ma thèse qui contient mon premier article.

iii. *Interactions entre L. maculans / L. biglobosa et la plante hôte (chapitre II.)*

Ce jeu de données offre l'opportunité de décrire une interaction multipartenaire entre deux champignons ayant la même niche écologique et leur hôte commun : *B. napus*. A partir des analyses de mapping préliminaires, j'ai choisi d'analyser les échantillons issus des infections sur cotylédons pour décrire l'interaction entre les trois partenaires au stade primaire. C'est une étape cruciale car elle est le point initial de la colonisation du pétiole puis de la tige et donc conditionne la réussite de l'infection.

En décrivant cette étape en co-inoculation et en conditions contrôlées l'objectif était de déterminer si les deux espèces interagissent ensemble et si c'est le cas, quel type d'interaction est établie. Grâce aux données transcriptomiques j'ai pu suivre la dynamique transcriptionnelle et les fonctions activées/réprimées chez chacun des partenaires au cours de plusieurs cinétiques (coinfection et mono-infections contrôles) composées chacune de 6 dates de prélèvement après l'infection. En complétant ces analyses avec des suivis phénotypiques et microscopiques, en réalisant de nouveaux tests de co-inoculation, j'ai pu étayer les hypothèses issues des analyses

transcriptomiques. Ces résultats sont rédigés sous forme d'un article et présentés dans le chapitre III.

iv. Participation aux autres projets de l'équipe EPLM

En complément de ces résultats obtenus dans le strict cadre de mon projet de thèse, j'ai été sollicitée pour participer à différents projets au sein de l'équipe mais aussi avec des partenaires européens. J'ai pu travailler aux côtés de Jessica Soyer (Chargée de recherche au sein de l'équipe) sur des données de génomique et d'épigénétique comparative dans le cadre de l'étude du paysage chromatinien de *L. maculans* en condition de croissance *in vitro* (Soyer et al., 2020). En collaboration avec C. Clairet (ancien doctorant de l'équipe) j'ai aussi participé activement à l'analyse de l'influence du double contrôle, chromatinien et par un facteur de transcription, de la dynamique transcriptomique globale de *L. maculans* (Clairet et al., en préparation).

Enfin, grâce aux données issues du projet LeptoLife j'ai pu contribuer à l'analyse de l'expression de certains sets de gènes d'intérêts dans des projets tiers, comme par exemple celui mené par Lenka Burketová et Hana Leontovyčová qui portait sur les gènes impliqués dans la synthèse de l'auxine *in vitro* et lors de l'infection primaire (Leontovyčová et al., 2020).

Chapitre I. Analyses préliminaires du matériel biologique, génomique et transcriptomique du projet LeptoLife

Ce premier chapitre a pour objectif de donner des informations complémentaires sur les données génomiques et transcriptomiques issues du projet LeptoLife, *ie* les re-séquençages des génomes de *L. maculans* 'brassicae' et de *L. biglobosa* 'brassicae' (nommés ci-après *L. maculans* et *L. biglobosa*) (Dutreux et al., 2018) et les séquençages des échantillons RNA-Seq. J'ai, dans un premier temps, récolté et comparé les informations disponibles sur les génomes de *L. maculans* et de *L. biglobosa* afin de résumer les particularités génomiques de chaque espèce. Dans un second temps, je présente les caractéristiques issues du séquençage RNA-Seq des échantillons LeptoLife, je résume la diversité des échantillons disponibles et j'aborde les variations de l'activité transcriptomique de chaque espèce selon les conditions d'infection ou de croissance *in vitro* qui m'ont permis de sélectionner les échantillons analysés dans les deux axes suivant de ma thèse (chapitre II et III).

1 Résumé des caractéristiques des nouvelles versions des génomes de *Leptosphaeria maculans* 'brassicae' et *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae'

En 2018 au début de ma thèse, deux nouvelles versions des génomes (nommées ci-après V2) de *L. maculans* et *L. biglobosa* ont été générées grâce à la technologie de séquençage long-read Nanopore dans le cadre du projet LeptoLife (Dutreux et al., 2018) apportant deux assemblages génomiques et deux répertoires de gènes améliorés. Ces deux nouvelles versions ont été utilisées durant tout mon projet de thèse et dans les différentes publications dans lesquelles je suis impliquée.

Comme décrit en introduction (5.3), les premières versions (nommées ci-après V1) des génomes de *L. maculans* (Grandaubert et al., 2014 ; Rouxel et al., 2011) et de *L. biglobosa* (Grandaubert et al., 2014) avaient fait l'objet d'analyses comparatives dans le cadre de la description du complexe d'espèces (Grandaubert et al., 2014). Suite à la génération des nouvelles versions, il était important d'appréhender l'ampleur des changements potentiels entre les V1 et V2, et de vérifier que ces changements ne remettaient pas en cause les particularités génomiques décrites chez les deux espèces. Cette partie n'a pas pour objectif de réaliser une analyse de génomique comparative complète et exhaustive mais plutôt de mettre à jour les principales caractéristiques déjà analysées et publiées entre les V1 et V2 des génomes. Par ailleurs, les analyses précédentes étaient axées sur la description de l'organisme modèle *L.*

maculans et n'intégraient pas toujours les analyses réciproques chez *L. biglobosa*. Certaines informations n'étaient donc pas disponibles sur la V1 du génome de *L. biglobosa* mais j'ai pu les compléter sur la V2 dans le cadre de ma thèse.

Les caractéristiques génomiques décrites dans le Tableau 2 (taille du génome, nombre de super-contigs, régions riches en AT) sont tirées des publications des V1 et des V2 de chaque espèce. Les informations de prédiction de répertoires de gènes codant différentes catégories fonctionnelles (CAZymes, PPS, PKS/NRPS, **Tableau 2**) sont extraites, pour les V1, de données publiées (Grandaubert et al., 2014) mais sur les V2, elles ont été réalisées entièrement pendant ma thèse avec des méthodologies qui peuvent différer de la première version. Je comparerai dans un premier temps les changements apportés par le re-séquençage puis je discuterai des différences observées inter-espèces sur ces nouvelles versions.

1.1. Comparaisons des caractéristiques génomiques entre les deux versions des génomes de *L. maculans* et *L. biglobosa*

a) Changements apportés sur les assemblages et la prédiction des gènes

Concernant les métriques d'assemblage on constate que le nombre de super-contigs a drastiquement diminué suite aux re-séquençages (**Tableau 2**, Dutreux et al., 2018). Grâce à la technologie long-read, le séquençage de fragments supérieurs à 10 KB a permis d'améliorer l'assemblage et notamment de résoudre l'assemblage des régions riches en AT. Chez *L. maculans*, la première version avait déjà mis en évidence que 35,5% du génome (36,9% dans la V2) était composé de régions riches en AT. Chez *L. biglobosa*, le re-séquençage a apporté une meilleure estimation de la proportion de ces régions qui est désormais estimée à 15% du génome contre 4% prédit en 2014. Chez *L. maculans* uniquement, l'addition des données issues d'une carte optique du génome a permis de résoudre l'assemblage à l'échelle du chromosome (19 chromosomes et 1 mini-chromosome).

Le nombre de gènes prédits au sein des V2 est plus important pour chacune des espèces. Ce changement est principalement dû à l'augmentation des ressources biologiques utilisées comme évidences transcriptomiques. Dans les deux versions, deux types différents de données d'expression ont été utilisés pour valider la présence des séquences codantes. Dans la V1, une centaine d'EST (Expressed Sequence Tag) a été utilisée alors que des données illumina RNA-Seq de 14 échantillons ont fourni des données d'expression plus denses et plus fiables lors de l'annotation des gènes de la V2.

Dans la V2, 103 gènes ont été annotés dans les régions riches en AT chez *L. biglobosa* (régions absentes dans la V1). Chez *L. maculans*, une plus faible proportion de gènes a été annotée dans les régions riches en AT dans la V2 (319 gènes) comparé à la V1 (627 gènes). Pourtant le pourcentage de régions riches en AT est similaire dans les deux versions. En fait, l'assignation de ces gènes à cette catégorie diffère là encore entre les deux versions. Dans la V1, les gènes en bordures des isochores ainsi que les gènes en bordure d'éléments transposables isolés étaient compris dans cette catégorie, ce qui n'est plus le cas dans la V2 (**Tableau 2**).

b) Comparaison de la proportion des répertoires de gènes assignés à différentes catégories fonctionnelles

Il faut tout d'abord noter qu'une très faible proportion des gènes annotés dans la V1 du génome de *L. maculans* avait une fonction prédite (32,6%) et, malgré une amélioration de la prédiction fonctionnelle des gènes fongiques, seule la moitié de l'ensemble des gènes des deux espèces a une fonction assignée par le pipeline automatique BLAST2GO (58,6% et 54,7% pour *L. maculans* et *L. biglobosa*, respectivement) sur les V2 (**Tableau 2**). Les analyses des proportions de chaque catégorie fonctionnelle sont donc biaisées par ces annotations *in silico* qui sont très lacunaires.

Les proportions de gènes codant trois catégories fonctionnelles sont détaillées ici. D'après ce récapitulatif, les nombres de gènes codant les enzymes clés de synthèse des métabolites secondaires PKS/NRPS restent similaires entre les deux versions des génomes de chaque espèce (29 vs 21 chez *L. maculans* et 26 vs 24 chez *L. biglobosa*, **Tableau 2**). On retrouve une augmentation du nombre de Petites Protéines Secrétées 'PPS' (651 vs 1 070 chez *L. maculans* et 621 vs 864 chez *L. biglobosa*) et une diminution de nombre de CAZymes chez *L. maculans* (427 vs 317). J'ai dans le cadre de ma thèse, utilisé des méthodologies de prédictions fonctionnelles différentes par rapport aux V1 (**Tableau 2**) qui expliquent les variations de proportions observées entre les deux versions des génomes pour chaque espèce.

Tableau 2 : Caractéristiques génomiques et annotations fonctionnelles de *Leptosphaeria maculans* et de *Leptosphaeria biglobosa* sur les V1 (Grandaubert et al., 2014 ; Rouxel et al., 2011) et V2 (Dutreux et al., 2018) des génomes.

		<i>L. maculans</i> (JN3) Grandaubert et al., 2014 ; Rouxel et al., 2011	<i>L. maculans</i> (JN3) Dutreux et al., 2018	<i>L. biglobosa</i> (b3.5) Grandaubert et al., 2014	<i>L. biglobosa</i> (G12-14) Dutreux et al., 2018
Caractéristiques génomiques	Taille du génome (MB)	45,1	45,9	31,8	34,9
	Nombre de super- contigs	76	34	606	157
	% de régions riches en AT	35,5	36,9	4,4	15,5
	^a Nombre de gènes	12 543	13 047	11 390	12 678
	Nombre de gènes localisés dans les régions riches en AT	627; 5%	319; 2,4%	-	103; 0,8%
Orthologies et catégories fonctionnelles	^b Nombre de protéines orthologues inter-espèces	7 380 ; 58,83%	8 737; 67%	7 380; 64,8%	8 798; 69,4%
	^c Nombre de protéines avec une fonction prédite	4 093 ; 32,6%	7 642; 58,6%	-	6 935; 54,7%
	^d CAZymes	427; 3,4%	317; 2,4%	-	313; 2,4%
	^e Petites Protéines Sécrétées (PPS)	651; 5,2%	1070; 8,2%	621; 5,45%	864; 6,8%
	^f PKS/NRPS	29; 0,2%	21; 0,16%	26; 0,2%	24; 0,19%

^(a) Les coordonnées des régions riches en AT ont été générées par l'utilisation d'une série d'outils de détection de séquences codants les éléments transposables et de scripts non publiés de détection des taux de GC/AT dans la V1. Elles ont été générées par l'outil Occultercut dans la V2 et affinées par un outil non publié pour corriger les incohérences générées par Occultercut. ^(b) Les groupes de protéines orthologues entre *L. maculans* et *L. biglobosa* ont été générés par OrthoMCL dans la V1 et par OrthFinder dans la V2. ^(c) L'outil BLAST2GO a été utilisé dans les V2 pour prédire les fonctions sur la totalité des gènes. Les annotations fonctionnelles chez *L. maculans* dans la V1 ont été obtenues par BLAST (données non publiées et absentes pour *L. biglobosa*). ^(d) Une curation manuelle des gènes codants les CAZymes avait été réalisée dans la V1. L'outil d'annotation automatique dbCAN a été utilisé pour annoter les CAZymes dans la V2. ^(e) La prédiction des répertoires des Petites Protéines Secrétées (PPS) dans les V1 est décrite dans Grandaubert et al (2014) et celles de la V2 dans Gay et al (2020). Elles diffèrent par le recours à une curation manuelle dans la V1. ^(f) Les annotations des protéines PKS/NRPS ont été générées par BLAST dans la V1 et par l'outil SMURF dans la V2.

1.2. Analyse comparative entre les deux espèces *L. maculans* et *L. biglobosa*

a) Comparaison des caractéristiques génomiques entre *L. maculans* et *L. biglobosa*

Premièrement le nombre de super-contigs entre les deux espèces reste toujours dans la V2, bien supérieur chez *L. biglobosa* (157) par rapport à *L. maculans* (34) (**Tableau 2**). Le reséquençage long-reads du génome de *L. maculans* a été réalisé sur la base du génome de référence V1, une version déjà de qualité mais contenant encore 1,1 MB de gaps (Dutreux et al., 2018). Concernant, *L. biglobosa*, le séquençage par la technologie long-reads constitue un séquençage *de novo* et génère un assemblage de moins bonne qualité. A titre d'exemple, le séquençage *de novo*, d'un autre isolat de l'espèce *L. maculans* 'brassicae' établi selon le même pipeline que *L. biglobosa* 'brassicae', résulte en un assemblage de 288 super-contigs (Dutreux et al., 2018) ce qui semble définir les limites des assemblages suite au séquençage Nanopores et à un assemblage *de novo* chez deux espèces différentes.

Deuxièmement, on détecte au sein des V2, 15,5% de régions riches en AT chez *L. biglobosa* et 36,9% chez *L. maculans* (seule espèce du complexe jusqu'alors associé à un génome bipartite). Une question résulte de ce nouvel élément : le génome de *L. biglobosa* présente-t-il une structure génomique composée d'isochores (régions riches en AT de taille supérieure à 10 KB) répartis le long des chromosomes comme c'est le cas chez *L. maculans* ? Trois éléments sont présentés dans la figure 14 pour y répondre.

La proportion du pourcentage de GC dans les génomes de *L. maculans* (typique d'un génome structuré en isochores), de *Botrytis cinerea* (typique d'un génome sans isochores) montre que celui de *L. biglobosa* présente un profil intermédiaire en taux de GC (« GC% » ; **Figure 14a**). Le pic majoritaire dans les trois organismes correspond aux proportions du génome composées d'un taux équilibré de AT/GC (régions majoritaires dans les génomes). Un autre pic est détecté uniquement chez *L. maculans* et chez *L. biglobosa* et correspond à un taux de GC plus faible (32% chez *L. biglobosa* et 33,8% chez *L. maculans*). Il y a donc une proportion faible (15,5%) mais non négligeable du génome de *L. biglobosa* qui concentre une surreprésentation de base AT à un taux similaire aux régions riches en AT chez *L. maculans*.

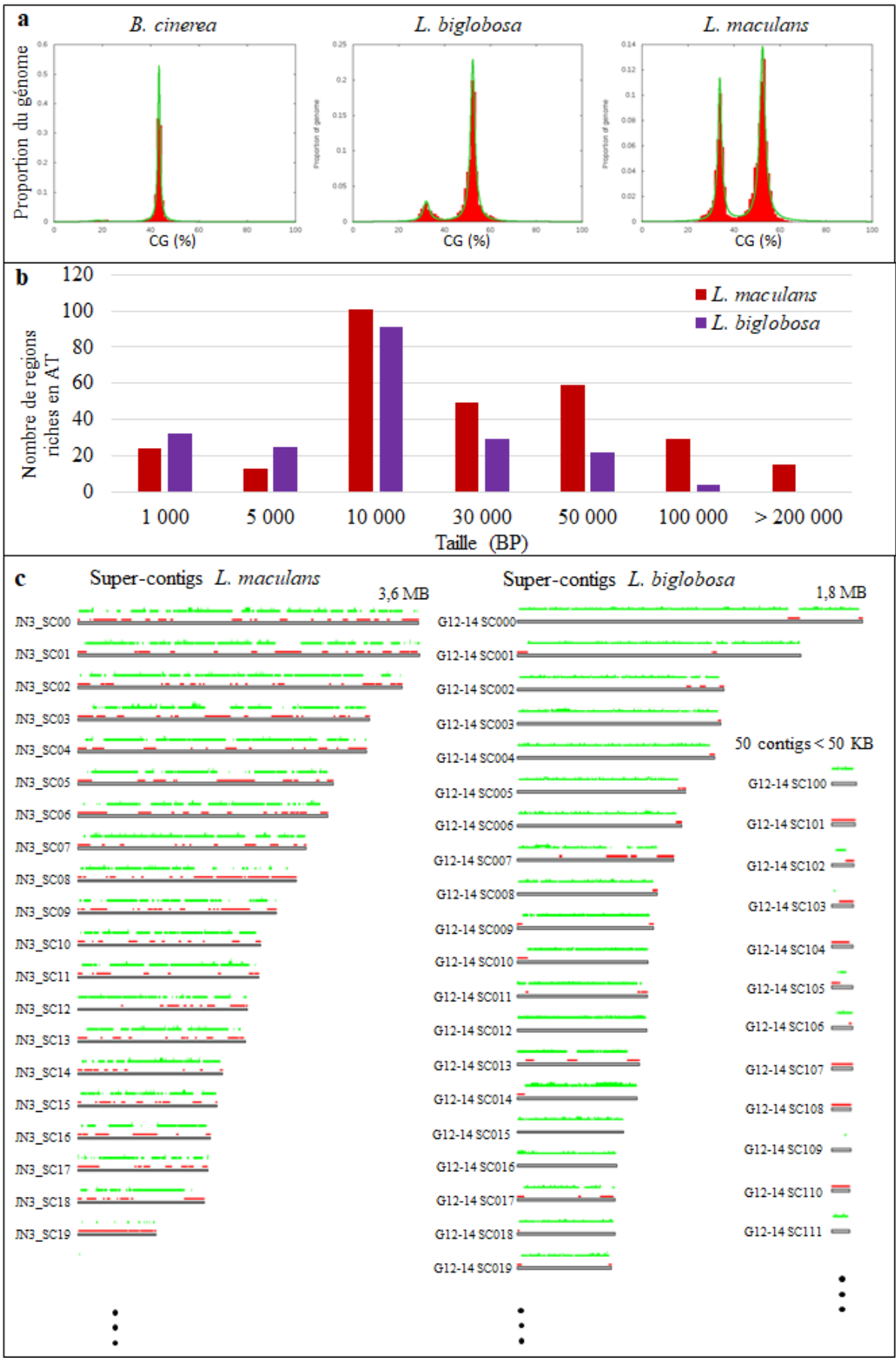


Figure 14: Analyses de la proportion, des tailles et de la localisation des régions riches en AT chez *L. maculans* et *L. biglobosa*.

(a) Les proportions de pourcentage en base GC (GC%) dans les génomes de *B. cinerea*, *L. biglobosa* et *L. maculans* ont été générées par l’outil Occultercut (Testa et al., 2016). Un pic entre 40% de 50% correspond à un taux de GC/AT équilibré, et un taux de GC entre 30% et 40% correspond à un enrichissement en bases AT. (b) Les régions riches en AT ont été annotées dans les génomes de *L. maculans* et *L. biglobosa* publiés en 2018 (Dutreux et al., 2018). Elles ont été générées par l’outil Occultercut avec les paramètres par défaut puis un outil d’affinage créée par le plateau de Bioinformatique de l’UMR Bioger a été appliqué pour corriger les incohérences. Les régions inférieures à 10 000 KB sont considérées comme des éléments transposables isolés ou des parties d’isochores non assemblés. Au total, 290 et 203 régions riches en AT ont été détectées chez *L. maculans* et *L. biglobosa* (dont 37 et 57 inférieures à 10 KB respectivement). (c) Distribution des localisations des régions riches en AT annotées chez *L. maculans* et *L. biglobosa* représentées le long des super-contigs (barres noires). Les 18 premiers super-contigs (JN3_SC00 à JN3_SC18) et le chromosome accessoire (JN3_SC19) de *L. maculans* sont représentés. Les 19 premiers super-contigs de *L. biglobosa* (G12-14_SC000 à G12-14_SC019) ainsi que 12 supers-contigs (G12-14_SC100 à G12-14_SC111), non assemblés et de tailles inférieures à 50 000 BP sont représentés en exemple chez *L. biglobosa*. Les barres rouges représentent les isochores AT et les barres vertes la localisation des gènes.

Les coordonnées des régions génomiques qui présentent un enrichissement en AT ont été établies grâce à l’outil Occultercut (Testa et al., 2016). Ainsi, chez *L. maculans*, on détecte des régions riches en AT d’une taille moyenne de 55,2 KB (sur 290 régions). La taille minimale d’une région riche en AT pour être considérée comme « isochore » a été fixée à 10 KB, ce qui représente 253 isochores chez *L. maculans*. On détecte chez *L. biglobosa* 203 régions riches en AT de taille moyenne deux fois moins importante que chez *L. maculans* : 24,5 KB. Néanmoins seules 57 d’entre elles sont inférieures à 10 KB. Nous considérons donc que la majorité des régions AT, chez *L. biglobosa*, correspondent donc bien à des isochores (**Figure 14b**). La principale différence entre les deux espèces réside dans une plus grande proportion d’isochores AT de grande taille chez *L. maculans* (> 30 KB, **Figure 14b**). La différence de taille moyenne des isochores observée entre les deux espèces est due principalement à la différence de qualité d’assemblage. Cela aurait généré chez *L. biglobosa*, la scission de certains isochores qui seraient alors repartis sur plusieurs contigs (**Figure 14c**, exemple des super-contigs inférieurs à 50 KB).

Enfin, la localisation des isochores chez *L. biglobosa* est biaisée par l’assemblage non résolu de ces régions. On constate cependant qu’ils sont aussi présents le long des supers-contigs (pas exclusivement sur les extrémités). Aussi, la densité d’isochores est beaucoup plus faible chez *L. biglobosa* et de nombreux super-contig en sont dépourvus (**Figure 14c**).

b) Comparaison des annotations des catégories fonctionnelles entre *L. maculans* et *L. biglobosa*

Concernant les catégories fonctionnelles réannotées, comme cela avait été décrit précédemment par Grandaubert et al. (2014) les proportions de CAZymes (2,4%) et de PKS/NRPS (0,16% et 0,19%) demeurent similaires entre les deux espèces (**Tableau 2**). Au contraire la proportion d'effecteurs candidats (PPS) est désormais plus importante chez *L. maculans* (8,2%) que chez *L. biglobosa* (6,8%) dans ces nouveaux répertoires (**Tableau 2**).

La recherche d'orthologue entre *L. maculans* et *L. biglobosa* montre que 67% gènes de *L. maculans* ont des orthologies avec 69,4% des gènes de *L. biglobosa* (**Tableau 2**). Parmi les gènes uniques à *L. maculans* et ceux uniques à *L. biglobosa*, qui pourraient donc être informatifs sur les différences biologiques des deux espèces, 88% chez *L. maculans* et 86% chez *L. biglobosa* n'ont pas de fonctions prédites, ce qui limite les analyses fonctionnelles comparatives.

Pour conclure, la différence génomique majeure entre les deux espèces concerne la composition en isochores AT. Le génome à deux vitesses de *L. maculans* est déjà largement décrit comme un élément clef de la pathogénie (taux de mutation élevé, localisation et régulation spécifique des effecteurs précoces). Chez *L. biglobosa*, l'implication des isochores AT dans la pathogénie n'est pas déterminée pour l'instant.

2 Analyses préliminaires des échantillons RNA-Seq LeptoLife

Après avoir réalisé les différentes étapes de mapping et généré les tables de comptages des échantillons du projet LeptoLife (comprenant le nombre de lectures mappées sur chaque gène prédit dans toutes les conditions), j'ai sélectionné les échantillons selon leur pertinence vis-à-vis des deux axes de ma thèse (**Figures 15-18**). Pour exposer mes critères de choix, créer une vue d'ensemble et faciliter la compréhension de ce grand jeu de données, je résume ici les différentes conditions disponibles ainsi que les proportions de lectures RNA-Seq assignées à chaque espèce fongique dans ces échantillons. J'ai représenté le jeu de données selon quatre catégories : les échantillons issus d'infections de colza ou de cultures *in vitro* de *L. maculans* ou de *L. biglobosa* en conditions contrôlées (**Figure 15-16**), les échantillons issus de coinfections de colza ou de co-cultures *in vitro* (**Figure 17**) et les échantillons issus d'infections naturelles (**Figure 18**).

Chaque catégorie est composée d'échantillons issus de cinétiques d'infection indépendantes de colza ou d'échantillons issus de culture *in vitro*. Tous les réplicats au sein d'une cinétique, sont des réplicats biologiques, réalisés avec différents lots de plantes, de suspension de spore des souches et à des temps différents, ce qui permet de prendre en compte dans les analyses, la variabilité intrinsèque aux matériels biologiques et aux conditions expérimentales. Pour chaque cinétique d'infection, j'ai représenté le pourcentage de lectures assignées à chaque espèce fongique à l'issue de l'étape de mapping.

Ces résultats préliminaires apportent de nombreuses informations primordiales pour aider à la sélection de deux sous-sets d'échantillons. Ils apportent aussi des informations biologiques sur la présence/absence des champignons ainsi que sur la dynamique transcriptomique dans les différentes étapes du cycle de vie. Ces conclusions biologiques ne seront pas discutées ici mais elles seront abordées dans les différents axes de ma thèse, agrémentées d'analyses approfondies.

2.1. Pourcentage de lectures assignées à *L. maculans* et *L. biglobosa* en conditions d'inoculations contrôlées

Des cinétiques d'infection ont été menées en conditions contrôlées en inoculant des solutions de pycnidiospores de chaque espèce sur différents organes de plantules de colza (cotylédons, pétioles et tiges) qui représentent différentes phases infectieuses (infection précoce, colonisation du pétiole et infection tardive de la tige, **Figure 15**). Puis les échantillonnages ont été effectués à différentes dates après l'inoculation selon l'organe infecté (de 2 à 6 dates après inoculation). Les prélèvements à chaque date correspondent à des mélanges

de disques de cotylédons ou de fragments de pétioles ou de tiges prélevés sur plusieurs plantes pour pallier à la variabilité potentielle entre les « individus plantes ». Les réplicats biologiques pour chaque date sont au nombre de deux à trois selon les cinétiques.

D'après les résultats de mapping, on remarque une augmentation des lectures assignées à chaque espèce lors des cinétiques d'infections sur cotylédons (de 2 jours à 15 jours, **Figure 15a,b**). Ces observations corrélerent avec l'augmentation de la biomasse fongique et la capacité de détection de l'ARN fongique dans des approches de Dual-RNA-Seq. On remarque aussi que contrairement à ce qui est observé pour *L. maculans*, la quantité de lectures assignées à *L. biglobosa* est beaucoup plus variable entre les deux réplicats lors de la cinétique d'infection précoce sur cotylédons (**Figure 15a**).

Les inoculations des pétioles ont été réalisées en inoculant les pycnidiospores directement sur le pétiole après la section du limbe de la feuille. Les proportions de lectures observées pour chaque espèce ont d'abord permis de valider la présence de chacune d'elles dans les tissus à 7 et à 14 jours après l'inoculation du pétiole (**Figure 15**). De plus, on détecte une augmentation de la proportion des lectures qui montre que les deux espèces sont actives transcriptomiquement et qu'elles colonisent progressivement les tissus de l'hôte

Pour mimer l'infection tardive, les tests sur tiges font partie des expérimentations de routine au laboratoire. Les pycnidiospores sont inoculées sur le pétiole sectionné à 1cm de la tige. Après 14 jours d'infection, les symptômes apparaissent au niveau de la tige ce qui montre que le champignon s'installe et progresse de manière systémique dans ce tissu. Cependant, le séquençage d'échantillons de tiges prélevés à 14 et 28 jours après l'infection montre que le pourcentage de lectures assignées à chaque espèce est inférieur à 5% du total de la librairie suggérant une activité transcriptomique faible ou un développement dans les tissus encore peu important à ce stade (**Figure 15**). Ce constat est d'autant plus marqué chez *L. biglobosa* auquel moins de 0,5% des lectures totales de la librairie sont assignées à 14 et 28 jours après l'inoculation. Les inoculations de *L. biglobosa* sur tige ont été réalisées avec une souche (B3.5) différente et moins agressive que celle utilisée dans les autres expérimentations, la différence peut donc provenir d'un « effet souche ».

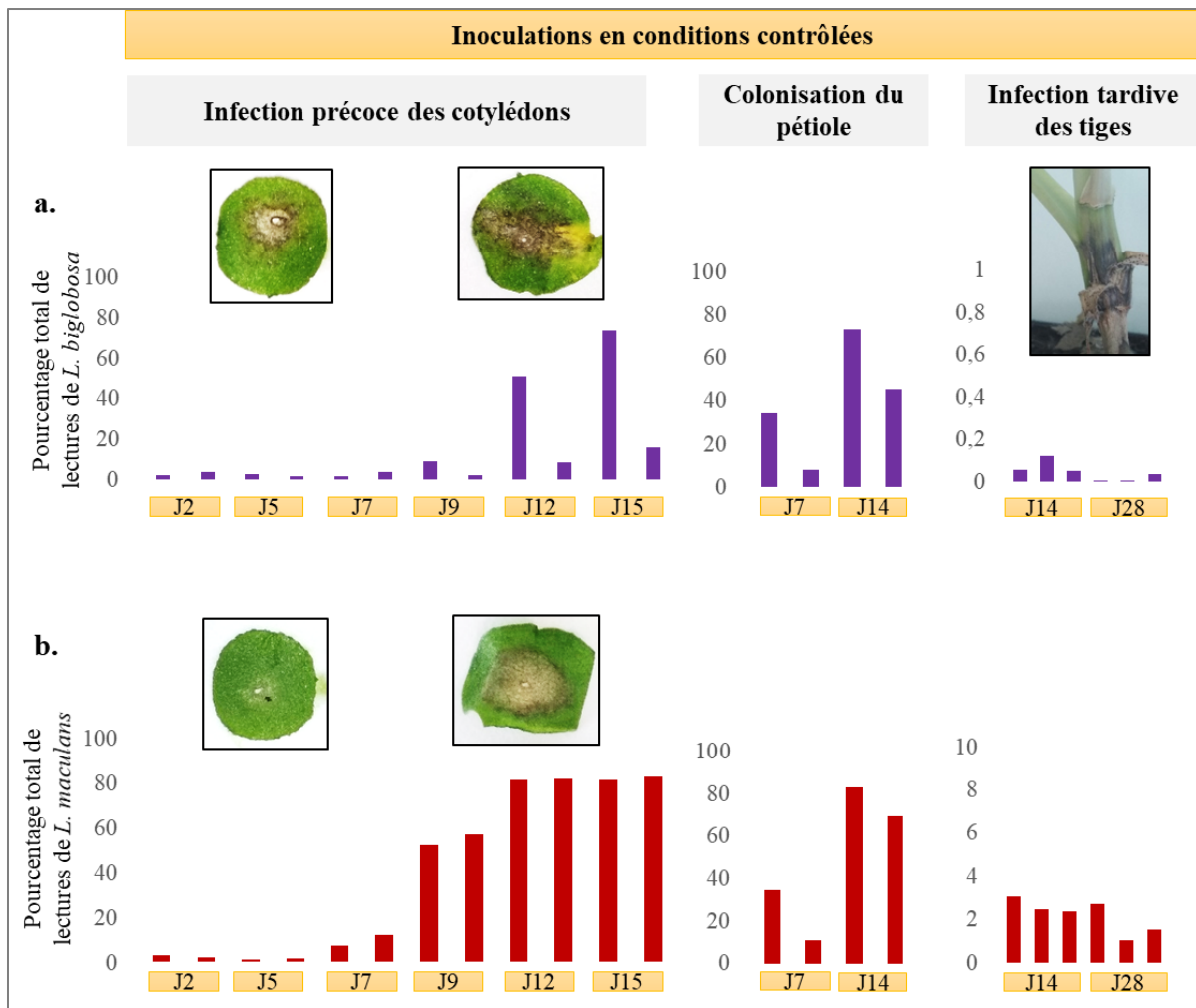


Figure 15 : Description de l'échantillonnage et de la proportion de lectures assignées à *L. maculans* et *L. biglobosa* lors de cinétiques d'infections sur cotylédons, pétioles et tiges menées en conditions contrôlées.

Les inoculations ont été réalisées avec une suspension de pycnidiospores de *L. biglobosa* (a.) ou de *L. maculans* (b.). Les cinétiques d'infection ont été suivies sur trois organes différents (cotylédons, pétioles, tiges) dans des expérimentations indépendantes. Deux réplicats biologiques ont été réalisés sur cotylédons et sur pétioles et trois sur tiges. Pour chaque cinétique d'infection, des prélèvements à différents temps ont été effectués : 2, 5, 7, 9, 12 et 15 jours post-inoculation sur cotylédons ; 7 et 14 jours post-inoculation sur pétioles ; 14 et 28 jours post-inoculation sur tiges. A chaque date les échantillons ont été séquencés par RNA-Seq. Les histogrammes représentent, pour chaque date et pour chaque réplicat, les pourcentages de lectures assignées à *L. biglobosa* (a.) ou *L. maculans* (b.) par rapport au nombre total de lectures séquencées dans l'échantillon.

2.2. Description des conditions de croissance *in vitro* de *L. maculans* et *L. biglobosa*

Plusieurs organes correspondant à plusieurs étapes de croissance et de développement ont été analysés en conditions *in vitro* et en l'absence de l'hôte (mycélium, spores, structure de reproduction...). Les spores asexuées (pycnidiospores) de *L. maculans* ou de *L. biglobosa*, responsables de l'infection secondaire des feuilles ont été générées en conditions *in vitro* et les ARN ont été extraits à deux états différents des spores : un état dormant et lors de l'induction de la germination (**Figure 16a**). L'étape de croissance végétative du mycélium a été obtenue sur milieu riche solide et liquide chez *L. maculans* et *L. biglobosa* (**Figure 16b**). La reproduction sexuée est une étape reproductible chez *L. maculans* en conditions *in vitro* et cela a permis d'obtenir des conditions de croisements entre souches de *L. maculans* naturellement compatibles (*ie* de mating-type opposé) par opposition aux conditions de croisements incompatibles entre souches de même mating-type. Lors de ce processus les échantillons ont été prélevés à différentes dates (**Figure 16c**). Aucun croisement entre souches de *L. biglobosa* n'a été réalisé dans le projet, la technique n'étant pas maîtrisée ni au sein de l'équipe ni à l'échelle internationale.

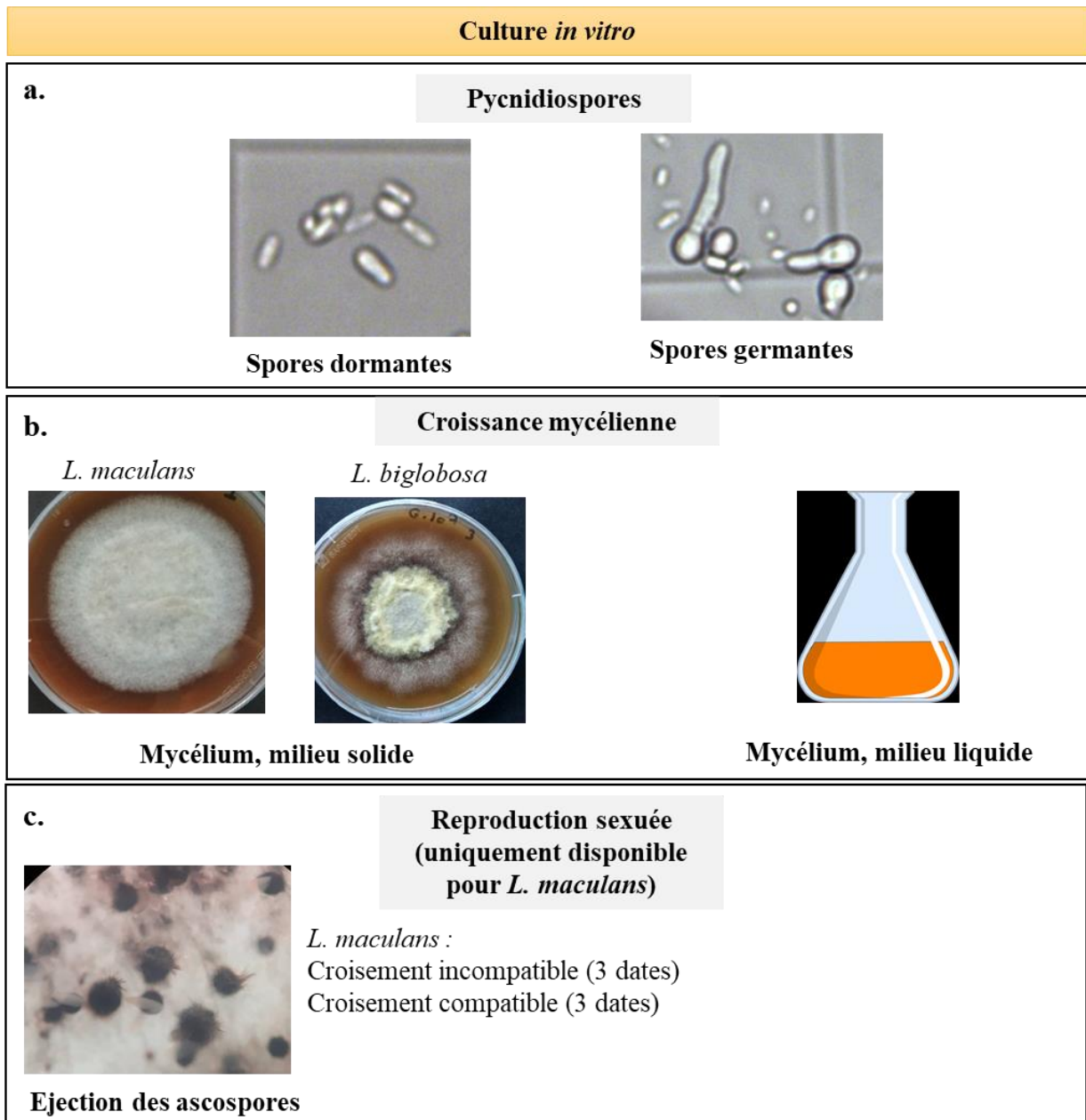


Figure 16 : Description des différentes conditions de croissance *in vitro* de *L. maculans* ou *L. biglobosa* séquencées par RNA-Seq.

Les échantillons ont été prélevés durant trois stades développementaux induits lors de cultures *in vitro*. (a.) Les pycnidiospores de *L. maculans* ou de *L. biglobosa* ont été échantillonnées dans deux états différents: en état de dormance (avant la germination) et lors de la germination en milieu liquide (b.) Le mycélium de *L. maculans* ou de *L. biglobosa* a été prélevé après 7 jours de culture sur deux milieux riches : solide ou liquide. (c) Le processus de reproduction sexuée a été reproduit *in vitro* uniquement chez *L. maculans*. Un croisement témoin entre deux souches de *L. maculans* incompatibles et un croisement test entre deux souches de *L. maculans* compatibles ont été réalisés. Sur ces deux conditions, des échantillons ont été prélevés à 3 dates après la mise en confrontation des deux souches (7, 20 et 35 jours). Pour chaque condition deux réplicats biologiques ont été analysés.

2.3. Pourcentage de lectures assignées à *L. maculans* et *L. biglobosa* en conditions de co-inoculations et co-cultures *in vitro*

Avec la même méthode que lors des inoculations en conditions contrôlées, des co-inoculations de *L. maculans* et *L. biglobosa* ont été réalisées et des échantillons ont été prélevés selon le même protocole et aux mêmes dates (**Figure 17**). Les suspensions en mélange de pycnidiospores des deux espèces à la même concentration ont été utilisées pour ces co-inoculations et co-cultures.

Ce jeu de données montre que lors de l'infection des cotylédons le pourcentage relatif de lectures des deux espèces à 2 dpi est d'environ 50%, ce qui reflète la concentration équivalente de spores dans le mélange. Cette proportion augmente progressivement chez *L. biglobosa* au détriment de *L. maculans* pour atteindre plus de 95% des lectures fongiques totales (**Figure 17a**). Lors de la colonisation du pétiole *L. biglobosa* représente plus de 90% des lectures fongiques des échantillons quels que soient la date et le réplicat. Enfin lors de l'inoculation de la tige, pour chaque date, moins de 5% des lectures sont des lectures fongiques et parmi elles, les lectures de *L. maculans* sont, cette fois, surreprésentées avec en moyenne 76% des lectures lui étant assignées (**Figure 17a**). Pour rappel, comme pour les inoculations individuelles sur tiges, la souche de *L. biglobosa* utilisée pour les co-inoculations sur tiges est une souche différente et moins agressive que celle utilisée lors des expérimentations sur cotylédons et pétioles.

Concernant les conditions *in vitro*, seuls des échantillons de mycélium cultivés sur milieu solide ou liquide en co-cultures ont été séquencés par RNA-Seq. Dans ces conditions *in vitro* aussi, ce phénomène de prépondérance des lectures assignées à *L. biglobosa* est observé après 7 jours de co-culture et ce, quel que soit le milieu (**Figure 17b**).

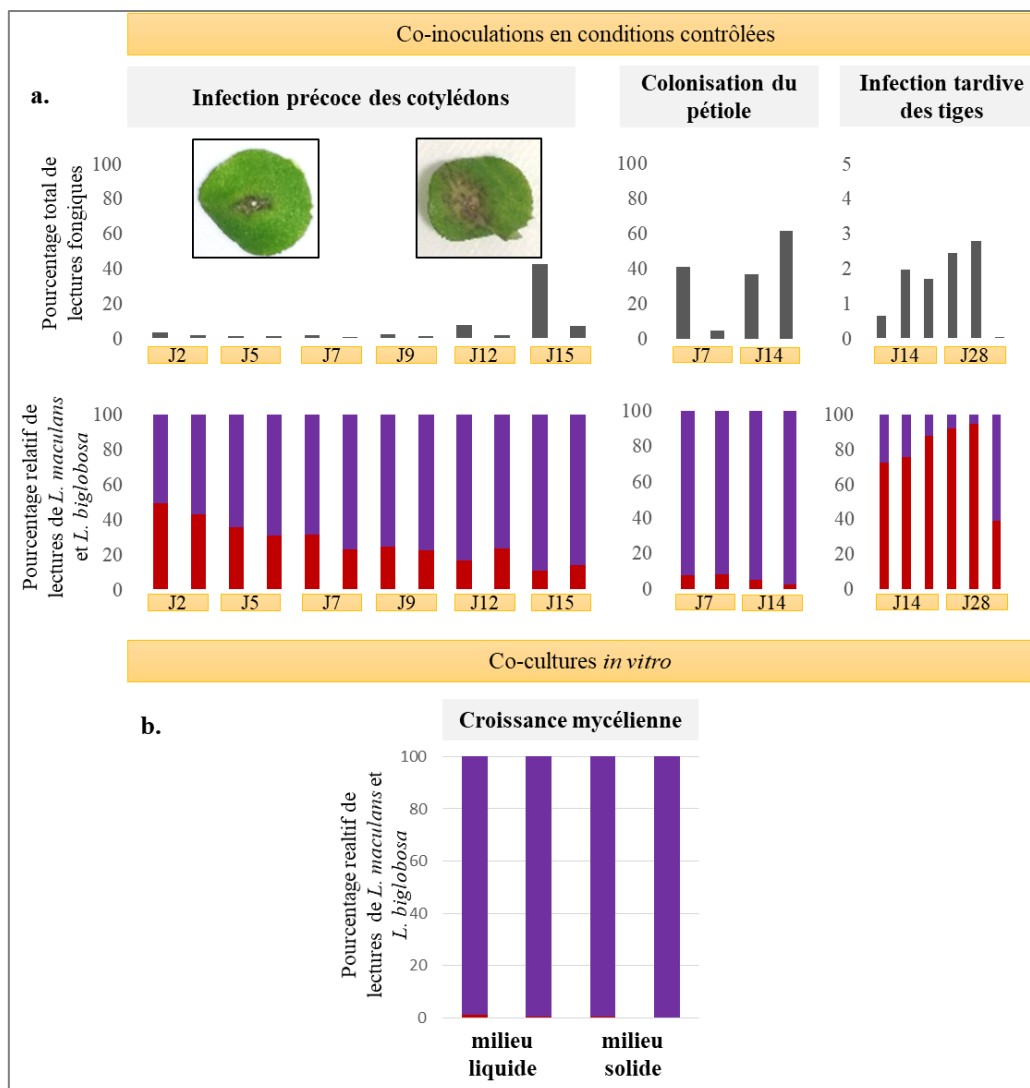


Figure 17 : Description de l'échantillonnage et de la proportion de lectures assignées à *L. maculans* et *L. biglobosa* lors de cinétiques de coinfections sur cotylédons, pétioles et lors de co-cultures *in vitro* menées en conditions contrôlées.

(a.) Les co-inoculations ont été réalisées avec une suspension composée d'un mélange de pycnidiospores de *L. biglobosa* et de *L. maculans* en concentration égale. Les cinétiques de coinfection ont été suivies sur trois organes différents (cotylédons, pétioles et tiges) dans des expérimentations indépendantes. Deux ou trois réplicats biologiques ont été réalisés. Pour chaque cinétique d'infection, des prélèvements à différents intervalles de temps ont été effectués : 2, 5, 7, 9, 12 et 15 jours post-inoculation sur cotylédons ; 7 et 14 jours post-inoculation sur pétioles ; 14 et 28 jours post-inoculation sur tiges. A chaque date les échantillons ont été séquencés par RNA-Seq. Le pourcentage cumulé de lectures assignées à *L. maculans* et *L. biglobosa* par rapport au nombre total de lectures dans la librairie pour chaque date et pour chaque réplicat est représenté en noir. Les pourcentages relatifs de lectures assignées *L. biglobosa* (en violet) ou *L. maculans* (en rouge) par rapport au nombre total de lectures fongiques dans l'échantillon sont représentés. (b.) Les co-cultures ont été réalisées avec une suspension composée d'un mélange de pycnidiospores *L. biglobosa* et de *L. maculans* en concentrations égales sur milieu solide ou sur milieu liquide. Des échantillons de mycélium ont été prélevés à 7 jours et séquencés par RNA-Seq. Les pourcentages relatifs de lectures assignées *L. biglobosa* (en violet) ou *L. maculans* (en rouge) par rapport au nombre total de lectures fongiques dans l'échantillon sont représentés.

2.4. Pourcentage de lectures assignées à *L. maculans* et *L. biglobosa* en conditions naturelles d'infection

Dans le cadre de ce projet, de nombreux échantillons issus d'infections naturelles ont été prélevés et séquencés offrant la possibilité pour la première fois d'observer la dynamique transcriptomique de chaque espèce en condition d'infection naturelle. Ces échantillons ont été prélevés en fonction du cycle biologique connu des champignons sur une année de culture et sur différents organes.

En conditions naturelles, l'infection des deux champignons débute par l'infection des feuilles par un inoculum primaire issu de la reproduction sexuée (les ascospores). Au regard de la difficulté d'échantillonner cette étape en conditions naturelles, un protocole adapté a été mis en place et est détaillé dans le matériel et méthode du chapitre 2. Brièvement, la projection naturelle d'ascospores a été obtenue à partir de résidus de culture placés au-dessus de plantules de colza au stade cotylédonnaire afin de forcer l'infection sur cotylédons par un inoculum naturel d'ascospores. Les cotylédons ont ensuite été prélevés à 24h et 48h après l'éjection des ascospores dans le but d'analyser l'infection très précoce des cotylédons par un inoculum primaire naturel. Le séquençage RNA-Seq n'a permis de détecter qu'une très faible proportion de transcrits fongiques assignées à *L. maculans* et/ou *L. biglobosa* (**Figure 18a**). Néanmoins, nous distinguons des transcrits des deux espèces ce qui montre que l'éjection des ascospores peut être concomitante au sein du complexe d'espèces (**Figure 18a**).

Par la suite, en automne, quand les conditions sont favorables, on assiste à une augmentation accrue des symptômes sur les feuilles de colza. Aucun échantillon d'infection précoce de feuilles infectées en conditions naturelles n'a été séquencé lors de l'élaboration du projet Leptolife. Pour compléter ces données, j'ai, durant ma première année de thèse, prélevé, extrait et fait séquencer des échantillons de feuilles infectées naturellement et représentatifs des macules typiques de *L. maculans* à deux dates en novembre (**Figure 18b**). Contrairement aux échantillons issus des infections contrôlées sur cotylédons, ceux-ci ne couvrent pas la phase biotrophe car l'échantillonnage de tissus asymptomatiques analysés en parallèle aux mêmes dates n'a pas permis d'y détecter des transcrits de *L. maculans*. Dans le but de détecter une coinfection potentielle au champ, j'ai aussi prélevé des symptômes atypiques qui après analyse ont révélé la présence de *L. maculans* et de *L. biglobosa* en proportion variable selon le réplicat mais en trop faible quantité pour l'un et l'autre pour réaliser une analyse transcriptomique (**Figure 18b**).

Les échantillons de suivi de la phase de colonisation de la tige ont été prélevés sur une année culturale entière couvrant ainsi toutes les phases en amont (février-avril) du développement de la nécrose au collet (mai-juillet). D'après les résultats de mapping on remarque que les deux espèces sont peu actives transcriptomiquement jusqu'en mars (**Figure 18c**). Par la suite on détecte une forte augmentation des lectures de *L. maculans* de manière concomitante avec le développement de la nécrose au collet (**Figure 18c**). On retrouve aussi une augmentation des lectures de *L. biglobosa* dans ces mêmes échantillons montrant que les deux espèces sont bien retrouvées ensemble au collet en fin de saison culturale mais avec une prépondérance marquée de transcrits assignés à *L. maculans* (**Figure 18c**).

Enfin, les échantillons de suivi de la phase saprophyte ont été obtenus en conditions naturelles sur une année d'échantillonnage. Le pourcentage de lectures assignées à *L. maculans* est variable et est plus important dans les périodes d'été (juillet, août, sept), à la suite de la récolte des colzas. Une nouvelle fois, ces analyses révèlent la présence des deux espèces mais ne révèlent qu'une faible proportion de lectures assignées à *L. biglobosa* (**Figure 18d**).

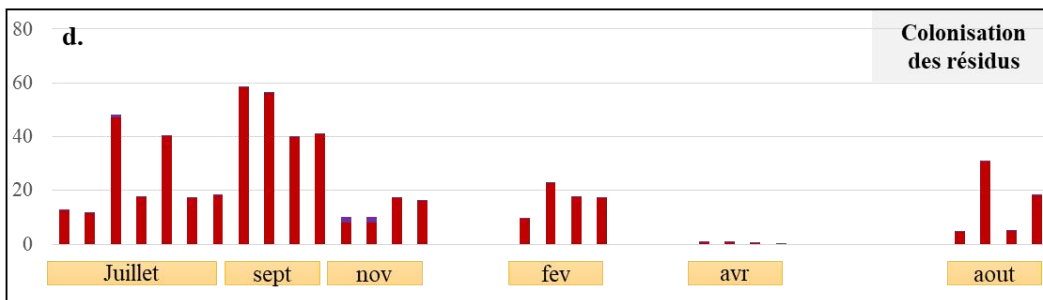
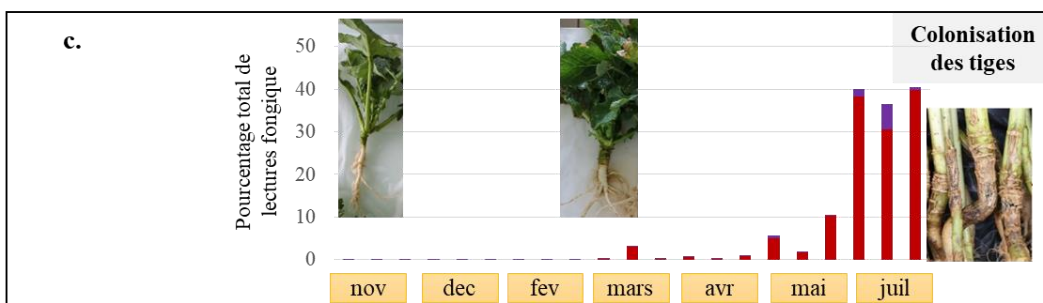
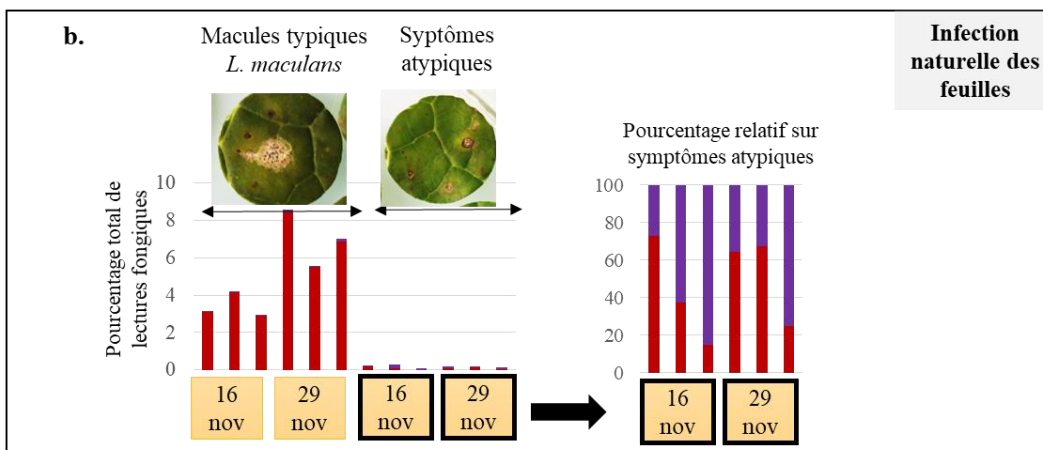
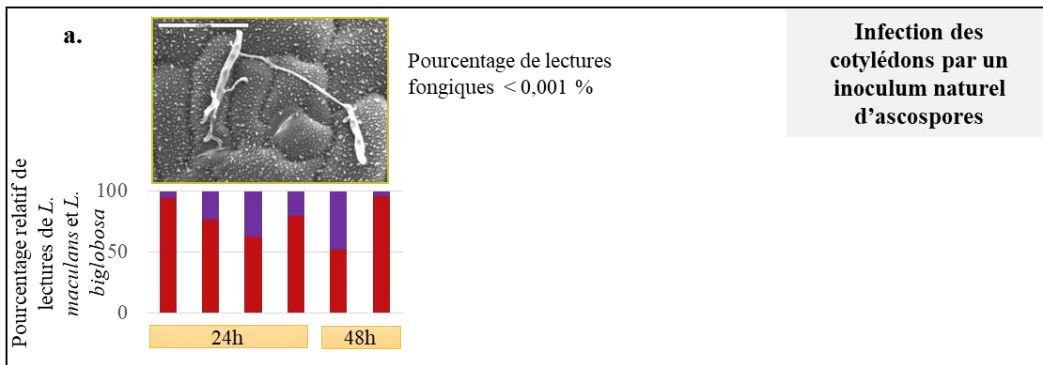
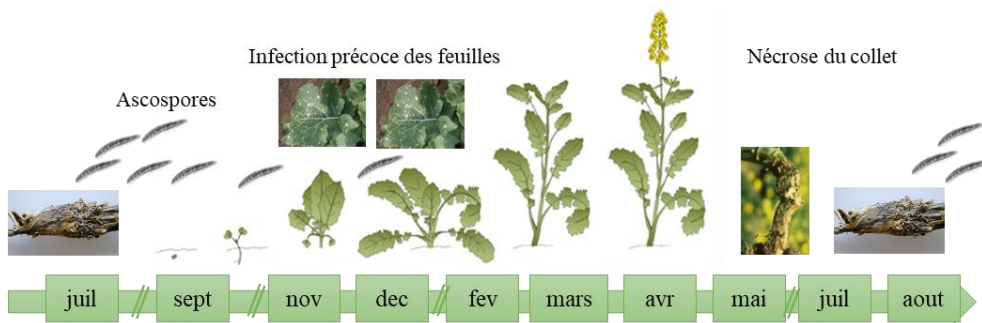


Figure 18 : Description de l'échantillonnage et de la proportion de lectures assignées à *L. maculans* et *L. biglobosa* au sein d'échantillons prélevés en conditions d'infection naturelle sur une année de culture de colza d'hiver.

Le schéma représente les différentes étapes du cycle de vie de *L. maculans* et de *L. biglobosa* en fonction des stades développementaux du colza sur une année de culture : du semis (septembre) à la récolte (juillet) ainsi que la phase de vie saprophyte entre deux cultures (juillet à aout). Au cours d'une année de culture, des échantillons ont été prélevés à différents intervalles de temps et sur différents organes (**a.** à **d.**). (**a.**) L'infection primaire par les ascospores a été reproduite en conditions contrôlées sur cotylédons avec un inoculum naturel d'ascospores éjectées de résidus de culture. Les cotylédons ont été prélevés à 24h et 48h sur quatre et deux réplicats biologiques, respectivement. Le pourcentage de lectures cumulées entre *L. maculans* et *L. biglobosa* correspond à moins de 0,001% des lectures des librairies. Le pourcentage relatif de lectures assignées à *L. maculans* (en rouge) et *L. biglobosa* (en violet) est représenté par l'histogramme. (**b.**) Un stade plus avancé de l'infection précoce a été prélevé sur des feuilles de colza à deux dates en novembre (16 et 29 nov 2017) sur trois réplicats. Deux types de symptômes ont été prélevés : des macules typiques de *L. maculans* et des symptômes atypiques. Le pourcentage de lectures de *L. maculans* (en rouge) et *L. biglobosa* (en violet) détectées dans chaque échantillon est représenté. Le pourcentage relatif de lectures assignées à *L. maculans* (en rouge) et *L. biglobosa* (en violet) au sein des échantillons de macules atypiques est représenté. (**c.**) Des échantillons de collet ont été prélevés de novembre à juillet en triplicat. Le pourcentage de lectures de *L. maculans* (en rouge) et *L. biglobosa* (en violet) détecté dans chaque échantillon est représenté. (**d.**) Des échantillons de résidus de culture ont été prélevés de juillet à aout (entre 4 et 7 réplicats). Le pourcentage de lectures de *L. maculans* (en rouge) et *L. biglobosa* (en violet) détecté dans chaque échantillon est représenté.

Pour répondre aux objectifs de ma thèse, j'ai sélectionné les échantillons à analyser selon trois critères : (i) la pertinence selon la question biologique posée, (ii) le nombre de lectures assignées à l'espèce d'intérêt et (iii) la disponibilité de conditions témoin notamment lors de l'analyse de l'interaction entre *L. maculans* et *L. biglobosa*.

2.5. Choix des échantillons pour la description du cycle de vie de *L. maculans*

Ces analyses préliminaires ont révélé qu'il était possible de constituer un sous-set de conditions qui permet de décrire l'activité transcriptomique de *L. maculans* tout au long de son cycle de vie. Dans cet objectif, j'ai sélectionné toutes les cinétiques d'infection par *L. maculans* obtenues en conditions contrôlées (cotylédons, pétioles et tiges), les échantillons issus d'infections naturelles sur feuilles, sur collets et sur résidus de culture. Tous les échantillons *in vitro* de *L. maculans* décrits dans la figure 15 ont été sélectionnés.

Au total, 102 échantillons ont été analysés dans mon premier article. Sur ce lot d'échantillons, certains ont été écartés des analyses statistiques quantitatives de détection de gènes différentiellement exprimés car ils comprenaient trop peu de lectures mais ils ont été

gardés pour une analyse qualitative discutée dans l'article. Finalement, 32 conditions (87 échantillons) d'infection *in planta* et conditions contrôles *in vitro* ont été utilisées pour décrire les gènes impliqués dans le cycle pathologique chez *L. maculans*.

Contrairement à *L. maculans*, l'analyse du cycle complet de *L. biglobosa* n'a pas été effectuée. En effet, la quantité d'échantillons analysables était déséquilibrée entre les deux espèces et cela aurait engendré une description uniquement parcellaire du cycle de vie de *L. biglobosa* (absence de certaines conditions de culture *in vitro*, absence d'infection sur tige et faible quantité de lectures en conditions naturelles d'infection).

2.6. Choix des échantillons pour l'analyse de l'interaction au sein du complexe d'espèce

Pour répondre au deuxième objectif de ma thèse, j'ai sélectionné un autre sous-set de conditions selon différents critères. Pour pouvoir révéler la dynamique transcriptomique chez les deux espèces lors des coinfections ou co-cultures il était primordial de sélectionner des conditions pour lesquelles les témoins en infection individuelle étaient disponibles. Quand c'était le cas, une quantité suffisante de lectures devait être assignée à chacune des espèces dans toutes les conditions (conditions individuelles mais surtout dans les conditions en mélange) pour pouvoir réaliser les comparaisons statistiques.

Ces critères n'étaient pas remplis au sein des échantillons issus des conditions naturelles d'infection pour lesquels la quantité de lectures assignées à *L. biglobosa* est très faible et pour lesquelles les conditions témoins d'infections individuelles ne sont pas disponibles. Bien que ces échantillons aient été écartés de l'analyse ils seront tout de même discutés dans la discussion de ma thèse. De la même manière, j'ai écarté les conditions *in vitro* car la faible proportion de lectures détectées chez *L. maculans* en co-culture sur milieu *in vitro* ne permet pas de décrire la réponse de *L. maculans* à la présence de *L. biglobosa*.

Finalement, j'ai sélectionné uniquement les conditions de co-infections obtenues lors de (co-)inoculations sur cotylédons mimant l'infection précoce du cycle infectieux. Ces échantillons comprennent un jeu complet de quatre cinétiques d'infection : inoculations par *L. biglobosa* ou *L. maculans* (**Figure 17**), co-inoculation par *L. maculans* et *L. biglobosa* (**Figure 18**) et une infection témoin avec de l'eau. Le tout compose un set de 48 échantillons, qui sera exploité dans le second article de cette thèse (chapitre 3).

Chapitre II. Analyses à grande échelle de la régulation transcriptomique au cours du cycle infectieux de *Leptosphaeria maculans*

La quantité massive de données RNAseq générée dans le cadre du projet LeptoLife nécessitait un traitement de celles-ci en fonction des questions biologiques posées. La première concernait l'identification des gènes associés aux multiples interactions avec la plante durant tout le cycle de vie de *L. maculans*, de façon à développer une compréhension de la biologie de l'organisme basée sur les données RNA-Seq.

Ainsi, ce chapitre est constitué de mon premier article intitulé "Large-scale transcriptomics to dissect two years of the life of a fungal phytopathogen interacting with its host plant" actuellement déposé dans BioRxiv. L'objectif de cet article est de décrire la dynamique transcriptomique chez *L. maculans* lors de ses interactions avec la plante-hôte grâce aux échantillons séquencés dans le cadre du projet LeptoLife, et en étant le plus exhaustif possible dans la description des fonctions impliquées dans la pathogénie et les modes de régulation de l'expression génique sur un maximum d'étapes du cycle de vie de *L. maculans*.

1. Démarche analytique

J'ai réalisé une description du cycle de vie de *L. maculans* par le prisme de l'analyse des gènes spécifiquement induits lors de l'infection. Pour obtenir ce sous-set de gènes, toutes les conditions *in vitro* ont été utilisées en tant que contrôle dans les analyses statistiques de détection des gènes différentiellement exprimés. Ces dix conditions *in vitro* sont représentatives de différents états de croissance fongique en l'absence de l'hôte (mycélium, spore, structure de reproduction). En utilisant toutes les conditions *in vitro* en tant que contrôle, les gènes détectés comme étant sur-exprimés *in planta* ont été considérés comme directement impliqués dans le cycle infectieux et ils composent le set de gènes d'intérêt analysé dans cette étude.

Les analyses statistiques ont permis de détecter 1 207 gènes sur-exprimés durant les différentes conditions infectieuses disponibles. Nous avons pu mettre en évidence des profils d'expression pertinents et cohérents avec le cycle infectieux. Tous les stades du cycle tels que décrits et subdivisés dans la littérature sont représentés par au moins un cluster d'expression révélant pour certains une décomposition plus complexe que celle décrite initialement. Cette analyse précise les profils d'expression des gènes de la pathogénie déjà caractérisés chez *L. maculans* mais révèle aussi de nouveaux gènes candidats qui sont soit coexprimés avec ceux déjà connus ou qui sont compris dans de nouvelles vagues d'expression.

2. Intégration du paysage chromatinien de *L. maculans* en conditions de croissance *in vitro*

Avant mon arrivée en thèse, l'association entre la répression de l'expression de quelques gènes prédits dans les régions riches en AT et la présence de la marque de méthylation des histones H3K9me3 *in vitro* avait déjà été décrite (Soyer et al., 2014). Cependant, aucune donnée n'avait permis de cartographier directement la répartition de cette marque à l'échelle du génome de *L. maculans*. Par ailleurs, ni la marque H3K27me3 caractéristique de l'hétérochromatine facultative ou la marque H3K4me2 caractéristique de l'euchromatine n'avaient été étudiées chez *L. maculans*.

Au sein de l'équipe, J. Soyer et al., ont mené un projet de cartographie des marques de méthylation d'histone (H3K9, H3K27, H3K4) du génome de *L. maculans* dans des conditions de croissance *in vitro*. Cette cartographie a été obtenue par des expériences de ChIP-Seq (Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing) et les résultats ont abouti à un article publié en 2020 (Soyer et al., 2020) dans lequel j'ai participé à une partie de l'analyse (détection des orthologues et des effecteurs de *L. maculans* 'brassicae' et *L. maculans* 'lepidii')

Les résultats présentés dans l'article de Soyer et al., ont permis de valider à l'échelle du génome et dans des conditions *in vitro*, que la répartition des marques épigénétiques n'est pas uniforme dans le génome et qu'elle est fortement corrélée avec l'activité transcriptomique et la localisation génomique des gènes.

D'après cette étude, le génome de *L. maculans* est décoré à 39% de la marque euchromatinienne (H3K4) et à 19% et 33% des marques hétérochromatiniennes H3K27 et H3K9 respectivement, dans des conditions de croissance *in vitro*. La marque H3K9 est surreprésentée dans les isochores AT et est mutuellement exclusive avec la marque H3K4 qui est, elle, surreprésentée dans les régions pauvres en AT et riches en gènes. Les analyses RNA-seq menées sur ces mêmes échantillons *in vitro* ont montré que la marque H3K9 est localisée dans des régions inactives transcriptomiquement alors que la marque H3K4 est localisée dans les régions de forte expression génique (Soyer et al., 2020). La corrélation entre la présence de certaines marques épigénétiques et l'expression des gènes *in vitro* a donc été validée par cette étude.

Par ailleurs, d'après les éléments plus anciens de la littérature, la régulation transcriptomique durant l'infection, notamment celle des gènes de la pathogénie, serait en partie régulée par la dynamique des marques épigénétiques. Pour l'instant chez *L. maculans* aucune

donnée de cartographie des marques épigénétiques lors de l'infection *in planta* n'a été apportée pour valider cette hypothèse. Néanmoins, dans mon premier article, nous avons intégré les données de cartographie épigénétique décrits par Soyer et al. (2020) afin de détecter de potentielles corrélations entre les gènes composant les vagues d'expression durant l'infection et les marques épigénétiques qui leur sont associées *in vitro*.

En pratique, pour chaque vague d'expression décrite nous avons dénombré les gènes qui, dans les conditions *in vitro*, sont associés aux marques H3K9, H3K27 et H3K4 (Soyer et al., 2020). Ainsi nous avons pu montrer que les gènes présents dans les différentes vagues d'expression sont enrichis en gènes associés à des marques hétérochromatiniennes *in vitro*. Nous avons pu aussi mettre en évidence que certains clusters sont spécifiquement enrichis en gènes associés à la marque d'hétérochromatine constitutive (H3K9). Ces résultats présentés dans l'article, suggèrent que la coexpression fine de certains sets de gènes est corrélée à une régulation épigénétique.

3. Article 1

Large-scale transcriptomics to dissect two years of the life of a fungal phytopathogen interacting with its host plant

Authors:

Elise J. Gay ¹, Jessica L. Soyer ¹, Nicolas Lapalu ¹, Juliette Linglin ¹, Isabelle Fudal ¹, Corinne Da Silva ², Patrick Wincker ², Jean-Marc Aury ², Corinne Cruaud ³, Anne Levrel ⁴, Jocelyne Lemoine ⁴, Regine Delourme ⁴, Thierry Rouxel ¹, Marie-Hélène Balesdent ¹

¹Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR BIOGER, 78850 Thiverval-Grignon, France.

²Génomique Métabolique, Genoscope, Institut François Jacob, CEA, CNRS, Université d'Evry, Université Paris-Saclay, 91057 Evry, France

³Genoscope, Institut François Jacob, CEA, Université Paris-Saclay, Evry, France

⁴INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, IGEPP, 35653, Le Rheu, France.

Abstract

The fungus *Leptosphaeria maculans* has an exceptionally long and complex relationship with its host plant, *Brassica napus*, during which it switches between different lifestyles, including asymptomatic, biotrophic, necrotrophic, and saprotrophic stages. The fungus is also exemplary of “two-speed” genome organisms in which gene-rich and repeat-rich regions alternate. Except for a few stages of plant infection under controlled conditions, nothing is known about the genes mobilized by the fungus throughout its life cycle, which may last several years in the field. We show here that about 9% of the genes of this fungus are highly expressed during its interactions with its host plant. These genes are distributed into eight well-defined

expression clusters, corresponding to specific infection lifestyles or to tissue-specific genes. All expression clusters are enriched in effector genes, and one cluster is specific to the saprophytic lifestyle on plant residues. One cluster, including genes known to be involved in the first phase of asymptomatic fungal growth in leaves, is re-used at each asymptomatic growth stage, regardless of the type of organ infected. The expression of the genes of this cluster is repeatedly turned on and off during infection. Whatever their expression profile, the genes of these clusters are located in regions enriched in heterochromatin, either constitutive or facultative. These findings provide support for the hypothesis that fungal genes involved in niche adaptation are located in heterochromatic regions of the genome, conferring an extreme plasticity of expression. This work opens up new avenues for plant disease control, by identifying stage-specific effectors that could be used as targets for the identification of novel durable disease resistance genes, or for the in-depth analysis of chromatin remodeling during plant infection, which could be manipulated to interfere with the global expression of effector genes at crucial stages of plant infection.

Author Summary

Fungi are extremely important organisms in the global ecosystem. Some are damaging plant pathogens that threaten global food security. A knowledge of their biology and pathogenic cycle is vital for the design of environmentally-friendly control strategies. Unfortunately, many parts of their life cycle remain unknown, due to the complexity of their life-cycles and technical limitations. Here, we use a rapeseed pathogen, *Leptosphaeria maculans*, which has a particularly complex life-cycle, to show that large-scale RNA-Seq analyses of fungal gene expression can decipher all stages of the fungal cycle over two years of interaction with living or dead hosts, in laboratory and agricultural conditions. We found that the fungus uses about 9% of the genes of its genome specifically during interactions with the plant, and observed

waves of extremely tight, complex regulation during the colonization of specific tissues and specific parts of the life-cycle. Our findings highlight the importance of genes encoding effectors, small secreted proteins manipulating the host. This work opens up new avenues for plant disease control through the identification of stage-specific effectors leading to the discovery of novel durable disease resistance genes, or the analysis of epigenetic regulation, which could be manipulated to interfere with effector gene expression.

Introduction

Fungi play a vital role in global ecosystems. They have highly complex life-cycles that often remain poorly understood, due to the multiplicity of fungal species and their behavior. Plant-associated fungi (endophytes, symbionts and phytopathogens) contribute to this complexity and diversity of behavior, as they may have beneficial, neutral or detrimental interactions with their hosts; some are of paramount importance in favoring the growth of plants or their adaptation to the environment, whereas others are highly damaging pathogens of cultivated plants [1].

Many fungal pathogens of annual crops display contrasting infection strategies (e.g. the biotrophs *Blumeria graminis* and *Ustilago maydis*, the hemibiotroph *Colletotrichum higginsianum* or the necrotroph *Botrytis cinerea*), with reproducible short cycles of colonization/sporulation, lasting from hours to weeks, on plant leaves. For such species, high-throughput RNA sequencing has made it possible to describe the stage-specific expression of genes during the few days or weeks over which the infection process occurs, under laboratory conditions. Such studies have identified concerted waves of pathogenicity gene expression during fungal infection [2-3], sets of genes involved in the switch from asymptomatic to necrotrophic growth in the hemibiotrophic fungus *Zymoseptoria tritici* [4,5], or four waves of

expression for genes encoding putative effectors in *C. higginsianum* [6]. Short life-cycles, of no more than a few weeks on the host, are compatible with the description of biological and phytopathogenic features in experiments performed in controlled conditions.

In many other models, including symbionts and endophytes, the fungi spend much longer interacting with their host, and make use of different pathogenic/symbiotic developmental programs to adapt to different lifestyles during host colonization (this is the case in *Leptosphaeria maculans*, the fungus studied here), different host tissues (e.g. *U. maydis*; [7]), or different plant species (e.g. rust species with complex pathogenic cycles including two alternate host species; [8]). For these species, RNA-Seq approaches also seem to be the approach of choice for dissecting the entire fungal life-cycle and describing the biology of the fungus, together with the sets of genes involved and their regulation. However, the use of RNA-Seq to describe the fungal life-cycle is challenging and technically demanding. Even for fungal species that can be grown in axenic media and for which miniaturized pathogenicity assays have been developed, parts of the pathogenicity cycle remain inaccessible and cannot be reproduced in laboratory conditions. It is, therefore, essential to sample and monitor isolates from the wild. The second challenge is developing a sufficiently comprehensive *a priori* knowledge of all the relevant stages of the fungal life-cycle, and a means of sampling all of these stages for analysis. The third challenge is the generation of sufficient amounts of high-quality samples (often corresponding to minute amounts of fungal organisms in large amounts of plant material, or samples obtained blind, without knowing whether the fungus is present in the plant at the time of sampling) for RNA-Seq, to ensure the generation of enough reads for appropriate statistical analyses. The fourth challenge is coping with complex field samples, containing not only the phytopathogen and the host plant, but also many other fungal or bacterial species, necessitating a careful evaluation of the specificity of RNA-Seq mapping before analysis. The final challenge is coping with field samples subject to natural infection in

variable environmental conditions, potentially resulting in a high level of heterogeneity in terms of the presence of the fungus and its developmental stage within the tissues, and attaining a biologically relevant continuity when monthly samples are obtained over a whole growing season.

L. maculans, a pathogen of rapeseed (*Brassica napus*), has an exceptionally complex life cycle compared to most other fungal phytopathogens attacking annual plants. It can infect different plant tissues, undergo multiple switches from biotrophy to necrotrophy during a lengthy lifespan in plant tissues, and can also live as a saprophyte on plant residues. The epidemiological cycle of *L. maculans* is well described [9,10]. It begins with the hemibiotrophic colonization of young leaves by spores generated by sexual reproduction (ascospores) in early autumn (October-November) in Europe. The fungus first colonizes the leaf tissues as a biotroph, for a few days or weeks, depending on the climatic conditions, without causing any symptoms. It then induces the development of necrotrophic leaf lesions in which its asexual spores (conidia) are produced. The fungus then migrates, without causing symptoms, from the petiole to the stem, where it lives in the plant tissues, as an endophyte, for several months. Finally, at the end of the growing season (May to July in Europe), it switches back to necrotrophic behavior, inducing the formation of a damaging stem canker that may result in plant lodging. Having completed all these stages of infection on living plant tissues, *L. maculans* then switches to a saprotrophic lifestyle, living on crop residues for up to three years. It develops structures for sexual reproduction to create the new inoculum (ascospores) for subsequent seasons on these residues. Due to its length and complexity, only a limited part of the life-cycle of *L. maculans* is amenable to laboratory experiments. Most of the RNA-seq-based time-course experiments published to date were performed during the first two weeks of infection, on cotyledons in controlled conditions [11-13], or in one set of stem infection conditions in controlled conditions [14].

In many models analyzing primary leaf infection, RNA-Seq approaches have highlighted the importance of genes encoding small secreted proteins (SSPs), acting as effectors, which often compromise plant defense responses [15]. In *L. maculans*, SSP genes are strongly expressed during cotyledon infection in controlled conditions [11-13], whereas another set of putative effectors and a toxin encoded by a secondary metabolite gene cluster, sirodesmin PL, are recruited during stem infection [14,16]. To date, 20 effector genes have been characterized in *L. maculans*, corresponding to the most documented class of pathogenicity genes in this species. These genes include nine cloned “early” effector genes (*AvrLm* genes) [17-25] located in AT-rich regions of the fungal genome enriched in transposable elements (TEs) [26] and encoding typical SSPs with few, if any, matches to sequences in databases, frequently enriched in cysteine residues. These genes are expressed and act during asymptomatic cotyledon infection. Eleven “late” putative effector genes, with molecular features similar to those of “early” effectors, were then shown to be expressed during stem colonization [14]. Unlike “early” effectors, these genes are located in gene-rich regions of the genome.

In addition to effector genes, the possible role in virulence of dozens of genes of different functional categories has been studied in *L. maculans*. These genes encode proteins involved in the biosynthesis of two secondary metabolites: abscisic acid (ABA) [27] and the toxin sirodesmin [16], and genes disrupted or silenced in *L. maculans*, 11 of which have been implicated in fungal virulence [28-36]. Again, all these studies were performed in controlled conditions, generally with miniaturized pathogenicity tests on cotyledons, and nothing is known about the involvement of the candidate genes, or of other pathogenicity genes, in other parts of the fungal life cycle. ‘Late’ effectors have been identified only in controlled conditions, and their involvement in the lengthy process of stem colonization in the field requires further investigation.

L. maculans has a well-defined bipartite genome consisting of gene-rich, GC-equilibrated regions and large AT-rich regions enriched in transposable elements (TE) but depleted of genes. The AT-rich regions account for 34.8% of the genome and are enriched in H3K9me3 (trimethylation of the lysine 9 residue of histone H3) marks, typical of constitutive heterochromatin in other species, whereas the GC-rich regions are enriched in H3K4me2 (dimethylation of the lysine 4 residue of histone H3) marks, typical of euchromatin [37-38]. In addition, species-specific genes and genes silenced during axenic growth display an enrichment in H3K9me3 and H3K27me3 (trimethylation of the lysine 27 residue of histone H3; [38]) heterochromatin modifications. The chromatin-based regulation of the expression of 'early' effector genes has been experimentally validated for a few *AvrLm* genes in this model [37].

We hypothesized here that, with the use of careful experimental and sampling procedures, it should be possible to use a large-scale transcriptomic approach to decipher the whole of the complex life cycle of *L. maculans* in interaction with its host, in both controlled and field conditions, and over time scales ranging from weeks (controlled condition experiments) to months or years (follow-up of plant infection on leaves and stems for a whole growing season, survival of *L. maculans* on residues remaining on the soil for one year). Our objective was, thus, to use RNA-Seq data to describe the complete fungal life-cycle and pathogenicity cycle and to identify the genes and functions involved in each stage. We found that about 9% of the genes of the fungus were expressed specifically during host-fungus interactions. A clustering of all the genes involved in the host-fungus interaction led to the detection of eight major waves of gene expression that could be consistently related to the consecutive stages of the *L. maculans* life-cycle, to tissue-specific expression, or corresponded to genes recycled for all similar lifestyles at different stages of the fungal life-cycle. The regulation of expression was strongly associated with the hosting of genes of the eight waves in heterochromatin landscapes, and

heterochromatin dynamics is thought to be instrumental in allowing the recycling of expression for genes from the same wave during all stages of fungal biotrophy.

Results

Biological and RNA samples representing all aspects of the life-cycle of the fungus in interaction with its host

The RNA-Seq experiment was designed to generate samples corresponding to all stages of the interaction of *L. maculans* with its host plant, either alive (**Fig 1E-C**) or dead (stem residues after harvest; **Fig 1D**), in controlled conditions or in field experiments under natural inoculum pressure, over periods of time ranging from a few days to months or years (**Fig 1**; For a detailed description of biological samples, see the M&M section). As a reference, we included a series of samples grown in axenic conditions promoting a particular fungal developmental stage (mycelium growth, pycnidium differentiation, pseudothecium differentiation, resting conidia, conidial germination) (**Fig 1E**), to distinguish between these fundamental biological processes and those specific to interaction with the plant. In total, 102 biological samples, corresponding to 37 different sets of conditions, were subjected to RNA-Seq. Several quality control checks and parameter optimization were required before this heterogeneous dataset could be subjected to statistical analyses. *In fine*, 32 sets of conditions were retained for statistical analyses, whereas five sets of conditions were excluded because too few fungal reads were available (**S1 Text, S1 and S2 Tables**).

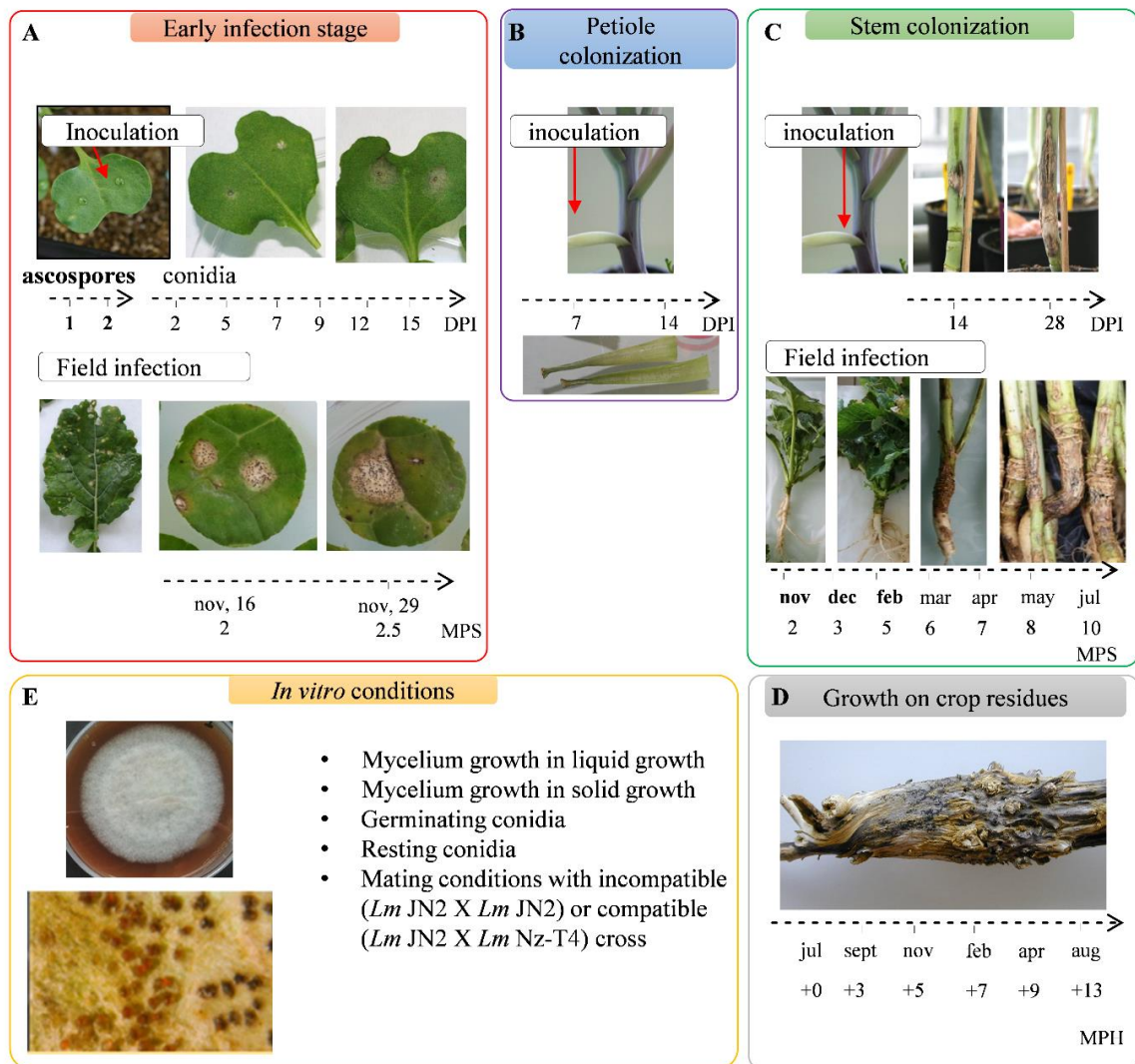


Fig 1. Conditions and samples used for the RNA-Seq study of the *Leptosphaeria maculans* life cycle.

Time-course studies are represented by an arrow and the sampling time points are indicated. (A) RNA was extracted from cotyledons infected with ascospores one or two days post inoculation (DPI). Another time-course study was conducted by inoculation with conidia, with RNA extraction at six time points, from 2 to 15 DPI. Young leaves from naturally infected fields were sampled 2 or 2.5 months post sowing (MPS). (B) Petiole colonization was achieved on petioles inoculated in controlled conditions, with RNA extraction at 7 and 14 DPI. (C) Stem colonization samples were obtained in controlled conditions, at 14 and 28 DPI. Stem base samples from naturally infected fields were collected and used for RNA extraction every two to three months over an entire growing season. (D) Leftover stem residues were sampled every two to three months for one year after harvest (dates expressed in months post harvest, MPH). (E) We used 10 sets of *in vitro* growth conditions, based on two different media (liquid or solid) and corresponding to different physiological states (mycelium, sporulation, germinating and resting conidia, *in vitro* crossing conditions). The samples highlighted in bold did not provide enough fungal RNA-Seq reads for statistical analysis.

Quality control analyses highlight the consistency of the RNA-Seq dataset

Clustering based on pairwise Pearson's correlation analyses of the 32 sets of conditions identified four groups of clustered conditions (**Fig 2**). In each of these four groups, principal component analysis (PCA) showed a low level of variation between biological replicates, except for a few field samples and *in vitro* crosses (**S2 Text, S1A-D Fig**). The four clusters (**Fig 2**) corresponded to: (i) the early infection stage on cotyledons and leaves and colonization of the petiole (group 2), (ii) the late infection stage on stems (group 1), (iii) the saprophytic lifestyle (group 3), in controlled conditions or in the field, and (iv) all the *in vitro* growth conditions promoting the differentiation of pseudothecia and/or pycnidia (group 4).

Within each group, lifestyle provided a second level of sample discrimination, with samples from biotrophic or endophytic stages distinguished from necrotrophic-stage samples (**Fig 2**). For example, within group 2, samples displaying necrotrophic behavior on petioles 14 days post infection (DPI) were more closely related to the necrotrophic samples collected from cotyledons 12 and 15 DPI than to the corresponding biotrophic samples (petioles 7 DPI) (**Fig 2**). Similarly, in group 1, the residues collected immediately after harvest grouped with the last samples collected from the stem base, even though the residues did not originate from the same growing season, or from the same rapeseed variety, suggesting that the transition from stem necrosis to saprophytic life takes place after harvest (**Fig 2**).

Some axenic growth conditions were also grouped with some *in planta* conditions. Within group 2, germinating conidia grouped with the earliest samples collected from cotyledons, consistent with the use of conidia to inoculate plant tissues in controlled conditions (**Fig 2**). Samples grown in axenic culture on solid V8 medium under conditions promoting mycelial growth over sporulation clustered within group 3, indicating that mycelial growth is a major component of the saprophytic lifestyle in the wild. By contrast, mycelium grown in static liquid

medium grouped with all conditions in which the fungus colonized stem tissues, possibly reflecting growth under low-oxygen conditions in plant vessels or intercellular spaces.

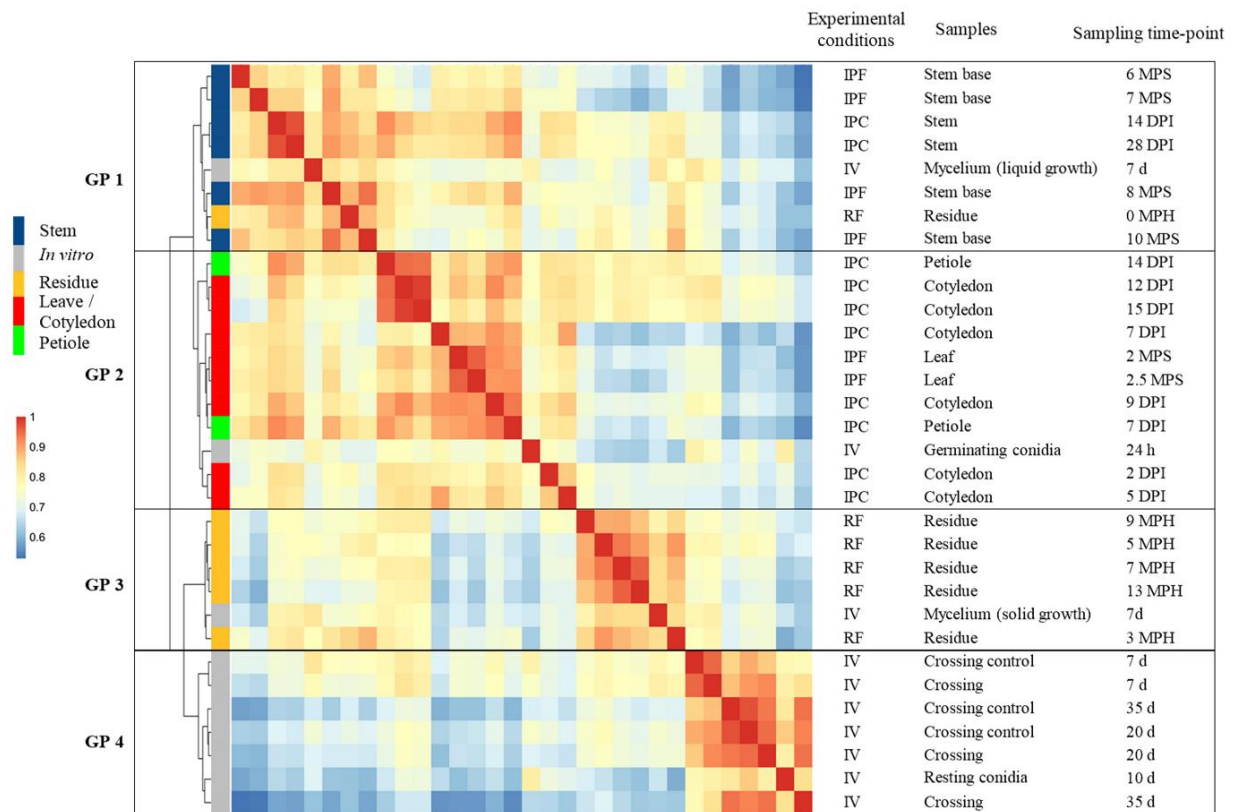


Fig 2. Hierarchical clustering of *Leptosphaeria maculans* gene expression in 32 conditions representing the fungal life cycle.

Each gene with an FPKM count > 2 in at least one set of conditions was retained for the correlation analysis. A pairwise Pearson's correlation analysis was performed between the 32 sets of conditions on $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$ values. The resulting Pearson's correlation matrix was subjected to hierarchical clustering (represented by the tree) with the ward.D2 method. The Pearson's correlation results are shown on a color scale. Four groups of clustered samples were identified (GP1 to GP4). The experimental conditions are indicated as IPF, *in planta* field conditions; IPC, *in planta* controlled conditions; IV, *in vitro* conditions and RF, residues in field conditions. The infected plant tissues collected or the conditions under which the *in vitro* samples were obtained are detailed, together with the corresponding time points for sampling (DPI, days post-inoculation; MPS, months post-sowing; MPH, months post-harvest; d, days; h, hours).

Analytical strategy for identifying genes involved in pathogen-plant interactions

For the identification of fungal genes specifically involved in at least one stage of the pathogen-plant interaction, we used the 10 sets of *in vitro* growth conditions as 10 sets of control conditions, to exclude all genes involved in basic fungal metabolism or life traits other than those associated with plant infection (**Fig 3**). Using very stringent criteria ($\text{LogFC} > 4$; p value < 0.01), we focused on genes specifically overexpressed *in planta* relative to *in vitro* control conditions. We analyzed the expression patterns of these genes, their functional annotation, their genomic localization, and their location with respect to histone modifications during axenic growth. We then focused on genes encoding SSPs from the new repertoire generated in this study (**S3 Text**). Finally, the expression profiles of co-expressed SSP genes were used as a template for the identification of waves of genes displaying a high level of co-regulation (R -squared > 0.80) exemplifying specific pathogenic strategies (**Fig 3**).

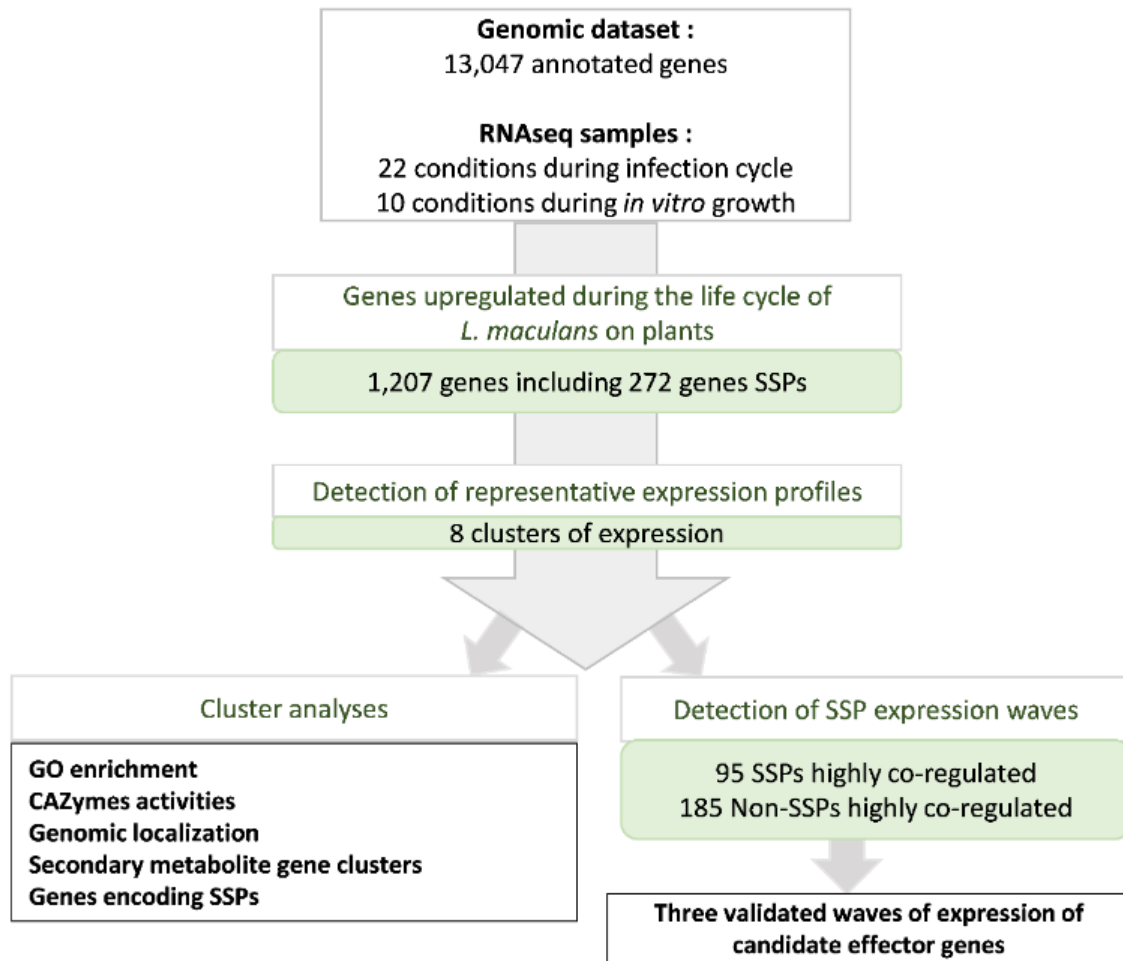


Fig 3. Pipeline used to describe *Leptosphaeria maculans* genes overexpressed in at least one condition *in planta*.

We found that 1,207 of the 13,047 annotated genes were overexpressed in at least one of the 22 sets of conditions *in planta* relative to the 10 sets of *in vitro* conditions. These genes included 272 predicted to encode small secreted proteins (SSPs). We analyzed the set of 1,207 genes to identify the major expression profiles by gene expression clustering. We defined eight expression clusters (clusters 1 to 8). For each cluster, we analyzed expression patterns, functional enrichment, and the genomic localization of the genes. For the specific detection of highly coregulated waves of SSPs, we performed a linear regression analysis of the mean expression value for each SSP subset present in each cluster against the expression of all 13,047 genes. This analysis identified 95 SSP genes and 185 non-SSP genes as highly coregulated genes.

Genes overexpressed during interaction with the plant define eight biologically relevant expression clusters

Relative to axenic growth conditions, 1207 genes were found to be overexpressed in at least one set of conditions *in planta*; thus, 9.2% of *L. maculans* genes are specifically mobilized during the interaction of the fungus with its host, alive or dead. Eight expression profiles were identified, referred to hereafter as clusters 1 to 8, defining a complex landscape of expression profiles (**Fig 4**). We analyzed the enrichment of each cluster in GO terms, focusing on CAZymes (Carbohydrate-active enzymes) associated with degradation activities, to identify the functions and pathways associated with each expression profile (**S2-S5 Fig**).

Clusters 1, 2 and 3 included genes expressed sequentially during cotyledon infection and were representative of three consecutive stages occurring during the two-week period of cotyledon colonization by *L. maculans*. Cluster 1 encompassed 97 genes highly expressed at the first stages of cotyledon infection, when the conidia germinate and the hyphae penetrate the wounded plant tissues (2-5 DPI). It was enriched in GO terms corresponding to carbohydrate metabolic processes ($p = 1 \times 10^{-2}$) and catalytic activities ($p = 1 \times 10^{-3}$), including peptidase and hydrolase activities (all $p \leq 1 \times 10^{-2}$). An enrichment in cutinase activity ($p = 1 \times 10^{-2}$), specific to this cluster, was also observed (**S2-S3, S5 Figs**).

The 148 genes of cluster 2 displayed peaks of expression during all stages of asymptomatic growth within plant tissues (cotyledon colonization 5-9 DPI, first stage of petiole colonization, first two dates of stem colonization in the field). The genes of this cluster were annotated with few GO terms or functions, but were strongly enriched in SSP genes ($p = 2 \times 10^{-16}$; **S3 Fig**). Cluster 3 encompassed 87 genes highly expressed during the necrotrophic stage on both cotyledons (9-15 DPI) and petioles, but not during the necrotrophic stem canker stage in the field. This cluster was enriched in carboxylic ester hydrolase activities ($p = 3 \times 10^{-3}$) suggesting a role in degradation activities specifically targeting the plant cell wall.

Cluster 4 encompassed 238 genes highly expressed during the shift from biotrophy to necrotrophy in cotyledons (7-9 DPI) and in stem bases infected in the field (7-8 months post-sowing, 'MPS'). This cluster displayed the strongest enrichment in catalytic processes ($p = 2 \times 10^{-10}$) and hydrolase activities ($p = 1 \times 10^{-12}$), and a specific enrichment in proteolysis processes ($p = 2 \times 10^{-2}$; **S3 Fig**). It also displayed the largest number of CAZymes (63 genes; **S5 Fig**) targeting different substrates, mostly plant cell-wall components, such as pectin, arabinose and galactan (**S5 Fig**).

Two clusters (cluster 5 and 6) displayed an increase in expression late in stem infection, but differed in terms of the timing of expression and the functions involved. Cluster 5 contained 128 genes highly expressed during the asymptomatic colonization of stems in the field (at 7-8 MPS) and on residues immediately after harvest. It was enriched in catalytic activities ($p = 1 \times 10^{-3}$), mostly linked to saccharide degradation, suggesting involvement in activities relating to the uptake of sugar resources (carbon-oxygen lyase activity acting on polysaccharides; hydrolase activity; cellulose binding; **S3 Fig**). Cluster 6 contained 141 genes highly expressed during colonization of the stem base in the field, with maximal expression at 10 MPS, corresponding to the time at which stem canker develops. This cluster was enriched in catalytic activities ($p = 2 \times 10^{-4}$) but was also linked to cofactor binding ($p = 3 \times 10^{-6}$), monooxygenase ($p = 1 \times 10^{-2}$), and oxidoreduction activities ($p = 5 \times 10^{-5}$), involved in detoxification processes (**S3 and S4 Figs**). The higher proportion of xylanase genes in cluster 6 than in cluster 5 (**S5 Fig**) suggests a change in the mode of nutrition during the necrotrophic stage on stems.

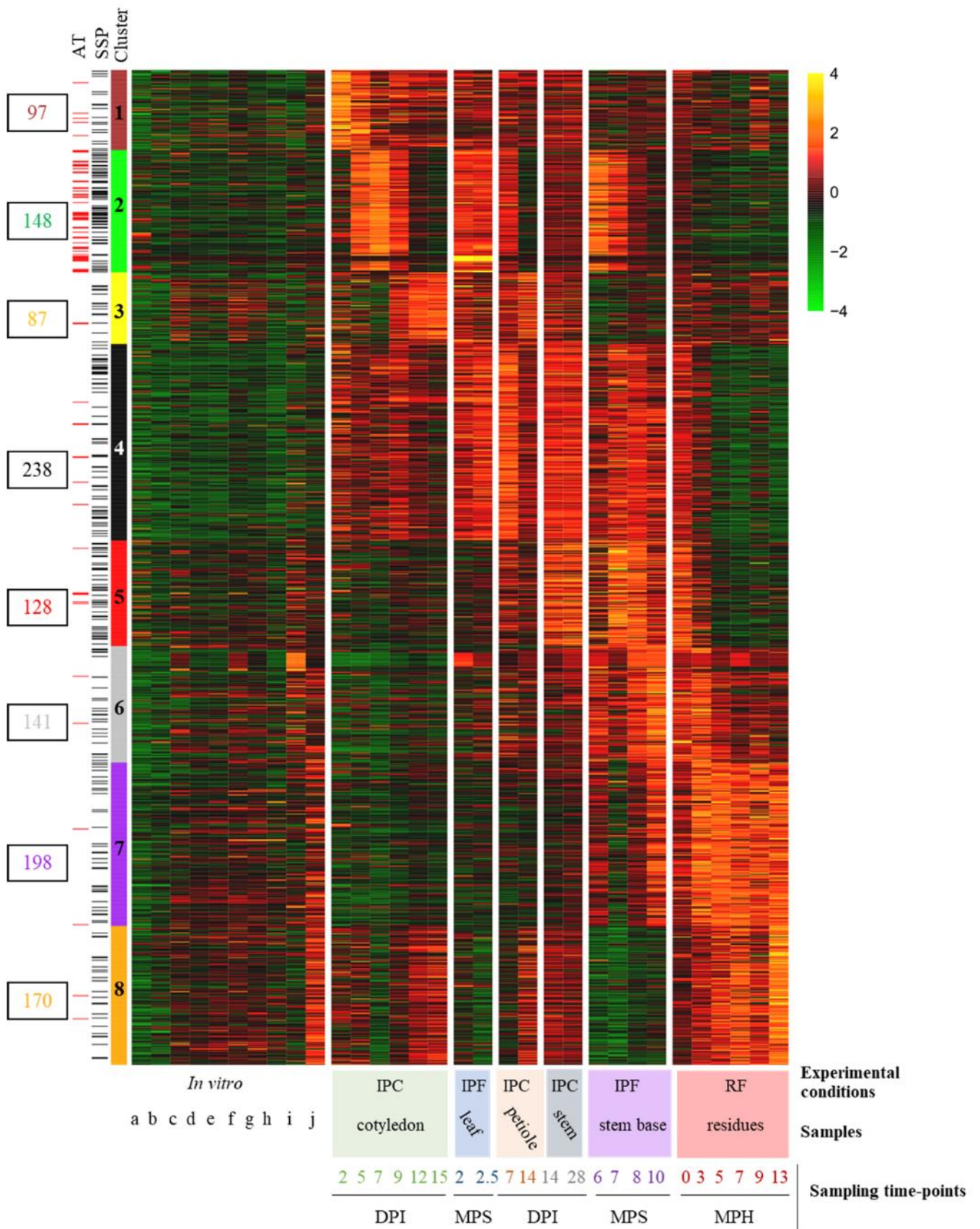


Fig 4. Heatmap obtained by clustering the 1,207 *Leptosphaeria maculans* genes upregulated in planta.

For each set of conditions, we calculated the mean FPKM value of the replicates, which we then subjected to Log_2 transformation and scaling. The self-organizing map method was used on the $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$ values, to define eight expression clusters (clusters 1 to 8) for the 1,207 genes. The level of expression ranged from 4 (yellow) to -4 (green). Genes located in AT-rich regions (AT) or encoding small secreted proteins (SSPs) are indicated by red and black lines, respectively, on the left. The conditions are described in the legend to the x axis of the heatmap. Three sample features are described (i) the experimental conditions: IPF, *in planta* field conditions; IPC, *in planta* controlled conditions; RF, residues in field conditions, (ii) the type of plant tissue sampled and (iii) the sampling time points (DPI, days post inoculation; MPS, months post sowing; MPH, months post harvest). The ten sets of *in vitro* conditions are ordered as follows: conidia (a. non-germinating, b. germinating); incompatible mating conditions (c. JN2 x JN2 7days (d), d. JN2 x JN2 20d, e. JN2 x JN2 35d); compatible mating conditions (f. JN2 x Nz-T4 7d, g. JN2 x Nz4 20d, h. JN2 x Nz-T4 35d); mycelial growth (i. in liquid medium, j. on solid medium).

Finally, clusters 7 and 8 were specific to saprophytic behavior on stem residues. The 198 genes in cluster 7 showed displayed an increase in expression from the last sampling on necrotic stems until the last sampling on stem residues one year after harvest. This cluster was enriched in genes relating to mono-oxygenase activities ($p = 1 \times 10^{-4}$) and contained the largest number of genes encoding LPMOs (lytic polysaccharide monooxygenases), cellulases and xylanases. Cluster 8 encompassed 170 genes specifically expressed during all stages occurring on senescent or dead plant tissue, with the highest levels of expression during saprophytic growth on residues. It was also enriched in oxidoreductase processes ($p = 1 \times 10^{-3}$), in response to oxidative stresses and oxidant detoxification associated with an enrichment in catalase ($p = 1 \times 10^{-3}$) and peroxidase ($p = 3 \times 10^{-3}$).

The different clusters of gene expression thus can be designated as follows: “Penetration and establishment” (cluster 1), “Biotrophy” (cluster 2), “Cotyledon and petiole necrotrophy” (cluster 3), “Biotrophy to necrotrophy transition” (cluster 4), “Stem biotrophy” (cluster 5), “Stem necrotrophy” (cluster 6), “Stem canker and saprophytism” (cluster 7) and “Saprophytism” (cluster 8).

Contribution of candidate pathogenicity genes to fungal life in interaction with the plant

1- Genes involved in fungal pathogenicity in other fungal species.

Several genes previously shown to be involved in fungal pathogenicity were found in one of the eight expression clusters, and were mostly associated with biotrophic stages of the interaction. One RALF (rapid alkalization factor) gene known to favor fungal infection [39] was identified in cluster 1 (Lmb_jn3_05329). Two of the six salicylate hydroxylase genes, known to compromise plant salicylic acid signaling in other models [40], were found in clusters 1 (Lmb_jn3_12582) and 2 (Lmb_jn3_11892). Three of the four LysM-domain containing genes of the genome, known to protect chitin from degradation by plant enzymes or to scavenge chitin oligomers [41], were found in clusters 2 (two genes, Lmb_jn3_00461, Lmb_jn3_10047) and 6 (one gene, Lmb_jn3_04300). Three isochorismatase genes (Lmb_jn3_11641, Lmb_jn3_10045, Lmb_jn3_06552), interfering with plant salicylate and jasmonate defense signaling in other phytopathogens, were present in clusters 1, 4 and 6, respectively. Finally, one of the two genes encoding NEP (necrosis and ethylene-inducing protein), frequently associated with necrotrophic behavior [42], was found to be overexpressed *in planta*, and belonged to cluster 4 (Lmb_jn3_10035).

2- Secondary metabolite gene clusters.

The genome of *L. maculans* contains 22 genes predicted by SMURF tools to encode secondary metabolite enzymes (SM) and annotated as “polyketide synthase” (PKS, 11) “non-ribosomal peptide synthetase” (NRPS, 5), or “others” (dimethylallyltryptophan synthase, 1; NRPS-like, 4; PKS-like, 1). Seven of the 1207 genes in the eight expression clusters encoded SM enzymes from the PKS or NRPS family. Four of these genes were highly expressed during necrotrophic stages of the life-cycle within the stem (cluster 6), whereas the other three were associated with clusters 2, 4 and 5 (**S3 Table**).

Among the SM genes analyzed in previous studies [27,43-44], the PKS gene involved in abscisic acid (ABA) synthesis was linked to biotrophic behavior (cluster 2), whereas genes involved in the synthesis of the toxins sirodesmin PL and phomenoic acid were associated with stem necrotrophy, together with one other PKS and one NRPS-like gene (cluster 6) (**S3 Table**). Secondary metabolite enzymes encode an SM backbone that may be modified by tailoring enzymes, forming complex secondary metabolite gene clusters (SMGC). Here, only three of the seven SM enzyme genes overexpressed *in planta* showed co-regulation with all or part of surrounding genes of their SMGC: (i) the PKS responsible for ABA production (all genes of the ABA SMGC being included in cluster 2), (ii) the NRPS responsible for sirodesmin PL production (16 of the 25 genes of the SMGC included in cluster 6), and (iii) an unknown NRPS-like gene, co-expressed with nine other surrounding genes also included in cluster 6 (**S6 Fig**).

3- Genes involved in *L. maculans* pathogenicity.

Thirty-six of the 52 genes previously identified as candidate pathogenicity genes in *L. maculans* (**S4 Table**) did not belong to the SM or avirulence effector gene (see below) categories. Fifteen of these genes were identified within a single cluster (**S4 Table**): cluster 1 (2 genes), cluster 2 (5 genes), cluster 3 (1 gene), cluster 4 (4 genes), cluster 5 (2 genes) or cluster 7 (1 gene). Nine had previously been selected as putative pathogenicity genes on the basis of their overexpression during infection, for inactivation with CRISP-cas9, but the inactivation of these genes individually resulted in no visible pathogenicity defect at the cotyledon stage [45] (**S4 Table**). Only one gene, encoding a 3-ketoacyl-thiolase (cluster 1), was shown to be involved in pathogenicity, but the mutant also displayed impaired *in vitro* growth and germination [28] (**S4 Table**). The other five genes have not been validated by functional approaches and are, thus, still considered to be candidate pathogenicity-related genes. Four of these genes (three GH genes and one ABC transporter) were included in the late expression clusters 4, 5 and 7, suggesting that they may be *bona fide* pathogenicity genes (**S4 Table**).

By contrast, another 21 putative pathogenicity genes did not belong to any of the expression clusters. Nineteen had previously been analyzed in functional studies (knockout or silenced mutants), and 10 were shown to induce a loss or reduction of pathogenicity following inactivation (**S4 Table**). However, the inactivation of six of these genes also induced defects in growth, sporulation or germination [30,33,36,45-46], suggesting a general effect on different stages of the fungal life-cycle with no specific overexpression during interactions with the plant.

4- Validated or candidate SSP effectors of *L. maculans*.

SSPs have been identified in *L. maculans* and were classified as “early” effectors (including all known avirulence proteins, inducing an avirulence phenotype when matching the corresponding resistance genes) or “late” candidate effectors by Gervais et al. [14]. The role of avirulence proteins as effectors suppressing plant defense responses or increasing/decreasing the size of cotyledon lesions has been investigated in a few cases following comparisons of near-isogenic *L. maculans* isolates, gene silencing or complementation (**S4 Table**, [21-22,47-48]). The most recently published version of the genome assembly of *L. maculans* isolate JN3 ([49]; **S4 Text**) included a number of major changes. We therefore produced a new repertoire of genes encoding putative SSPs, encompassing 1,070 genes (8.2% of the entire *L. maculans* gene set) (**S3 Text, S7 Fig, S5 and S6 Tables**).

All expression clusters displayed a significant enrichment in genes encoding SSPs (**S3 Fig**). We found that 272 of the 1207 genes upregulated during the *L. maculans* interaction with *B. napus* (22.5%) encoded SSPs. This enrichment was limited in clusters 1, 3, 6, 7 and 8, which contained only 14-17% of SSP-encoding genes ($0.013 < p < 3.10^{-5}$), but three other clusters displayed a much higher level of enrichment in genes encoding SSPs: cluster 4 (23.1%, $p = 7 \times 10^{-16}$), cluster 5 (31.2%, $p = 2 \times 10^{-16}$) and cluster 2 (45.3%, $p = 2 \times 10^{-16}$). Interestingly, both clusters 2 and 5 are associated with biotrophic behavior of the fungus. All the currently known *AvrLm* genes belonged to the “Biotrophy” cluster (cluster 2) (**S4 Table**). This cluster displayed

sequential rounds of overexpression/repression, with three peaks of overexpression occurring during the three biotrophic stages (5-9 DPI on cotyledons, leaf infection in the field; 7 DPI on petioles; 6-7 MPS in field plant stems) (**Fig 5; S8 Fig**).

The ten “late” effectors, expressed during stem colonization in controlled conditions [14] were scattered over four different clusters (3, 4, 5, 6), along with a series of other genes encoding SSPs (cluster 3, 14 SSPs; cluster 4, 55 SSPs; cluster 5, 40 SSPs and cluster 6, 22 SSPs) (**Fig 5**). The “late” effectors in clusters 5 and 6 were specific to stem colonization (and the first stages of saprotrophy on residues), but those in clusters 3 and 4 were also expressed during cotyledon infection. These “late” effector candidates were associated with either biotrophic behavior on stems (cluster 5) or necrotrophic behavior on cotyledons and stems (clusters 3 and 6).

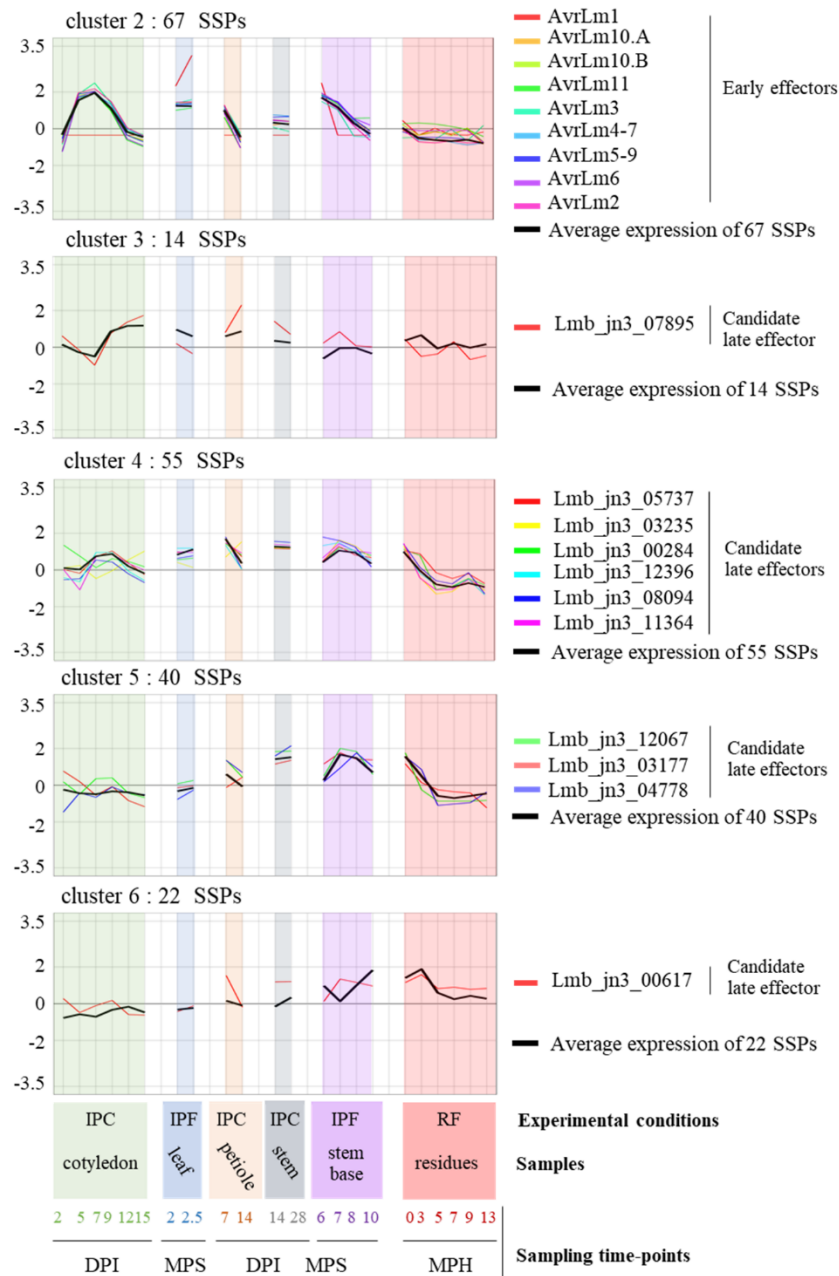


Fig 5. Expression of known and putative effectors of *Leptosphaeria maculans* within the eight expression clusters.

The scaled $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ expression values for the nine avirulence effector (*AvrLm*) genes, and the eleven candidate late effector genes shown to be upregulated in at least one set of conditions *in planta* are represented and grouped according to cluster assignment. The mean scaled $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ values of all the small secreted protein (SSP) genes in each cluster are indicated (black bold curve). The total number of SSP genes in each cluster is indicated. The conditions are described in the legend to the *x* axis. Three sample features are described: (i) the experimental conditions: IPF, *in planta* field conditions; IPC, *in planta* controlled conditions; RF, residues in field conditions. (ii) the type of plant tissue sampled and (iii) the sampling time points (DPI, days post inoculation; MPS, months post sowing; MPH, months post harvest).

Clusters 1, 7 and 8, were also found to be enriched in genes encoding SSPs (p value $< 5 \times 10^{-3}$). They contained 16, 33 and 24 SSP genes, respectively. Candidate effectors may, therefore, be mobilized very early in colonization (cluster 1) and during saprophytic life (clusters 7 and 8) (**S8 Fig**).

Additional RNA-Seq samples (ascospores germinating on unwounded cotyledons 24 and 48 hours post inoculation; stem base samples 2, 3 and 5 MPS) were available. They provided too few *L. maculans* reads for statistical analyses, but these samples allowed us to confirm that genes belonging to cluster 2, and “early” effector genes in particular, were among the genes most strongly expressed both during ascospore germination on cotyledons and very early stages of stem colonization in winter (**S5 Text, S7 Table**).

Histone methylation associated with gene regulation

All cloned avirulence genes of *L. maculans* identified to date are associated with H3K9me3. Furthermore, H3K9me3 and H3K27me3 domains are significantly enriched in genes encoding effectors, regardless of their expression [38]. During axenic culture, 7,373 *L. maculans* genes are associated with H3K4me2, 104 with H3K9me3, 2,020 with H3K27me3 and 101 with the two heterochromatin histone modifications [38]. We combined the genome-wide histone maps previously generated *in vitro* with our analysis of gene expression during infection, to determine whether (i) all genes, (ii) only (putative) effector genes, or (iii) only certain subsets of genes upregulated *in planta* were associated with a particular chromatin landscape. H3K4me2-domains encompass 56% of *L. maculans* genes, but only 20% of the genes upregulated *in planta* were associated with H3K4me2 (X^2 test=662; $p < 2 \times 10^{-16}$). By contrast, the genes upregulated *in planta* were significantly enriched in genes located in an H3K27me3 domain, as 44% of the upregulated genes were located in such a domain (X^2 test = 749, $p < 2 \times 10^{-16}$). Strikingly, only 205 genes were located in H3K9me3 or H3K27me3 domains *in vitro*, but 85 of these genes were upregulated *in planta*. Thus, regardless of the wave of

expression concerned, the genes upregulated *in planta* were enriched in genes associated with heterochromatin *in vitro*. Only cluster 2 was significantly enriched in genes associated with the H3K9me3 histone modification (**Fig 6**). Interestingly, all clusters of genes upregulated *in planta* relative to axenic culture were enriched in H3K27me3-associated genes *in vitro*, whereas these clusters contained significantly fewer genes located in H3K4me2-domains *in vitro* than the rest of the genome (**Fig 6**). The integration of RNA-seq and ChIP-seq data revealed that the genes upregulated *in planta* were not randomly located in the genome of *L. maculans*, with H3K4me2-domains significantly depleted of genes upregulated during rapeseed infection, and both types of heterochromatin domains significantly enriched in such genes.

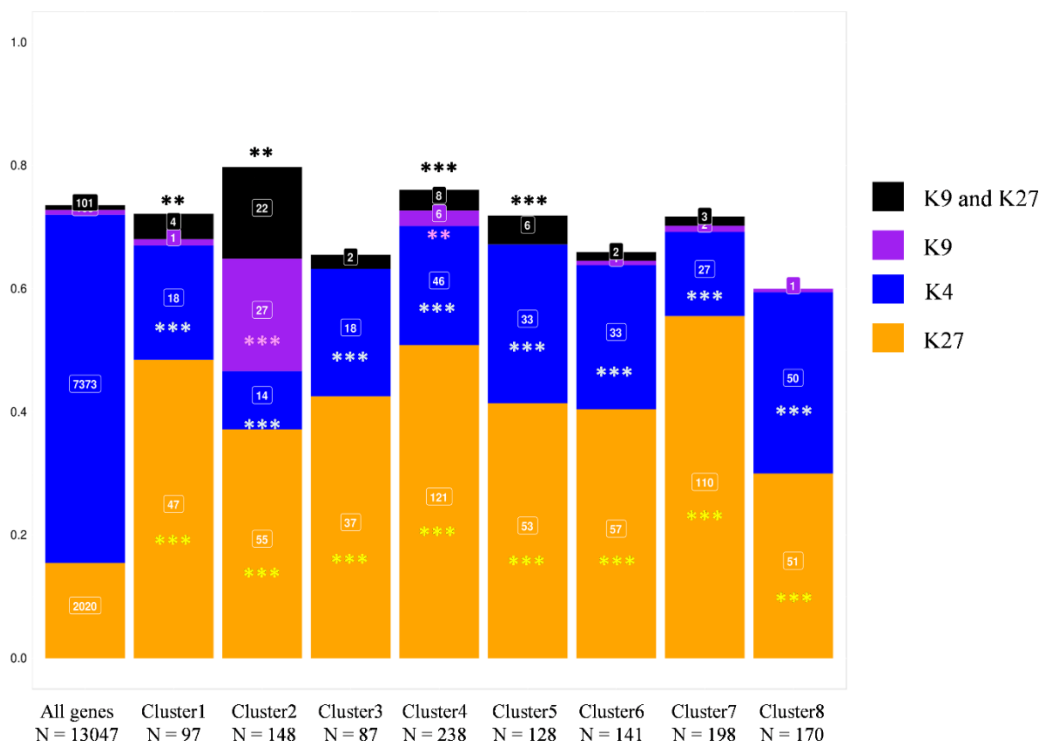


Fig 6. Association of *Leptosphaeria maculans* genes upregulated *in planta* with the histone modification marks.

The genome-wide histone map was generated by ChIP-seq analysis during axenic growth [38]. The proportion of genes associated with any of the histone modifications H3K4me2, H3K9me3 and H3K27me3 throughout the entire genome was used as a reference set for detecting the over- or under-representation of specific methylation marks in the eight gene clusters overexpressed *in planta*, in chi-squared tests (***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$). K4, H3K4me2; K9, H3K9me3; K27, H3K27me3.

The co-expression of effector genes defines waves of co-regulated gene expression.

Almost all the expression clusters were enriched in genes encoding SSPs. However within each cluster, the genes encoding SSPs could have different expression profiles, due to the clustering method (**S8 Fig**). We aimed here to increase the robustness of the detection of SSP expression waves. We defined eight SSP reference expression profiles by calculating the mean levels of expression for SSP genes within the eight clusters. We selected genes displaying significant co-regulation (SSP and non-SSP genes), by analyzing the linear regression between the expression patterns of the entire set of 13,047 genes and that of each SSP reference expression profile. Genes significantly co-expressed with the reference expression wave tested ($R^2 > 0.80$, $p < 0.05$) were included in the new SSP expression waves and were considered to be “highly coregulated genes”.

For clusters 1, 3, and 8, no highly coregulated genes could be identified (**Fig. 7**). For the other five clusters, waves of highly coregulated genes were identified, each containing five to 39 highly coregulated SSP genes (including 90 SSP genes from the 178 previously assigned to these clusters), together with 186 highly coregulated genes encoding other types of proteins (**Fig 7**). Two waves of expression, corresponding to clusters 5 and 6, displayed coregulation of a limited number of SSP genes (seven and five, respectively, i.e. 17% of the SSP genes of these clusters), together with 20 and 25 genes encoding other proteins, respectively. However, only 15 (cluster 5) and 13 (cluster 6) of these genes belonged to the clusters (**Fig 7**), suggesting that additional coregulated genes are either expressed in axenic conditions, or do not display specific regulation during plant infection. For clusters 2, 4 and 7, a higher proportion of highly coregulated SSP genes was found, with 58% (exact confidence interval [45-70%]), 34% ([22-48%]) and 63% ([45-79%]) of the SSP genes of the clusters retained in the waves of highly coregulated genes, respectively (**Fig 7**).

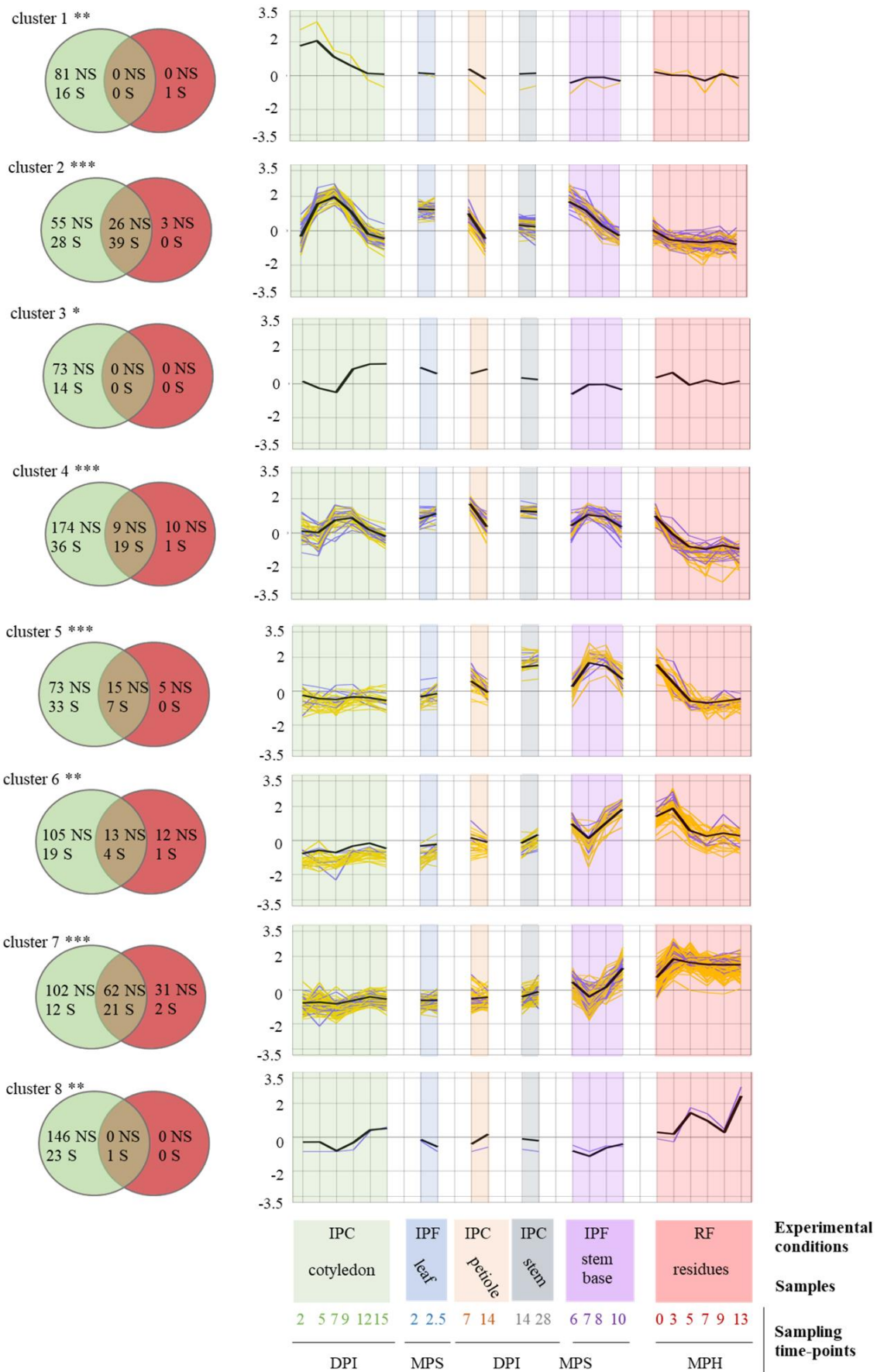


Fig 7. Identification of highly coregulated *Leptosphaeria maculans* genes based on mean SSP gene expression *in planta*.

The mean scaled $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ values for small secreted protein (SSP) genes in each cluster (cluster 1 to 8) was used to create the eight reference expression profiles (black bold curve). The 22 sets of biological conditions used to average SSP gene expression are described in the legend to the x axis. Three sample features are described: (i) the experimental conditions: IPF, *in planta* field conditions; IPC, *in planta* controlled conditions; RF, residues in field conditions (ii) the type of plant tissue sampled and (iii) the sampling time points (DPI, days post inoculation; MPS, months post sowing; MPH, months post harvest). A linear regression analysis was performed to determine the correlation between the scaled $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ value for the whole set of genes in the 22 sets of conditions and these eight reference expression profiles. A gene was considered to be highly correlated if its expression fitted the reference expression profile with an R-squared value > 0.80 and a corrected p -value < 0.05 . The expression values of the resulting highly correlated gene subsets (SSP in blue and non-SSP in yellow) are plotted. The Venn diagrams show the number of genes (S: SSP, NS: Non-SSP) present in each cluster (green circles) and the number of genes identified as highly correlated with the corresponding expression profile (red circles). The asterisks indicate the significance of the SSP enrichment in the initial cluster (***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$).

Thus, clusters 2 and 7 displayed the highest proportion of highly coregulated SSP genes, suggesting that the regulation of expression is much tighter in these two clusters than in the others. The highly coregulated genes in the “Biotrophy” wave (contained in cluster 2) included 39 SSPs, 23 (59%) of which displayed no sequence matches to the NCBI nr protein database (**S8 Table**) and could be considered *L. maculans*–specific effectors. These genes also included other genes mentioned above, such as the genes of the ABA cluster, providing additional support for their role in the biotrophic parts of the interaction. The highly coregulated genes in the “Stem canker and necrotrophy” wave included most of the SSP genes of the cluster, but only two of these genes (9.5%) were specific to *L. maculans*. This wave also included a large number of genes (24) encoding CAZymes.

Discussion

In this paper, we used large-scale transcriptomic analyses to decipher the complex life cycle of a phytopathogenic fungus, to identify genes paramount for its interactions with the host plant and to shed light on the underlying regulatory mechanisms. In particular, given that many

parts of the *L. maculans* life cycle remain poorly described, we focused on how the fungus copes with its different lifestyles, their timing and the transitions between them, and the regulation of gene expression throughout the long pathogenic/saprophytic life of the fungus. We generated RNA-Seq data for biological samples corresponding to the main relevant stages of infection in controlled conditions or in field conditions, and at different time scales (from days to years). Using this large dataset, we then focused on sets of genes mobilized exclusively when the fungus interacts with the plant. We used 10 different sets of axenic growth conditions promoting different aspects of the fungal life-cycle (e.g. vegetative growth, asexual sporulation, sexual reproduction) as basic expression features for the identification of pathogenicity genes *per se*, contrasting with the common practice of using only a few axenic conditions as controls [7,13-14] or performing pairwise comparisons of the infection time course [11]. We dealt with the variable number of fungal reads between samples and the diverse *in vitro* conditions, by applying very stringent conditions to determine whether a gene was specifically overexpressed ($\text{LogFC} > 4$, $p < 0.01$). With these criteria, we showed that 1,207 genes (less than 10% of the genes of the fungal genome) were overexpressed during interactions with the living or dead plant relative to axenic conditions. These genes may be considered the maximal set of genes mobilized by the fungus to infect the plant without involvement in basal biological processes. These 1,207 upregulated genes were consistently grouped into eight expression profiles, some of which displayed strong coregulation of a number of the genes within the cluster. The sequential expression profiles are consistent with the associated pathogenicity functions, confirming the relevance of this RNA-Seq study performed over a large timescale.

Transcriptome-based description of a complex fungal lifecycle

Our RNA-Seq data highlighted and strengthened our knowledge of the biology of the fungus all along its life-cycle, including for “obscure parts” of this cycle, as follows (**Fig. 8**) :

(i) Ascospores, which are difficult to generate for pathogenicity tests in controlled conditions, are known to be the main source of infection in the field, germinating within a few hours to produce a hypha that penetrates leaf tissues via stomata or wounds [50]. We found that germinating hyphae very rapidly (2 DPI) produced “early” effectors (including known AvrLm effectors), detected only 5-7 DPI as a massive peak of expression when inoculations were performed with conidia ([11,13-14], this study). This result is consistent with microscopy-assisted RNA-Seq analyses in other models, which have suggested that a few hyphal tips produce early effectors to counter the initial defense reactions of the plant upon contact [4,51]. This suggests that, like other plant-associated fungi, *L. maculans* manipulates the plant as soon as it enters the tissues, to initiate its own growth within plant tissues, without causing symptoms.

(ii) Following the infection of leaves or cotyledons and primary leaf spots development, the hyphae grow within the intercellular spaces within tissues in advance of the leaf spots towards and within the petiole and then enter the stem tissues [52-54]. Our RNA-Seq data highlight the kinetics of this process and the lifestyle transitions occurring during cotyledon infection, with three successive waves of gene expression related to different stages of infection (penetration, biotrophy, and necrotrophy). Consistent with the biological data, the pattern of gene expression during petiole colonization was similar to that in cotyledons, with a symptomless stage during which the same set of genes was mobilized in cotyledons or petioles (**Fig 8**).

(iii) We also found that isolates infecting leaves in the field had a pattern of gene expression similar to that of a reference isolate used to inoculate cotyledons in controlled conditions at 7 and 9 DPI, demonstrating that infections reproduced with routine protocols in controlled conditions can accurately mimic some stages of field infection.

(iv) The monitoring of stem samples for a full year in field conditions provided new information about the dynamics of stem colonization and necrosis in the field. We found that

the fungus was present very early in the stem base tissues, with fungal reads detectable as early as December, as little as one to two months after the initial leaf infection. However, levels of fungal transcriptomic activity remained very low between December and February, and it was only at the end of winter (from March on) that the fungus displayed a quantifiable, steady increase in transcriptomic activity.

(v) Fungal life within stem tissues, over a period of eight months, was characterized by complex patterns of gene expression, with some of the genes concerned expressed exclusively during stem colonization, highlighting the lengthy transition from biotrophy to necrotrophy leading to stem canker (**Fig 8**). The gene expression patterns observed for stem infection at six and seven months post sowing (March-April) were very similar to those observed for biotrophic stem infection in controlled conditions at 14 and 28 DPI, again demonstrating that controlled conditions adequately reproduce at least one stage of stem colonization in the field.

(vi) The fungus has been reported to survive on residues for between two and four years, depending on the climatic conditions [50]. However, we currently know nothing about how *L. maculans* survives as a saprobe on residues. A recent metabarcoding study showed that *L. maculans* was the predominant fungal species on rapeseed residues, on which many other fungal species, including other phytopathogens were also present, highlighting complex interplay between the species [55]. Our RNA-Seq analysis of residues left on the soil for one year confirmed these findings and systematically revealed transcriptomic activity of *L. maculans* on the residues, with a mean of 22% of the total RNA-Seq reads corresponding to *L. maculans* throughout the year, but with seasonal variations.

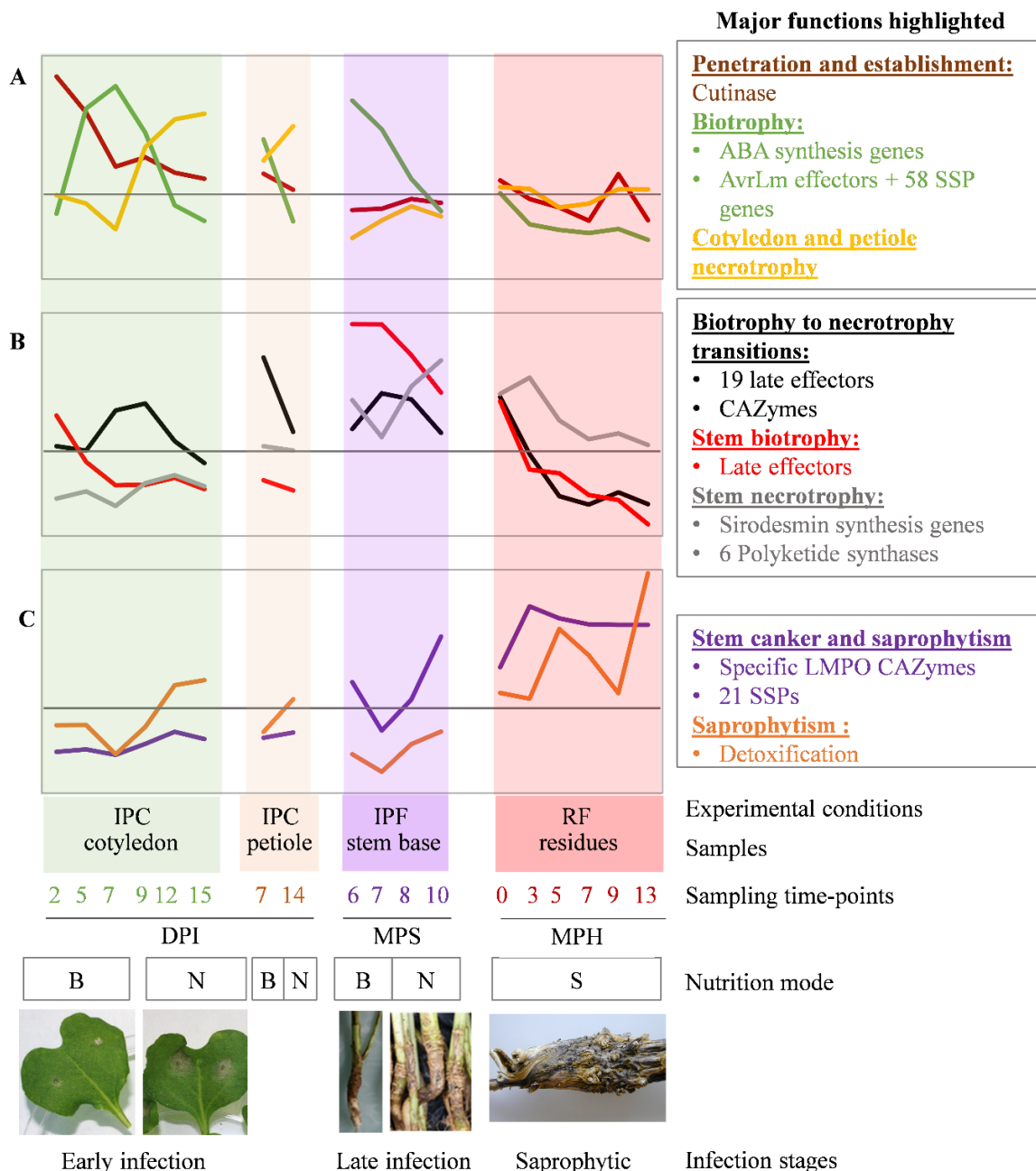


Fig 8: Overview of the eight expression profiles detected during the infection cycle of *Leptosphaeria maculans*.

Each curve represents the mean expression value for the genes making up the eight clusters described in this study. The eight profiles are divided into three different plots, depending on the timing of their major expression peaks: (A) early infection and colonization of cotyledons, (B) late colonization of stems, (C) development on crop residues. The characteristics associated with each sample are indicated: mode of nutrition (B: biotrophy, N: necrotrophy, S: saprotrophy); the experimental conditions: (i) IPF, *in planta* field conditions; IPC, *in planta* controlled conditions; RF, residues in field conditions. (ii) the type of plant tissue sampled and (iii) the sampling time points (DPI, days post inoculation; MPS, months post sowing; MPH, months post harvest). We did not include field-infected leaves and the stem infected in controlled conditions, to prevent redundancy and generate a simplified model. The major gene functions identified in each gene cluster are shown on the right.

Expression profiles and characteristics of genes specifically involved in interaction with the plant

We observed successive or partly overlapping expression profiles, highlighting various life traits or feeding strategies specific to a particular lifestyle or colonized tissue (cluster 1, cluster 2, cluster 4, cluster 8), or with a combination of lifestyle/tissue specificities (cluster 3, cluster 5, cluster 6, cluster 7) (**Fig 8**). For example, necrotrophic behavior is tissue-specific, with genes expressed during cotyledon or petiole necrosis (cluster 3) or in stem tissues at the end of the growing season (cluster 6; **Fig 8**). By contrast, cluster 2 is involved in biotrophic behavior, whatever the tissue colonized.

The set of 1,207 genes specifically expressed during interaction with the plant is strongly enriched in candidate effectors, with enrichment in effectors observed for all expression clusters. As shown for cotyledon infection in other studies [13], and expanded here to other biotrophic or necrotrophic stages of plant infection, biotrophic behavior was associated with enrichment in very few, if any GO terms, whereas biotrophy-necrotrophy transitions were strongly enriched in genes involved in catalytic processes and CAZymes. Strict necrotrophic behavior within stems is associated with an overrepresentation of PKS-encoding genes (including the sirodesmin biosynthesis gene cluster) relative to other necrotrophic clusters.

The fungus expresses a set of 148 genes in all biotrophic/endophytic/asymptomatic stages of colonization (cluster 2). Interestingly, we found that the expression of these genes was up- and down-regulated on multiple occasions during the interaction with the plant. The recycling of the same set of genes for a similar lifestyle highlights the key role played by this set of genes in establishing symptomless growth within the plant, with at least one set of stem-specific genes (cluster 5) also associated with biotrophic behavior, but only during stem colonization. Cluster 2 (and, to a lesser extent, cluster 5) was found to be strongly enriched in genes encoding candidate effectors, which are generally thought to act by compromising plant immunity [15].

One of these candidate effectors, *AvrLm10A*, has been shown to compromise leaf symptom development [23], and two others, *AvrLm4-7* and *AvrLm1*, interfere with SA and ET signaling [47-48]. In addition, cluster 2 includes genes reported in various models to be involved in the suppression of plant defense responses (salicylate hydroxylase or the ABA cluster; [27,56-57]) or the scavenging of chitin oligomers, such as the *LysM* genes [41]. This strongly suggests that cluster 2 plays an important role in hiding the fungus from the plant surveillance machinery, or in compromising or suppressing plant defense responses to various extents.

Our findings suggest that the previous classification of effectors as “early” or “late” [14] is not relevant. “Early” effector genes were found to be expressed on several occasions during symptomless cotyledon infection and colonization, the symptomless colonization of petioles and during at least three months of symptomless growth in the tissues of the stem base. Similarly, the “late” effector genes identified by Gervais et al. [14] and thought to be specific to stem colonization according to experiments in controlled condition, were actually found in four different expression clusters, only one of which was specific to biotrophic behavior in stem tissues (cluster 5, **Fig 8**).

Importantly, cluster 2 contains all the genes encoding avirulence proteins identified to date in *L. maculans*. During leaf or cotyledon infection, these avirulence proteins can be recognized by the products of the major resistance genes (*Rlm* genes) of the plant, resulting in complete resistance to avirulent isolates. The re-use of these same genes at other stages of plant colonization strongly suggests that recognition can also take place during the systemic growth of the fungus within petioles or stems, resulting in efficient resistance at these stages of colonization, provided that the *Rlm* genes are constitutively expressed in all plant tissues. In addition to the nine already cloned avirulence genes, cluster 2 contains 58 additional SSP genes (39 of which are highly coregulated with all *AvrLm* genes), which are candidates of choice for the screening of genetic resources for novel resistance genes.

We also found that effector gene expression was not restricted to interaction with the living plant. Genomic studies on fungal saprotrophs focus on CAZymes and class-II peroxidases [58]. We show here that *L. maculans* recruits a typical cocktail of CAZymes, including the lytic polysaccharide mono-oxygenases (LPMO) involved in wood decay, but also peroxidases, cytochrome P450 and stress response genes, during one year of life on crop residues. In addition, cluster 7 encompasses 21 SSP genes specifically expressed during saprophytic growth on stem residues (**Fig 8**). It has been suggested that effector genes arise from genes used by saprobes to suppress ecological competitors [59]. The steady expression of a series of coregulated candidate effector genes during many months of life on residues, regardless of the changes in the mycoflora present on the residues over time [55], may indicate a need for the fungus to produce a minimal set of molecules involved in ecological competition.

Heterochromatin-based regulation of expression as a key player in the lifetime coregulation of genes involved in pathogenicity

One of the key findings of our work is that all clusters of genes overexpressed during interaction with the host are significantly associated with localization within a heterochromatin domain during axenic growth. Evidence is accumulating, for many other plant-associated fungi, regardless of their lifestyles and modes of nutrition, that the genes involved in fungus-plant interaction are often present in regions of heterochromatin within the genome (e.g. in [60-62]). Genes highly expressed during infection are often associated with heterochromatin during axenic culture (e.g. in *Z. tritici* or *L. maculans* [4,37,63]) and histone modifications (H3K9me3 and / or H3K27me3) have been shown to play a major role in regulating secondary metabolite gene clusters or effector genes (e.g. in *F. graminearum*, *F. fujikuroi*, *Z. tritici*, *Epichloe festucae* [64-68]). In the endophyte *E. festucae* and the pathogen *Z. tritici*, the derepression of putative effector genes or secondary metabolite gene clusters upon infection is associated with an underlying dynamic of histone modifications, which has been experimentally validated [64,67].

These data suggest that there is a generic chromatin-based control of plant infection mechanisms. We previously showed that, in *L. maculans*, heterochromatin domains (either H3K9me3 or H3K27me3) display significant enrichment in putative effector genes, and that all known avirulence genes are associated with H3K9me3 during axenic growth [38]. We found here that the genes included in the eight clusters specifically overexpressed during interaction with the plant relative to axenic growth were also enriched in H3K9me3 and/or H3K27me3 histone modifications *in vitro*. One striking finding of our study is that genes from the various waves of expression are scattered throughout the genome, but are significantly associated with heterochromatin, facilitating the temporal regulation of sets of genes involved in the same process. All the eight expression clusters identified in the lifecycle of *L. maculans* contained genes displaying significant enrichment in H3K27me3 heterochromatin *in vitro*. This histone modification is an important regulator of development and response to several biotic and abiotic stresses, in various fungal or plant models (e.g. [69-70]). By contrast, genes associated with biotrophic or biotrophic/asymptomatic life within the plants (cluster 2, **Fig 8**) displayed enrichment in H3K9me3 *in vitro*. The genes in this cluster are located in TE-rich regions of the genome and were found to be more enriched in heterochromatin modifications than the genes of the other clusters. They included the largest number of candidate effector genes, and the largest number of highly coregulated genes (65 genes). In *L. maculans*, the TE-rich regions are comprised of heterochromatin, leading to the silencing of associated genes; loss of the repressive histone modification H3K9me3 is a prerequisite to induce the expression of these genes [37]. The unique association between genes involved in the symptomless spread of the fungus and H3K9me3 suggests that this histone modification is involved in a regulatory mechanism important for the concealment of the fungus from the plants defenses. Conversely, this cluster also contains all the known avirulence genes, providing additional support for the role of H3K9me3 as the primary regulator of expression for genes at the forefront of the battle

with the plant, and as a target of choice for the establishment of effector-triggered immunity during co-evolution of the plant and the pathogen.

The genes associated with H3K9me3 in cluster 2 appear to be more strictly coregulated than those in other clusters, in which genes are associated with H3K27me3. Our findings suggest that chromatin remodeling during interaction with the plant is highly dynamic, rather than occurring only once when the fungus infects the plant, as might have been anticipated from analyses of species with a short lifecycle, or from the few days of interaction amenable to laboratory experiments. This combined analysis of transcriptomic and epigenomic data thus supports the notion that the finely tuned temporal progress of fungal infections is underpinned by a highly dynamic phenomenon based on the successive opening and closing of different genomic regions.

Materials and methods

Plant and fungal materials

Isolate JN2 (v23.1.2) was used in all experiments. Unless otherwise stated, the fungus was cultured on V8-agar medium, and conidia for inoculation tests were produced as previously described [71]. Isolate Nz-T4, which is sexually compatible with JN2, was also used in *in vitro* crossing experiments. Both isolates were described by Balesdent et al. [72].

Three winter *B. napus* cultivars were used, depending on the experiment: ‘Darmor-*bzh*’, the reference sequenced cultivar [73], ‘Darmor’ and ‘Bristol’. ‘Darmor-*bzh*’ is a dwarf isogenic line resulting from the introduction of the dwarf *bzh* gene into ‘Darmor’ [74]. ‘Darmor-*bzh*’ and ‘Darmor’ are characterized by a high level of quantitative resistance in the field, and ‘Bristol’ is moderately susceptible [75].

Production of biological material for RNA sequencing

***In vitro* culture.** The fungus was grown under different *in vitro* conditions, to mimic as many physiological stages as possible. All replicates used for RNA sequencing were true independent biological replicates. The following physiological conditions were reproduced: mycelial growth on V8-agar medium or in liquid Fries medium, pycnidiospore production on V8-agar medium, pycnidiospore germination in liquid Fries medium, and sexual mating *in vitro* at three time points (7, 20 and 35 days). All samples were immediately frozen in liquid nitrogen after recovery and stored at -80°C until RNA extraction. Detailed protocols for the production of samples in each set of conditions are provided in the S6 Text.

Cotyledon inoculation and sampling. The cotyledons of 10-day-old plants of cv Darmor-*bzh* were inoculated with pycnidiospore suspensions, as previously described ([76]; S6 Text). Control plants were mock-inoculated with sterile deionized water. Samples for RNA-Seq were recovered at 0 (with or without wound), 2, 5, 7, 9, 12, 15 and 17 DPI. At each time point, eight cotyledons from eight different plants were randomly selected. The plant tissues around the inoculation site were cut with a 10 mm-diameter disposable hole-punch and the 16 corresponding samples were pooled together in a Falcon tube, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until extraction. Two replicates were recovered at each time point and the whole experiment was repeated once.

Petiole inoculation and sampling. The petioles of cvs Darmor-*bzh* and Bristol were inoculated as described by Dutreux et al. [49]. Plants were grown in individual pots and the petioles of the second and third true leaves were inoculated with 8 μL of 10^7 spores.mL⁻¹ pycnidiospore suspensions. Petioles were sampled at 0 (mock), 7 and 14 DPI. At each date, the two inoculated petioles of four plants were cut at their base and placed in Petri dishes. Each petiole was cut 1 cm away from the point of inoculation, and the eight upper fragments obtained were pooled in a 15 mL Falcon tube. The contents of this tube constituted one sample of the upper part of the

petiole. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until extraction. Two independent replicates were recovered at each time point and the whole experiment was repeated.

Petiole inoculation and stem sampling. Plants from the three varieties were sown in individual pots and grown for three weeks before inoculation (S6 Text). When the plants reached the three-leaf stage, the petiole of the second leaf was cut 0.5 cm from the stem. We applied 10 μL of pycnidiospores (10^7 spores mL^{-1}) or sterile water (for mock inoculation) to the petiole section. The plants were kept in the dark, under high humidity, for 36 h, and were then transferred to a growth chamber (S6 Text). Three biological replicates were performed. Each replicate consisted of three blocks of five plants per variety for RNA-Seq sampling. At 14 and 28 DPI, a 0.5 cm-long section of stem was excised from each plant with a razor blade. The stem section was harvested at the level at which the inoculated petiole inserted into the stem, at 14 DPI, and 0.5 cm below this level at 28 DPI. The tissues harvested from each block at each time point (five individual plants) were pooled as a single sample. Harvested tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Crop residue sampling. In 2012-2013, the susceptible cultivar Alpaga was sown at Grignon, France, where it was subject to natural infection. Disease incidence, assessed in the fall, revealed high levels of infection, and pre-harvest assessments revealed high levels of disease severity, variable between plants (S6 Text). After harvest, the stem bases of the plants were removed from the field and kept outside until use, either to re-inforce the natural inoculum for the 2013-2014 field assay (see below), or for RNA extraction. For RNA extraction, only plants presenting necrosis on more than 50% of the stem area were used, and stem residues were collected at seven time points after harvest. For one sampling date, two stem residues were pooled to constitute a single sample, and four samples (four replicates) were used per date for RNA sequencing.

Stem bases from field sampling. A field experiment was set up at Grignon, France in the fall of 2013, with two cultivars, Darmor-*bzh* and Bristol, with natural, but reinforced inoculum (S6 Text). Stem base tissues (1 cm above the collar of the plants) were collected from both cultivars in the field, at six time points, for RNA extraction (11/20/2013; 12/18/2013; 02/13/2014; 03/13/2014; 04/04/2014; 05/14/2014, 07/08/2014, i.e. one week before harvest (S6 Text)). For each cultivar and time point, we collected three samples (each containing three pooled stem bases) for RNA sequencing. Stem canker severity was assessed by G2 scoring, beginning at the April sampling (S6 Text). Only samples from the susceptible cultivar Bristol collected from March to July were kept for RNA-Seq statistical analyses.

Young leaves from field sampling. A field experiment was set up at Grignon, France in the fall of 2017. It included three plots of cv Darmor, subjected to natural, but reinforced inoculum (S6 Text). When typical leaf lesions due to *L. maculans* were visible on more than 60% of the plants (16/11/2017), leaves with leaf lesions were harvested. Five disks of leaf tissue with typical leaf lesions were pooled in a 15 mL Falcon tube (S6 Text). All samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until extraction. Pooled disks from one plot constitutes one replicate, and a similar sampling was performed two weeks later.

Infection of cotyledons with ascospores. Stem residues bearing mature pseudothecia were placed on a metallic grid over seven-day-old plants (S6 Text). The stem residues were left over the plants for 24 hours, in the dark, under saturation, to promote ascospore ejection. The plants were then transferred to a growth chamber. After 24 h and 48 h, six cotyledons per pot were randomly cut, pooled in a single 15 mL tube, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Cotyledons from four selected neighboring pots (i.e., a total of 24 cotyledons; S6 Text) were pooled to produce a single sample of the early stage of cotyledon infection with ascospores. Two samples were obtained for each time point and the experiment was repeated once.

RNA extraction and sequencing

Cotyledons, leaf disks, and freeze-dried cultures of fungal spores or mycelia were ground with a Retsch MM300 mixer mill in Eppendorf tubes, with one tungsten carbide bead per tube, for 45 s, at 30 oscillations per second. Petioles were ground with a pestle and mortar. Stem bases from the field and stem residues were ground with a Retsch MM300 mixer mill, with zirconium oxide jars and beads, for 40 s, at 30 oscillations per second. Inoculated stem samples were ground in liquid nitrogen, in the presence of steel marbles, with a TissueLyser II (Qiagen).

RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), as previously described [18]. RNA-Seq libraries were prepared as previously described [49]. Each library was sequenced with 101 bp paired-end read chemistry, on a HiSeq2000 Illumina sequencer.

Annotation of genomic data

Comparisons of gene annotations between the two published version of the *L. maculans* strain JN3 genome. The reference genome assembly of *L. maculans* isolate v23.1.3 (aka. JN3) was generated in 2007, by Sanger sequencing [26]. Dutreux et al. [49] subsequently generated an improved genome assembly, to achieve assembly at the chromosome scale. We compared this new version of the genome sequence with that published in 2011, using BLAT suite tools [77] (S4 Text).

Functional annotations. Functional annotations were predicted with BLAST2GO [78]. Genes encoding CAZymes were annotated manually, together with *de novo* prediction with dbCAN tools v3 [79]. Pfam domains were annotated with PfamScan software version 1.6 [80]. For discrimination between proteins with and without annotated functions, the BLAST2GO results and Pfam annotations were used, but with the terms “hypothetical protein”, “predicted protein”

and “uncharacterized protein” discarded. PKS and NRPS genes were predicted with the SMURF online tool, using default parameters [81].

Annotation of genes encoding SSPs. We generated a new repertoire of genes encoding SSPs, by first creating a secretome of predicted secreted proteins with three filters. The predicted secretome contained all the proteins with no more than one transmembrane domain predicted by TMHMM version 2.0. [82], and either a signal peptide predicted by SignalP version 4.1 [83], or an extracellular localization predicted by TargetP version 1.1 [84]. The final SSP repertoire was created by applying a size cutoff of 300 amino acids to the predicted secretome. In parallel, EffectorP version 1.0 [85] was applied to the whole predicted secretome and detected four proteins of more than 300 amino acids in length, which were added to the SSP repertoire.

Detection of AT-rich regions. AT-rich and GC-equilibrated regions were annotated with OcculterCut [86] and post-processed to avoid the detection of regions that were too small. OcculterCut uses a predefined window of 1 kb to analyze AT/GC content, and this can lead to the detection of small GC-rich-regions within AT-rich regions in the case of isolated genes. We overcame this problem by defining reliable detected regions (10 kb for AT and 6 kb for GC), which we used as anchors for the merging of regions (S6 Text).

Analyses on genomic data

Genomic localization and enrichment in epigenetic marks. For genes in the eight clusters, we performed Chi² tests to detect enrichment in the associated epigenetic marks (H3K4me₂, H3K9me₃ or H3K29me₃), recovered from Soyer et al. [38], to compare the distribution of marks in the whole set of genes. Enrichments were considered significant for *p* values < 0.05; all analyses were performed in R.

Gene Ontology enrichment analysis. The Bingo plugin of Cytoscape software v3.5.1 [87] was used for Gene Ontology (GO) enrichment analysis. For each gene, the GO identifier was

generated with BLAST2GO software. Significant enrichments in “Molecular Function”, “Biological Process” and “Cellular Component” were detected with a hypergeometric test, by comparing the proportion of genes identified for a given GO function in the subset of interest to that for the whole set of protein-coding genes in *L. maculans*.

BLAST. A BLAST alignment was generated with non-redundant protein sequences from the GenPept, Swissprot, PIR, PDF, PDB, and NCBI RefSeq databases. Only the 10 best BLAST hits were selected, with the max_target_seqs: 10 and max_hsps: 10 options.

Analyses on transcriptomic data

Mapping. Raw RNA-Seq reads were mapped with STAR software version 020201 [88]. As *Leptosphaeria biglobosa* isolates could be present in the field samples, we assessed the mapping specificity of the final parameters for the genome of *L. maculans* (S1 Text, **S1 Table**). We chose a number of two base-pair mismatches for a one-step process of mapping onto the concatenated genome of the two species for the final analysis. Based on the maximum intron size within the genome, we allowed for an intron size of 10 000 bp. The other parameters used were as follows: outFilterMultimapNmax: 100; SeedSearchStartLmax: 12; alignSJoverhangMin: 15; alignIntronMin: 10. We then selected the correctly paired reads in BAM files with Samtools v1.6 [89]. Finally, FeaturesCounts version v1.5.1 [90] was used to quantify gene expression for the uniquely mapped and paired reads.

Sample correlation analysis. Pairwise Pearson’s correlation analysis was performed on all samples, with the Log₂(FPKM +1)-transformed expression values for the 32 selected sets of conditions. The resulting correlation matrix was clustered with the Ward.D2 method. PCA was performed with the FactoRmineR R package [91] on the scaled Log₂(FPKM +1) expression values for the four groups identified in the correlation matrix.

Detection of differentially expressed genes. Differential expression analyses were performed with the EdgeR package v3.20.9 [92]. Genes with > 30 reads in at least one condition were kept for statistical analysis. Samples were normalized by the TMM method. We fitted a negative binomial generalized linear model to the data with the glmFit function. We then used the glmLRT function to compare gene expression in each of the 22 *in planta* conditions with that in the 10 *in vitro* conditions, using appropriate coefficients and contrasts ($-1/10$ for the 10 *in vitro* conditions and $+1$ for the tested conditions). We also used coefficients to mask the effects of replicate on cotyledon, petiole and stem samples from controlled conditions. Only genes overexpressed relative to the 10 *in vitro* conditions with $\text{LogFC} > 4$ and a p -value < 0.01 were selected.

Clustering For the clustering step, genes with a FPKM > 2 in at least one condition were $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ -transformed and scaled. The whole 1207 gene set overexpressed in at least one set of conditions *in planta* was extracted from this transformed count table and the self-organizing map method of the Kohonen R package v3.0.8 [93] was used to classify those genes into eight clusters, with 200 iterations.

Detection of co-expressed genes. For each cluster, the mean scaled $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ value for SSP gene expression was calculated and used as a reference for an analysis of linear regression against the scaled $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ expression of all genes. Genes with an R-squared value > 0.80 and an adjusted p -value < 0.05 were considered to be highly correlated.

Acknowledgments

We would like to thank Christophe Montagnier and the experimental unit team, INRAE, France, for the setting up and management of the experimental rapeseed fields; Guillem Rigail from the Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, France, for helpful comments and advice on

statistics, and Antoine Gravot, (INRAE IGEPP, France), for helpful discussions and review of the manuscript. For preliminary analyses and genomic work, we would like to thank Fabien Dutreux (CEA, Genoscope, Evry, France). This work was supported in part by Promosol (METAPHOR project), and France Génomique (Leptolife project). The “Effectors and Pathogenesis of *L. maculans*” group benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007).

Author contribution

Conceptualization, RD, TR, MHB; Data curation, EJG, NL, CDA, JMA, CC; Formal analysis EJG, JLS, NL, CDA, JMA; Funding acquisition, PW, TR, MHB; investigation, EJG, NL, JL, CC, AL, JL, MHB; methodology, EJG, JL; Project administration, TR; resources, EJG, NL, CDA, PW, JMA, CC, MHB; supervision, PW, JMA, TR, MHB; validation, JLS, IF; TR; visualization; EJG, JLS; writing draft, EJG, JLS, NL, TR, MHB; writing review, EJG, JLS, NL, IF, CDA, PW, JMA, CC, RD, TR, MHB.

References

1. Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*. 2012;484(7393): 186–194.
2. Dobon A, Bunting DCE, Cabrera-Quio LE, Uauy C, Saunders DGO. The host-pathogen interaction between wheat and yellow rust induces temporally coordinated waves of gene expression. *BMC Genomics*. 2016;17: 380.
3. Dong Y, Li Y, Zhao M, Jing M, Liu X, Liu M, et al. Global genome and transcriptome analyses of *Magnaporthe oryzae* epidemic isolate 98-06 uncover novel effectors and pathogenicity-related genes, revealing gene gain and lose dynamics in genome evolution. *PLoS Pathog*. 2015;11(4): e1004801.
4. Haueisen J, Möller M, Eschenbrenner CJ, Grandaubert J, Seybold H, Adamiak H, et al. Highly flexible infection programs in a specialized wheat pathogen. *Ecol Evol*. 2019;9: 275–294.
5. Palma-Guerrero J, Torriani SFF, Zala M, Carter D, Courbot M, Rudd JJ, et al. Comparative transcriptomic analyses of *Zymoseptoria tritici* strains show complex lifestyle transitions and intraspecific variability in transcription profiles. *Mol Plant Pathol*. 2016;17: 845–59.
6. Kleemann J, Rincon-Rivera LJ, Takahara H, Neumann U, van Themaat EVL, van der Does HC, et al. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathog*. 2012;8(4): e1002643.
7. Lanver D, Müller AN, Happel P, Schweizer G, Haas FB, Franitza M, et al. The biotrophic development of *Ustilago maydis* studied by RNA-seq Analysis. *Plant Cell*. 2018;30: 300–323.
8. Lorrain C, Marchal C, Hacquard S, Delaruelle C, Pétrowski J, Petre B, et al. The rust fungus *Melampsora larici-populina* expresses a conserved genetic program and distinct sets of secreted protein genes during infection of its two host plants, larch and poplar. *Mol Plant Microbe Interact*. 2018;31: 695-706
9. Rouxel T, Balesdent MH. The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Mol Plant Pathol*. 2005;6: 225–241.
10. West JS, Balesdent M-H, Rouxel T, Narcy JP, Huang Y-J, Roux J, et al. Colonization of winter oilseed rape tissues by A/Tox+ and B/Tox0 *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in France and England. *Plant Pathol*. 2002;51: 311–321.
11. Haddadi P, Ma L, Wang H, Borhan MH. Genome-wide transcriptomic analyses provide insights into the lifestyle transition and effector repertoire of *Leptosphaeria maculans* during the colonization of *Brassica napus* seedlings. *Mol Plant Pathol*. 2016;17: 1196–210.
12. Lowe RGT, Cassin A, Grandaubert J, Clark BL, Van de Wouw AP, Rouxel T, et al. Genomes and transcriptomes of partners in plant-fungal-interactions between canola (*Brassica napus*) and two *Leptosphaeria* species. *PLoS ONE*. 2014;9(7): e103098.
13. Sonah H, Zhang X, Deshmukh RK, Borhan MH, Fernando WGD, Bélanger RR. Comparative transcriptomic analysis of virulence factors in *Leptosphaeria maculans* during compatible and incompatible interactions with canola. *Front Plant Sci*. 2016;7: 1784.

14. Gervais J, Plissonneau C, Linglin J, Meyer M, Labadie K, Cruaud C, et al. Different waves of effector genes with contrasted genomic location are expressed by *Leptosphaeria maculans* during cotyledon and stem colonization of oilseed rape. *Mol Plant Pathol*. 2017;18: 1113–1126.
15. Lo Presti LL, Lanver D, Schweizer G, Tanaka S, Liang L, Tollot M, et al. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu Rev Plant Biol*. 2015;66: 513–145.
16. Elliott CE, Gardiner DM, Thomas G, Cozijnsen A, Van de Wouw AP, Howlett BJ. Production of the toxin sirodesmin PL by *Leptosphaeria maculans* during infection of *Brassica napus*. *Mol Plant Pathol*. 2007;8: 791–802.
17. Balesdent M-H, Fudal I, Ollivier B, Bally P, Grandaubert J, Eber F, et al. The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytol*. 2013;198: 887–898.
18. Fudal I, Ross S, Gout L, Blaise F, Kuhn ML, Eckert MR, et al. Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: Map-Based Cloning of *AvrLm6*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2007;20: 459–470.
19. Ghanbarnia K, Ma L, Larkan NJ, Haddadi P, Fernando WGD, Borhan MH. *Leptosphaeria maculans* AvrLm9: a new player in the game of hide and seek with AvrLm4-7. *Mol Plant Pathol*. 2018;19: 1754–64.
20. Ghanbarnia K, Fudal I, Larkan NJ, Links MG, Balesdent M-H, Profotova B, et al. Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm2* using an intraspecific comparative genomics approach. *Mol Plant Pathol*. 2015;16: 699–709.
21. Gout L, Fudal I, Kuhn M-L, Blaise F, Eckert M, Cattolico L, et al. Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Mol Microbiol*. 2006;60: 67–80.
22. Parlange F, Daverdin G, Fudal I, Kuhn M-L, Balesdent M-H, Blaise F, et al. *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents *Rlm4*-mediated recognition through a single amino acid change. *Mol Microbiol*. 2009;71: 851–863.
23. Petit-Houdenot Y, Degrave A, Meyer M, Blaise F, Ollivier B, Marais C-L, et al. A two genes-for-one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*. *New Phytol*. 2019;223: 397–411.
24. Plissonneau C, Daverdin G, Ollivier B, Blaise F, Degrave A, Fudal I, et al. A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol*. 2016;209: 1613–1624.
25. Van de Wouw AP, Lowe RGT, Elliott CE, Dubois DJ, Howlett BJ. An avirulence gene, *AvrLmJ1*, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Mol Plant Pathol*. 2014;15: 523–530.
26. Rouxel T, Grandaubert J, Hane JK, Hoede C, van de Wouw AP, Couloux A, et al. Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nature Commun*. 2011;2: 202.

27. Darma R, Lutz A, Elliott CE, Idnurm A. Identification of a gene cluster for the synthesis of the plant hormone abscisic acid in the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet Biol.* 2019;130: 62–71.
28. Elliott CE, Howlett BJ. Overexpression of a 3-Ketoacyl-CoA thiolase in *Leptosphaeria maculans* causes reduced pathogenicity on *Brassica napus*. *Mol Plant Microbe Interact.* 2006;19: 588–596.
29. Elliott CE, Harjono, Howlett BJ. Mutation of a gene in the fungus *Leptosphaeria maculans* allows increased frequency of penetration of stomatal apertures of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant.* 2008;1: 471–481.
30. Feng J, Zhang H, Strelkov SE, Hwang S-F. The *LmSNF1* Gene is required for pathogenicity in the canola blackleg pathogen *Leptosphaeria maculans*. *PLoS ONE.* 2014;9: e92503.
31. Idnurm A, Howlett BJ. Analysis of loss of pathogenicity mutants reveals that repeat-induced point mutations can occur in the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet and Biol.* 2003;39: 31–37.
32. Remy E, Meyer M, Blaise F, Chabirand M, Wolff N, Balesdent M-H, et al. The *Lmpmal* gene of *Leptosphaeria maculans* encodes a plasma membrane H⁺-ATPase isoform essential for pathogenicity towards oilseed rape. *Fungal Genet Biol.* 2008;45: 1122–1134.
33. Remy E, Meyer M, Blaise F, Simon UK, Kuhn D, Chabirand M, et al. The *Lmgpi15* gene, encoding a component of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis pathway, is required for morphogenesis and pathogenicity in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.* 2008;179: 1105–1120.
34. Remy E, Meyer M, Blaise F, Simon UK, Kuhn D, Balesdent MH, et al. A key enzyme of the Leloir pathway is involved in pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* toward oilseed rape. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009;22: 725–736.
35. Soyer JL, Hamiot A, Ollivier B, Balesdent M-H, Rouxel T, Fudal I. The APSES transcription factor LmStuA is required for sporulation, pathogenic development and effector gene expression in *Leptosphaeria maculans*. *Mol Plant Pathol.* 2015;16: 1000–1005.
36. Van de Wouw AP, Pettolino FA, Howlett BJ, Elliott CE. Mutations to LmIFRD affect cell wall integrity, development and pathogenicity of the ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet Biol.* 2009;46:695–706.
37. Soyer JL, Ghalid ME, Glaser N, Ollivier B, Linglin J, Grandaubert J, et al. Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genetics.* 2014;10: e1004227.
38. Soyer JL, Clairet C, Gay EJ, Lapalu N, Rouxel T, Stukenbrock EH, et al. Genome-wide mapping of histone modifications in two species of *Leptosphaeria maculans* showing contrasting genomic organization and host specialization. *bioRxiv.* 2020 May 10;2020.05.08.084566.
39. Murphy E, De Smet I. Understanding the RALF family: a tale of many species. *Trends Plant Sci.* 2014;19:664–671.
40. Rabe F, Ajami-Rashidi Z, Doehlemann G, Kahmann R, Djamei A. Degradation of the plant defence hormone salicylic acid by the biotrophic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* 2013;89: 179–188.
41. De Jonge R, Thomma BPHJ. Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol.* 2009;17:151–157.

42. Gijzen M, Nürnberger T. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry*. 2006;67 :1800–1807.
43. Elliott CE, Callahan DL, Schwenk D, Nett M, Hoffmeister D, Howlett BJ. A gene cluster responsible for biosynthesis of phomonoic acid in the plant pathogenic fungus, *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet and Biol*. 2013;53: 50–58.
44. Gardiner DM, Jarvis RS, Howlett BJ. The ABC transporter gene in the sirodesmin biosynthetic gene cluster of *Leptosphaeria maculans* is not essential for sirodesmin production but facilitates self-protection. *Fungal Genet Biol*. 2005;42: 257–263.
45. Urquhart AS, Idnurm A. Limitations of transcriptome-based prediction of pathogenicity genes in the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2019;366: fnz080.
46. Idnurm A, Howlett BJ. Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*). *Eukaryot Cell*. 2002 10;1: 719–724.
47. Ma L, Djavaheri M, Wang H, Larkan NJ, Haddadi P, Beynon E, et al. *Leptosphaeria maculans* effector protein avrlm1 modulates plant immunity by enhancing MAP kinase 9 phosphorylation. *iScience*. 2018;3: 177–191.
48. Nováková M, Šašek V, Trdá L, Krutinová H, Mongin T, Valentová O, et al. *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm4-7 affects salicylic acid (SA) and ethylene (ET) signalling and hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in *Brassica napus*. *Mol Plant Pathol*. 2016;17: 818–831.
49. Dutreux F, Da Silva C, d'Agata L, Couloux A, Gay EJ, Istace B, et al. De novo assembly and annotation of three *Leptosphaeria* genomes using Oxford Nanopore MinION sequencing. *Scientific Data*. 2018;5: 180235.
50. West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ, Fitt BDL. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathol*. 2001;50: 10–27.
51. Valent B, Khang CH. Recent advances in rice blast effector research. *Curr Opin Plant Biol*. 2010;13: 434–441.
52. Hammond KE, Lewis BG. Variation in stem infections caused by aggressive and non-aggressive isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* var. *oleifera*. *Plant Pathol*. 1987;36: 53–65.
53. Hammond KE, Lewis BG. The establishment of systemic infection in leaves of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathol*. 1987;36: 135–147.
54. Johnson RD, Lewis BG. Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathol*. 1994;43: 269–277.
55. Kerdraon L, Balesdent M-H, Barret M, Laval V, Suffert F. Crop residues in wheat-oilseed rape rotation system: a pivotal, shifting platform for microbial meetings. *Microb Ecol*. 2019;77: 931–945.
56. Chanclud E, Morel J-B. Plant hormones: a fungal point of view. *Mol Plant Pathol*. 2016;17: 1289–1297.
57. Qi G, Chen J, Chang M, Chen H, Hall K, Korin J, et al. Pandemonium breaks out: disruption of salicylic acid-mediated defense by plant pathogens. *Mol Plant*. 2018;11: 1427–1439.

58. Ohm RA, Riley R, Salamov A, Min B, Choi I-G, Grigoriev IV. Genomics of wood-degrading fungi. *Fungal Genet Biol.* 2014;72: 82–90.
59. Tyler BM, Rouxel T. Effectors of fungi and oomycetes: their virulence and avirulence functions and translocation from pathogen to host cells. ; In *Molecular Plant Immunity.* 2013; G. Sessa, Ed., Wiley Blackwell Press, Chap. 7, pp. 123-167.
60. Cheeseman K, Weitzman JB. Host–parasite interactions: an intimate epigenetic relationship. *Cell Microbiol.* 2015;17: 1121–1132.
61. Gómez-Díaz E, Jordà M, Peinado MA, Rivero A. Epigenetics of host-pathogen interactions: the road ahead and the road behind. *PLoS Pathog.* 2012 Nov 29 [cited 2020 Apr 27];8(11). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3510240/>
62. Soyer JL, Rouxel T, Fudal I. Chromatin-based control of effector gene expression in plant-associated fungi. *Curr Opin Plant Biol.* 2015;26: 51–56.
63. Fouché S, Badet T, Oggenfuss U, Plissonneau C, Francisco CS, Croll D. Stress-driven transposable element de-repression dynamics and virulence evolution in a fungal pathogen. *Mol Biol Evol.* 2020;37: 221–239.
64. Chujo T, Scott B. Histone H3K9 and H3K27 methylation regulates fungal alkaloid biosynthesis in a fungal endophyte-plant symbiosis. *Mol Microbiol.* 2014;92: 413–434.
65. Connolly LR, Smith KM, Freitag M. The *Fusarium graminearum* histone H3 K27 methyltransferase KMT6 regulates development and expression of secondary metabolite gene clusters. *PLoS Genet* 9: e1003916.
66. Gacek A, Strauss J. The chromatin code of fungal secondary metabolite gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;95:1389–1404.
67. Soyer JL, Grandaubert J, Haueisen J, Schotanus K, Stukenbrock EH. *In planta* chromatin immunoprecipitation in *Zymoseptoria tritici* reveals chromatin-based regulation of putative effector gene expression. *bioRxiv.* 2019 Feb 8;544627.
68. Studt L, Rösler SM, Burkhardt I, Arndt B, Freitag M, Humpf H-U, et al. Knock-down of the methyltransferase Kmt6 relieves H3K27me3 and results in induction of cryptic and otherwise silent secondary metabolite gene clusters in *Fusarium fujikuroi*. *Environ Microbiol.* 2016;18: 4037–4054.
69. Basenko EY, Sasaki T, Ji L, Prybol CJ, Burckhardt RM, Schmitz RJ, et al. Genome-wide redistribution of H3K27me3 is linked to genotoxic stress and defective growth. *PNAS.* 2015;112: E6339–6348.
70. Wang G, Köhler C. Epigenetic processes in flowering plant reproduction. *J Exp Bot.* 2017;68: 797–807.
71. Ansan-Melayah D, Balesdent MH, Buée M, Rouxel T. Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology.* 1995;85: 1525–1529.
72. Balesdent MH, Attard A, Kühn ML, Rouxel T. New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology.* 2002;92:1122–1133.
73. Chalhouf B, Denoëud F, Liu S, Parkin IAP, Tang H, Wang X, et al. Early allopolyploid evolution in the post-neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science.* 2014;345(6199): 950–953.

74. Foisset N, Delourme R, Barret P, Renard M. Molecular tagging of the dwarf BREIZH (Bzh) gene in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet.* 1995;91: 756–761.
75. Pilet ML, Delourme R, Foisset N, Renard M. Identification of loci contributing to quantitative field resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not., in Winter rapeseed (*Brassica napus*). *Theor Appl Genet.* 1998;96: 23–30.
76. Gall C, Balesdent M-H, Desthieux I, Robin P, Rouxel T. Polymorphism of Tox⁰ *Leptosphaeria maculans* isolates as revealed by soluble protein and isozyme electrophoresis. *Mycol Res.* 1995;99: 221–229.
77. Kent WJ. BLAT-The BLAST-Like Alignment Tool. *Genome Res.* 2002;12: 656–664.
78. Conesa A, Götz S. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *Int J Plant Genomics* [Internet]. 2008 [cited 2019 Nov 12];2008. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2375974/>
79. Yin Y, Mao X, Yang J, Chen X, Mao F, Xu Y. dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Web Server issue):W445–451.
80. Mistry J, Bateman A, Finn RD. Predicting active site residue annotations in the Pfam database. *BMC Bioinformatics.* 2007 Aug 9;8(1): 298.
81. Khaldi N, Seifuddin FT, Turner G, Haft D, Nierman WC, Wolfe KH, et al. SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genet Biol.* 2010;47:736–741.
82. Möller S, Croning MDR, Apweiler R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics.* 2001;17: 646–653.
83. Nielsen H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. *Methods Mol Biol.* 2017;1611: 59-73. doi: 10.1007/978-1-4939-7015-5_6.
84. Almagro Armenteros JJ, Salvatore M, Emanuelsson O, Winther O, von Heijne G, Elofsson A, et al. Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Sci Alliance.* 2019;2(5): 01900429.
85. Sperschneider J, Gardiner DM, Dodds PN, Tini F, Covarelli L, Singh KB, et al. EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytol.* 2016;210: 743–761.
86. Testa AC, Oliver RP, Hane JK. OcculterCut: A comprehensive survey of AT-rich regions in fungal genomes. *Genome Biol Evol.* 2016;8: 2044–2064.
87. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13: 2498–504.
88. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29: 15–21.
89. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25: 2078–2079.
90. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014 Apr 1;30(7):923–30.

91. Lê S, Josse J, Husson F. FactoMineR : An R package for multivariate analysis. J Stat Soft [Internet]. 2008 [cited 2019 Nov 12];25(1). Available from: <http://www.jstatsoft.org/v25/i01/>
92. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics. 2010;26: 139–140.
93. Wehrens R, Buydens LMC. Self- and super-organizing maps in R: The kohonen Package. J Stat Soft. 2007;21:1–19.
94. Gardiner DM, Howlett BJ. Negative selection using thymidine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus *Leptosphaeria maculans*. Curr Genet. 2004;45: 249–255.
95. Sexton AC, Paulsen M, Woestemeyer J, Howlett BJ. Cloning, characterization and chromosomal location of three genes encoding host-cell-wall-degrading enzymes in *Leptosphaeria maculans*, a fungal pathogen of *Brassica* spp. Gene. 2000;248: 89–97.
96. Taylor JL, Condie J. Characterization of ABC transporters from the fungal phytopathogen *Leptosphaeria maculans*. In Biology of Plant-Microbe Interactions (P. J. G. M. de Wit, T. Bisseling and W. J. Stiekema, Eds.), 2000 Vol. 2, pp. 71–76. Int. Soc. Plant–Microbe Interact, St. Paul, MN.
97. Idnurm A, Warnecke DC, Heinz E, Howlett BJ. Characterisation of neutral trehalase and UDP-glucose:sterol glucosyltransferase genes from the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. Physiol Mol Plant Pathol. 2003 ;62: 305–313.
98. Idnurm A, Taylor JL, Pedras MSC, Howlett BJ. Small scale functional genomics of the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*: analysis of a 38 kb region. Australas Plant Pathol. 2003;32: 511–519.
99. Sexton AC, Howlett BJ. Characterisation of a cyanide hydratase gene in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. Mol Gen Genet. 2000;263: 463–470.
100. Urquhart AS, Idnurm A. Sit4-associated protein is required for pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus*. Curr Microbiol. 2017;74: 1438–1446.
101. Wilson LM, Idnurm A, Howlett BJ. Characterization of a gene (sp1) encoding a secreted protein from *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of *Brassica napus*. Mol Plant Pathol. 2002;3: 487–493.
102. Vincent D, Balesdent M-H, Gibon J, Claverol S, Lapaillerie D, Lomenech A-M, et al. Hunting down fungal secretomes using liquid-phase IEF prior to high resolution 2-DE. Electrophoresis. 2009;30: 4118–4136.
103. Balesdent MH, Attard A, Ansan-Melayah D, Delourme R, Renard M, Rouxel T. Genetic control and host range of avirulence toward *Brassica napus* cultivars Quinta and Jet Neuf in *Leptosphaeria maculans*. Phytopathology. 2001;91:70–76.

Supporting information

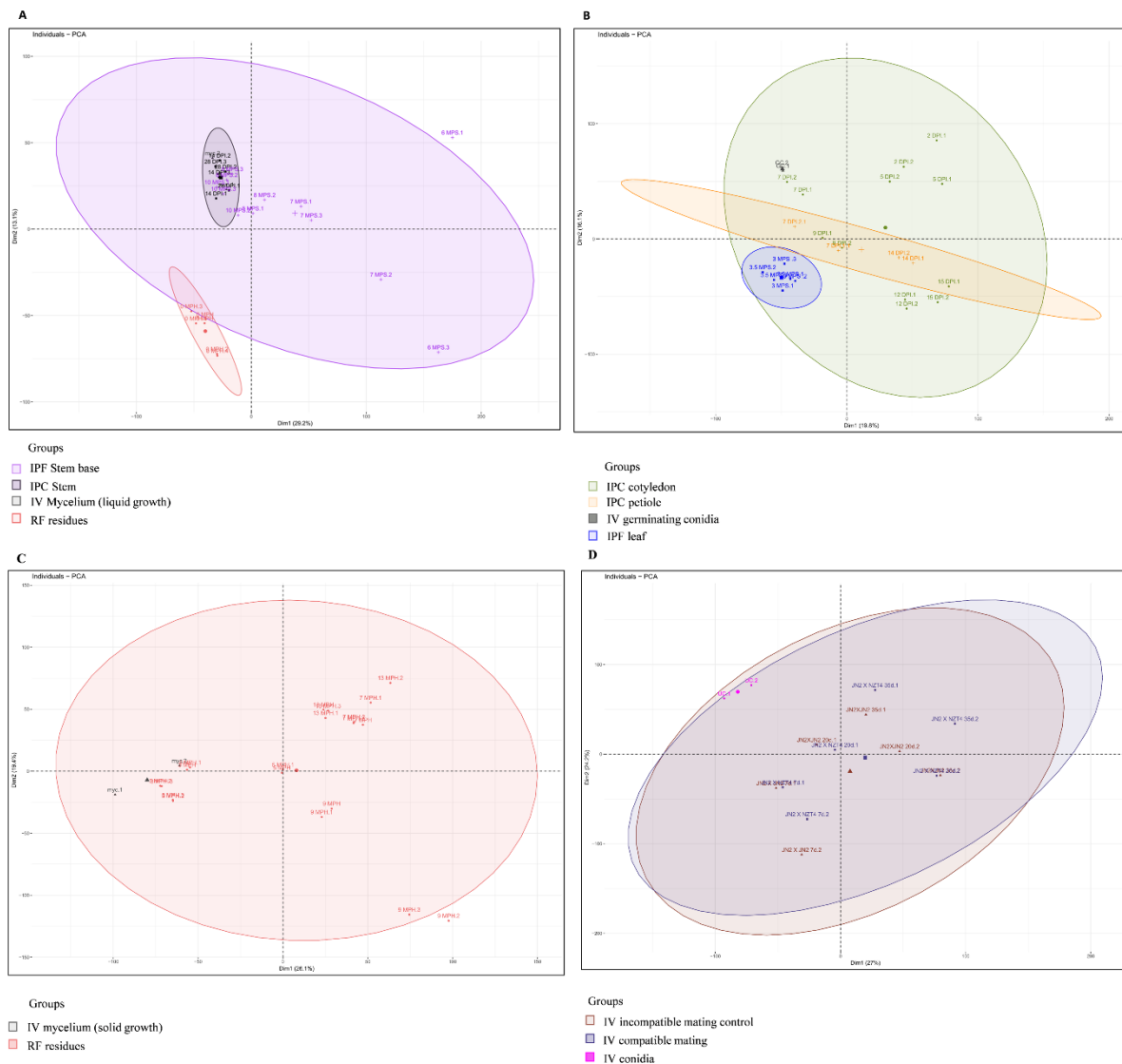


Fig S1. Principal component analyses (PCA) of RNA-Seq replicates. Genes with an FPKM count >2 in at least two sets of conditions were selected and the $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$ value of each replicate was used as an input for PCA. PCA was performed separately for each group (GP1 to GP4) identified in the correlation analysis (Fig 2), and the results are shown in (A) to (D). Samples are named according to Fig 1 and the last number indicates the replicate number. The two axes represent the first and second principal components. In each PCA, a color is attributed to each independent set of *in vitro* or *in planta* time-course experiment. The ellipses represent the variability of each group, with a confidence interval of 95%.

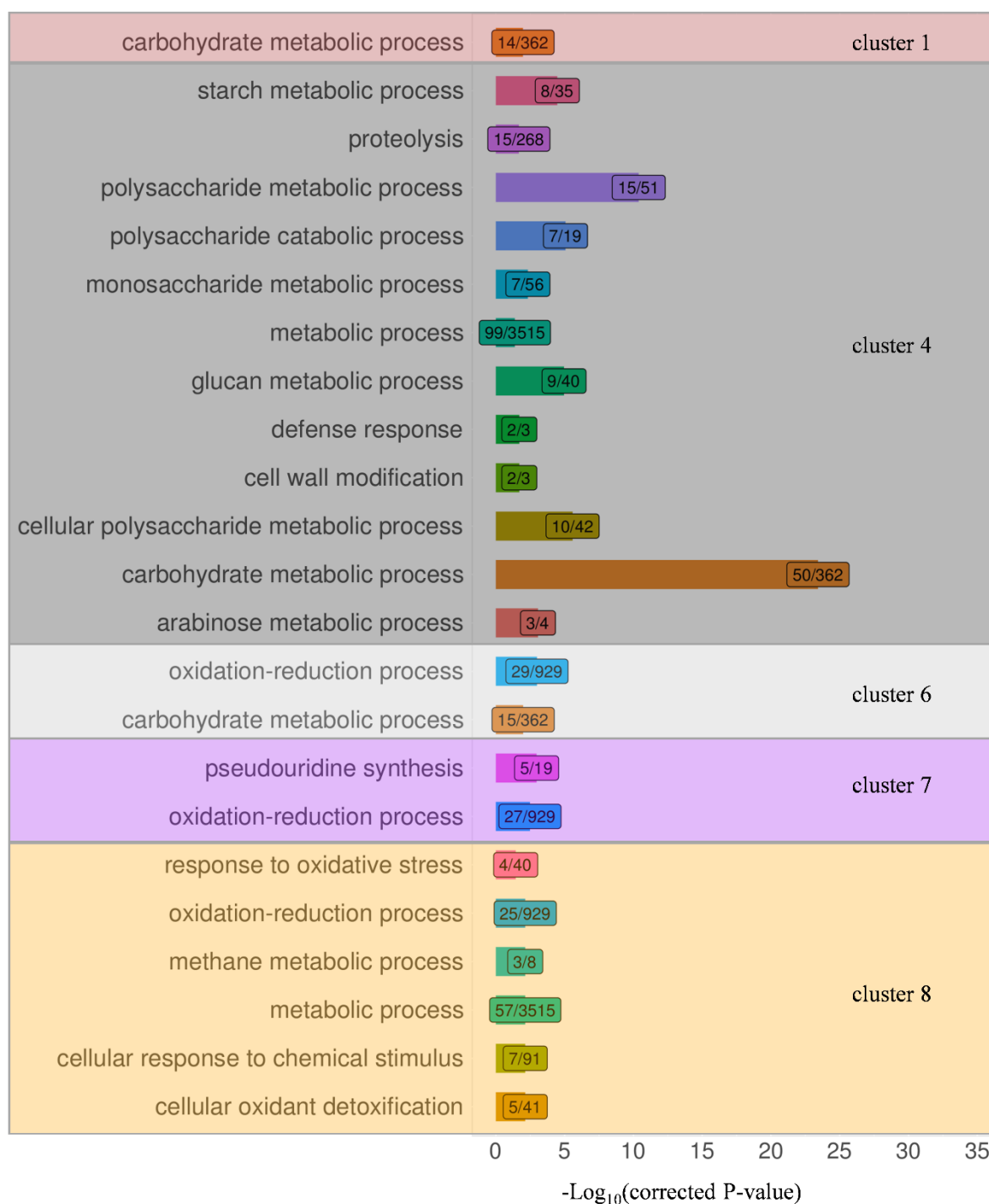


Fig S2. Detection of Gene Ontology enrichment (“Biological Process” category) in each of the eight clusters containing the 1,207 *Leptosphaeria maculans* genes overexpressed in at least one set of conditions in planta relative to the 10 sets of in vitro conditions. For each cluster, enrichment in a Biological Process category was assessed in a hypergeometric test, with the Cytoscape tool Bingo [87]. The y-axis indicates the overrepresented Biological Process terms. The x-axis represents the resulting $-\text{Log}_{10}(\text{corrected p-value})$ of the enrichment test. The numbers in the boxes indicate the number of genes assigned to the corresponding Biological Processes in the cluster (left) and the total number of genes associated to this Biological Process for the whole gene set (right). No significant enrichment in Biological Processes was found in clusters 2, 3 and 5.



Fig S3. Detection of Gene Ontology enrichment (“Molecular Function” category) in each of the eight clusters containing the 1,207 *Leptosphaeria maculans* genes overexpressed in at least one set of in planta conditions relative to the 10 sets of in vitro conditions. For each cluster, enrichment in a particular Molecular Function category was assessed in a hypergeometric test, with the Cytoscape tool Bingo [87]. The y-axis indicates the overrepresented Molecular Function terms. The x-axis represents the $-\text{Log}_{10}(\text{corrected } p\text{-value})$ of enrichment for each Molecular Function. The numbers in the boxes indicate the number of genes assigned to the corresponding Molecular Function in the clusters (left) and the total number of genes associated to this Molecular Function term in the whole gene set (right). The ‘small secreted protein’ category, which is not present in the GO database, was added to the statistical tests.

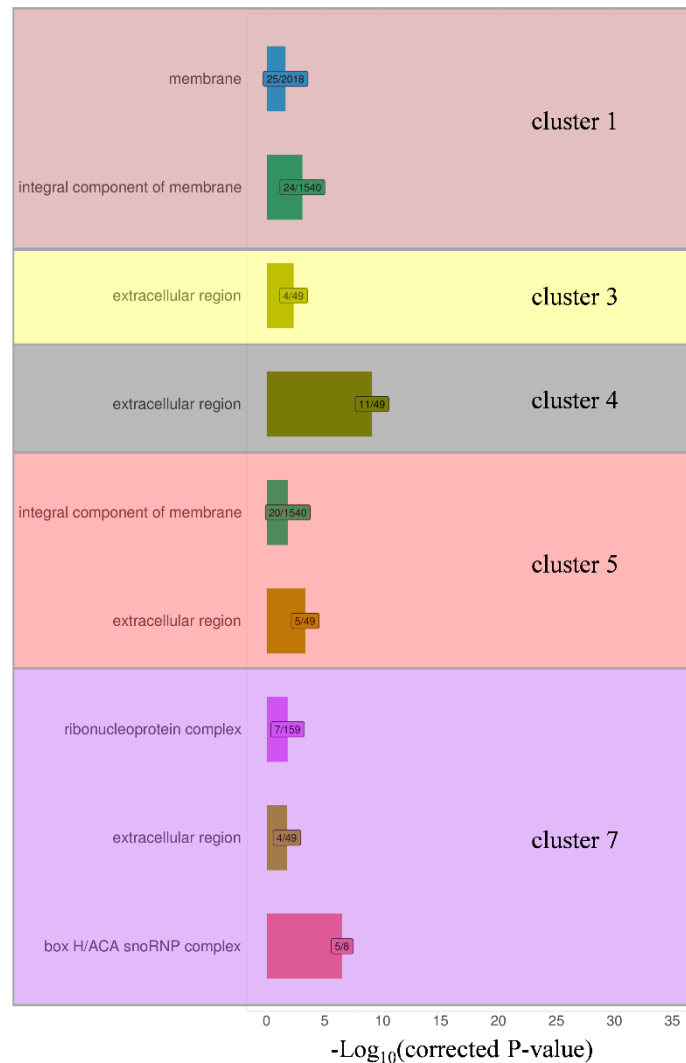


Fig S4. Detection of Gene Ontology enrichment (“Cellular Component” category) in each of the eight clusters containing the 1,207 *Leptosphaeria maculans* genes overexpressed in at least one set of conditions in planta relative to the 10 sets of conditions in vitro. For each cluster, we assessed the enrichment in a particular Cellular Component category in a hypergeometric test with the Cytoscape tool Bingo [87]. The y-axis indicates the overrepresented Cellular Component terms. The x-axis represents the $-\text{Log}_{10}(\text{corrected p-value})$ of the enrichment for each corresponding Cellular Component. The numbers in the boxes indicate the number of genes assigned to the corresponding Cellular Component in the cluster (left) and the total number of genes associated to this Cellular Component term in the whole gene set (right). No significant enrichment in Cellular Components was found in clusters 2, 6 and 8.

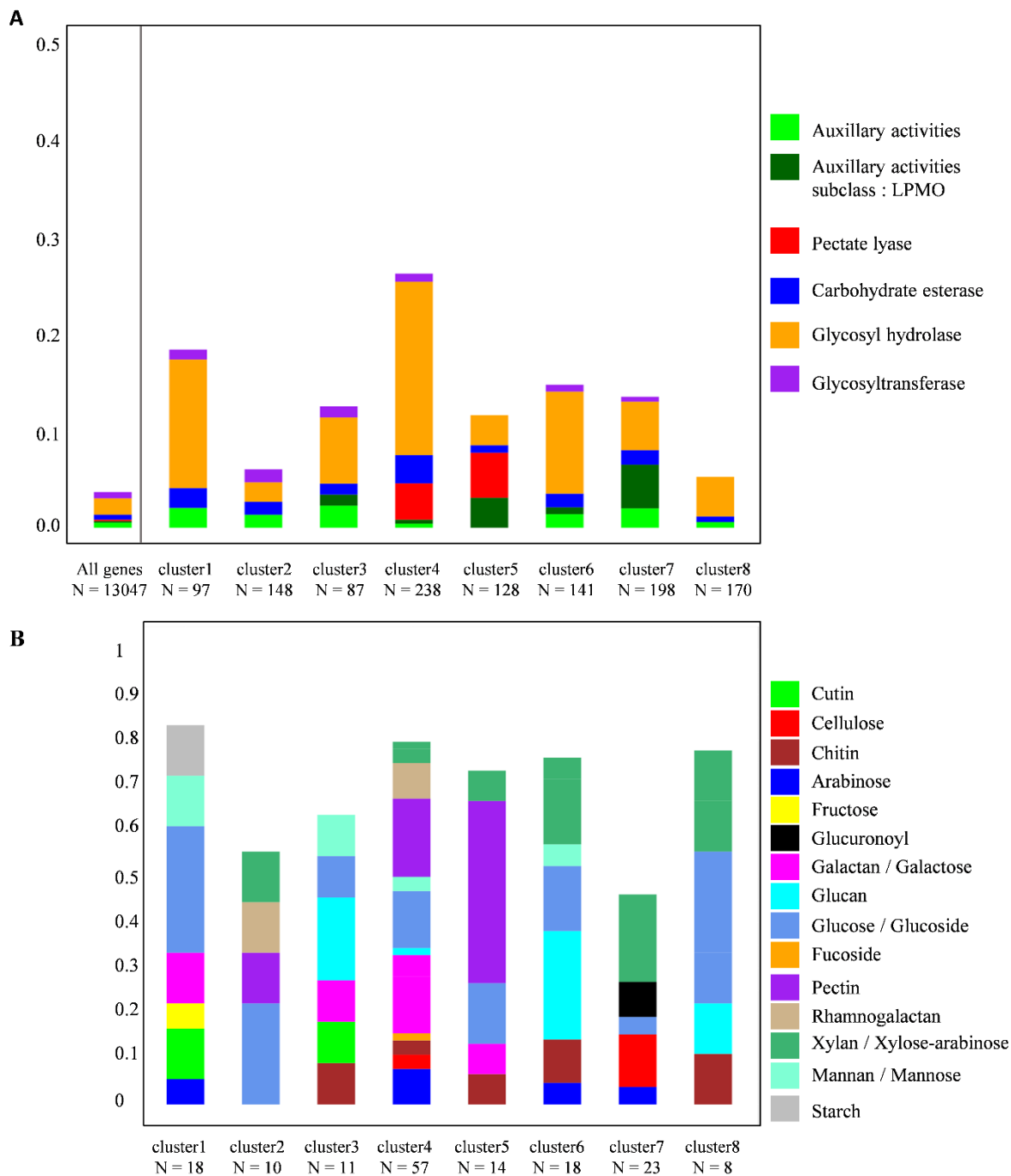


Fig S5. Proportion of different classes of CAZymes and their substrates in the eight gene clusters. (A) The proportion of the five CAZyme classes and one subclass of CAZymes with auxiliary activities (LPMO: lytic polysaccharide monooxygenase) within the clusters (cluster 1 to 8) or the whole gene set of *Leptosphaeria maculans* (N, number of genes in each cluster). (B) The proportion (y-axis: from 0 to 1) of the identified CAZyme substrates relative to the total number of CAZymes in each cluster (N).

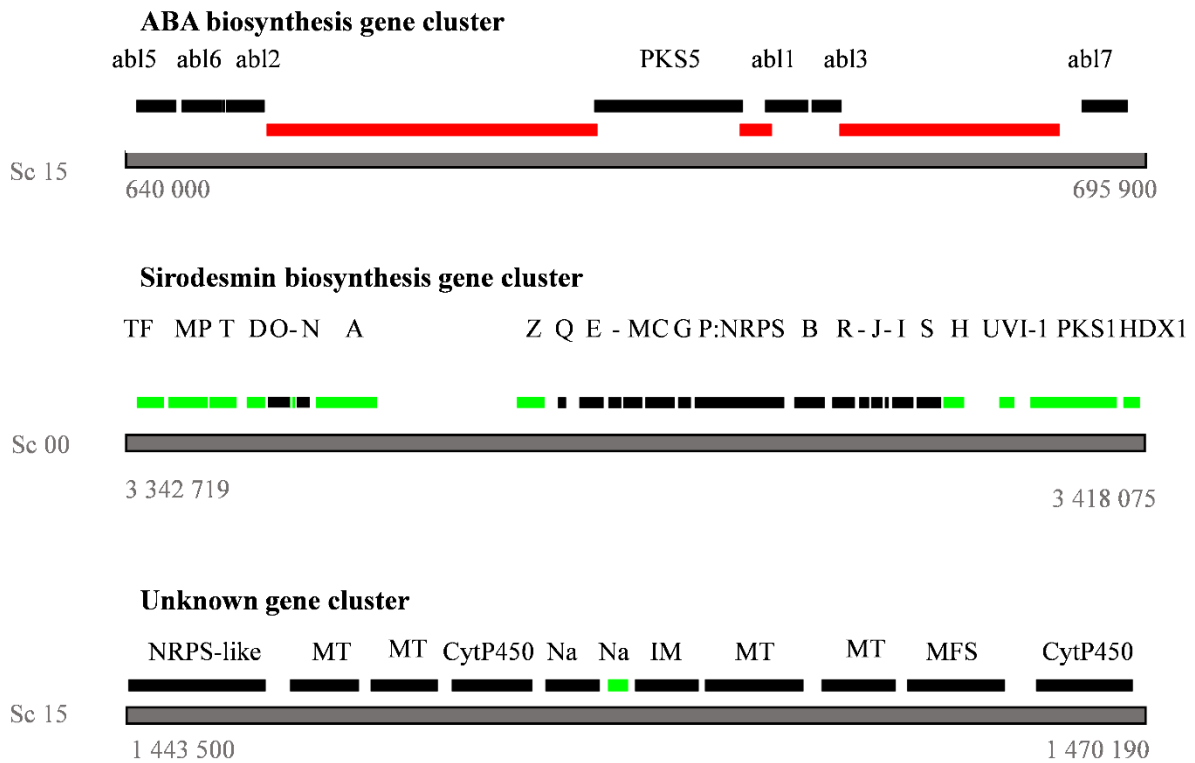


Fig S6. Details of the three *Leptosphaeria maculans* secondary metabolite biosynthesis gene clusters upregulated during rapeseed infection. The genomic regions and scaffolds are represented by the gray bars, with the coordinates indicated beneath them. The red bars correspond to AT-rich regions. The annotations of the genes involved in the abscisic acid (ABA) or sirodesmin biosynthesis are indicated. One secondary metabolite (SM) biosynthesis gene cluster was annotated de novo and its borders were delimited by the co-expression of 10 neighboring genes, with one gene encoding an NRPS-like protein. The genes in green represent the genes annotated in the SM cluster in previous studies but not found to be overexpressed during rapeseed infection. The genes in black represent the genes found to be overexpressed during rapeseed infection and present in the cluster. The gene names are indicated for the ABA [27] and sirodesmin biosynthesis cluster [94]. For the de novo annotated cluster, the functional annotations predicted by BLAST2GO are indicated (MT: methyltransferase, IM: integral membrane, TF: transcription factor, MP: maltose permease, CytP450: cytochrome P450, Na: no predicted function, MFS, major facilitator superfamily).

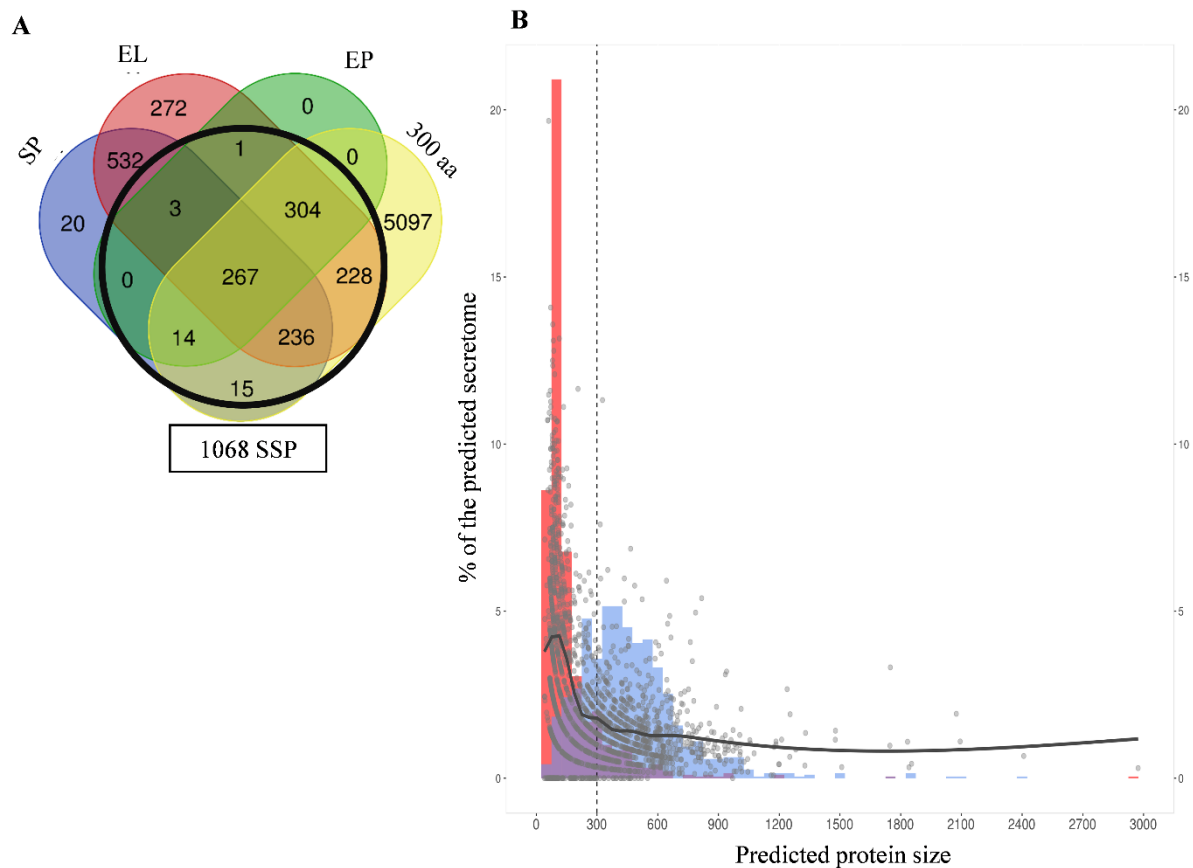


Fig S7. Characteristics of the small secreted proteins (SSP) predicted from the *Leptospira maculans* protein set. (A) Protein features used to predict the SSP repertoire. The Venn diagram contains all proteins with no more than one transmembrane domain. The numbers of proteins with a predicted signal peptide (SP, predicted by SignalP), a predicted extracellular localization (EL: predicted by TargetP), a size of less than 300 amino acids (300 aa), and predicted to be SSPs by the EffectorP tool (EP) are indicated. The black circle includes all proteins comprising the SSP repertoire. (B) Relationship between functional annotation, percentage of cysteine residues and protein size of the 1 892 proteins of the *L. maculans* secretome. The predicted secretome includes all proteins with no more than one transmembrane domain, with a predicted signal peptide or a predicted extracellular localization. The percentage of cysteine residues was calculated (gray dot) and the trend line obtained with the GAM function (generalized additive models with integrated smoothness estimation) is plotted to indicate the change of the percent cysteine residues with protein size. The histogram represents the percentage of genes with and without a predicted function, in blue and red, respectively. The dotted line represents the protein size cutoff (300 amino acids) applied to the secretome.

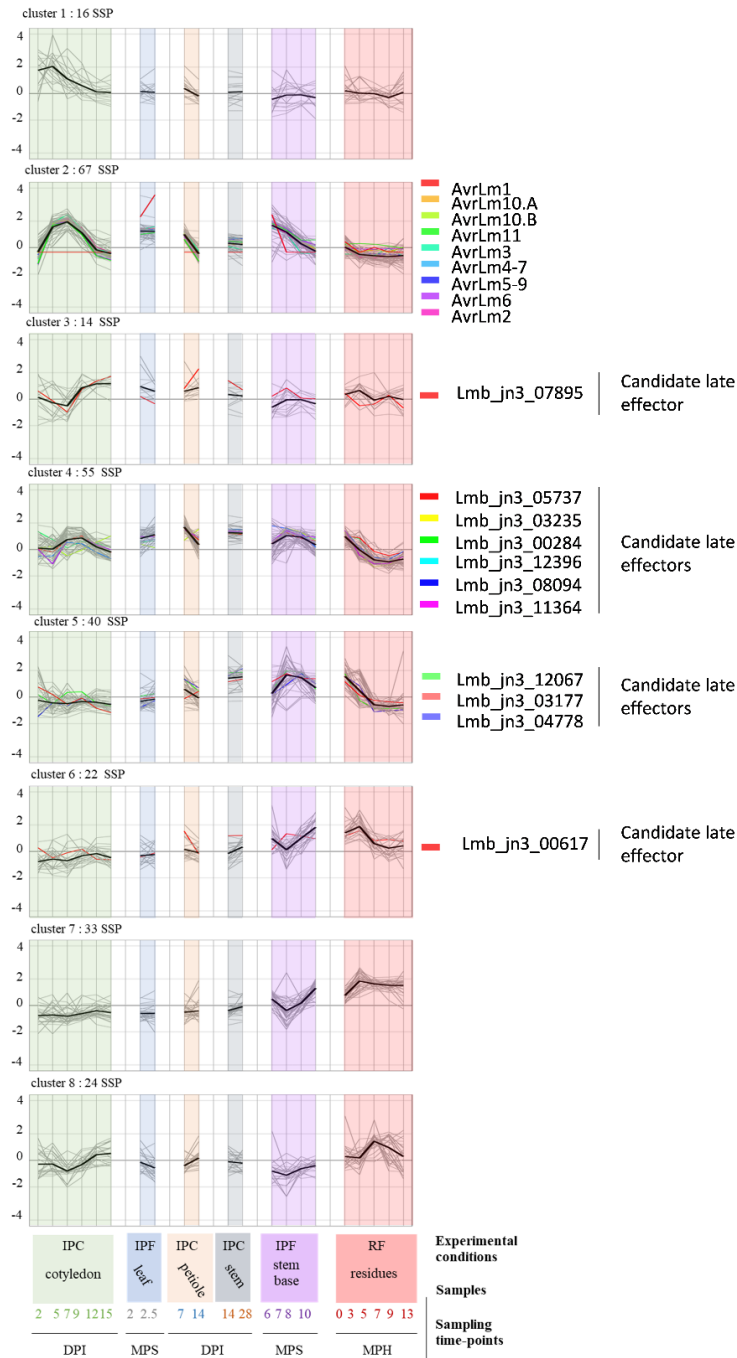


Fig S8. Expression of the 271 small secreted protein-encoding genes upregulated in at least one of the 22 sets of conditions *in planta*. The scaled $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$ expression values for the 271 SSP genes upregulated in at least one set of conditions in planta condition are shown, grouped according to cluster assignment. The distribution and expression of the nine avirulence effector genes (AvrLm), and the eleven late candidate effector genes [14] are highlighted. The mean expression level of the SSP genes in each of the eight clusters is plotted (black bold curve) and the total number of SSP genes in each cluster is indicated. Three sample features are described: (i) the experimental conditions: IPF, *in planta* field conditions; IPC, *in planta* controlled conditions; RF, residues in field conditions, (ii) the type of plant tissue sampled and (iii) the sampling time points (DPI, days post-inoculation; MPS, months post-sowing; MPH, months post harvest).

Table S1. Results of the mapping parameters tested for distinguishing between reads from *L. maculans* and *L. biglobosa*.

Reference mapping genome	RNAseq samples used	Number of mismatch allowed	% of reads mapped on <i>L. maculans</i> (JN3) genome	% of reads mapped on <i>L. biglobosa</i> (G12-14) genome
a. JN3 or G12-14 genomes	<i>In vitro</i> culture of <i>L. maculans</i> (JN2)	0	96.62	0.46
		1	97.27	0.97
		2	97.42	1.63
	<i>In vitro</i> culture of <i>L. biglobosa</i> (G12-14)	0	0.76	95.13
		1	1.54	95.59
		2	2.66	95.69
b. JN3 and G12-14 concatenated genomes	<i>In vitro</i> culture of <i>L. maculans</i> (JN2)	0	96.7	0.04
		1	97.32	0.06
		2	97.45	0.08
	<i>In vitro</i> culture of <i>L. biglobosa</i> (G12-14)	0	0.10	95.15
		1	0.11	95.58
		2	0.12	95.67

^{a.} Reads of the two samples from *in vitro* cultures of either *L. maculans* (isolate JN2) or *L. biglobosa* (isolate G12-14) were mapped independently on the genomes of *L. maculans* (isolate JN3) and *L. biglobosa* isolate G12-14)

^{b.} Reads of the two samples from *in vitro* cultures of either *L. maculans* (isolate JN2) or *L. biglobosa* (isolate G12-14) were both mapped on one artificial genome created by the concatenation of the *L. maculans* (isolate JN3) and *L. biglobosa* (isolate G12-14) genomes.

Table S2. Mapping results for the 102 samples subjected to RNA sequencing on the *L. maculans* and *L. biglobosa* genomes.

ERI Samples accession number	<i>B. rapae</i> cultivar infected or <i>in vitro</i> fungal structure	Plant tissue inoculated or <i>in vitro</i> fungal structure	Fungal species inoculated, <i>L. maculans</i> isolate	* experimental conditions	Sampling time points	Replicates	Total nb. of reads in the library	Absolute read quantities (percent or nb) assigned to <i>L. maculans</i> or <i>L. biglobosa</i> among all the RNAseq library				Cumulated fungal read quantities and relative proportion of <i>L. maculans</i> and <i>L. biglobosa</i>			
								% of reads assigned to <i>L. maculans</i> , isolate JN2 among the total number of reads in the library	Total nb. of reads assigned to the genome of <i>L. maculans</i> , isolate JN2	% of reads assigned to <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14 among the total number of reads in the library	Total nb. of reads assigned to the genome of <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	Nb of reads assigned to <i>L. maculans</i> , isolate JN2 among all the <i>L. maculans</i> + <i>L. biglobosa</i> reads	% of reads assigned to <i>L. maculans</i> , isolate JN2 among all the <i>L. maculans</i> + <i>L. biglobosa</i> reads	Nb of reads assigned to <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14 among all the <i>L. maculans</i> + <i>L. biglobosa</i> reads	% of reads assigned to <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14 among all the <i>L. maculans</i> + <i>L. biglobosa</i> reads
ERS4810094	Bristol	coryledon	<i>L. maculans</i> or <i>L. biglobosa</i> , ascoptes from residues	IPC	24h	1	77183188	4.90E-03	3767	3.00E-04	240	4007	94.01	5.99	
ERS4810095	Bristol	coryledon	<i>L. maculans</i> or <i>L. biglobosa</i> , ascoptes from residues	IPC	48h	1	84368940	6.00E-04	531	2.00E-04	164	695	76.40	23.60	
ERS4810096	Bristol	coryledon	<i>L. maculans</i> or <i>L. biglobosa</i> , ascoptes from residues	IPC	48h	1	85682895	1.10E-03	961	1.00E-03	897	1858	51.72	48.28	
ERS4810097	Bristol	coryledon	<i>L. maculans</i> or <i>L. biglobosa</i> , ascoptes from residues	IPC	24h	2	77063159	6.00E-04	495	4.00E-04	299	794	62.34	37.66	
ERS4810098	Bristol	coryledon	<i>L. maculans</i> or <i>L. biglobosa</i> , ascoptes from residues	IPC	48h	2	95847572	4.70E-03	4470	2.00E-04	196	4666	95.80	4.20	
ERS4810099	Bristol	coryledon	<i>L. maculans</i> or <i>L. biglobosa</i> , ascoptes from residues	IPC	24h	2	97500880	3.00E-04	321	1.00E-04	82	403	79.65	20.35	
SAMEA0686549	Darmor-BZH	coryledon	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	12 DPI	1	71671634	81.04	58085469	0.04	26879	58112348	99.95	0.05	
SAMEA0686549	Darmor-BZH	coryledon	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	12 DPI	1	69422414	81.68	5079381	0.04	25745	5673160	99.86	0.15	
SAMEA0686549	Darmor-BZH	coryledon	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	15 DPI	1	86504338	80.95	70053188	0.04	33119	7305307	99.95	0.05	
SAMEA0686549	Darmor-BZH	coryledon	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	15 DPI	1	5585007	82.65	46162195	0.04	23532	46185727	99.95	0.05	
SAMEA0686549	Darmor-BZH	coryledon	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	2 DPI	1	74105833	3.10	2293844	9.00E-04	694	2294538	99.97	0.03	
SAMEA0686549	Darmor-BZH	coryledon	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	2 DPI	1	52460743	2.06	1532671	1.10E-03	1418	1533472	99.85	0.15	
SAMEA0686549	Darmor-BZH	coryledon	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	5 DPI	1	74849258	1.35	1013318	5.00E-04	386	1013704	99.96	0.04	
SAMEA10415286	Darmor-BZH	coryledon	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	5 DPI	2	82769974	1.65	1368517	9.00E-04	718	1369235	99.95	0.05	
SAMEA0686549	Darmor-BZH	coryledon	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	7 DPI	1	78240411	7.27	5763158	4.50E-03	3540	5768098	99.94	0.06	
SAMEA0686549	Darmor-BZH	coryledon	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	7 DPI	2	88304930	12.24	10885171	7.90E-03	6983	10812154	99.94	0.06	
SAMEA0686549	Darmor-BZH	coryledon	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	9 DPI	1	87000313	52.02	45569791	0.03	22759	45592550	99.95	0.05	
SAMEA10415287	Darmor-BZH	coryledon	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	9 DPI	2	10857108	57.08	40272177	0.03	23888	40297085	99.94	0.06	
ERS4810044	petiole	damorBZH	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	7 DPI	1	84552565	34.45	28746337	0.02	14148	28760485	99.95	0.05	
ERS4810043	petiole	damorBZH	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	14 DPI	1	97757453	10.76	10520496	7.80E-03	7626	10528122	99.93	0.07	
ERS4810045	petiole	damorBZH	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	14 DPI	1	83849396	82.72	69361925	0.04	33407	69395532	99.95	0.05	
SAMEA10415293	stem	Bristol	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	14 DPI	2	137647626	3.08	4240984	1.70E-03	2540	4243324	99.94	0.06	
ERS4810064	stem	Bristol	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	14 DPI	3	79468405	2.44	1942580	1.20E-03	943	1943523	99.95	0.05	
ERS4810065	stem	Bristol	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	14 DPI	4	78954292	2.27	1871269	1.10E-03	878	1872177	99.95	0.05	
ERS4810066	stem	Bristol	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	28 DPI	1	51686632	2.69	1390614	1.20E-03	610	1391224	99.96	0.04	
ERS4810067	stem	Bristol	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	28 DPI	1	11533139	1.05	211021	6.00E-04	685	1211706	99.94	0.06	
ERS4810068	stem	Bristol	<i>L. maculans</i> , JN2	IPC	28 DPI	3	85336327	1.52	1270712	8.00E-04	607	1271489	99.95	0.05	
ERS4822237	leaves	Darmor	natural infection	PF	3 MPP	1	61364647	3.12	193306	0.03	8030	1931136	99.17	0.83	
ERS4822236	leaves	Darmor	natural infection	PF	3 MPP	2	8387485	4.15	3482435	7.00E-03	5847	3488282	99.83	0.17	
ERS4822235	leaves	Darmor	natural infection	PF	3 MPP	3	79646788	2.91	2318226	0.04	30969	2349195	99.88	1.12	
ERS4822240	leaves	Darmor	natural infection	PF	3.5 MPP	1	69596232	8.43	5869771	0.12	81063	5953834	99.59	1.41	
ERS4822239	leaves	Darmor	natural infection	PF	3.5 MPP	2	64354811	5.52	3549486	0.03	19543	3560029	99.45	0.55	
ERS4822238	leaves	Darmor	natural infection	PF	3.5 MPP	3	99459927	6.86	6821917	0.18	17205	6999122	97.47	2.53	
ERS4810022	stem basis	Bristol	natural infection	PF	2 MPP	1	87984673	2.00E-03	1771	2.00E-04	178	1940	99.89	9.13	
ERS4810029	stem basis	Bristol	natural infection	PF	2 MPP	2	14281010	1.40E-03	1453	8.00E-04	640	1793	64.31	35.69	
ERS4810036	stem basis	Bristol	natural infection	PF	2 MPP	3	10082635	2.90E-03	2960	3.00E-04	253	3213	92.13	7.87	
ERS4810030	stem basis	Bristol	natural infection	PF	3 MPP	2	7657108	3.50E-03	2649	1.00E-04	44	2693	98.57	1.43	
ERS4810037	stem basis	Bristol	natural infection	PF	3 MPP	3	83878501	1.40E-03	1187	2.00E-04	183	1370	96.64	13.36	
ERS4810023	stem basis	Bristol	natural infection	PF	3 MPP	1	99380000	4.20E-03	4204	1.00E-04	145	4349	96.67	3.33	
ERS4810024	stem basis	Bristol	natural infection	PF	5 MPP	1	94016675	5.80E-03	5411	6.00E-04	589	8900	90.18	9.82	
ERS4810031	stem basis	Bristol	natural infection	PF	5 MPP	1	84332713	2.84E-02	23934	4.70E-03	5962	29626	90.79	19.21	
ERS4810038	stem basis	Bristol	natural infection	PF	5 MPP	3	80489018	2.70E-03	2179	4.00E-03	3197	5376	40.53	59.47	
ERS4810025	stem basis	Bristol	natural infection	PF	6 MPP	1	83911444	0.08	69762	9.40E-03	7919	77681	89.81	10.19	
ERS4810032	stem basis	Bristol	natural infection	PF	6 MPP	1	75821420	3.11	2280179	8.00E-03	104759	264938	99.52	4.25	
ERS4810039	stem basis	Bristol	natural infection	PF	6 MPP	3	92110823	0.08	77000	8.40E-03	4528	81528	94.45	5.55	
ERS4810026	stem basis	Bristol	natural infection	PF	7 MPP	1	77164785	0.51	391304	0.06	49800	441104	88.71	11.29	
ERS4810033	stem basis	Bristol	natural infection	PF	7 MPP	2	74898729	0.15	114233	0.02	13262	127495	89.60	10.40	
ERS4810040	stem basis	Bristol	natural infection	PF	7 MPP	3	87826456	0.73	573108	5.40E-03	4220	576328	99.27	0.73	
ERS4810027	stem basis	Bristol	natural infection	PF	8 MPP	1	83230039	4.96	4122325	0.76	63511	4757346	86.69	13.31	
ERS4810034	stem basis	Bristol	natural infection	PF	8 MPP	2	89796051	1.64	1473017	0.12	104619	1577636	93.37	6.63	
ERS4810041	stem basis	Bristol	natural infection	PF	8 MPP	3	78008587	10.37	8088309	0.04	27178	811557	99.66	0.34	
ERS4810028	stem basis	Bristol	natural infection	PF	10 MPP	1	57520239	38.25	21999128	1.71	981067	22809195	95.73	4.27	
ERS4810035	stem basis	Bristol	natural infection	PF	10 MPP	2	71290361	30.44	21701794	6.03	4295254	25997048	83.48	16.52	
ERS4810042	stem basis	Bristol	natural infection	PF	10 MPP	3	53866174	39.70	2138280	0.73	392228	2174708	98.20	1.80	
ERS4810020	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	0 MPP	1	81763610	0.12	9137624	0.02	117	9137741	99.97	0.03	
ERS4810021	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	0 MPP	2	71229711	11.39	8113419	0.06	42144	8155653	99.48	0.52	
ERS4810075	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	0 MPP	2	5662814	46.96	2659298	1.09	617770	2721308	97.73	2.27	
ERS4810080	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	0 MPP	3	69245196	17.52	1211204	0.05	5899	1216103	99.70	0.30	
ERS4810081	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	0 MPP	3	69724631	40.16	28002177	0.24	167752	28169929	99.40	0.60	
ERS4810087	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	0 MPP	4	5814435	16.98	9873474	0.05	28778	9903521	99.71	0.29	
ERS4810088	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	0 MPP	4	68004428	18.01	1224815	0.17	114789	12361604	99.07	0.93	
ERS4810069	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	3 MPP	1	7042135	58.35	41337360	0.44	313477	41658837	99.25	0.75	
ERS4810076	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	3 MPP	2	40809001	56.20	22928066	0.47	194026	2318492	99.18	0.82	
ERS4810082	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	3 MPP	3	69228233	39.75	27519103	0.05	32108	2755121	99.88	0.12	
ERS4810089	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	3 MPP	4	51217821	40.85	2992455	0.04	22399	2994384	99.89	0.11	
ERS4810070	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	5 MPP	1	73397234	8.04	5899139	2.97	1614738	7513877	78.51	21.49	
ERS4810077	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	5 MPP	2	57477869	8.18	4700263	1.20	1130845	5811108	80.61	19.39	
ERS4810083	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	5 MPP	3	53731293	17.03	942091	0.05	29471	946762	99.69	0.31	
ERS4810090	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	5 MPP	4	68440252	16.19	11083722	0.07	49672	11133394	99.55	0.45	
ERS4810071	cop residua	Alpaga	natural infection	PF	7 MPP	1	66886895	9.56	6396318	0.03	19203	6415321	99.70	0.30	
ERS															

Table S3. Detection and cluster distribution of PKS and NRPS genes among the 1,207 *Leptosphaeria maculans* genes upregulated in planta.

Gene ID [49]	Cluster assignment	PKS/NRPS annotation ^a	Associated metabolite
Lmb_jn3_11562	cluster 2	PKS	Abscisic acid
Lmb_jn3_03490	cluster 4	NRPS	-
Lmb_jn3_12570	cluster 5	PKS	-
Lmb_jn3_00988	cluster 6	NRPS	Sirodesmin
Lmb_jn3_05348	cluster 6	PKS	Phomenoic acid
Lmb_jn3_06412	cluster 6	PKS	-
Lmb_jn3_11822	cluster 6	NRPS-like	-

^a. PKS and NRPS were annotated by SMURF tool

Table S4. Description and cluster assignment of the 52 genes for which molecular studies have been performed.

Gene name	Gene ID [49]	Protein accession number	Functional annotation	Cluster assignment in this study ^a	Molecular modifications of the gene ^b	Method used ^c	Fungal changes observed <i>in vitro</i> on different targeted traits ^d	Impact of the gene modifications on pathogenicity ^e	References
LmPMA1	Lmb_jn3_00081	CAP70082.1	Plasma membrane ATPase 1	Na	KO or silenced	ATMT / Complementation / RNAi silencing	None	Loss of pathogenicity (no germination on plants)	[32]
SirA	Lmb_jn3_00978	AAB88657	ABC transporter	Na	KO	ATMT	None	nd	[44]
SirP	Lmb_jn3_00988	AAO23333	Nonribosomal peptide synthase 2	cluster 6	KO	ATMT	None	nd	[16,94]
Lema_P056680.1	Lmb_jn3_01051	CBX90634	Glycoside hydrolase family 16	cluster 2	KO	CRISPR-CAS9	None	None	[45]
Pg1	Lmb_jn3_01866	AAF70169.1	Glycoside hydrolase family 28 / Endopolysaccharuronase	cluster 5	WT	Expression quantification by RT-qPCR	nd	nd	[95]
Ipa	Lmb_jn3_02096	ABY83629.1	Unknown	Na	KO	ATMT / Complementation	nd	Increased virulence : enhanced penetration in Arabidopsis	[29]
LmABC1	Lmb_jn3_02169	ABR15506.1	ABC transporter	cluster 4	WT	Heterologous complementation in yeast	Overexpressed in response to phytoalexins or toxins	nd	[96]
Cel2	Lmb_jn3_02194	AAF70171.1	Glycoside hydrolase family 7 / Cellulase	cluster 4	WT	Expression quantification by RT-qPCR	nd	nd	[95]
Lmhk1	Lmb_jn3_02908	AAR99466.1	Histidine kinase	Na	KO	ATMT	None	nd	[94]
Lema_P082980.1	Lmb_jn3_03603	CBX90959.1	Hypothetical protein LEMA_P083130.1	Na	KO	CRISPR-CAS9	None	None	[45]
Thiol	Lmb_jn3_04743	ABBS5459.1	3-ketoacyl- thiolase A	cluster 1	OE	ATMT	Impact on mycelium morphology and germination	Reduced virulence	[29]
Lema_P030640.1	Lmb_jn3_04848	CBX95912.1	Glucose galactose transporter	cluster 2	KO	CRISPR-CAS9	None	None	[45]
LmfFRD	Lmb_jn3_05070	ACS92459.1	IFRD domains-containing	Na	KO	ATMT / Complementation / RNAi silencing	Slower germination	Loss of pathogenicity	[36]
Icl1	Lmb_jn3_05078	AAM89498.1	Isocitrate lyase	Na	KO	Protoplast transformation	Unable to metabolise acetate and fatty acids	Reduced virulence; Complementation only partially restored the WT phenotype	[46]
LmGpi15	Lmb_jn3_05085	CAP19625.1	Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase	Na	KO or silenced	ATMT / Complementation / RNAi silencing	Growth reduced by 40%	Reduced virulence	[33]
LmSNF1	Lmb_jn3_05157	AAD43341	Serine threonine kinase SNF1p	Na	KO	Protoplast transformation	Slower growth, lower number of pycnidia, lower germination rate	Loss of pathogenicity	[30]
Nth1	Lmb_jn3_05204	AAM92143	Glycoside hydrolase family 37 / Neutral trehalase	Na	KO	Protoplast transformation	None	None	[97]
C6TF	Lmb_jn3_05347	XP_003844957	Transcription factor in the phenolic acid biosynthesis gene cluster	Na	silenced	RNAi silencing	nd	None	[43]
PKS2	Lmb_jn3_05348	XP_003844958	PKS in the phenolic acid biosynthesis gene cluster	Na	silenced	RNAi silencing	nd	None	[43]
LmABC2	Lmb_jn3_05560	ABR15507.1	ABC transporter CDR4	Na	nd	complementation in yeast and expression quantification by qPCR	Overexpressed in response to phytoalexins or toxins	nd	[96]
Lema_P120090.1	Lmb_jn3_06198	CBX94518.1	FAD NAD(P)-binding domain containing	cluster 2	KO	CRISPR-CAS9	None	None	[45]
Lema_P117020.1	Lmb_jn3_06495	CBX94518.1	Glycosyltransferase family 34	cluster 1	KO	CRISPR-CAS9	None	None	[45]
StuA	Lmb_jn3_06662	E5AD52	Transcription factor	Na	silenced	RNAi silencing	None	Loss of pathogenicity	[35]
Ugt51E1	Lmb_jn3_07133	AAM81359.1	UDP-glucose : sterol glucosyltransferase	Na	KO	Protoplast transformation	None	None	[97]
Lema_P006160.1	Lmb_jn3_07241	CBY01829.1	Predicted protein	Na	KO	CRISPR-CAS9	None	None	[45]
Lema_P122320.1	Lmb_jn3_07285	CBX94253.1	Like cupin	cluster 2	KO	CRISPR-CAS9	None	None	[45]
Lema_P034100.1	Lmb_jn3_08015	CBX93736.1	Glycoside hydrolase family 28	cluster 4	KO	CRISPR-CAS9	None	None	[45]
LmEpi	Lmb_jn3_08124	CAQ03441.1	UDP-glucose 4-epimerase	Na	KO	ATMT / Complementation / RNAi silencing	None	Loss of pathogenicity	[34]
Lema_P043000.1	Lmb_jn3_08903	CBX93399.1	DUF946 domain-containing	cluster 3	KO	CRISPR-CAS9	None	None	[45]
Maa1	Lmb_jn3_09218	AAO49458.1	Acetyl- synthetase / NRPS-like	Na	KO	Protoplast transformation	None	None (cotyledons and stem assay)	[98]
Znr1	Lmb_jn3_09221	AAO49457.1	Zn-II 2Cys6 regulatory	Na	KO	Protoplast transformation	None	None (cotyledons and stem assay)	[98]
Chl	Lmb_jn3_09940	AAF66098.1	Cyanide hydratase	Na	WT	Expression quantification by RT-qPCR	induced strongly by potassium cyanide	nd	[95]
Lema_P070100.1	Lmb_jn3_10047	CBX91502.1	Carbohydrate-binding module family 50	cluster 2	KO	CRISPR-CAS9	None	None	[45]
sit4	Lmb_jn3_10159/Lmb_jn3_10160	CBX91641.1	Extragenic suppressor of kinetochore 1 / sacrase ferredoxin domain containing	Na	KO	ATMT	Reduced growth rate	Reduced pathogenicity	[100]
Cel1	Lmb_jn3_10344	AAF70170.1	Glycoside hydrolase family 7 / cellulase	cluster 7	WT	Expression quantification by RT-qPCR	nd	nd	[95]
LopB	Lmb_jn3_10600	AAP40632.1	Unknown	Na	KO	Protoplast transformation	None	Reduced pathogenicity	[31]
Lema_P123340.1	Lmb_jn3_11402	CBX94182.1	Flavin-containing superfamily amine oxidase	cluster 4	KO	CRISPR-CAS9	None	None	[45]
PKS5	Lmb_jn3_11562	XP_003843013	PKS in the ABA biosynthesis gene cluster	cluster 2	KO	CRISPR-CAS9	None (but needed to produce ABA <i>in vitro</i>)	None	[27]
ab11	Lmb_jn3_11563	XP_003843015	CytP450 in the ABA biosynthesis gene cluster	cluster 2	KO	CRISPR-CAS9	None (but needed to synthesise ABA <i>in vitro</i>)	None	[27]
ab17	Lmb_jn3_11565	XP_003843017	Transcription factor in the ABA biosynthesis gene cluster	cluster 2	OE	ATMT	Overproduction of ABA	None	[27]
Sp1	Lmb_jn3_12067	AAM3130.1	Eliciting plant response	cluster 5	KO	Protoplast transformation	None	None	[101]
DIM-5	Lmb_jn3_09141	CBX92341.1	SET domain-containing	Na	silenced	RNAi silencing	Reduced growth rate	None	[37]
HP1	Lmb_jn3_12532	CBX96122	Chromo domain-containing	Na	silenced	RNAi silencing	Reduced growth rate	Reduced pathogenicity	[37]
AvrLm4-7	Lmb_jn3_03262	CAQ53119.1	ACHain Structure Of A Fungal	cluster 2	natural isolate lacking the targeted genes	Complementation by ATMT	None	Reduced ROS production, salicylic acid and jasmonate gene marker expression / Gain of pathogenicity on <i>Rlm4</i> and <i>Rlm7</i> , reduced pathogenicity on susceptible plants	[22,48]
AvrLm6	Lmb_jn3_07862	CAJ90695.1	m6	cluster 2	natural isolate lacking the targeted genes	Complementation by ATMT	None	Gain of pathogenicity on <i>Rlm6</i>	[35]
AvrLm1	Lmb_jn3_13126	CAJ29326.1	Unknown	cluster 2	natural isolate lacking the targeted genes	nd	None	Gain of pathogenicity on <i>Rlm1</i> / interaction with a <i>B. napus</i> MPK9 resistance gene	[21,47]
LmCys1 / AvrLm2	Lmb_jn3_11454	ADU04158	Six1 effector	cluster 2	natural isolate lacking the targeted genes	Complementation by ATMT	None	Loss of pathogenicity	[20]
AvrLm3	Lmb_jn3_00001	ALS92799.1	Unknown	cluster 2	natural isolate lacking the targeted genes	Complementation by ATMT	None	Gain of pathogenicity on <i>Rlm3</i> ; reduced pathogenicity on susceptible cultivars	[24]
AvrLm1J-5-9	Lmb_jn3_10106	AHB63016.1	Avirulence 1 precursor	cluster 2	natural isolate lacking the targeted genes	Complementation by ATMT	None	Gain of pathogenicity on <i>B. Juncea</i>	[19,25]
AvrLm10.A	Lmb_jn3_07874	QBL54612.1	Unknown	cluster 2	natural isolate lacking the targeted genes	Complementation by ATMT	None	Gain of pathogenicity on <i>B. nigra</i> and <i>B. napus-Rlm10</i> ; increased lesion size on susceptible <i>B. napus</i> cultivars	[23]
AvrLm10.B	Lmb_jn3_07875	QBL54613.1	Secreted in xylem partial	cluster 2	natural isolate lacking the targeted genes	Complementation by ATMT	None	Gain of pathogenicity on <i>B. nigra</i> and <i>B. napus-Rlm10</i>	[23]
AvrLm11	Lmb_jn3_12994	CBX90019.1	Unknown	cluster 2	natural isolate lacking the targeted genes	nd	None	Gain of pathogenicity on <i>Rlm11</i>	[17]

Table S5. Characteristics of the 1,070 genes encoding small secreted proteins (SSP).

The table S5 is available at :

<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2020/11/23/2020.10.13.331520/DC22/embed/media-22.xlsx?download=true>

Table S6. Comparison of protein features and genomic localization between the small secreted protein (SSP) repertoire predicted from v2 genome annotation relative to the whole gene set with those obtained for the previously predicted SSP repertoire.

	Predicted SSP on the v2 genome	All proteins	SSP repertoire in [26]
Total number of proteins	1070	13047	651
Average coding sequence size (AA)	139.81	392.33	155.90*** ^c
Cysteine composition (%)	3.51	1.98 *** ^a	3.10** ^d
Genes in AT-rich regions (%)	6	1.70 *** ^b	8.70* ^e
Proteins with a predicted function (%)	25	58.58	13

^{a,b} Results of the statistical comparisons made on cysteine percent and proportion of genes localized in AT-rich regions between the whole protein set and the predicted SSP set with a student and a Chi-square test respectively. Asterisks indicate a significant enrichment in cysteine and in gene localized in AT-rich region is detected in the new predicted SSP set. *** : p-value < 0.001, **: p-value < 0.01.

^{c,d,e} Results of the statistical comparisons made on CDS size, cysteine percent (with a student test) and on the proportion of genes localized in AT-rich regions (with a Chi-squared test), between previously published [26] and the SSP repertoire predicted in the current study. Asterisks indicate a significant reduction in SSP protein size, a significant increase in cysteine percent, and a significantly lower proportion of genes localized in AT-rich region in the newly predicted SSP set. *** : p-value < 0.001, **: p-value < 0.01, * p-value < 0.05.

Table S7. Genes with more than 10 reads in (A) at least one of the four replicates of samples at 24 h or 48 h after ascospore ejection on cotyledons (B) at least one of the nine replicates from the three samples of stem base tissues at 2, 3 or 5 months post sowing.

A

Gene categories	Non-SSP	SSP
Total number of genes with a count > 10 reads ^a	55	31
No of genes showing no differential expression ^b	33	2
No of genes over-expressed during the infectious cycle and their cluster assignments ^c :	22	29
cluster 1	0	1
cluster 2	6	26 (including 7 <i>AvrLm</i> genes)
cluster 3	0	1
cluster 4	2	0
cluster 5	0	0
cluster 6	0	1
cluster 7	5	0
cluster 8	9	0

B

Gene categories	Non-SSP	SSP
Total number of genes with a count > 10 reads ^a	331	62
No of genes showing no differential expression ^b	278	11
No of genes over-expressed during the infectious cycle and their cluster assignments ^c :	53	51
cluster 1	6	2
cluster 2	27	40 (including 6 <i>AvrLm</i> genes)
cluster 3	2	2
cluster 4	8	3
cluster 5	9	4 (including one late effector)
cluster 6	0	0
cluster 7	1	0
cluster 8	0	0

^a Total number of genes with a count > 10 reads in at least one of the replicates at 24h or 48h post infection by ascospores

^b No of genes absent from the set of 1,207 genes over-expressed in one of the 22 analyzable conditions compared to the ten *in vitro* conditions

^c No of genes present in the set of 1,207 genes over-expressed in one of the 22 analyzable conditions compared to the ten *in vitro* conditions, and their cluster assignment (cluster 1 to cluster 8).

Table S8. Conservation of the protein sequences encoded by highly co-expressed SSP genes.

Assignment to wave	^a . Total no of highly co-regulated SSP genes	^b . No of known effectors in <i>L. maculans</i>	^c . No of SSP without homologous protein in the non-redondant protein NCBI database
Wave 1	1	-	-
Wave 2	39	7	23
Wave 3	0	-	-
Wave 4	20	3	12
Wave 5	7	2	2
Wave 6	5	0	1
Wave 7	23	0	2
Wave 8	1	-	-

^a. Number of SSP genes detected as highly correlated with each reference expression wave

^b. Number of *AvrLm* effectors and *LmSTEE* effectors detected as highly correlated with each reference expression wave

^c. Number of SSP sequences with no homology after a BLAST search

S1 Text. Characteristics of biological and RNA samples.

The RNA sequencing dataset represents a highly heterogeneous series of RNA samples that confronted us with two challenges: (i) discrimination of *L. maculans* reads from those of the plant and, mostly, those of other fungal species present at the same time during infection of the plants in agricultural settings, of which the most challenging was *Leptosphaeria biglobosa*, a closely related species to *L. maculans* always associated with it in the wild, (ii) variable amounts of *L. maculans* reads in the samples that may preclude statistical analyses.

(i) Because *L. maculans* belongs to a species complex together with *L. biglobosa*, the field-infected samples, or cotyledons infected with ascospores ejected from “wild” pseudothecia differentiated on residues from the field, are expected to contain both species. *L. biglobosa* was used as a template to design a mapping protocol minimizing wrong assignments and mapping biases (S1 Table). Eventually, our choice was to align reads of all RNAseq samples on the two concatenated genomes in a one-step mapping with two mismatches allowed. These parameters allowed us to reduce the percentage of reads of *L. maculans* wrongly assigned to *L. biglobosa* to 0.008% of the reads (S1 Table).

(ii) The amount of reads obtained per sample ranged between 16 M and 137 M, with RNAseq samples corresponding to axenic growth (i.e., only consisting of *L. maculans* reads) ranging between 16 M and 25 M reads, and those corresponding to interaction with the plant ranging between 41 M and 137 M reads (S2 Table). The number of reads assigned to *L. maculans* in the samples was very variable, and in some cases insufficient to be submitted to statistical analyses. This mainly regarded infection of cotyledons with ascospores from the field, with less than 0.01% of the reads that were assigned to *L. maculans*, and the earliest samplings of stem bases of plants naturally infected in the field (November to February samplings, two to five months post-sowing - MPS) in which the quantity of reads assigned to *L. maculans* was very low and ranged from 1153 reads (0.002%) to 23 934 reads (0.028%) (S2 Table). These samples were discarded for the statistical analyses, but they showed that the stem base colonization begins early in the plant development, and that the fungus shows a steady increase of transcriptomic activity bursting at the end of winter. The active presence of *L. maculans* on residues leftover for more than one year was obvious on all residues, but, again the number of reads attributed to *L. maculans* was highly variable, roughly ranging between 0.18% and 58% of the sample libraries. On an inert substratum, devoid of living plant material (and RNA reads from the plant) this confirms the presence of a dynamic community of Eukaryote microbes [55].

In conclusion, 87 samples showed a percentage of reads assigned to *L. maculans* ranging between 0.08% and 87.01% and were useable for statistical analyses. These corresponded to 32 different conditions.

S2 Text. Reproducibility between replicates.

Variability between replicates was analysed with a PCA approach and indicated consistency between replicates in most of the samples (S1 Fig). The highest variability was detected between replicates from asymptomatic field-infected stem bases (S1A Fig) or crop residues (S1C Fig) probably linked to numerous environmental factors causing transcriptomic variability from one replicate to another or variable intensity of fungal colonization from one plant to the other. One series of *in vitro* growth conditions, those promoting differentiation of pycnidia and/or pseudothecia, also showed some variability between replicates (S1D Fig) that may reflect lack of synchronicity from one sample to the other in the differentiation processes.

S3 Text. Generation of a new repertoire of small secreted proteins considered as candidate effectors.

The secretome of *L. maculans*, defined as proteins with (i) at most one transmembrane domain (predicted by TMHMM) and (ii) a predicted signal peptide (predicted by SignalP) or a predicted extracellular localization (predicted by TargetP) encompassed 1,984 predicted proteins in the v2 genome and annotation recently published by Dutreux et al. [49]. Along with abundance of cysteine residues, and scarce homologies in databases, a size cut-off is often applied to refine the secretome in candidate effectors, but the relevance of this criterium has sometimes been questioned in the literature. Here, we applied a size cut-off of 300 amino-acid, resulting in a set 1,064 small secreted proteins (SSP) (S7A Fig).

To question and assess the impact of this size cut-off, we analysed the percentages of cysteine residues and of predicted function in the whole predicted secretome depending on protein size (S7B Fig). The cut-off at 300 amino-acid discarded 73% of genes with a functional annotation and kept a set of proteins with a significant enrichment in cysteine residues compared to the whole secretome.

EffectorP, used on the whole secretome, predicted that 596 proteins of the secretome are effector candidates of which 592 are among the 1,064 SSP identified with the 300 AA size cut-off and only four are larger than 300 AA (S7A Fig). These four proteins were added to the 1,064 to generate the new repertoire containing containing 1068 proteins (S7B Fig). This set contained all known *AvrLm* genes, but two of the eleven late effectors analysed by Gervais et al. [14] were discarded because they did not match all the criteria and they were manually added to the SSP set leading to a final repertoire of 1,070 genes. The results of each tool used to create the SSP repertoire as well as other features such as the corresponding gene annotation in v1 annotation [26], the genomic localization, the functional annotation, the number of cysteine residues and the *AvrLm* gene Id. are detailed in S5 Table. This repertoire is enriched in genes located in AT-rich regions (S6 Table).

S4 Text. Comparison between the v1 and v2 versions of gene model annotations.

Changes in genome assembly and gene annotations between 2011 and 2018 (Rouxel et al., 2011; Dutreux et al. [49]) showed drastic changes in the gene repertoire: while 88.3% (11,154) of the genes of v1 annotation showed at least one overlap with genes of v2, only 59% had a unique overlap and 29.2% were merged or splitted in the v2 annotation. In addition 11.7% of gene models of v1 had no correspondence with the v2 annotation while 1,905 genes of v2 were absent from the previous annotation. Due to these changes in gene annotation, we generated a new repertoire of candidate effectors.

S5 Text. Genes expressed when ascospores colonize the plant tissues or when the fungus is dormant in the stem.

Among the 37 conditions from which RNA samples were obtained, five were discarded from statistical analyses due to the low amount of fungal material leading to insufficient number of *L. maculans* reads. They corresponded (i) to ascospore germination and growth on cotyledons after 24 and 48h of putative ejection of the ascospores, and (ii) to oilseed rape stem bases collected in the field 2, 3 and 5 months after sowing, i.e. during the winter period.

We nevertheless tried to take advantage of these data to identify whether these genes could be assigned to one or the other wave of expression. For germinating ascospores, only 86 genes

showed more than 10 RNAseq reads in one or the other sample (S7 Table) and 51 of them were found in one of the expression clusters. The majority, 32 genes (60.7%), were included within cluster 2, 83.8% of them being SSP genes of cluster 2 (including *AvrLm3*, *AvrLm4-7*, *AvrLm5*, *AvrLm6*, *AvrLm10A*, *AvrLm10B* and *AvrLm11*). Twenty-seven% of the genes were included within clusters 7 or 8. Interestingly, these latter corresponded exclusively to genes detected 24 h after ascospore inoculation while genes of cluster 2 were exclusively found in samples from 48 hpi. Similarly, in samples from stem bases, 41, 50 and 394 genes showed more than 10 RNA-Seq reads in one or the other replicate for November (3 MPS), December (4 MPS) and February (6 MPS), respectively. 104 (26.2%) of these genes were included in the expression clusters (S7B Table), and mostly belonged to cluster 2 (67 genes including 40 genes encoding SSPs, including *AvrLm2*, *AvrLm3*, *AvrLm4-7*, *AvrLm5*, *AvrLm6*, *AvrLm10A*, *AvrLm10B* and *AvrLm11*).

S6 Text. Additional material and methods.

***In vitro* culture**

For the mycelial state on solid medium, the fungus was cultivated on V8-agar plates. A plug of an actively growing culture was placed on the centre of 9 cm diameter V8-agar Petri dishes. The plates were sealed with Parafilm and were incubated at 25°C in the dark. After 7 days of growth the aerial mycelium was collected with a spatula and immediately frozen with liquid nitrogen in an Eppendorf tube. The mycelia from a minimum of three plates were pooled in one sample, and mycelia harvested from two independent experiments were submitted to RNA sequencing.

To produce pycnidiospores, the fungus was cultivated on V8-agar plates without Parafilm and under both white light and near-UV light with a 12 hour photoperiod. After 10 days, spores were collected as previously described [71]. The spore suspension from 9 Petri dishes were pooled in 50 mL Falcon tubes and centrifuged for 15 min at 4°C and 2 600 g. The supernatant was discarded and the spores were suspended in 4 mL of sterile water. One mL of this spore suspension was centrifuged similarly in an Eppendorf tube and the pellet was immediately frozen in liquid nitrogen to constitute the “resting spores” sample. For germinating spores, Erlenmeyer containing 20 mL of Fries liquid medium were seeded with the spore suspension at a final concentration of $1.25 \cdot 10^8$ spores.mL⁻¹ and submitted to orbital shaking at 150

rotations.mn⁻¹. After 24 h at 25°C, the germinating spore suspension was centrifuged in a Falcon tube for 7 min at 9000 g, and 4°C, re-suspended in 1 mL of sterile water for a second centrifugation for 5 min at 9000 g in an Eppendorf tube. The centrifugate was immediately frozen and stored at -80°C to constitute the “germinating spores” sample.

Mycelium was also obtained in liquid cultures in Fries liquid medium as previously established [102] after seven days of cultivation.

Sexual mating conditions were obtained as previously described [103]. Briefly, plugs of two isolates of the opposite mating types, JN2 and Nz-T4, were deposited side by side on V8 agar plates. After seven days of cultivation under sporulating conditions, 5 mL of 1.5% water agar were poured over the plates, further sealed with Parafilm and placed at 10-11°C under backlight with a 12h photoperiod. Plates with JN2 only were used as a control. Fungal material on the plates was harvested at days 7 (before pouring the agar overlay), 20 and 35 days of cultivation. For each time point, the fungal material (mix of mycelium, pycnidia and maturing pseudothecia) of 10 plates were recovered using a spatula and pooled in one Eppendorf tube, immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C.

Cotyledon inoculations and sampling

Cotyledons of 10 day-old plants of cv. *Darmor-bzh* were inoculated as described previously [76]. Briefly, 48 seeds were sown per tray (4 rows of 12 plants) and 12-15 days old plantlets were inoculated. Ten µL droplets of 10⁷ conidia.mL⁻¹ suspension were deposited on the centre of each half-cotyledon previously punctured with a needle. Plants were maintained in the dark and saturating humidity at room temperature for 48 hours then maintained in growth chambers at 16°C (Night)/24°C (Day) with a 16 hours light photoperiod. Control plants were mock-inoculated with sterile deionized water. Samples for RNA-Seq were recovered at day 0 (with or without wound), 2, 5, 7, 9, 12, 15 and 17 after inoculation. At each time-point, eight cotyledons from eight different plants were randomly selected on the trays. The plant tissues around the inoculation were cut with a 10 mm disposable punch and the 16 corresponding samples were pooled together in a sterile Falcon tube, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until extraction. At each time point, two replicates were recovered and the whole experiment was repeated once. At each time point and repeat, mock-inoculated samples were recovered similarly.

Petiole inoculation and stem sampling

Plants were sown in individual pots (9 * 9* 9.5 cm) in commercial Falienor substrate (65% Irish blond peat, 20% Baltic black peat, 15% perlite, 2% Danish clay) and grown in a growth chamber (16h of light at 18°C at 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 8h of dark at 15°C) for three weeks before inoculation. When the plants were at the three-leaf stage, the petiole of the second leaf was cut 0.5 cm from the stem. 10 μL of inoculum (conidia at 10^7 spores.mL⁻¹) or 10 μl of sterile water for mock inoculation were applied on the petiole section. The plants were kept in darkness and high humidity for 36 h and then grown in a growth chamber (16h of light at 20°C at 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 8h of dark at 18°C). Sub-irrigation was performed using the commercial fertilizer preparation Liquoplant Bleu 0.3% (Plantin, France).

Field experiment establishment, disease assessment and sample preparation

In the 2012-2013 assay, the disease incidence (% of plants with at least one phoma leaf spot) was estimated in November 2012 and reached 80%. Disease severity before harvest was estimated on 50 plants using the “G2” rating score as described previously [75]. Only 4% of the plants displayed no stem canker symptom. For 29%, 40%, 22%, and 5% of the plants, the necrotic area represented less than 25%, between 25 and 50%, between 50 and 75% or more than 75% of the stem section area, respectively, showing variable intensity of plant contamination between plants.

The 2013-2014 field experiment was sown in Grignon, France in autumn 2013 (6 September). The two cultivars Darmor-*Bzh* and Bristol were sown in 10 m x 1.75 m plots in duplicates, at a 60 seeds per m² density. Naturally infected stem residues of the susceptible cv. Alpage from the previous cropping season were added over the soil the 19/09/2013 to reinforce the natural inoculum. The disease pressure was measured at two dates in autumn (18/10/2013 and 13/15/11/2013). For that, 2 x 50 consecutive plants per micro plot were observed and each plant was classified in one of the following classes: class 0, no visible phoma leaf spot, class 1, less than 5 leaf spots per plant, class 2, more than 5 leaf spots per plant. At the second rating date, the disease incidence (% of infected plants) reached 92.7% for Bristol and 99% for Darmor-*Bzh*. More than 70% and 90% of the plants of Bristol and Darmor-*Bzh*, respectively, displayed more than 5 leaf lesions per plant. Whole plants were collected from this field at 6 time points for RNA extraction (20/11/2013; 18/12/2013; 13/02/2014; 13/03/2014; 4/04/2014; 14/05/2014, 8/07/2014 i.e. one week before harvest). For each time point and each cultivar, six plants were

collected per micro plot. Plants were washed in the lab with running water and rapidly air dried. Stem section of 1 cm was cut just above the limit between the root and the stem (collar with leaf scars). This piece of stem was then sliced in a sterile Petri dish and the first and last slices were discarded. The central parts of three plants were pooled in one Falcon tube to constitute one sample that was immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C before RNA extraction. For one given cultivar and time point, 4 samples were thus collected but only three were submitted to RNA sequencing. The stem canker severity (G2 rating, [75]) was calculated on the collected plants starting from the April sampling, and then on 60 plants per plot the 20th June 2014.

Young leaves from field sampling

A field experiment was set up in Grignon, France in autumn 2017. The cultivar Darmor was sown the 31/08/2017 along with other varieties, in 8 m x 1.75 m plots in triplicates, at a 60 seeds per m² density. In order to reinforce the natural inoculum of the field, naturally infected stem residues of cv. Alpaga from the previous cropping season were added over the soil the 16/09/2017 at a density of 4 residues per m². The 16/11/2017 typical leaf lesions due to *L. maculans* were visible in more than 60% of the plants. Ten leaves per plot with leaf lesions were harvested. In the lab, leaves were washed with running water, rapidly dried between sterile filter papers. Disks of leaf tissues were cut with a sterilized punch (diameter: 2cm), and classified in three categories: disks without any visible symptoms, disks with atypical symptoms potentially attributable to *L. biglobosa*, and disks with typical leaf lesions. Five leaf discs per category were pooled in a 15 mL Falcon tube. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until extraction. Here, pooled disks from typical leaf lesions only were submitted to RNA-Seq.

Cotyledon infections with ascospores

Stem residues of the cv. Bristol were collected at the end of the 2013-2014 field experiment (see above) and were left outside from July 2014 to March 2015, allowing pseudothecia to differentiate on the stems. Seven days-old plants of Bristol, grown in 5 x 5 cm pots with 10 plants per pot, were transferred in 50x40 cm plastic bowls (24 pots per bowl). Stem residues were rinsed with water, then allowed to dry up again and placed on a metallic grid over the plants (30 residues per bowl). Stem residues were left 24hours over the plants, maintained in the dark with saturated humidity, to allow ascospores to be ejected on the cotyledons. Then the plants were transferred to growth chambers (18-24°C night-day, 16h photoperiod as above). After 24h and 48h, six cotyledons per pot were randomly cut, pooled in one 15 mL tube, frozen

in liquid nitrogen and stored at -80C. The remaining cotyledons were observed for typical leaf lesions one week later. This allowed us to select cotyledons corresponding to pots on which leaf spots, typically due to ascospore due to their rapid development compared to conidia, had developed. Based on this information, cotyledons from 4 neighbour pots on which leaf lesions had developed (i.e., a total of 24 cotyledons) were pooled to produce samples of early stage (24h and 48h) of cotyledon infection with ascospores. Two samples were produced at each time point and the experiment was repeated once.

Annotation of isochores

As for the gene models, the new genome version impacted the boundaries of AT/GC isochores previously defined on the first version of the genome assembly [26]. Contrary to the previous annotation, which was manually curated, an automatic protocol was set up combining Occultercut and post-processed to detect coordinates of isochores. Finally, the genome was divided in 553 regions, among them 290 were AT-rich regions (16.01 Mb, 34.8% genome) and 263 were GC-equilibrated regions (29.96 Mb, 65.2% genome).

Chapitre III. Etude de l'interaction entre *Leptosphaeria maculans* et *Leptosphaeria biglobosa*

Une seconde question que le jeu de données LeptoLife nous permettait d'explorer concernait les modes d'interactions entre *L. maculans* et le second membre du complexe d'espèces généralement associé à *L. maculans in natura*, *L. biglobosa*.

L'hypothèse qu'une interaction biotique interviendrait entre les deux espèces *L. maculans* et *L. biglobosa* durant leur cycle infectieux a été étayée selon différentes approches dans la littérature sans toutefois fournir une description précise de la nature de cette interaction potentielle. Les données épidémiologiques montrent une répartition mondiale quasi-similaire entre les deux espèces (excepté en Asie où seul *L. biglobosa* est détecté) (Fitt et al., 2006b). D'après les analyses moléculaires de détection menées sur des populations naturelles au cours du cycle épidémiologique, il est montré que les deux espèces arborent les mêmes stratégies de colonisation et suivent les mêmes cinétiques d'infection (Jacques et al., 2020 ; West et al., 2001). Les analyses phénotypiques ont montré des différences de symptômes entre les deux espèces durant les deux étapes clés du cycle infectieux les plus étudiées : (i) l'infection précoce durant laquelle *L. biglobosa* présente un mode de vie strictement nécrotrophe et *L. maculans* un mode de vie hémibiotrophe ; et (ii) l'infection tardive du collet où les deux espèces présentent un mode vie nécrotrophe mais au cours de laquelle seul *L. maculans* engendre la « nécrose du collet ».

Pour détecter de potentielles interactions entre les deux espèces, seules deux analyses de suivi des symptômes en conditions de coinfection ont été réalisées (Liu et al., 2007 ; Chen and Fernando, 2006). D'après ces résultats, il a été proposé que *L. biglobosa* aurait un effet inhibiteur (réduction des symptômes de *L. maculans*) lorsqu'il est utilisé en pré-traitement sur la même feuille mais aussi sur des feuilles distantes montrant un effet inhibiteur direct mais aussi indirect (via la réponse de la plante) sur *L. maculans*.

1. Méthodes descriptives de la co-infection du colza par le complexe *L. maculans* / *L. biglobosa*

Nous proposons ici d'approfondir l'étude du comportement de chaque espèce lors de l'infection précoce *via* des analyses transcriptomiques, symptomatologiques et de

quantifications de biomasses en conditions d'infections individuelles ou de coinfections sur cotylédons de colza.

Le jeu de données RNA-Seq, disponible avant mon arrivée en thèse, offre l'opportunité de décrire la dynamique transcriptomique chez *L. maculans*, chez *L. biglobosa* mais aussi chez la plante hôte (analyses transcriptomiques réalisées chez le colza en étroite collaboration avec les partenaires du projet LeptoLife à INRAE de Rennes (R. Delourme, A. Gravot)). Dans ces différentes conditions. L'analyse transcriptomique représente une grande partie des résultats de mon deuxième article qui compose ce chapitre. J'y détaille dans un premier temps le comportement transcriptomique de *L. biglobosa* lors de l'infection des cotylédons, puis j'y présente les changements transcriptomiques induits chez les deux espèces fongiques mais aussi ceux induits chez la plante hôte en conditions de coinfection. En parallèle, j'ai réalisé des quantifications de biomasse fongique et des observations macro- et microscopiques sur ces mêmes conditions d'infection et de coinfection amenant à une analyse intégrée et complète de cette interaction tri-partite.

La compilation des résultats issus de ces différentes approches révèle une forte cohérence entre les phénotypes observés et l'expression des gènes dans les différentes conditions appuyant ainsi la fiabilité des résultats obtenus. Nous avons alors pu établir des hypothèses sur le type d'interaction qui intervient au sein du complexe dans ces conditions de coinfection en conditions contrôlées.

Enfin, suite à ces premières analyses, j'ai réalisé de nouveaux tests *in vitro* et *in planta* en modifiant certains paramètres (concentration des inoculum, inoculations séquentielles) dans le but de tester la stabilité de l'interaction initialement détectée. Lors de ces tests, les analyses phénotypiques ont mis en évidence que le développement de *L. maculans* varie selon les paramètres d'inoculation. Ces résultats permettent d'affirmer que cette interaction est dynamique, qu'elle n'est pas figée et qu'elle dépend des conditions de traitement comme cela pourrait être le cas en conditions naturelles.

2. Article 2

Title : Antagonistic interactions between the two phytopathogens *Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa*: only a question of location and timing

Authors : Elise J. Gay ¹, Noémie Jacques¹, Nicolas Lapalu ¹, Corinne Cruaud ², Valerie Laval¹, Thierry Rouxel ¹, Marie-Hélène Balesdent ¹.

¹Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR BIOGER, 78850 Thiverval-Grignon, France.

²Genoscope, Institut François Jacob, CEA, Université Paris-Saclay, Evry, France.

ABSTRACT

Leptosphaeria maculans ‘brassicae’ (Lmb) and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb) are two fungi infecting rapeseed (*Brassica napus*) and belong to a species complex. They are found together, coinfecting rapeseed throughout the whole plant life, from the early stage of infection on leaves to the final necrotic stage at the stem base and survival on plant residues. Lmb has a hemibiotrophic lifestyle on leaves and causes the basal stem canker. Lbb is considered as a strict necrotroph on leaves and stems and causes less severe stem lesions than Lmb. Previous studies have suggested that Lbb could limit the early colonisation of Lmb during coinfection and consequently, decrease the incidence and damages caused by Lmb. However, this potential interaction is still poorly understood at the molecular level. Here we took advantage of RNA-Sequencing technology to decipher the role of the three partners (including the plant host) during a two-week kinetics of coinfections on cotyledons in controlled experiments. Fungal biomass quantifications and fungal development monitoring provided complementary approaches to get an integrative overview of this tri-partite interaction. We demonstrated that during simultaneous co-infection by both species, Lmb was strongly impacted in its transcriptomic dynamics and its development *in planta*: in the presence of Lbb, Lmb cannot initiate the biotrophic part of its cycle required for massive mycelium increase prior to sporulation and systemic colonization of tissues. In contrast, Lbb was unaffected by the presence of Lmb. The response of the host to Lmb or Lbb individually confirmed the hemibiotrophic or necrotrophic behaviour of each species while, during coinfection, the plant responded to the mixed inoculum identically to the response to Lbb alone. However, the drastic inhibition of Lmb growth by the presence of Lbb strongly depended on the Lbb inoculation parameters. Whether due to competition for trophic resources, to the generation by Lbb of an environment unsuitable for the lifecycle of Lmb or/and to the effect of plant defense responses induced by Lbb on Lmb, the final result is that Lmb is blocked early in the setting up of its pathogenicity program.

INTRODUCTION

Arable crops are submitted to major fungal diseases usually studied as a bi-partite interaction between a fungal pathogen and its host. However, plants can be co-infected by multiple pathogens in different tissues or at different stages of the plant growth. When coinfection is caused by closely related species, they are defined as ‘species complexes’ (Tollenaere et al., 2016 ; Taylor et al, 2000). They are extensively studied in bacterial or viral (Tollenaere et al., 2016) diseases but still poorly investigated in the field of fungal diseases. Yet, several fungal pathogens causing major plant diseases belong to species complexes (Ex : *Fusarium* spp (Coleman, 2016), *Colletotrichum* spp (Baroncelli et al., 2017), *Magnaporthe* spp (Zhang et al., 2016)).

In this paper, we define species complexes as closely related species coinfecting the same host at the same time and involved in the same disease symptoms. For instance, the causal agents of the Ascochyta blight disease in pea, *Mycosphaerella pinodes* and *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (May et al., 2009), the causal agents of eyespot disease of wheat *Oculimacula yallundae* and *O. acufiformis* (Walsh et al., 2005), or the *Erysiphe* pathogenic complex, responsible for powdery mildew on oak (Mougou-Hamdane et al., 2010) are species complexes which meet these criteria.

The fact that species belonging to species complexes coexist intimately within their host suggests that potential fungal-fungal interactions or a multi-partite fungi-host interaction could occur and impact the final disease severity. It has been shown that interactions between pathogens, in general, or in some cases within species complexes, can take various forms like synergism (Lamichhane and Venturi, 2015), lower overall virulence, or the direct/indirect promotion of one species over another (Tollenaere et al., 2016; Fitt et al., 2006a).

Molecular screenings on natural populations revealed various interaction types in the *Fusarium* species complex comprising synergism or indirect competition as shown by the significant co-occurrence of the two members *F. graminearum* and *F. culmorum* in Poland (Kuzdraliński et al., 2014) or the opposite occurrence between *F. graminearum* and *F. poae* species on a heat/humidity gradient (Xu et al., 2007). Deciphering the multiple factors influencing the interactions is usually helped by controlled inoculations such as concomitant or sequential coinfections on local or distant tissues in varying abiotic conditions. Different types of interactions between *M. pinodes* and *P. medicaginis* var. *pinodella* were thus highlighted depending on the order of species inoculation on pea (May et al., 2009). Indirect interactions, through the plant responses, were also demonstrated in several cases revealing that plant

responses can promote or inhibit one species over another. For instance, pre-inoculation of wheat by a non-pathogenic strain of *F. graminearum* inhibits the subsequent infection of a strain that was initially virulent on the variety tested (Ravensdale et al., 2014). On the contrary, some species activate defense pathways that limit new coinfections as observed for many beneficial organisms and particularly in symbiotic organisms (Van der Ent et al., 2009).

Another widely studied example is the *Leptosphaeria* species complex, the causal agents of stem canker disease on *Brassica napus*. Phenotypic and genomic analyses discriminated two species in this complex: *Leptosphaeria maculans* corresponding to the major actor of the stem canker disease and *Leptosphaeria biglobosa* which causes less severe lesions on stem (Fitt et al., 2006b; Shoemaker and Brun, 2001). Later on, more sub-groups, now considered as distinct species, were identified both in *L. maculans* (2 subclades) and *L. biglobosa* (seven subclades; Mendes-Pereira et al., 2003; Grandaubert et al., 2014). Here, we focus on *L. maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and *L. biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb), the only two subclades of the complex found in France to date.

Both species coexist on their host all along the oilseed rape life cycle; from the seedling stage in autumn where the primary leaf infection takes place to the adult stage in spring when the stem canker appears under European conditions (Jacques et al., 2020; West et al., 2001). During the early infection stage on leaves, Lmb has a hemibiotrophic lifestyle whereas Lbb is considered as a strict necrotroph. Then during several months (from autumn to spring) both fungi are known or hypothesized to migrate from the leaves to the stems with an endophytic/asymptomatic behaviour, as shown in controlled experiments (Eckert et al., 2005; Howlett et al., 2001; Hammond and Lewis, 1987). At the end of the spring, they both harbour a necrotrophic lifestyle and cause necrotic lesions on the stem, with Lmb causing the stem canker disease at the crown whereas Lbb causes less severe and upper lesions (Fitt et al., 2006b).

In natura, several studies based on symptom quantification hypothesized that *L. biglobosa* competes and limits the incidence of *L. maculans* (Chen and Fernando, 2006; Liu et al., 2006), while other studies, based on biomass quantifications, did not confirm the negative correlation between both species on leaf or stem samples over two years of monitoring (Jacques et al., 2020). Such studies are faced with large variability in the proportion or occurrence of the different members of the complex in time (within and between growing seasons (Jacques et al., 2020)) or in space (regional variations (Dawidziuk et al., 2012; Stonard et al., 2010)). However, previous co-infection tests under controlled conditions substantiated the occurrence of a competitive interaction and suggested that both direct and indirect interactions occur between

the two species. A pre-inoculation on the same leaf (direct interaction) or on different leaves (indirect interaction) by *L. biglobosa* spp ('brassicae' and 'canadensis') reduced significantly the size of lesions caused by Lmb (Liu et al., 2007; Chen and Fernando, 2006; Liu et al., 2006; Mahuku et al., 1996). The mechanisms underlying the limitation of Lmb symptoms during coinfection are still unknown.

Transcriptomic approaches offer the possibility of dissecting gene expression in samples containing several organisms simultaneously. It also provides a global view of expression changes, without *a priori*, when the molecular determinants of the observed interaction are unknown. For instance, it has been shown that the activation of genes encoding proteins involved in plant defense responses is probably involved in the antagonistic interaction observed between *Macrophomina phaseolina* and an arbuscular mycorrhizal fungi (Marquez et al., 2018). Also, the co-infection of two fungal antagonists, *Pseudozyma flocculosa* and *Blumeria graminis* on barley was analysed by transcriptomics and revealed a complex tri-partite interaction. From these data, the authors were able to develop an interaction model involving the three protagonists: *P. flocculosa* effectors could have a deleterious effect on the development of *B. graminis* haustoria, which could then deregulate the plant's response to the benefit of *P. flocculosa* (Laur et al., 2018).

The complex life cycle of Lmb was widely described by transcriptomic approaches during leaf infection (Gay et al., 2020; Becker et al., 2017; Haddadi et al., 2016; Sonah et al., 2016), and during other stages of the infection cycle (Gay et al., 2020; Gervais et al., 2017). Only one transcriptomic analysis concerned *L. biglobosa* and aimed to compare leaf infection by Lmb or by Lbc (*L. biglobosa* 'canadensis'). This study confirmed the necrotrophic lifestyle of Lbc by deciphering its transcriptomic activity. In addition, plant response to Lmb and Lbc species individually displayed the typical response to hemibiotrophic and necrotrophic fungi, respectively (Lowe et al., 2014). Available genomic and transcriptomic data have thus provided information on the two fungal species individually, but to date no molecular information is available to determine the mechanisms underlying the competitive interaction previously hypothesized between both species.

Here, we conducted RNA-Seq experiments on three 6-time-points kinetics of cotyledons infected by Lmb and/or Lbb. For the first time we describe the transcriptomic activity of the three partners upon co-infection compared to control samples. During co-infection, we detected a tipping point during which huge changes in Lmb gene expression occur in concomitance with a transcriptomic reprogramming in Lbb and in the host plant gene expression. In parallel, we

performed quantifications of fungal biomasses, macro- and microscopic observations on diverse conditions leading to an integrated and complete analysis of this tri-partite interaction in controlled environments. These results show that the coinfection on cotyledons greatly impacts gene expression, growth and symptoms of Lmb but that the type and issue of this interaction is conditioned by the inoculum quantity and by the infection timing as it could be the case under natural conditions.

RESULTS

In planta biological interactions between L. maculans and L. biglobosa

A time-course analysis of infection of *Brassica napus* cotyledons inoculated by *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb; GFP isolate), *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb) (single species inoculation, hereafter SSI) or a mix of both species (mixed species inoculation, hereafter MSI) was performed and the fungal development was monitored by microscopy to identify the main stages and differences between both species, as well as the incidence of one species on the other following MSI (**Fig 1**). Biomass of each species was measured in parallel by qPCR. Experiments were also performed with delayed inoculation of Lbb at the same inoculation point (two days later) or with lower concentrations of Lbb pycnidiospores (10^5 spores ml⁻¹) compared to Lmb (10^7 spores ml⁻¹).

Following Lmb SSI, symptoms began to be distinguishable at 9 days post inoculation (dpi), and the biotrophic/asymptomatic stage (4-9 dpi) was easily distinguishable from the necrotrophic stage (9-14 dpi) (**Fig 1A**). The use of an Lmb isolate constitutively expressing the GFP reporter gene allowed monitoring the development of the fungal hyphae and pycnidia. At the penetration stage (2 and 4 dpi), pycnidiospores were aggregated and numerous germ tubes were visible in the intercellular space of epidermal cells (**Figure 1A**). Then hyphae grew between plant cells from 7 to 9 dpi, with a massive colonization of intercellular spaces at 9 dpi followed by the development of the typical leaf spot with pycnidia differentiation (**Fig 1A**). Consistent with these observations, Lmb biomass in cotyledons, estimated by DNA quantification, increased slowly between 2 and 7 dpi, and then much more rapidly between 9 and 11 dpi, to reach an average amount of 500 ng at 11 dpi (**Fig 2**).

For Lbb, we could not construct an isolate with a reporter gene. We validated here that the Lbb isolate G12-14 developed necrotic symptoms much earlier than Lmb (4 and mostly 7 dpi), and that these were accompanied by a chlorotic halo of variable size absent in the case of Lmb SSI (**Fig 1B**). The necrosis was always characterized by a dark color contrasting with the

greyish symptoms caused by Lmb, and no pycnidia were visible (**Fig 1A-B**). The quantification of DNA following Lbb SSI revealed very low amounts of Lbb biomass within plant tissues whatever the date, with average DNA quantities varying between 1.77 ng and 3.17 ng (**Fig 2**). Compared to Lmb, there was no significant increase in Lbb biomass in plant tissues between 2 and 11 dpi.

When both species were inoculated together at the same site and in equal amount of spores, symptoms appeared at 4, and mostly 7 dpi with the same kinetics and phenotype as those observed for Lbb SSI (**Fig 1C**). The visual monitoring of Lmb development by the GFP-fluorescence revealed that only Lmb pycnidiospores from the primary inoculum were visible whatever the time point (including in dead plant tissues at 14 dpi). In some plants, Lmb hyphae were visible departing from 9 dpi but they never massively colonized the intercellular spaces and remained confined to the surroundings of the inoculation point. Finally, no differentiation of Lmb pycnidia was observed on leaf spots (**Fig 1C**). These observations were confirmed by qPCR estimation of fungal biomass; co-inoculation of Lmb and Lbb had a drastic impact on Lmb biomass compared to Lmb SSI, with no significant increase between 2 and 11 dpi (range = 2.44-7.97 ng). Co-inoculations had no significant impact on Lbb biomass (range = 1.10-6.08 ng) (**Fig 2**).

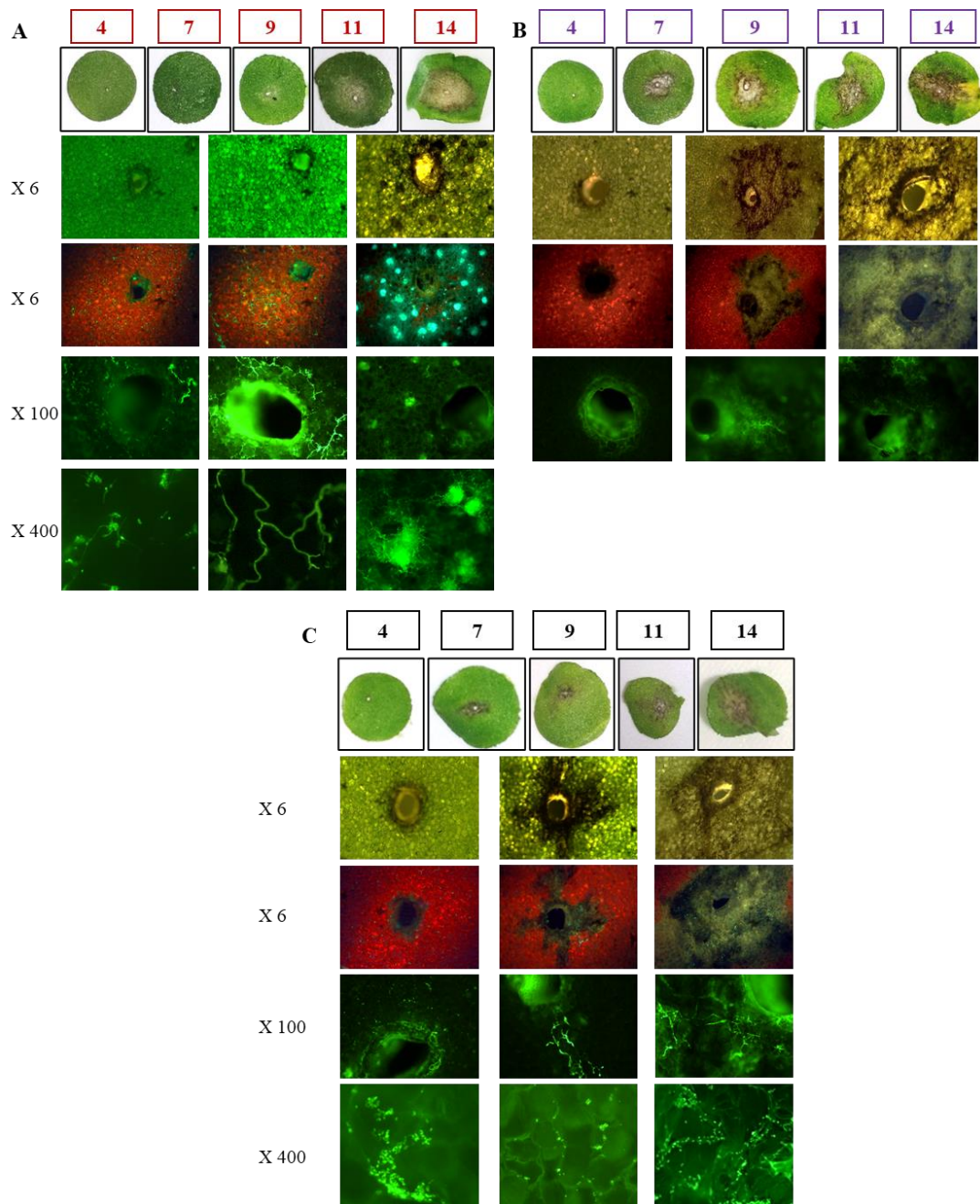


Fig 1: Monitoring of *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ development during cotyledon infections of *Brassica napus* following Single Species Inoculation (SSI) or Mixed Species Inoculation (MSI).

For SSI, the cotyledons of *B. napus* were inoculated with (A) a pycnidiospore suspension of Lmb (transgenic isolate JN2 expressing GFP) at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ or (B) with a pycnidiospores suspension of Lbb (isolate G12-14) at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹. (C) For MSI, co-inoculations were made by inoculating a mixed suspension of pycnidiospores of both Lmb and Lbb species in equal quantity (10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ each). The cotyledons were collected at six different time points (4,7,9,11,14 days post inoculation; dpi). Observations were made using a stereomicroscope under brightfield or under a GFP filter (magnification: X6). An optical microscope was used to make observations with higher magnification factor under brightfield and GFP filter (X100 and X400). The pictures are representative observations made on eight infection points with three biological replicates.

To test if the pre-establishment of Lmb on cotyledons could hamper the negative impact of Lbb, delayed inoculations were done by inoculating Lbb two days after Lmb. During this kinetics of infection, symptoms appeared between 7 and 9 days after the inoculation of Lmb (thus 5 days after Lbb co-inoculation, **Fig S1**). We could discriminate small necrotic lesions caused by Lbb around the inoculation spot meaning that it could infect plant cotyledons but in restricted areas (**Fig S1**). However, Lmb was not impacted by the Lbb development and pursued the cotyledon infection similarly to Lmb SSI infection. Consistent with these results, the delayed co-inoculation with Lbb did not induce significant differences in DNA quantities compared to the control SSI, either for Lbb or Lmb (**Fig 2**).

The quantitative effect of inoculum concentration was also tested by co-inoculating the two species with Lbb at a hundred-time lower spore concentration than Lmb. Under these conditions, no differences in Lmb mycelium and conidia development could be visually detected compared to the control SSI of Lmb (**Fig S1B**). This was confirmed by qPCR, with Lmb DNA amounts that were only significantly lower than the SSI control at 9 dpi but not at later date, 11 dpi (range = 0.77-115.48) (**Fig 2**). Dark necrotic patches characteristic of Lbb development and devoid of GFP fluorescence were distinguishable suggesting that the over-representation of Lmb spores did not inhibit the development of Lbb. Lowering Lbb spore concentrations by a factor 100 did not significantly affect the DNA amount of Lbb in plants (**Fig 2**).

In summary, no differences in Lbb biomass were observed when co-inoculated with Lmb, compared to the control inoculation whatever the experimental conditions. In contrast, the co-inoculation conditions had an impact on the development of Lmb biomass. A strong inhibition of Lmb by Lbb occurred in concomitant and equi-concentrated co-inoculations while no or only partial inhibition were detected following delayed or less-concentrated Lbb inoculations.

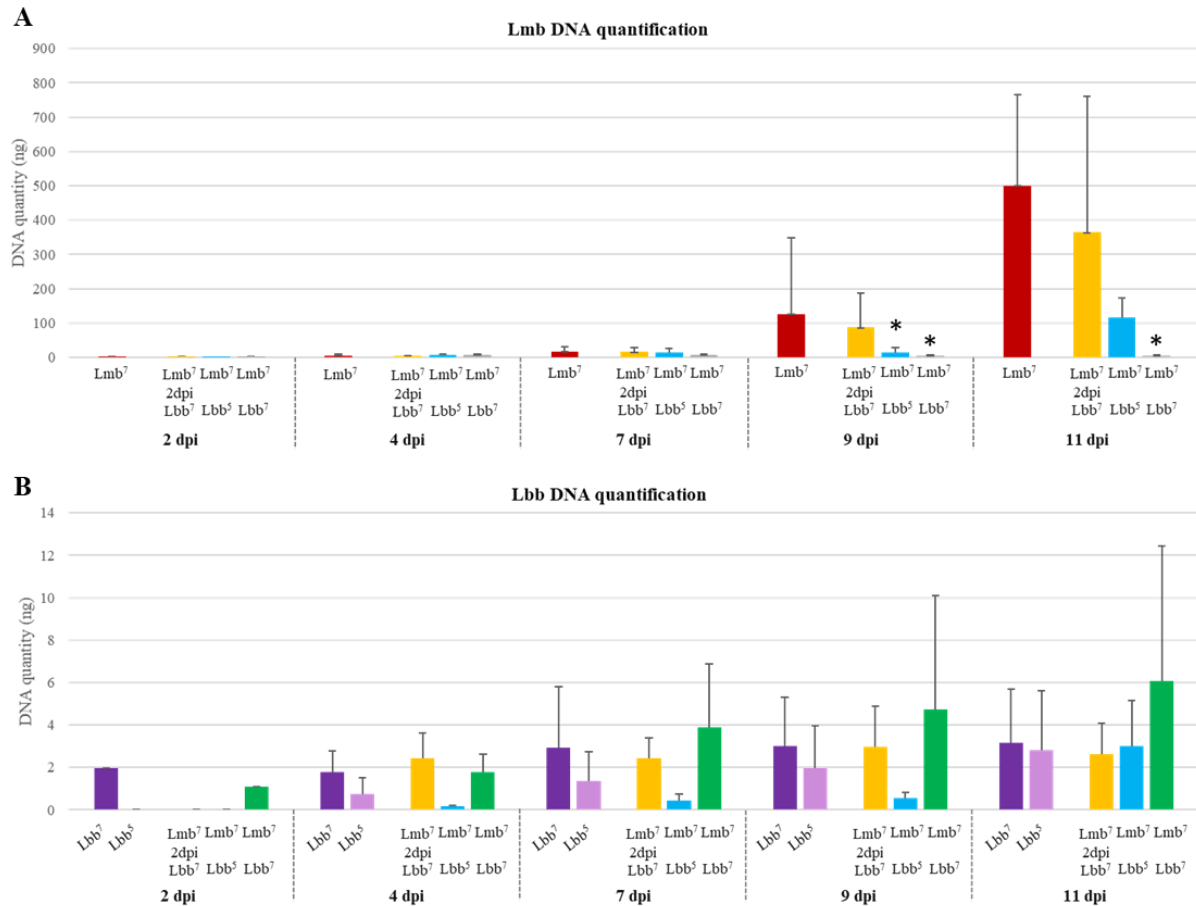


Fig 2: Quantitative monitoring of *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ DNA following Single Species Inoculation (SSI) or following three different conditions of Mixed Species Inoculations (MSI).

Quantifications of DNA of Lmb (A) and Lbb (B) were made at 2, 4, 7, 9 and 11 days post-inoculation (dpi) of *Brassica napus* on six different kinetics of infection. Three control SSI were made by inoculating pycnidiospores suspensions of Lmb or Lbb at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ (named ‘Lmb⁷’ in red bars or ‘Lbb⁷’ in purple bars) or at 10^5 pycnidiospores.ml⁻¹ (named ‘Lbb⁵’ in pale purple bars, not tested for Lmb). Three different MSI conditions were monitored (i) delayed MSI with an addition of Lbb inoculum two days after the inoculation of Lmb (named ‘Lmb⁷ 2dpi Lbb⁷’; yellow bars) ; (ii) concomitant MSI with different concentrations: Lmb at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ and Lbb at 10^5 pycnidiospores.ml⁻¹ (named ‘Lmb⁷ Lbb⁵’; purple bars); (iii) concomitant MSI with mixed suspension of pycnidiospores of both Lmb and Lbb species in equal quantity (10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ each) (named ‘Lmb⁷ Lbb⁷’; green bars). DNA quantities were measured by qPCR using partial sequence of the EF1 α gene for Lmb, and of actin gene for Lbb, on six biological replicates in control SSI and on three biological replicates in the three MSI tests. Pairwise statistical comparisons were made on the average DNA quantities obtained on all replicates in each condition and at each time-point. Statistical analyses were done with the non-parametrical Wilcoxon test. The asterisks represent a significant difference compared to the control SSI ($p < 0.05$). The error bars represent the standard deviation.

In vitro biological interactions between *L. maculans* and *L. biglobosa*

This strong *in planta* interaction could be direct or indirect (i.e. depending on induced plant responses). To address this question, SSI and MSI experiments were also conducted *in vitro* on V8-agar media and visually monitored during 14 days (**Fig S2A, Fig S3**). During *in vitro* SSI, growth rates were similar between Lmb and Lbb (**Fig S2A**). In co-culture when inoculating the media with the same amount of conidia at the same time, Lbb growth overcame the development of Lmb. GFP-fluorescent spores and hyphae of Lmb were restricted to the inoculation point, whereas Lbb mycelia entirely colonized the Petri dishes (**Fig S3B**). When co-cultures were made with a 100-times less concentrated spore suspension of Lbb, mycelium of both species grew and colonized the media. GFP-fluorescent hyphae colonized the media and shared the space with Lbb hyphae without exclusion area (**Fig S3C**). Finally, during delayed co-inoculation, only a dense network of GFP-fluorescent hyphae was visible suggesting that Lbb could not develop when it is post-inoculated (**Fig S3D**).

Confrontation experiments were also done by placing one drop of 10 μ l of pycnidiospore suspensions of Lbb and Lmb at a 2-cm distance on Petri dishes and allowing mycelial growth for 14 days. Under these conditions, there was no mycelial growth inhibition of Lmb by Lbb, but an exclusion front between the two species was evident (**Fig S2C**). Finally, no effect could be detected on pycnidiospore germination rate of each species by the other *in vitro* (data not shown).

Incidence of *L. biglobosa* on transcriptional activity of *L. maculans*.

Comparative transcriptomic analyses were performed *in vitro* and on three kinetics of infection of *Brassica napus* cotyledons corresponding to Lmb SSI, Lbb SSI or MSI.

The proportion of RNA-Seq reads assigned to Lmb or Lbb following SSI *in planta* (**Fig 3A,B**) revealed differences in transcriptomic activity between species, and also within replicates for Lbb SSI. While the proportion of reads assigned to Lmb was comparable at a given time between replicates, the proportion of reads assigned to Lbb was highly variable between replicates with differences between samples as high as 73.25% and 15.91% of the reads at 15 days post-inoculation (dpi) (**Fig 3A,B; Table S1**). In spite of this variability, the linear regression of gene expression between replicates showed that the r-squared at each time point were always higher than 0.90 (**Table S2**), which validated the use of comparative statistical tests.

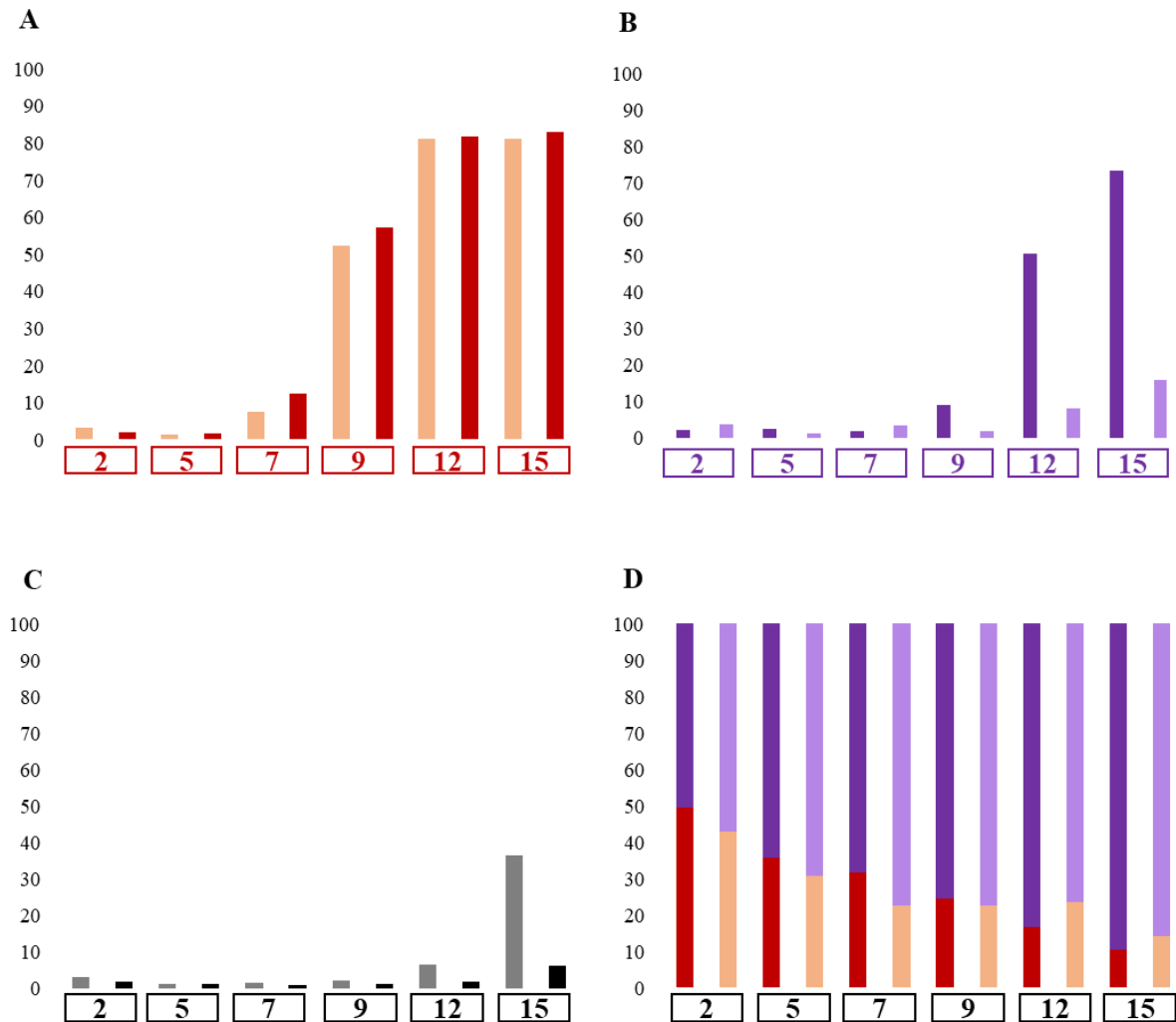


Fig 3: Proportion of RNA-Seq reads assigned to *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ during Single Species Inoculation (SSI) or Mixed Species Inoculation (MSI) of *Brassica napus* cotyledons.

(A) and (B), percentages of reads assigned to Lmb (A) or Lbb (B) among the total number of reads at the six sampling time-points (2,5,7,9,12,15 days post-inoculation, dpi). (C) Cumulated percentage of reads of the two fungal species following MSI. (D) Relative proportion of fungal reads assigned to Lmb or Lbb following MSI. For each time point, data from two biological replicates are shown as dark and pale color (red and pink bars for Lmb reads, purple and pale purple bars for Lbb reads, black and grey for total fungal reads in MSI).

The proportions of fungal reads in the samples were very low at 2 and 5 dpi for Lmb (**Fig 3A**), and until 7 dpi for Lbb (**Fig 3B**), and increased steadily to reach 80.9% to 82.6% of the reads at 15 dpi for Lmb (**Fig 3A**). An increase was also observed for Lbb reads with time, beginning at 9 dpi or 12 dpi, depending on the replicate (**Fig 3B**).

Following MSI, the proportion of fungal (Lmb + Lbb) reads in the samples followed a trend similar to that observed following Lbb SSI, including variability between replicates, but delayed in timing. In addition, the proportion of total fungal reads in the samples was lower than what was observed following Lbb or Lmb SSI (**Fig 3C, Table S1**). Similarly to what was observed for SSI, the linear regression between replicates showed that the r-squared at each time point were close to 0.90 or above (**Table S2**). In addition, the relative proportion of reads assigned to each fungal species during the co-infection was consistent between replicates (**Fig 3D**) and showed a steady decrease of the proportion of Lmb reads relatively to Lbb reads, departing from 49.5% for Lmb and 50.5% for Lbb at 2 dpi to reach 12.3% for Lmb and 87.7% for Lbb at 15 dpi (**Fig3D, Table S1**).

The same trend on transcriptomic activity was observed when the two species were grown *in vitro*, either on solid medium or in liquid culture. After seven days of co-culture, 78.8% to 81.5% of the reads were assigned to Lbb and only 0.1% to 0.9% of the reads were assigned to Lmb (**Table S1**).

Together, these results suggest a strong impact of Lbb on the Lmb quantitative transcriptomic activity during co-inoculation or growth in axenic culture while no or low reverse quantitative effect could be noticed.

Transcriptomic activity of *L. biglobosa* during cotyledon infection.

The Principal Component Analysis (PCA) grouped Lbb SSI samples in three clusters (2 dpi, 5 dpi to 9 dpi and 12 dpi to 15 dpi) (**Fig 4A**). A total of 1,232 differentially expressed genes (DEGs) were identified during the kinetics, by comparing gene expression between these three groups of samples (**Fig S4**). As expected from the PCA, the highest number of Lbb DEGs was observed between 2 dpi and all other time points, with 238 down-expressed genes and 578 over-expressed genes (total of 66% of all DEGs), thus highlighting a major transcriptomic reprogramming between 2 and 5 dpi (**Fig S4**). Only 12 down-expressed genes and 119 over-expressed genes were found at 5-7-9 dpi and 46 down-expressed and 240 over-expressed genes at 12-15 dpi (**Fig S4**).

GO analyses showed that, at 2 dpi of Lbb SSI, glycosyl hydrolases ($p = 2.10^{-4}$), transport ($p = 1.10^{-2}$) and catalytic activities ($p = 5.10^{-4}$) were enriched along with four different peptidase activities (metallopeptidase activity: $p = 3.10^{-3}$; metalloprotease activity: $p = 5.10^{-3}$; serine-type (endo)-peptidase activity: $p = 8.10^{-3}$; carboxypeptidase activity: $p = 2.10^{-2}$) (**Fig S4, S5, S6**). Then, two sets of genes were over-expressed departing from 5 dpi. The first one

included genes that remained over-expressed all along the cotyledon colonization. This cluster was enriched in heme binding ($p = 1.10^{-2}$; **Fig S5**) including six Cytochrome P450 mono-oxygenases, two peroxidases, and one catalase suggesting a major detoxification activity. The second one included genes over-expressed 5-9 dpi only. This cluster was enriched in pectate lyase ($p = 5.10^{-4}$) and polysaccharide metabolism activities ($p = 1.10^{-6}$) suggesting the activation of cell-wall degrading enzymes involved in the necrotrophic behavior of Lbb. Finally, at 12 dpi and 15 dpi, genes involved in oxido-reduction activities ($p = 1.10^{-5}$) were over-represented including two catalases, five Lytic Polysaccharide MonoOxygenase (LPMO) and three other mono-oxygenases, one PKS, and one NRPS. Also processes involving three nitrate reductases and seven alcohol dehydrogenases suggested the activation of a nitrate uptake process that was part of the oxido-reductase activity enrichment at 12 and 15 dpi. Enrichment analyses of the gene set encoding Small Secreted Proteins (SSP) revealed that they were enriched ($p = 1.10^{-14}$) in the DEGs (12%) compared to the set of SSP annotated in the genome (6.81%). By comparing the composition of DEGs in each cluster, a specific enrichment in SSP was detected in the genes up-regulated at 5-9 dpi (41% of the cluster; $p < 2.10^{-2}$) (**Table S3**).

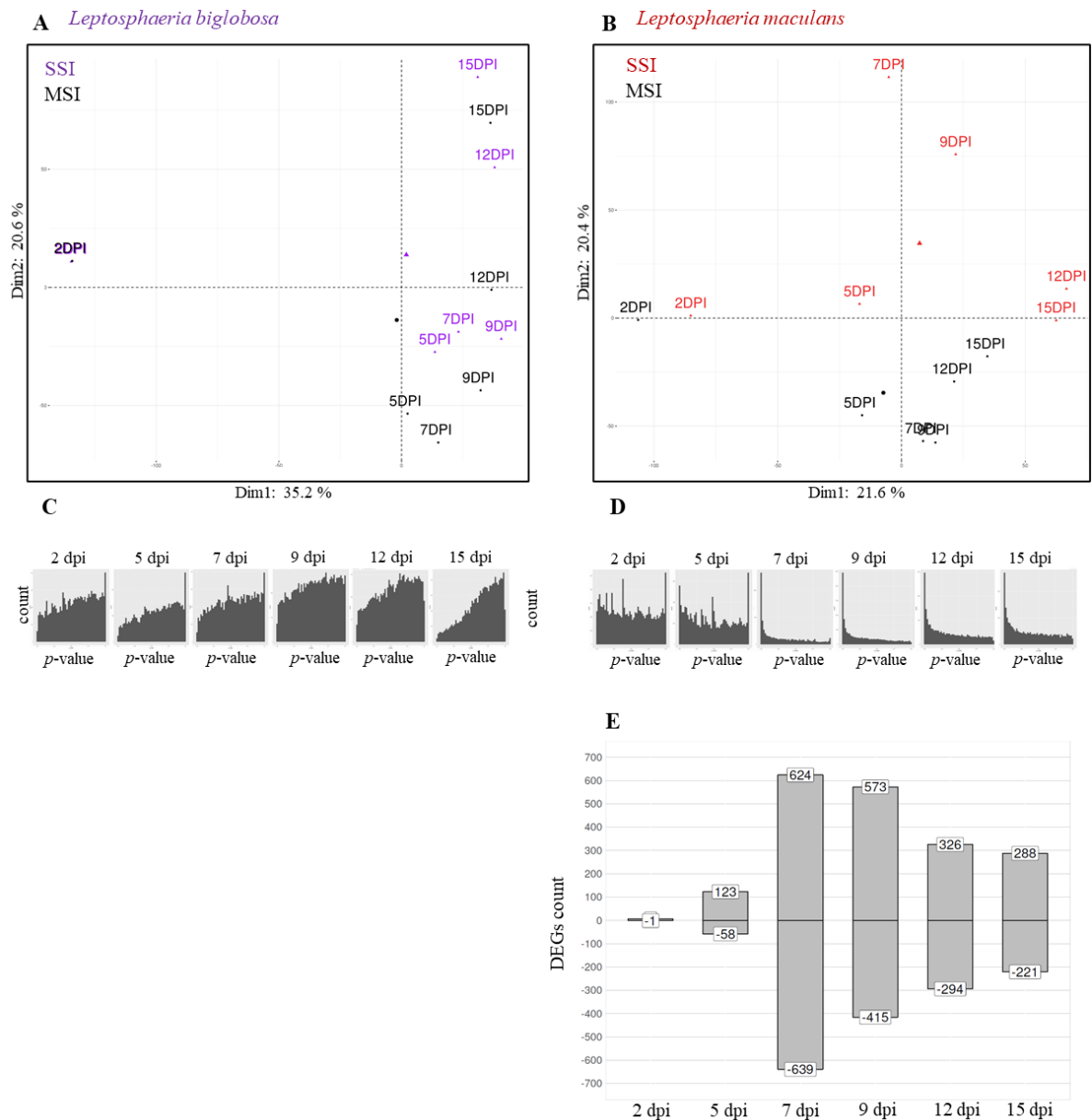


Fig 4: Relatedness of samples and detection of differentially expressed genes (DEGs) between Single Species Inoculation (SSI) and Mixed Species Inoculation (MSI) of cotyledons of *Brassica napus* by *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) or/and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

Principal component analyses (PCA) were done on normalized fungal gene expression (centered $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$) of Lbb (A) and Lmb (B) either in SSI or in MSI. (A) Samples from Lbb SSI are in purple and samples from MSI are in black. (B) Samples from Lmb SSI are in red and samples from MSI are in black. Statistical comparisons were done between SSI samples and MSI samples at each time-point and for each fungal species. The six p -value histograms resulting from the comparisons of gene expression of Lbb (C) or Lmb (D) are shown (x-axis : p -value values from 0 to 1 ; y-axis : p -value counts). (E) Histogram of the number of DEGs detected in Lmb following the comparison of SSI and MSI samples at each sampled date (p -value < 0.05, $\text{LogFC} > |2|$). The positive or negative numbers represent the genes up-regulated or down-regulated in the MSI compared to the SSI, respectively. According to the statistical tests, no DEGs were found in Lbb when comparing gene expression following SSI and MSI.

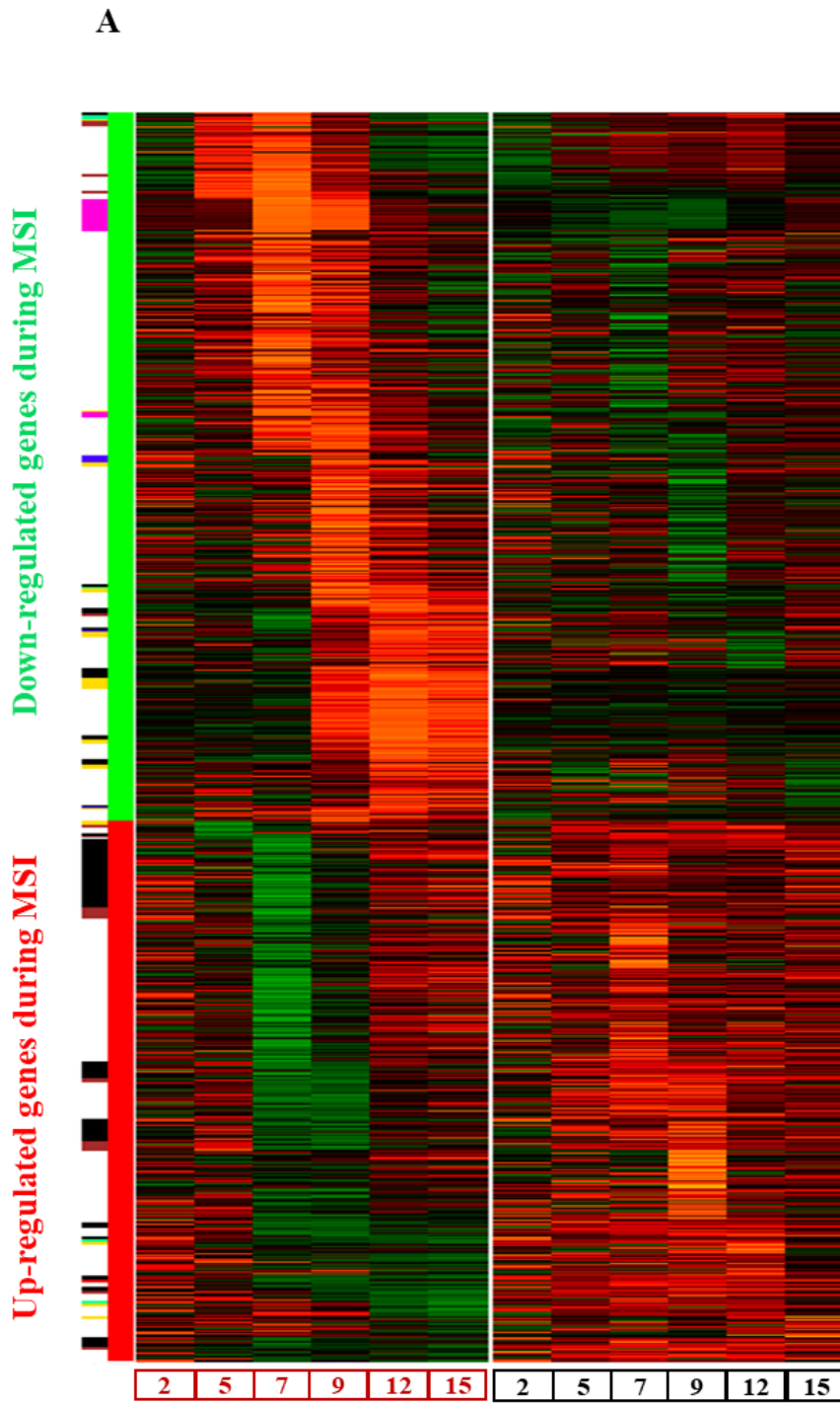
Qualitative effect of co-infection on gene expression of *L. biglobosa* and *L. maculans* during cotyledon infection.

PCA on Lbb gene expression indicated that SSI and MSI samples were closely related at each time-point. No DEGs could be detected in Lbb when comparing SSI and MSI (**Fig 4A**). The uniform distribution of the *p-values* resulting from DEG detection indicated that this result was not due to a stringent threshold effect (**Fig 4C**). Similarly, no DEGs could be found in Lbb gene expression between SSI *in vitro* and in MSI *in vitro* suggesting that Lmb had no impact on Lbb gene expression whatever the growth environment (data not shown).

Contrasting with what was observed for Lbb, the PCA showed a rapid divergence between Lmb SSI and MSI samples departing from 5dpi and peaking at 7 dpi (**Fig 4B**). No DEGs between SSI and MSI were detected at 2 dpi while a high number of DEGs were detected at 7 dpi and 9 dpi with 1,263 and 988 DEGs, respectively (**Fig 4E**). In total, 999 Lmb genes were found to be over-expressed and 1,311 to be down-expressed following MSI compared to SSI (**Fig 5**).

Lmb genes over-expressed in MSI compared to SSI were strongly enriched in catalytic activities at 7, 9, 12 and 15 dpi (**Fig 5 A, Fig S7**) involving functions such as cutinase activities ($p = 3.10^{-2}$; **Fig S7**) or detoxification processes comprising peroxidase ($p = 2.10^{-2}$; **Fig S7**) and catalase ($p = 7.10^{-3}$; **Fig S7**) genes. ATPase active transmembrane transport was also enriched ($p = 2.10^{-2}$) in the genes over-expressed at 7 and 9 dpi and were related to drug efflux (with four ABC multidrug transporter) or to inorganic molecule transport of sodium, potassium and calcium (**Fig S7**).

For down-regulated Lmb genes in MSI compared to SSI, the most significantly impacted GO at 7 dpi were “Structural constituent of ribosome” in the “Molecular Function” category and “ribosome biogenesis” in the “Biological Process” category, suggesting an impoverishment in ribosome activity ($p = 2.10^{-43}$, **Fig 5A, Fig S7, S8, S9**) and an inhibition of the transcriptional burst usually occurring during the biotrophic stage between 7 and 9 dpi. In addition, genes involved in signal peptide processing ($p = 6.10^{-4}$, **Fig S7**) and protein secretion ($p = 2.10^{-4}$, **Fig S8**) were enriched among down-regulated genes at 7 dpi, suggesting an inhibition of the secretion process, including that of effector proteins. Catalytic activities involved in the necrotrophic stage of the disease on leaves at 12 dpi and 15 dpi were strongly repressed in presence of Lbb ($p = 2.10^{-3}$, **Fig 5A, Fig S7**), strengthening the postulate of an inhibition of the necrotrophic stage of Lmb.



Single Species Inoculation of
Lmb

Mixed Species Inoculation of
Lmb and Lbb

- Catalytic activity
- Pectate lyase
- Oxido-reductase
- Transmembrane transport
- Cofactor binding
- Glycosyl hydrolase
- Structural constituent of ribosome

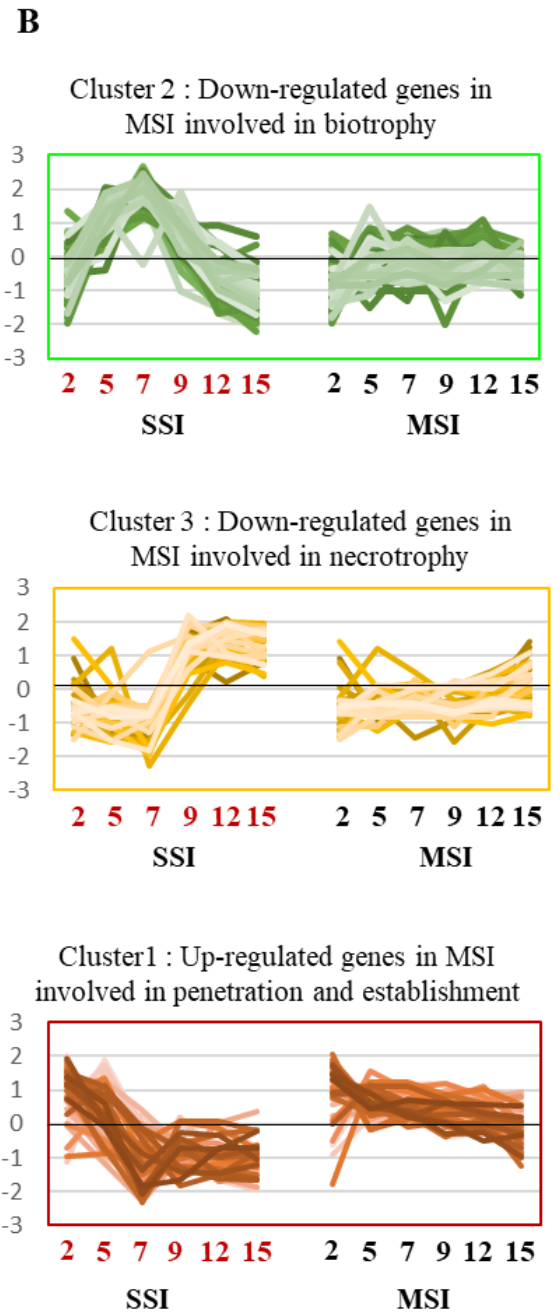


Fig 5: Expression profiles of the 2,310 genes differentially expressed (DEGs) in *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) between Single Species Inoculation (SSI) and Mixed Species Inoculation (MSI) of cotyledons of *Brassica napus*.

DEGs were obtained by comparing the Lmb gene expression between SSI and MSI at each date (2,5,7,9,12,15 days post-inoculation; dpi). (A) The heatmap represents normalized expression (centered $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$) of the 2,310 DEGs set. Genes were grouped into two main categories: the down-expressed gene set in MSI compared to SSI (green bar on the left of the heatmap) or the up-expressed genes in MSI compared to SSI (red bar on the left of the heatmap). In each category, genes are classified according to the date where they were found deregulated (from earlier deregulation to later deregulation). The most significant Gene Ontology (GO) enrichments detected in DEGs at each date are indicated on the left of the picture. (B) Lmb DEGs were detected overrepresented in the three successive waves of expression occurring during the hemibiotrophic infection of cotyledons by Lmb (Gay et al, 2020). DEGs expression (centered $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$) are represented during the SSI (left panel) and MSI (right panel) for each cluster. Cluster 1: ‘Penetration and establishment’ (2-5 days post inoculation - dpi); Cluster 2: ‘Biotrophy’ (5-9 dpi); Cluster 3: ‘Necrotrophy on cotyledons’ (12-15 dpi).

Deregulation of *L. maculans* pathogenicity expression waves in the presence of *L. biglobosa*

Previously, 1,203 Lmb genes were found to be specifically over-expressed during the plant infection by Lmb (Gay et al, 2020). Here, the Lmb DEGs detected between SSI and MSI were over-represented in this set of genes, suggesting that MSI had a significant impact on the transcription of genes specifically involved in the interaction with the host (**Table S3**). Gay et al (2020) identified eight waves of gene expression among these 1,203 genes, displaying a stage-specific (cotyledons, stem or residue colonization) and/or a lifestyle-specific expression profile (biotrophy, transition to necrotrophy, necrotrophy and saprotrophy). Here, genes deregulated by the MSI conditions were overrepresented in the three successive waves specifically expressed during cotyledon infection in SSI (cluster 1: penetration and establishment, cluster 2: biotrophy, cluster 3: cotyledon necrotrophy, **Table S3**).

Down-regulated Lmb genes in MSI were found in high proportions in clusters 2 and 3 (**Table S3**). The biotrophy cluster (cluster 2) contains 148 genes including all currently known avirulence effectors of Lmb, and is characterized by a strong over-expression starting at 5 dpi and peaking at 7 dpi (**Fig 5B**; Gay et al, 2020). This peak of over expression was fully suppressed in the presence of Lbb with 80% of the genes of the cluster under-expressed in Lmb in the presence of Lbb (**Fig 5B, Table S3**).

Similarly, the expression of 36 genes belonging to cluster 3 (41% of the genes of this cluster), which are usually overexpressed from 9 dpi onward (**Fig 5B**), was inhibited in the

context of MSI (**Fig 5B, Fig S6**) suggesting that Lmb could not initiate its necrotrophic stage either.

In contrast to clusters 2 and 3, the cluster 1, which corresponds to the set of genes involved in the penetration and establishment of Lmb (Gay et al., 2020), was enriched in genes up-regulated in MSI conditions (**Table S3**). This cluster is characterized by an expression profile peaking at 2-5 dpi and a decreased expression during the subsequent cotyledon colonization during SSI (**Fig 5B**). In the presence of Lbb, 50% of the genes of this cluster remained expressed for the whole experiment (**Fig 5B, Table S3**), suggesting the fungus continues to attempt penetrate and establish in the tissues with no success.

These three consecutive waves of Lmb gene expression in SSI were no longer seen following MSI. In contrast, a stagnation of transcriptomic activity was detected between 5 dpi and 15 dpi (**Fig 5A,B**). This was validated by intra-kinetic comparisons showing that no DEGs were detected in pairwise comparison in Lmb from 5 dpi to 15 dpi following MSI (data not shown).

These results indicated that, in an unsuccessful attempt, the transcriptional activities needed to penetrate and set up in the tissues are maintained, and consequently, the transcriptional activities needed to set up the biotrophic stage of Lmb and the subsequent necrotrophic behavior of the fungus are not initiated in the presence of Lbb. No new pathways were found to be induced *de novo* in Lmb in response to co-inoculation with Lbb. This transcriptomic change in Lmb following MSI is concomitant with the transcriptomic reprogramming of Lbb observed at 5 dpi.

Kinetics of plant responses to SSI or MSI conditions

PCA (**Fig 6A**) and detections of DEGs (**Fig 6B,C**) provided preliminary information about the plant response to each species and to the co-inoculation. The PCA firstly showed that, at each time point, control samples were grouped together suggesting that there were no intrinsic transcriptomic changes with time when cotyledons were inoculated with water (**Fig 6A**). In addition, the control samples at 2 dpi were closely related to inoculated samples collected at 2 dpi (Lbb and Lmb SSI, MSI) and no DEGs were detected at 2 dpi between any pairs of treatments, suggesting there is no sensing by the plant of the infection at this very early stage.

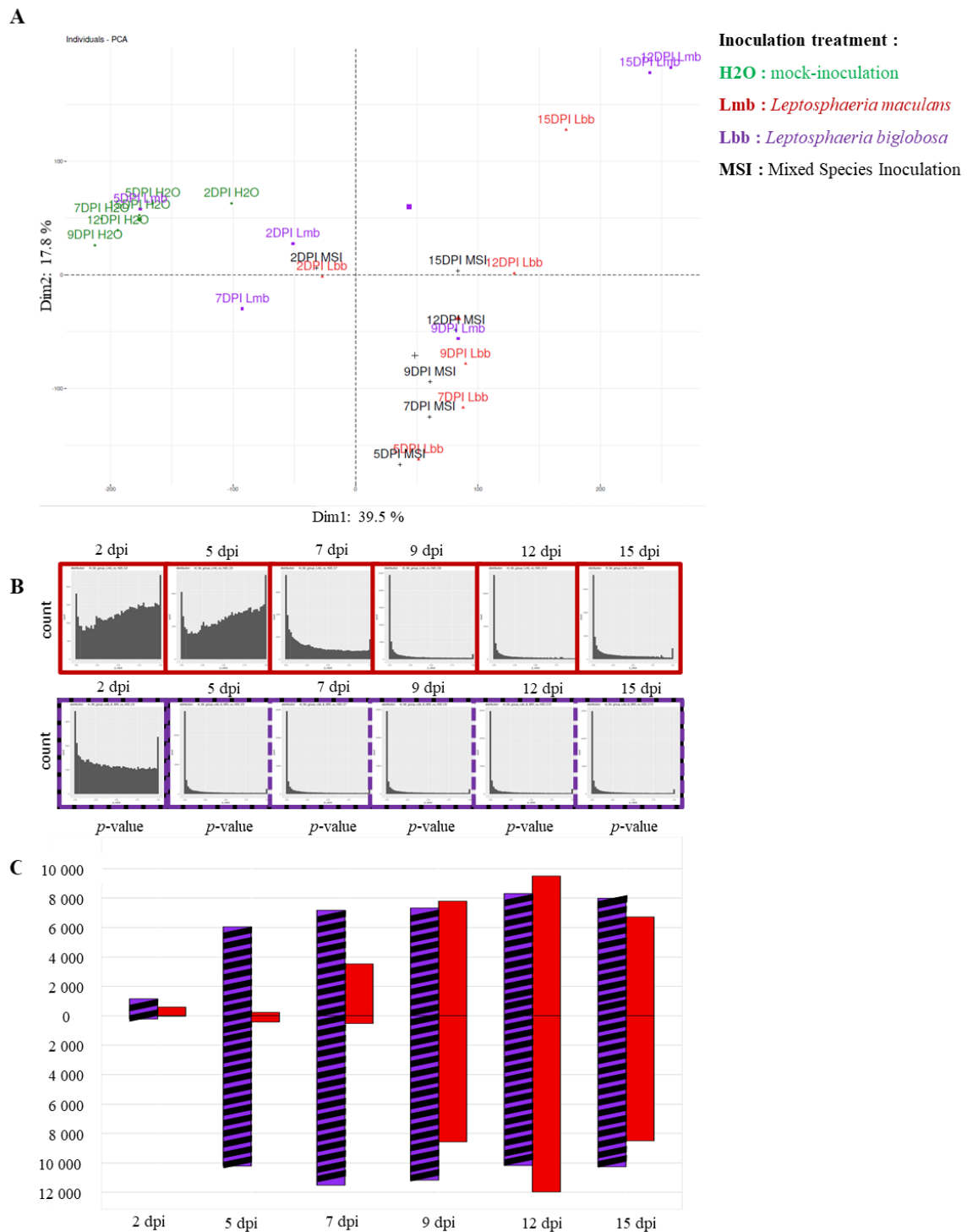


Fig 6: Relatedness of samples and detection of Differentially Expressed Genes (DEGs) of *Brassica napus* following Single Species Inoculation (SSI) or Mixed Species Inoculation (MSI) of cotyledons by *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) or/and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

(A) Principal component analyses (PCA) were done on normalized gene expression of *B. napus* (centered $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$). Color code is as follows: SSI by Lbb (purple), SSI by Lmb (red), MSI by both Lmb and Lbb (black), control mock inoculation with water (green). (B) Detection of DEGs in *B. napus* were done in two sample comparisons: (i) ‘Lbb SSI and MSI’ samples were compared to the control cotyledons inoculated with water at each time points; (ii) Lmb SSI were compared to the control

cotyledons inoculated with water at each time points. The resulting histograms of p -values are shown (x-axis: p -value from 0 to 1, y-axis : p -value counts). (C) For each of the six time points, the resulting number of DEGs (p -value < 0.05 , $|\text{LogFC}| > 2$) are shown by the histogram which includes the DEG set detected between control samples and Lmb SSI in red and the DEG set detected between the control samples and the 'Lbb SSI + MSI' samples in hatched black and purple bars. The positive or negative numbers represent the genes up- or down-regulated, respectively.

B. napus samples extracted from Lmb SSI at 5 dpi were also closely related to the control samples at the same time-point, and a low number of DEGs was detected (**Fig 6B,C**). The response of *B. napus* to Lmb SSI was mostly evident at 7 dpi with about 4,000 DEGs and reached a peak at 12 and 15 dpi with ca. 20,000 DEGs detected at 12 dpi (**Fig 6C**). In contrast, plant DEGs were detected starting at 5 dpi in response to Lbb SSI (16,265 DEGs) until 15 dpi (**Fig 6A,C**). At most time point, plant samples infected by Lbb SSI or MSI grouped together (**Fig 6A,C**) and no DEGs were detected between the transcriptomic response to Lbb and to the MSI (data not shown).

A total of 26,852 genes of *B. napus* were found to be differentially expressed compared to the water control following inoculation by the pathogens. This led to the identification of four plant DEG sets: (i) up-regulated genes in response to Lmb infection, (ii) down-regulated genes in response to Lmb infection, (iii) up-regulated genes in response to Lbb SSI and MSI, and (iv) down-regulated genes in response to Lbb SSI and MSI (**Fig 7A**). By crossing these gene sets, we identified six sets of *B. napus* genes mobilized or repressed specifically in response to the Lmb infection or the Lbb SSI/MSI, as well as the sets of genes expressed or repressed in response to both pathogens (**Fig 7A,B**).

The set of 14,518 genes expressed or repressed in response to both pathogens represented 54% of the *B. napus* DEGs (**Fig 7A**). However, while representing a common response to both pathogens, the timing of repression/over-expression differed in response to Lmb or to Lbb SSI and MSI (**Fig 7B**).

Common *B. napus* response to inoculation by *L. maculans*, *L. biglobosa* or the two species together

The 7,299 genes over-expressed in common in response to the infection were mobilized very early (5 dpi) in response to Lbb SSI+MSI while they were strongly induced only at 9 dpi following Lmb SSI (**Fig 7B**). This gene set was enriched in genes involved in various defense responses (response to drug, to abiotic stimuli, to stress, to organisms such as bacterium or fungus, all with a corrected $p < 1.10^{-40}$, **Fig S10**).

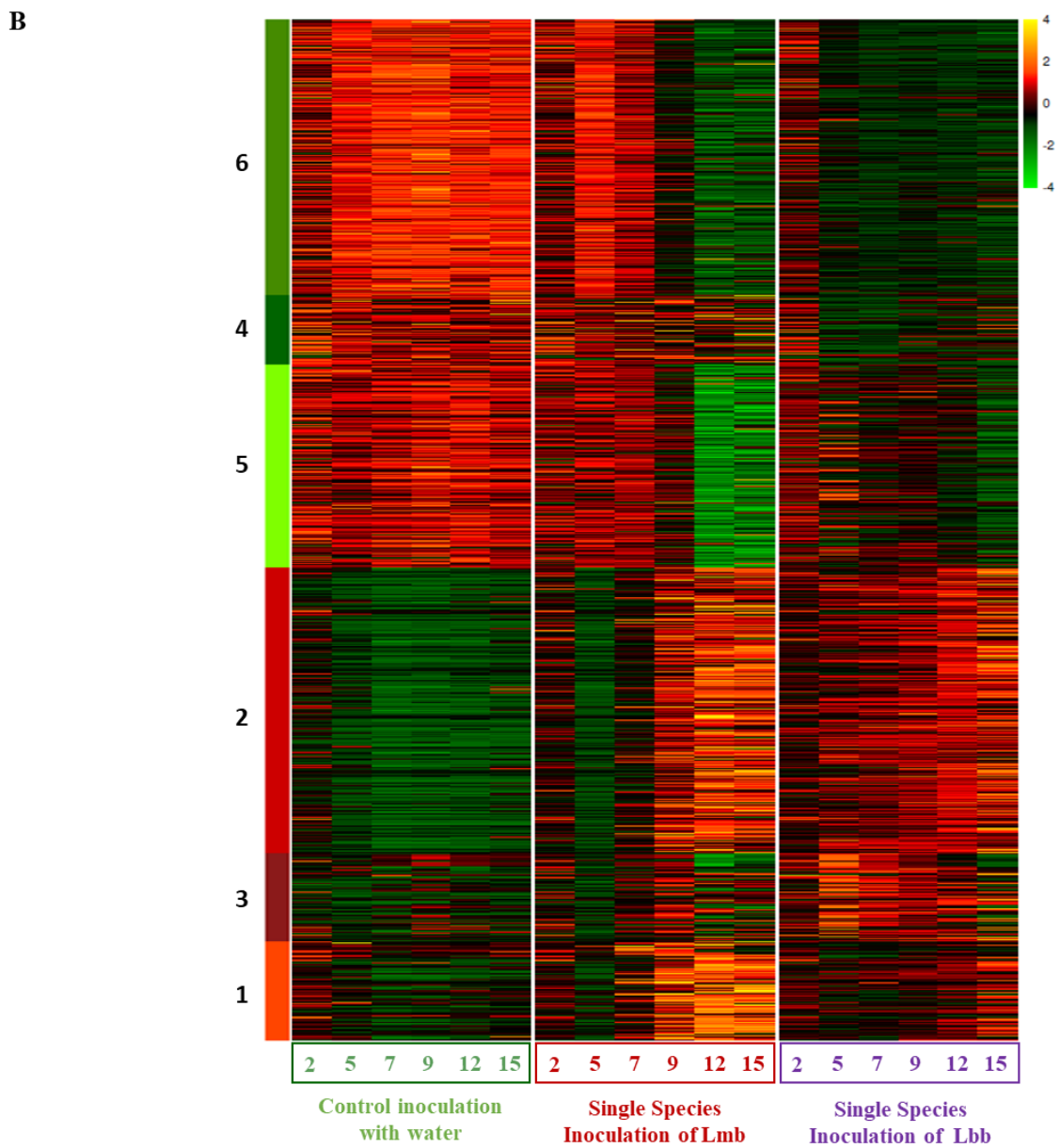
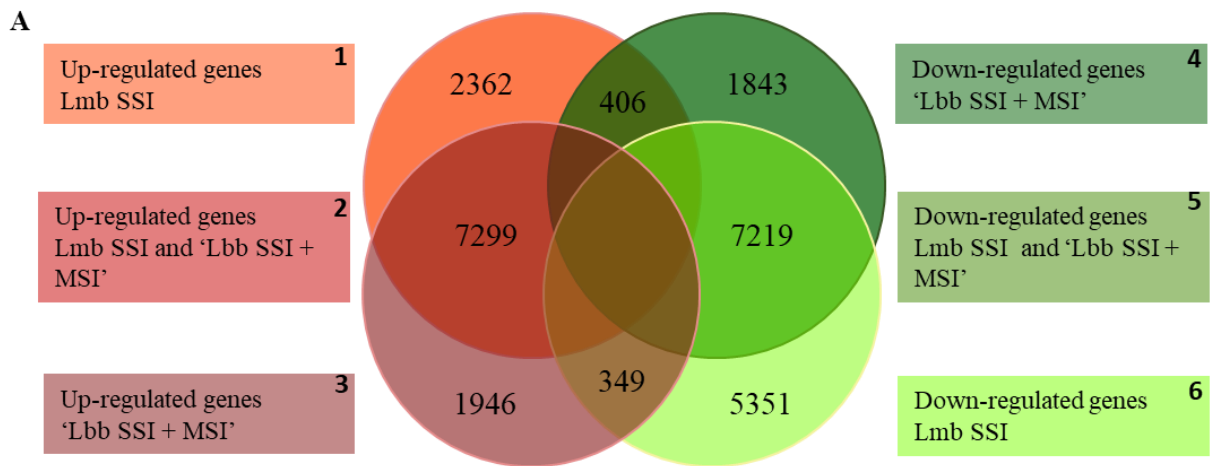


Fig 7: Expression profiles of the 26,852 genes of *Brassica napus* detected as differentially expressed following Single Species Inoculation (SSI) or Mixed Species Inoculation (MSI) of cotyledons by *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) or/and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

(A) The total number of Differentially Expressed Genes (DEGs) was obtained according to two statistical comparisons: for each of the six sampled time-points, (i) gene expression in cotyledons inoculated with Lbb (SSI and the MSI) was compared to that of the control cotyledons inoculated with water and (ii) gene expression in cotyledons inoculated by Lmb was compared to that of control cotyledons inoculated with water. From these differentially expressed gene sets the Venn diagram shows the intersection of the up- or down-regulated genes in response to Lmb SSI (1,6); in response to ‘Lbb SSI + MSI’ (3, 4) and in response to both Lbb SSI and ‘Lbb SSI + MSI’ (2,5). (B) The heatmap represents the normalized expression (centered $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$) of DEGs in *B. napus* following mock inoculation with water (left block), and during SSI by Lmb or Lbb (middle and right blocks, respectively). Genes were grouped in the six categories highlighted by the Venn diagram, and identified by the bars on the left of the heatmap with the same color code as in the Venn diagram.

In addition, among the GO terms belonging to Molecular Processes, a strong enrichment was detected in Serine Threonine Kinase activity ($p = 1.10^{-19}$, **Fig S11**), a large family known to be involved in the detection and signaling transduction of defense responses following PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) recognition (Afzal et al., 2008).

Similarly, down regulation was only observed departing from 9 dpi for Lmb while it was evident departing from 5 dpi following Lbb SSI + MSI (**Fig 7B**). This set of 7,219 genes was enriched in carbon metabolism processes (photosynthesis, response to light, generation of precursor metabolites and energy, photosynthetic electron transport chain; all with a corrected $p < 1.10^{-30}$; **Fig S12**).

In *B. napus*, the activation of defense responses as well as the repression of genes involved in primary metabolism and photosynthesis were thus concomitant with the transition towards necrotrophy, whatever the inoculated species.

Specific *B. napus* responses to inoculation by *L. maculans* or *L. biglobosa* or the two species together

A comparable number of genes were found to be specifically up-regulated in response to Lmb (2,362 genes) or Lbb SSI + MSI (1,946 genes) (**Fig 7A**). In contrast, a much larger number of genes were down-regulated following infection by Lmb (5,351 genes) compared to Lbb SSI + MSI (1,843 genes) (**Fig 7A**), possibly reflecting manipulation of the plant immunity by Lmb.

In the gene set specifically up-regulated in response to Lbb SSI + MSI, peptide, ribosome or macromolecule biosynthesis processes (related to protein production processes, $p = 1.10^{-100}$;

Fig S11) were over-represented, without clear evidence that these processes could impact colonization by Lmb. Actually, the main difference regarded the specific down regulation of numerous genes involved in responses to hormonal signalization following Lbb SSI +MSI (response to endogeneous stimuli, response to hormone, hormone mediated signaling pathways all $p > 1.10^{-20}$ **Fig S12**).

Up-regulated genes specifically induced in response to Lmb were enriched in molecular transports (Golgi transport, protein transport, $p = 4.10^{-9}$, **Fig S10**) and in global response to stress, temperature, and to chitin compounds (all $p < 1.10^{-8}$, **Fig S10**). Specific enrichments were found only in response to Lmb inoculation, such as a set of 38 serine/threonine kinase proteins and genes belonging to the LOX pathway involved in the biosynthesis of Jasmonic Acid ($p = 1.10^{-2}$; **Fig S11**). In the gene set specifically down-regulated in response to Lmb, genes involved in the nitrogen metabolism and RNA metabolism were over-represented (cellular nitrogen compound metabolic process; organonitrogen compound biosynthetic process; cellular nitrogen compound biosynthetic process all $p < 1.10^{-20}$ **Fig S12**).

DISCUSSION

In this study we aimed to investigate how *L. biglobosa* and *L. maculans* interact within *B. napus* plants and also during co-cultures (neutral interaction, synergy, direct or indirect competition). For this purpose, we combined macroscopic and microscopic assessment of symptoms and of fungal biomass development following single species inoculation (SSI) or mixed species inoculation (MSI), and fungal and plant gene expression analyses by RNA-sequencing under *in vitro* and *in planta* conditions.

Altogether our results show (i) a strong negative effect of *L. biglobosa* on *L. maculans* growth and transcriptomic activity both *in vitro* and *in planta*, but only when conidia of both species were inoculated together at the same place, and no reverse effect of *L. maculans* on *L. biglobosa*. In addition the existence of an exclusion front when both species are grown away one from another on solid medium may indicate direct competition; (ii) a strongly divergent response of *B. napus* to the infection by *L. maculans* alone and in conditions of MSI, while no difference in plant response was observed when *L. biglobosa* was inoculated alone or in conditions of MSI, which may indicate an indirect competition favored by induced plant defense responses, and (iii) the lack of transcriptomic reprogramming of *L. biglobosa* in the presence of *L. maculans in planta*, but a reduced or null effect of *L. biglobosa* on *L. maculans* when lower amounts of *L. biglobosa* conidia, compared to *L. maculans* conidia, were inoculated

or when a delayed inoculation took place, suggesting indirect competition between the two species could take place via trophic effect.

A clearly distinct mode of colonization of oilseed rape cotyledons by *L. maculans* or *L. biglobosa*

Although *L. maculans* and *L. biglobosa* are closely related and share the same host plant with a similar life cycle, they were already shown to display different behaviors on oilseed rape leaves or cotyledons, with a rapid induction of plant necrosis by *L. biglobosa* coupled with a low biomass development, compared to a delayed plant necrosis and higher biomass development for *L. maculans* (Huang et al., 2011; Fitt et al., 2006b; Eckert et al., 2005). Here, similar observations were done all along detailed time-course experiments. The symptoms developed by the two species clearly differed visually, and we correlated the weak colonization of plants tissues by *L. biglobosa* with a low biomass development measured by qPCR. As a strict necrotroph, Lbb symptoms on cotyledons appeared much faster than those due to *L. maculans* (5 dpi vs. 9 dpi). Transcriptomic analyses revealed that, in *L. biglobosa*, protein degradation activities were strongly activated at 2 dpi followed, at 5 dpi, by the activation of inorganic molecule transport and polysaccharide metabolism concomitant with cell detoxification activities. This confirms that Lbb rapidly generates an environment made up of necrotic tissues in which it feeds and protects itself from plant toxic compound. The stagnation of *L. biglobosa* biomass and induced symptoms also correlates with a stagnation of transcriptomic activity from 5 dpi onward. In contrast, *L. maculans* biomass steadily increases all along the kinetics, with a high biomass increase before the first symptoms appeared. This was accompanied by a very dynamic transcriptomic activity of both the fungus, as shown previously (Gay et al., 2020b), and the plant.

The competitive exclusion of *L. maculans* by the co-inoculation with *L. biglobosa* depends on co-infection conditions

During the co-infection *in planta*, or during the co-culture *in vitro* of Lmb and Lbb, we observed a drastic impact of Lbb on Lmb, but not the reverse. This latter point is surprising since one could have imagined that suppression of plant defense responses by Lmb, mainly when inoculated two days before Lbb, would have favored necrotic colonization of the tissue by Lbb. This definitely was not the case, with a similar (lack of) increase of Lbb biomass following SSI or when plants were inoculated by both species, whatever the protocol.

The adverse effect of Lbb on Lmb was evident following visual monitoring or biomass measurements of both species, showing that the development of Lmb is stopped before primary hyphal development which led to the complete suppression of Lmb infection. Also Lbb completely modified the transcriptomic activity of Lmb *in planta* that appeared to be unable to initiate its dynamic gene regulation from 5 to 15 dpi as observed for Lmb SSI. But, this effect was observed only in one very specific condition, when both species were inoculated together at the same place and with identical concentrations of conidia of both species. A series of non self-exclusive hypotheses can be proposed to explain these observations: (i) direct toxicity of Lbb towards Lmb, (ii) inhibition of germination of conidia of Lmb in the presence of Lbb, (iii) higher speed of growth of Lbb compared to Lmb, favoring colonization of tissues by the former, (iv) adverse effect towards Lmb of the plant defense responses mobilized in response to Lbb infection, and (v) a local and quantitative competition for trophic resources.

(i) The inhibition of Lmb development by Lbb, either *in vitro* or *in planta* could be the result of a molecular interaction via the specific production by Lbb of molecules with general toxicity or directly targeting Lmb. Metabolite production is widely studied in co-infection assays on distant species. *Trichoderma harzianum* isolated from cacao pod produces nonanoic acid which inhibits the germination of *Moniliophthora roreri*, one of the most destructive pathogen of cocoa (Aneja et al., 2005). It has been shown that between phylogenetically distant saprophytic fungus, accumulation of reactive oxygen species, production of toxic metabolites (Peiris et al., 2007) or degrading enzymes could target other competitive species (Boddy and Hiscox, 2017). In fungal phytopathogens, one transcriptomic analysis suggested that specific effectors were involved in a fungal-fungal interaction during the tripartite infection of barley by *B. graminis* (obligate biotroph) and its antagonist *P. fucculosa* (Laur et al., 2018). In this study, we reported that Lbb transcriptomic dynamic was similar when it infected the cotyledons whenever Lmb was present or not. This suggests that no molecular interactions are specifically activated in Lbb to inhibit the Lmb development. Lbb could constitutively produce antagonist molecules, which are thus undetectable by comparing the Lbb transcriptome in SSI and MSI conditions, but still leading to a passive and deleterious toxic effect. In addition, this toxicity would have a dose effect since co-inoculation of *L. maculans* and lower amount of *L. biglobosa* did not indicate inhibition of growth of *L. maculans*. We also found no evidence of the production of secondary metabolites that may have an anti-fungal effect among Lbb genes which are over-expressed at 2 or 5 dpi. In contrast, key enzymes potentially involved in secondary metabolites production of unknown function were mostly expressed by Lbb at the end of the kinetics (12 dpi and 15 dpi), 10 days after the inhibition of the Lmb development

occurred. However, candidate effector genes of unknown function are produced by Lbb at 2 and 5 dpi, which may be involved in competition with other microbes as it is postulated in other cases of microbe-microbe interactions (Laur et al., 2018).

(ii) Another argument against a direct antibiosis lies in the lack of detectable effect of inhibition of germination of conidia in one or the other species when mixed conidia germination was observed and the co-existence of mycelia of both species growing alongside on solid medium (**Fig S2C**).

(iii) Competition between species can be linked to competition for space. In the literature, *L. biglobosa* is usually described as growing faster than *L. maculans* in axenic conditions as again demonstrated recently on isolates from natural populations (Newbery et al., 2020). The faster colonization of available space could thus have been a factor contributing to a better fitness of Lbb and exclusion of Lmb, but our data do not bring argument to support this hypothesis. We could not evidence significant differences in growth rate on V8-agar medium between the Lmb and Lbb isolates used here. Moreover, biomass monitoring suggested that Lbb mycelium grows at a lesser extend *in planta* and does not display continuous increase contrary to the mycelium of Lmb during SSI. The reasons for the differences between our study and those of others is unclear but may lie in individual differences between isolates of Lbb from different populations (or different sub-species) or in difference in the media used for fungal growth measurements in the different studies.

(iv) In several examples, co-infection of pathogens can lead to positive or negative indirect interaction through the modulation of the plant responses (Abdullah et al., 2017). For instance, the compatible interaction of *Blumeria graminis* on several hosts or the compatible infection of *Albugo candida* on *Brassica juncea* suppresses plant defenses which promotes in both cases the subsequent infections by avirulent strains or other unrelated pathogens (Olesen et al., 2003; Cooper et al., 2008) whereas the activation of defenses by a non-pathogenic mutant of *Fusarium graminearum* on wheat is deleterious for the subsequent infection by a virulent isolate (Ravensdale et al., 2014). Indirect interactions through the induction of Systemic Acquired Resistance (SAR) by the host have also been hypothesized to be involved in the competition within the Lmb/Lbb complex. Pre-treatment with an analog of Salicylic Acid or with Lbb spore suspensions both caused a decrease of the Lmb symptom size when inoculated on distant leaves (Liu et al., 2007, 2006).

Here we showed that the genes encoding plant defenses were activated from 5dpi in response to *L. biglobosa* or to the MSI whereas those genes were activated later and only during the necrotrophic stages, at 9 dpi in response to inoculation by *L. maculans*. During a compatible

interaction, Lmb activates the transcription of dozens of effectors dedicated to suppress plant defenses during the biotrophic stage (Gay et al., 2020b; Ma et al., 2018; Nováková et al., 2016). Here, we show that the MSI with Lbb prevents *L. maculans* to up-regulate the set of genes encoding effectors, thus depriving Lmb from the ability to suppress the plant defenses. The involvement of this potential indirect interaction on Lmb during MSI is still unclear as we could not dissociate the plant response effect from the Lbb direct competition showed by *in vitro* co-culture.

(v) It is well known that nutrient uptake plays a key role in competitive interactions and can be classified in resources-mediated competition for nutrients which then could engender a complete exclusion of one of the competitors. A depletion of nutrient or carbon sources could occur through the sequestration or the faster assimilation of some or one essential nutrient. This is highlighted in other antagonistic interactions between fungi or bacteria in which the competition is mediated for instance by the iron chelation by siderophores (Haas et al., 2008) or through competitions for carbon resources (amino acids, organic acids, and carbohydrates) (Giorni et al., 2009; Wilson and Lindow, 1994). In *L. maculans*, the analysis of a collection of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated insertion mutants revealed that many non-pathogenic mutants were affected in primary metabolism and nutrient acquisition (Remy et al., 2009, 2008a, 2008b).

The competition between both species could then be related to nutrient and resource impoverishment as suggested by the activation of nutrient uptake in Lbb between 2 and 5 dpi in MSI and SSI. However, if this kind of competition for resources occurs within the Lmb/Lbb complex, this seems to be a very local feature since the interaction between Lbb and Lmb was deleterious for Lmb only during equi-concentrated and concomitant co-infection in controlled conditions. When Lmb was pre-inoculated two days before Lbb, or when the Lbb inoculum was hundred-time less concentrated than that of *L. maculans*, no detrimental effect on growth or completion of Lmb pathogenicity cycle on cotyledons could be noticed.

The second hypothesis involving nutrition defects is that the early induction (2-5 dpi) of the necrotrophic behavior of Lbb could deploy a hostile environment for Lmb *via* the substrate transformation. In SSI, Lmb encompasses a biotrophic stage on living plant tissues which last until 7-9 dpi and during which the nutrient uptake is mediated by the metabolism of the living plant host. The competition between both species could then be related to the fact that Lmb is unable to feed on necrotic tissues during its biotrophic stage during MSI condition. Yet, Lmb has the capacity to develop on necrotic lesions during its necrotrophic stages on leaves (9-15 dpi) and in the stems (Gay et al., 2020). Thus, Lmb possesses genes dedicated to the

establishment of the necrotrophic behavior (Gay et al., 2020). However, the sequential expression waves observed in SSI might not be interchangeable or modulable to adapt its trophic type depending on the substrate changes on leaves induced by Lbb.

Whether due to competition for trophic resources, to the generation by Lbb of an environment unsuitable for the lifecycle of Lmb or/and to the effect of plant defense responses induced by Lbb on Lmb, the final result is that Lmb cannot initiate the biotrophic part of its pathogenic cycle required for the massive increase of mycelial mass prior to asexual multiplication and colonization of stems. The strong impact of *L. biglobosa* on Lmb development observed here under controlled conditions seems to contradict the continuous co-existence of both species in the different organs of the plant under field conditions. For instance, in a two-year field experiment in France, both species were detected on leaves, and it was shown that symptoms due to *L. maculans* or *L. biglobosa* could be observed at the same time suggesting a concomitant infection by ascospores of the two species (Jacques et al., 2020). The two species were also found together at the later colonization stage within stem tissues or stem residues, showing that the competition, even if occurring at the leaf level, does not exclude *L. maculans* in the presence of *L. biglobosa* at the stem base (Jacques et al., 2020; Kerdraon et al., 2019). However, the literature shows a higher colonization of stem tissues of oilseed rape by *L. biglobosa* in the field when *L. maculans* is absent due to exclusion by a resistance gene (Jacques et al., 2020), suggesting also an incidence of Lmb on Lbb that we could not evidence here. These apparently contradictory results can be probably explained by the fact that the occurrence and the frequency of exact co-infection situations tested here under controlled conditions are likely to be very different under field conditions where leaves are submitted to a constant ascospore shower of both species resulting in numerous entry points for the two species on a single leaf. Co-infection at exactly the same place and time is likely to be very rare under field infections, compared to separated or delayed infection spots, due to leaf surface size and to the length of the period of time during which primary (ascospores) or secondary (pycnidiospores) inocula are released (from autumn to spring). The lack of impact of Lbb on Lmb when infections are slightly delayed, slightly distant or done with unequal spore concentrations, as observed in our study, probably explains the co-existence of both species all along the life cycle. These results also indicate that protection by *L. biglobosa* of the attacks by *L. maculans* via SAR (Liu et al., 2007, 2006) is probably ineffective under field conditions.

MATERIALS AND METHODS

Plant and fungal materials

The *L. maculans* `brassicae` isolate JN2 (v23.1.2) was used for inoculations dedicated to RNA extraction and the same isolate JN2 constitutively expressing the GFP was used for all other experiment. The *L. biglobosa* `brassicae` isolate G12-14 was used in all experiments. The fungi were cultivated on V8-agar medium and conidia suspensions were produced as described earlier (Ansan-Melayah et al., 1995). ‘Darmor-*bzh*’, the reference sequenced cultivar (Chalhoub et al., 2014) was used in all experiments.

Production of biological material

Cotyledon inoculations and sampling

Cotyledons of 10 d-old plants of cv Darmor-*bzh* were inoculated with pycnidiospore suspensions as described previously (Gall et al., 1995). Control plants were mock-inoculated with sterile deionized water. For concomitant co-inoculations, a mixed suspension of pycnidiospores was inoculated (equi-concentrated at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹, or in a mix of 10^5 and 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ of Lbb and Lmb, respectively). For the delayed co-inoculations of Lmb and Lbb, the inoculation of Lbb at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ (or control inoculation with deionized water) was done two days after the inoculation of Lmb.

Inoculated cotyledon samples for RNA-Seq were recovered at day 0, 2, 5, 7, 9, 12 and 15 after inoculation. At each time-point, eight cotyledons from eight different plants were randomly selected. The plant tissues around the inoculation site were cut with a 10 mm disposable punch and the 16 corresponding samples were pooled together in a sterile Falcon tube, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until extraction. At each time point, two replicates were recovered and the whole experiment was repeated once.

For biomass quantification, the tissue around the inoculation points (1 cm in diameter) were collected at 2, 4, 7, 9 and 11 dpi, on six randomly selected plants (with four inoculation points per plant). The 24 samples were immediately pooled, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. At the same time-points, two plants were randomly collected for microscopic observations.

***In vitro* culture and sampling for RNA extraction**

Lmb isolate JN2 or Lbb isolate G12-14 were cultivated *in vitro* on two different media for RNA-sequencing; V8-agar medium or liquid Fries medium. After seven days of culture, the

mycelium was harvested as described previously (Gay et al., 2020b), immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Microscopic observation of infected cotyledons

On the two plants collected per condition, each half cotyledon was placed on the lid of a Petri dish and the eight inoculation points were observed with a stereomicroscope (Leica MZ16F, magnification: 6x) under brightfield or fluorescent lamp with GFP filter. At each time-point, two to four inoculation points were also observed with an optical microscope (Leica DM 5500 B) under the same conditions of light or fluorescence (magnification: 100x or 400x).

Biomass quantification

Samples were freeze-dried and ground using Retsch MM300 mixer mill in Eppendorf tubes, with one tungsten carbide bead per tube, for 45s with 30 oscillations per second. Total DNA was extracted as described in Jacques et al. (2020). DNA concentration was measured with a NanoDrop ND-1000 UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE, USA).

Fungal DNA was quantified by qPCR as described by Jacques et al. (2020), using the partial sequence of the EF1 alpha gene for Lmb quantification and of the actin gene for Lbb quantification. For calibration curves, serial dilutions of reference DNA, ranging from 5 ng to $5 \cdot 10^{-3}$ ng were used in triplicates. In each experiment, each sample was analyzed in three technical replicates.

DNA quantities of Lmb or Lbb between all dates and between all experiments were compared with a Wilcoxon test on R (version 3.4.4) on the average DNA quantity among the three independent biological replicates.

In vitro assays

Ten μ l of pycnidiospore suspensions of Lmb and/or Lbb were deposited at the centre of 9-cm Petri dishes containing V8-agar medium. Pycnidiospore suspensions were concentrated at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ or 10^5 pycnidiospores.ml⁻¹ either in separate spore suspensions for mono-culture of Lmb and Lbb or mixed in one spore suspension for co-culture. The mycelium growth was measured every two days from four days to 14 days of growth. Each plate was observed with a stereomicroscope at seven days and 14 days, as described above. All experiments were repeated twice with five Petri dishes per condition.

RNA extraction and sequencing

Cotyledons and freeze-dried cultures of fungal spores or mycelia were ground using a Retsch MM300 mixer mill in Eppendorf tubes, with one tungsten carbide bead per tube, for 45s with 30 oscillations per second. RNA extractions were performed using the Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) as previously described (Fudal et al., 2007). RNA-Seq libraries were prepared as reported earlier (Dutreux et al., 2018). Each library was sequenced using 101 bp paired-end reads chemistry on a HiSeq2000 Illumina sequencer.

Analyses of transcriptomic data

Mapping RNAseq reads on fungal genomes

Raw RNA-Seq reads were mapped with the STAR software version 020201 (Dobin et al., 2013). As Lbb and Lmb isolates are present in the same samples when they are co-inoculated, the mapping parameters have been optimized as follows (Gay et al., 2020b). We chose a number of mismatches of two and a mapping on an artificial concatenated genome of both species for the final analysis. According to the maximum intron size found in the genomes, we allowed an intron size of 10 000 pb. Other parameters have been used as follows: outFilterMultimapNmax: 100; SeedSearchStartLmax: 12; alignSJoverhangMin: 15; alignIntronMin: 10. Then, we selected the properly paired reads in BAM files with Samtools v1.6 (Li et al., 2009). Finally, FeaturesCounts version v1.5.1 (Liao et al., 2014) was used to quantify the gene expression of uniquely mapped and paired reads.

Mapping RNAseq reads on the *Brassica napus* genome

RNA-Seq reads were mapped on the *Brassica napus* V5 genome (Chalhoub et al., 2014) with the following parameters: outFilterMultimapNmax 6; outFilterMismatchNmax 2; alignIntronMin 10; alignIntronMax 50000; alignMatesGapMax 50000.

Sample correlation analysis

The three PCA, made either on *L. maculans*, *L. biglobosa* or *B. napus* gene expression data, were done with the FactoRmineR R package (Lê et al., 2008) on the scaled $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ expression.

Detection of differentially expressed genes

Differential expression analyses were made with the EdgeR package v3.20.9 (Robinson et al., 2010). Genes with a number of reads > 30 in at least one condition were kept for statistical analysis. Samples were normalized by the TMM method. The data were fitted to a negative

binomial generalized linear model by the glmFit function. Then, glmLRT function was used to compare the gene expression by using the appropriate coefficients and contrasts. Fungal gene expression (Lmb or Lbb) was compared between mono-inoculation and co-inoculation for each of the six time points of the kinetics. In *B. napus*, treatments (co-inoculation or mono-inoculation) were compared to the control cotyledons “inoculated” with water. As no *B. napus* genes were detected differentially expressed between Lbb SSI and MSI, the contrasts were adapted to compare the Lbb SSI and SSI together against the mock-inoculated water control samples. In each comparison genes were selected as differentially expressed with a LogFC > 2 and a $p < 0.05$.

Gene Ontology enrichment analysis

The plugin Bingo of the Cytoscape software v3.5.1 (Shannon et al., 2003) was used to conduct the Gene Ontology (GO) enrichment analysis. For each gene, the GO identifier was generated by the BLAST2GO software. Significant enrichments in “Molecular Function”, “Biological Process” and “Cellular Component” were detected with a hypergeometrical test by comparing the proportion of a given GO function in the gene subset of interest to its proportion in the whole protein set of Lmb, Lbb or *B. napus*.

Acknowledgments

We would like to thank Sylvain Raffaele from the LIPM institute, France, Thomas Kroj from the BGPI institute, France, Sebastien Duplessis from the IAM institute, France and Guillem Rigail from the Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, France, for helpful comments and advice on biological tests and statistics, and Antoine Gravot, (INRAE IGEPP, France), for helpful discussions. This work was supported in part by France Génomique (Leptolife project) and the Crop Health and Environment department at INRAE (FLIRT project). The “Effectors and Pathogenesis of *L. maculans*” group benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007).

Author contribution

Conceptualization, MHB, TR, CC; Formal analysis, EG, NL; Funding acquisition, TR; Investigation, EG, NJ; Methodology, EG, NL; Project administration, MHB, TR; Supervision, MHB, TR, VL; Visualization; EG; Writing draft, EG, MHB, TR; Writing review, All.

REFERENCES

- Abdullah, A.S., Moffat, C.S., Lopez-Ruiz, F.J., Gibberd, M.R., Hamblin, J., and Zerihun, A. (2017). Host–multi-pathogen warfare: pathogen interactions in co-infected plants. *Front. Plant Sci.* 8.
- Afzal, A.J., Wood, A.J., and Lightfoot, D.A. (2008). Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 507–517.
- Aneja, M., Gianfagna, T.J., and Hebbar, P.K. (2005). *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67, 304–307.
- Ansan-Melayah, D., Balesdent, M.H., Buée, M., and Rouxel, T. (1995). Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 85, 1525–1529.
- Baroncelli, R., Talhinhos, P., Pensec, F., Sukno, S.A., Le Floch, G., and Thon, M.R. (2017). The *Colletotrichum acutatum* species complex as a model system to study evolution and host specialization in plant pathogens. *Front. Microbiol.* 8.
- Becker, M.G., Zhang, X., Walker, P.L., Wan, J.C., Millar, J.L., Khan, D., Granger, M.J., Cavers, J.D., Chan, A.C., Fernando, D.W.G., et al. (2017). Transcriptome analysis of the *Brassica napus*–*Leptosphaeria maculans* pathosystem identifies receptor, signaling and structural genes underlying plant resistance. *Plant J.* 90, 573–586.
- Boddy, L., and Hiscox, J. (2017). Fungal ecology: principles and mechanisms of colonization and competition by saprotrophic fungi. In *The Fungal Kingdom*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 293–308.
- Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I.A.P., Tang, H., Wang, X., Chiquet, J., Belcram, H., Tong, C., Samans, B., et al. (2014). Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* 345, 950–953.
- Chen, Y., and Fernando, W.G.D. (2006). Induced resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease of canola (*Brassica napus*) caused by a weakly virulent isolate of *Leptosphaeria biglobosa*. *Plant Dis.* 90, 1059–1064.
- Coleman, J.J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Mol. Plant Pathol.* 17, 146–158.
- Cooper, A.J., Latunde-Dada, A.O., Woods-Tör, A., Lynn, J., Lucas, J.A., Crute, I.R., and Holub, E.B. (2008). Basic compatibility of *Albugo candida* in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica juncea* causes broad-spectrum suppression of innate immunity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 745–756.
- Dawidziuk, A., Kaczmarek, J., Podlesna, A., Kasprzyk, I., and Jedryczka, M. (2012). Influence of meteorological parameters on *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* spore release in central and eastern Poland. *Grana* 51, 240–248.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.
- Dutreux, F., Da Silva, C., d’Agata, L., Couloux, A., Gay, E.J., Istace, B., Lapalu, N., Lemainque, A., Linglin, J., Noel, B., et al. (2018). De novo assembly and annotation of three *Leptosphaeria* genomes using Oxford Nanopore MinION sequencing. *Sci. Data* 5, 180235.
- Eckert, M., Maguire, K., Urban, M., Foster, S., Fitt, B., Lucas, J., and Hammond-Kosack, K. (2005). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene DsRed and the jellyfish gene gfp. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 67–74.
- Fitt, B.D.L., Huang, Y.-J., van den Bosch, F., and West, J.S. (2006a). Coexistence of related pathogen species on arable crops in space and time. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 163–182.
- Fitt, B.D.L., Brun, H., Barbetti, M.J., and Rimmer, S.R. (2006b). World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 3–15.

- Fudal, I., Ross, S., Gout, L., Blaise, F., Kuhn, M.L., Eckert, M.R., Cattolico, L., Bernard-Samain, S., Balesdent, M.H., and Rouxel, T. (2007). Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of *AvrLm6*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *20*, 459–470.
- Gall, C., Balesdent, M.-H., Desthieux, I., Robin, P., and Rouxel, T. (1995). Polymorphism of *Tox⁰* *Leptosphaeria maculans* isolates as revealed by soluble protein and isozyme electrophoresis. *Mycol. Res.* *99*, 221–229.
- Gay, E.J., Soyer, J.L., Lapalu, N., Linglin, J., Fudal, I., Da Silva, C., Wincker, P., Aury, J.-M., Cruaud, C., Levrel, A., et al. (2020a). Large-scale transcriptomics to dissect two years of the life of a fungal phytopathogen interacting with its host plant. *BioRxiv* 2020.10.13.331520.
- Gervais, J., Plissonneau, C., Linglin, J., Meyer, M., Labadie, K., Cruaud, C., Fudal, I., Rouxel, T., and Balesdent, M.-H. (2017). Different waves of effector genes with contrasted genomic location are expressed by *Leptosphaeria maculans* during cotyledon and stem colonization of oilseed rape. *Mol. Plant Pathol.* *18*, 1113–1126.
- Giorni, P., Magan, N., and Battilani, P. (2009). Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains from maize. *Int. J. Food Microbiol.* *130*, 213–218.
- Grandaubert, J., Lowe, R.G.T., Soyer, J.L., Schoch, C.L., Van de Wouw, A.P., Fudal, I., Robbertse, B., Lapalu, N., Links, M.G., Ollivier, B., et al. (2014). Transposable element-assisted evolution and adaptation to host plant within the *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex of fungal pathogens. *BMC Genomics* *15*, 891.
- Haddadi, P., Ma, L., Wang, H., and Borhan, M.H. (2016). Genome-wide transcriptomic analyses provide insights into the lifestyle transition and effector repertoire of *Leptosphaeria maculans* during the colonization of *Brassica napus* seedlings. *Mol. Plant Pathol.* *17*, 1196–1210.
- Haas, H., Eisendle, M., and Turgeon, B.G. (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* *46*, 149–187.
- Hammond, K.E., and Lewis, B.G. (1987). Variation in stem infections caused by aggressive and non-aggressive isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* var. *oleifera*. *Plant Pathol.* *36*, 53–65.
- Howlett, B.J., Idrum, A., and Pedras, M.S. (2001). *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg disease of Brassicas. *Fungal Genet. Biol.* *33*, 1–14.
- Huang, Y.J., Hood, J.R., Eckert, M.R., Stonard, J.F., Cools, H.J., King, G.J., Rossall, S., Ashworth, M., and Fitt, B.D.L. (2011). Effects of fungicide on growth of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* in relation to development of phoma stem canker on oilseed rape (*Brassica napus*). *Plant Pathol.* *60*, 607–620.
- Jacques, N., Balesdent, M.-H., Rouxel, T., and Laval, V. (2020). New quantitative specific real-time PCR assays shed light on the epidemiology of two species of the *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex. *Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1111/ppa.13323>
- Kerdraon, L., Balesdent, M.-H., Barret, M., Laval, V., and Suffert, F. (2019). Crop residues in wheat-oilseed rape rotation system: a pivotal, shifting platform for microbial meetings. *Microb. Ecol.* *77*, 931–945.
- Kuzdraliński, A., Szczerba, H., Tofil, K., Filipiak, A., Garbarczyk, E., Dziadko, P., Muszyńska, M., and Solarska, E. (2014). Early PCR-based detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. poae* on stem bases of winter wheat throughout Poland. *Eur. J. Plant Pathol.* *140*, 491–502.
- Lamichhane, J.R., and Venturi, V. (2015). Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Front. Plant Sci.* *6*, 385.
- Laur, J., Ramakrishnan, G.B., Labbé, C., Lefebvre, F., Spanu, P.D., and Bélanger, R.R. (2018). Effectors involved in fungal-fungal interaction lead to a rare phenomenon of hyperbiotrophy in the tritrophic system biocontrol agent-powdery mildew-plant. *New Phytol.* *217*, 713–725.
- Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008). FactoMineR : An R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* *25*.

- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *25*, 2078–2079.
- 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.
- Liu, S., Liu, R., Latunde-Dada, A.O., Cools, H.J., Foster, S.J., Huang, Y., and Fitt, B.D.L. (2007). Comparison of *Leptosphaeria biglobosa*-induced and chemically induced systemic resistance to *L. maculans* in *Brassica napus*. *Chin. Sci. Bull.* *52*, 1053–1062.
- Liu, S.Y., Liu, Z., Fitt, B.D.L., Evans, N., Foster, S.J., Huang, Y.J., Latunde-Dada, A.O., and Lucas, J.A. (2006). Resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) induced by *L. biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments. *Plant Pathol.* *55*, 401–412.
- Lowe, R.G.T., Cassin, A., Grandaubert, J., Clark, B.L., Van de Wouw, A.P., Rouxel, T., and Howlett, B.J. (2014). Genomes and transcriptomes of partners in plant-fungal-interactions between canola (*Brassica napus*) and two *Leptosphaeria* species. *PLoS One* *9*, e103098.
- Ma, L., Djavaheri, M., Wang, H., Larkan, N.J., Haddadi, P., Beynon, E., Gropp, G., and Borhan, M.H. (2018). *Leptosphaeria maculans* effector protein AvrLm1 modulates plant immunity by enhancing MAP Kinase 9 phosphorylation. *IScience* *3*, 177–191.
- Mahuku, G.S., Hall, R., and Goodwin, P.H. (1996). Co-infection and induction of systemic acquired resistance by weakly and highly virulent isolates of *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *49*, 61–72.
- Marquez, N., Giachero, M.L., Gallou, A., Debat, H.J., Cranenbrouck, S., Di Rienzo, J.A., Pozo, M.J., Ducasse, D.A., and Declerck, S. (2018). Transcriptional changes in mycorrhizal and nonmycorrhizal soybean plants upon infection with the fungal pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Mol. Plant Microbe Interact.* *31*, 842–855.
- May, C.L., Potage, G., Andrivon, D., Tivoli, B., and Outreman, Y. (2009). Plant disease complex: antagonism and synergism between pathogens of the ascochyta blight complex on pea. *J. Phytopathol.* *157*, 715–721.
- Mendes-Pereira, E., Balesdent, M.-H., Brun, H., and Rouxel, T. (2003). Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*-*L. biglobosa* species complex. *Mycol. Res.* *107*, 1287–1304.
- Mougou-Hamdane, A., Giresse, X., Dutech, C., and Desprez-Loustau, M.-L. (2010). Spatial distribution of lineages of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods. *Ann. For. Sci.* *67*, 212.
- Newbery, F., Ritchie, F., Gladders, P., Fitt, B.D.L., and Shaw, M.W. (2020). Inter-individual genetic variation in the temperature response of *Leptosphaeria* species pathogenic on oilseed rape. *Plant Pathol.* *69*, 1469–1481.
- Nováková, M., Šašek, V., Trdá, L., Krutinová, H., Mongin, T., Valentová, O., Balesdent, M.-H., Rouxel, T., and Burketová, L. (2016). *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm4-7 affects salicylic acid (SA) and ethylene (ET) signalling and hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in *Brassica napus*. *Mol. Plant Pathol.* *17*, 818–831.
- Olesen, K.L., Carver, T.L.W., and Lyngkjær, M.F. (2003). Fungal suppression of resistance against inappropriate *Blumeria graminis* formae speciales in barley, oat and wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *62*, 37–50.
- Peiris, D., Dunn, W.B., Brown, M., Kell, D.B., Roy, I., and Hedger, J.N. (2007). Metabolite profiles of interacting mycelial fronts differ for pairings of the wood decay basidiomycete fungus, *Stereum hirsutum* with its competitors *Coprinus micaceus* and *Coprinus disseminatus*. *Metabolomics* *4*, 52.
- Ravensdale, M., Rocheleau, H., Wang, L., Nasmith, C., Ouellet, T., and Subramaniam, R. (2014). Components of priming-induced resistance to *Fusarium* head blight in wheat revealed by two distinct mutants of *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant Pathol.* *15*, 948–956.

- Remy, E., Meyer, M., Blaise, F., Chabirand, M., Wolff, N., Balesdent, M.-H., and Rouxel, T. (2008a). The *Lmpmal* gene of *Leptosphaeria maculans* encodes a plasma membrane H⁺-ATPase isoform essential for pathogenicity towards oilseed rape. *Fungal Genet. Biol.* *45*, 1122–1134.
- Remy, E., Meyer, M., Blaise, F., Simon, U.K., Kuhn, D., Chabirand, M., Riquelme, M., Balesdent, M.-H., and Rouxel, T. (2008b). The *Lmgpi15* gene, encoding a component of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis pathway, is required for morphogenesis and pathogenicity in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.* *179*, 1105–1120.
- Remy, E., Meyer, M., Blaise, F., Simon, U.K., Kuhn, D., Balesdent, M.H., and Rouxel, T. (2009). A key enzyme of the Leloir pathway is involved in pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* toward oilseed rape. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *22*, 725–736.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *26*, 139–140.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* *13*, 2498–2504.
- Shoemaker, R.A., and Brun, H. (2001). The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Can. J. Bot.* *79*, 412–419.
- 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*.
- Stonard, J.F., Latunde-Dada, A.O., Huang, Y.-J., West, J.S., Evans, N., and Fitt, B.D.L. (2010). Geographic variation in severity of phoma stem canker and *Leptosphaeria maculans*/*L. biglobosa* populations on UK winter oilseed rape (*Brassica napus*). *Eur. J. Plant Pathol.* *126*, 97.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., and Fisher, M.C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in Fungi. *Fungal Genet. Biol.* *31*, 21–31.
- Tollenaere, C., Susi, H., and Laine, A.-L. (2016). Evolutionary and epidemiological implications of multiple infection in plants. *Trends Plant Sci.* *21*, 80–90.
- Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., and Pieterse, C.M.J. (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* *70*, 1581–1588.
- Walsh, K., Korimbocus, J., Boonham, N., Jennings, P., and Hims, M. (2005). Using Real-time PCR to discriminate and quantify the closely related wheat pathogens *Oculimacula yallundae* and *Oculimacula acufiformis*. *J. Phytopathol.* *153*, 715–721.
- West, J.S., Kharbanda, P.D., Barbetti, M.J., and Fitt, B.D.L. (2001). Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathol.* *50*, 10–27.
- Wilson, M., and Lindow, S.E. (1994). Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Appl. Environ. Microbiol.* *60*, 4468–4477.
- Xu, X.-M., Nicholson, P., Thomsett, M.A., Simpson, D., Cooke, B.M., Doohan, F.M., Brennan, J., Monaghan, S., Moretti, A., Mule, G., et al. (2007). Relationship between the fungal complex causing fusarium head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology* *98*, 69–78.
- Zhang, H., Zheng, X., and Zhang, Z. (2016). The *Magnaporthe grisea* species complex and plant pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* *17*, 796–804.

Supplementary figures:

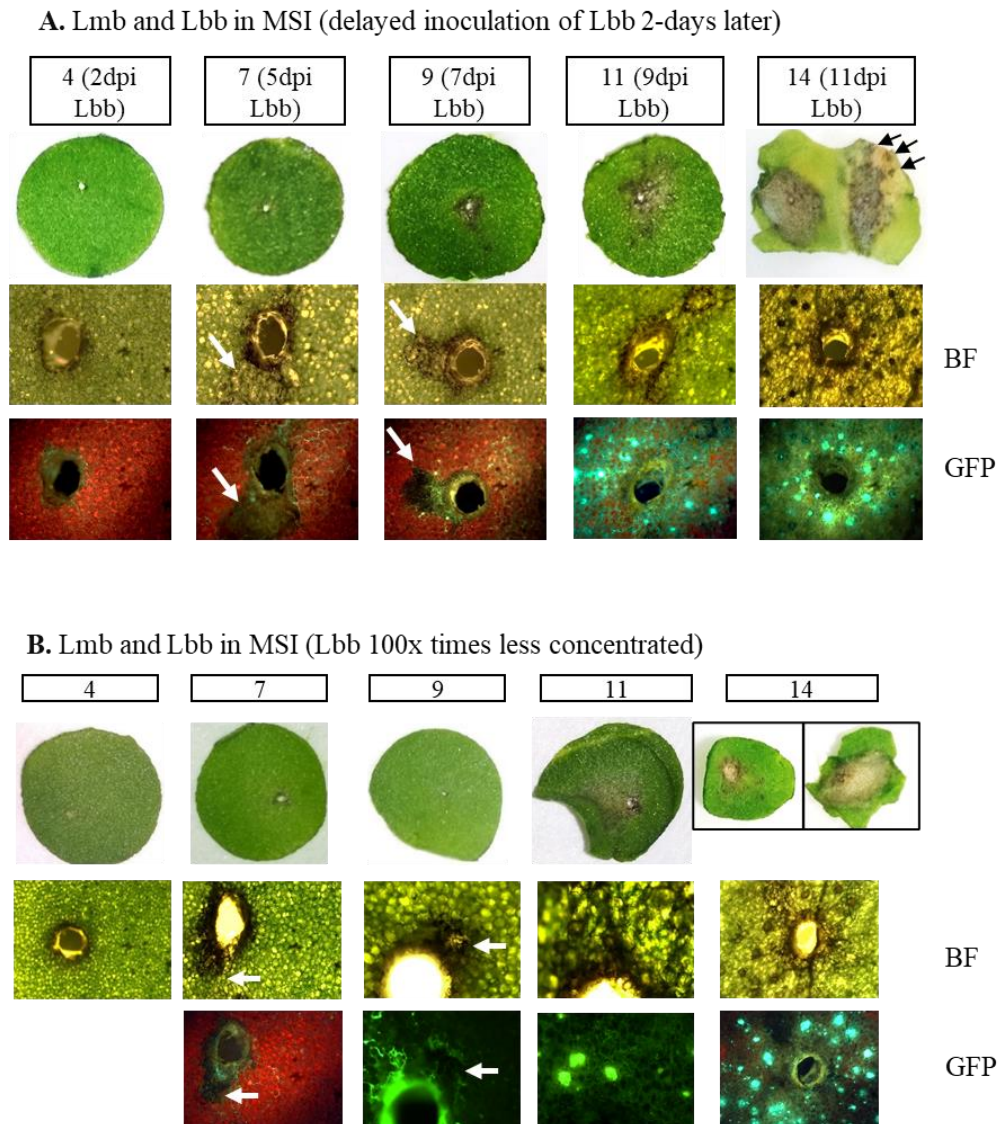


Fig S1: Monitoring of symptoms and fungal development following Mixed Species Inoculation (MSI) of *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb) on *Brassica napus* cotyledons with varying parameters.

(A) Lmb (transgenic isolate JN2 expressing GFP) was inoculated at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ and a delayed inoculation of Lbb (isolate G12-14) at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ was made two days later. (B) *B. napus* cotyledons were co-inoculated with a mixed suspension of pycnidiospores of Lmb and Lbb in different concentrations. Lmb was inoculated at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ and Lbb was inoculated at 10^5 pycnidiospores.ml⁻¹. The cotyledons were collected and observed at six different time points (4,7,9,11,14 days post inoculation; dpi), using a stereomicroscope under brightfield (BF) or using a GFP filter (magnification: X6). Pictures with a higher magnification factor were taken using an optical microscope under BF or GFP-filter (X100). Arrows point the dark necrotic spots, free from GFP fluorescence, caused by Lbb and visible at 7 and 9 dpi. The pictures are representative of observations made on eight infection points with three biological replicates.

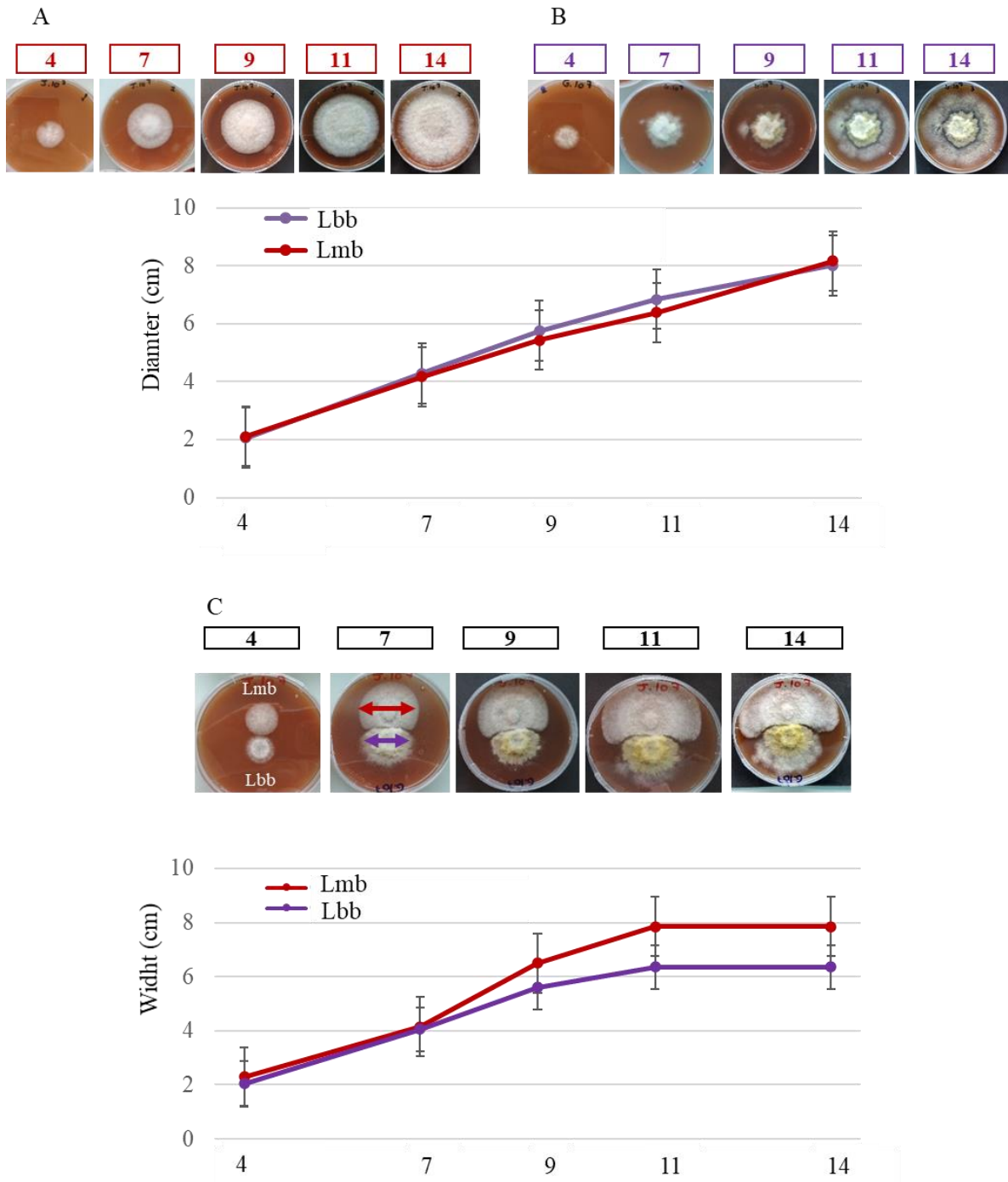


Fig S2: Monitoring of fungal growth following Single Species Inoculation (SSI) of *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb) during individual growth or side by side growth on *in vitro* media.

(A) Lmb (transgenic isolate JN2 expressing GFP) concentrated at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ was inoculated. (B) Lbb concentrated at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ was inoculated. (C) Lmb and Lbb suspension at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ each were inoculated at two centimeters of distance. The mycelium diameter (for SSI) or width (represented by red and purple arrows in confrontation pictures) were measured at six different time points (4,7,9,11,14 days post inoculation; dpi) on five Petri dishes with two replicates. Standard deviation is represented.

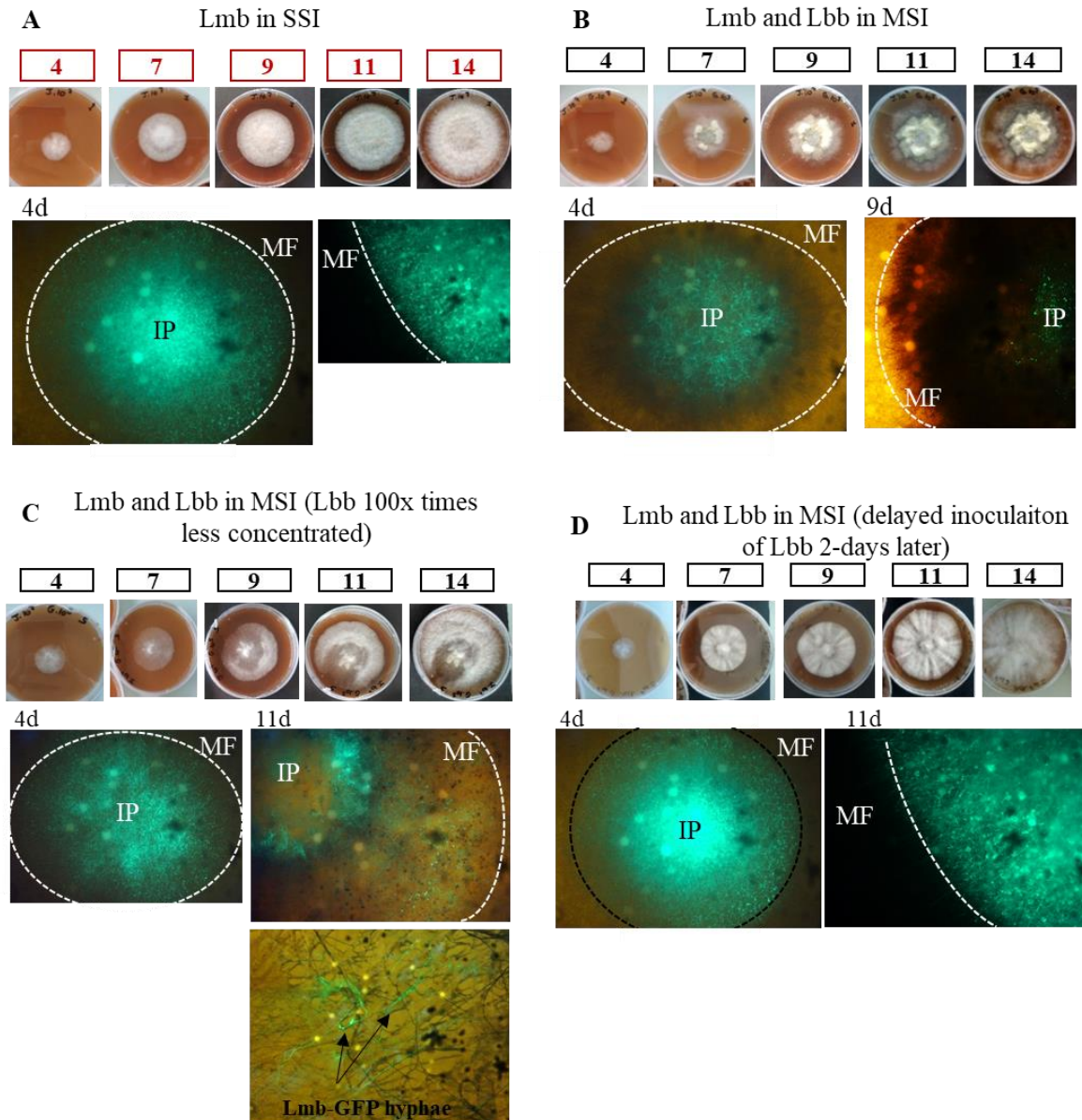


Fig S3: Monitoring of fungal *in vitro* growth following SSI or MSI of *Leptosphaeria maculans* 'brassicae' (Lmb) and *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae' (Lbb) with varying parameters.

(A) Lmb (transgenic isolate JN2 expressing GFP) concentrated at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ was inoculated. Three different MSI conditions were monitored (B) concomitant MSI with mixed suspension of pycnidiospores of both Lmb and Lbb species present in equal quantity (10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ each), (C) concomitant MSI with different concentrations: Lmb at 10^7 pycnidiospores.ml⁻¹ and Lbb at 10^5 pycnidiospores.ml⁻¹ and (D) delayed MSI with an addition of Lbb inoculum two days after the inoculation of Lmb; (ii). The mycelium was observed at six different time points (4,7,9,11,14 days post inoculation; dpi). For each kinetics, pictures represent the Lmb and Lbb growth using a stereomicroscope under a GFP filter at the beginning (4 days; 4d) and later in the kinetics (9d or 11d). The initial inoculation point (IP) and the migration front (hashed lines, MF) are shown. The pictures are representative observations done on eight infection points with three biological replicates.

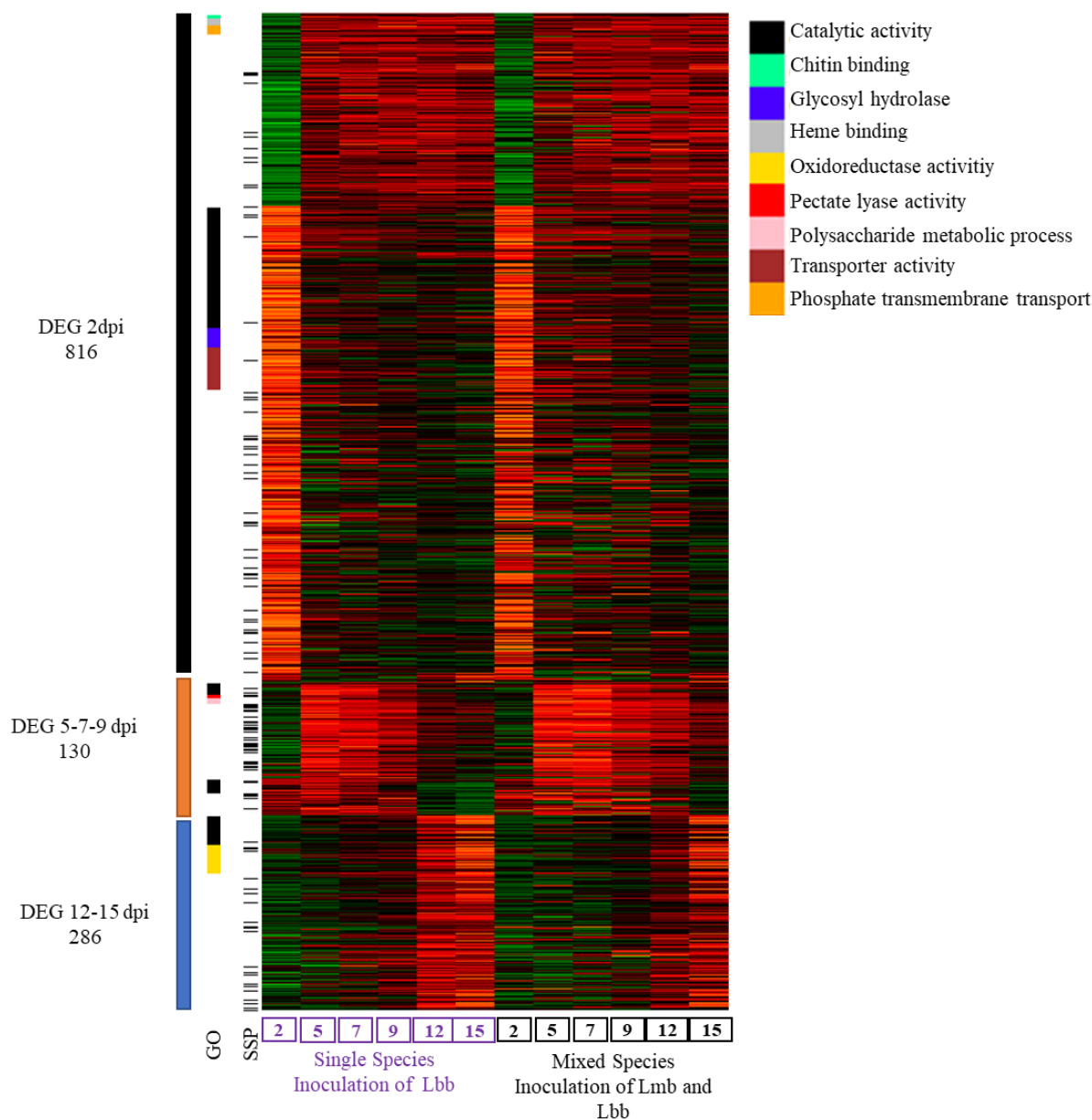


Fig S4: Expression profiles of the 1,233 genes of *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb) detected as differentially expressed during the 15-days infection of *Brassica napus* cotyledons either following single species inoculation (SSI) or when inoculated as a mix (MSI) with *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’.

Differentially expressed genes (DEGs) were detected using three different comparisons on samples obtained from the SSI inoculation of Lbb: 2 dpi vs 5-7-9-12-15 dpi (816 genes, black bar on the left of the heatmap), 5-7-9 dpi vs. 2-12-15 dpi (130 genes, orange bar on the left of the heatmap) and 12-15 dpi vs 2-5-7-9 dpi (286 genes, blue bar on the left of the heatmap). Gene raw counts of Lbb in SSI and MSI conditions were $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ transformed and then centered. The heatmap represents the normalized expression of DEGs detected on SSI and their expression is also shown in MSI conditions. SSP, genes annotated as Small Secreted Protein repertoire (horizontal black bars). Five categories of the “Molecular Function” Gene Ontology (GO) show a significant enrichment and are identified by colored bars on the left of the heatmap (Catalytic activities in black; Chitin binding in cyan; Glycosyl hydrolase activity in blue; Pectate lyase activity in red; Transmembrane transport activity in brown).

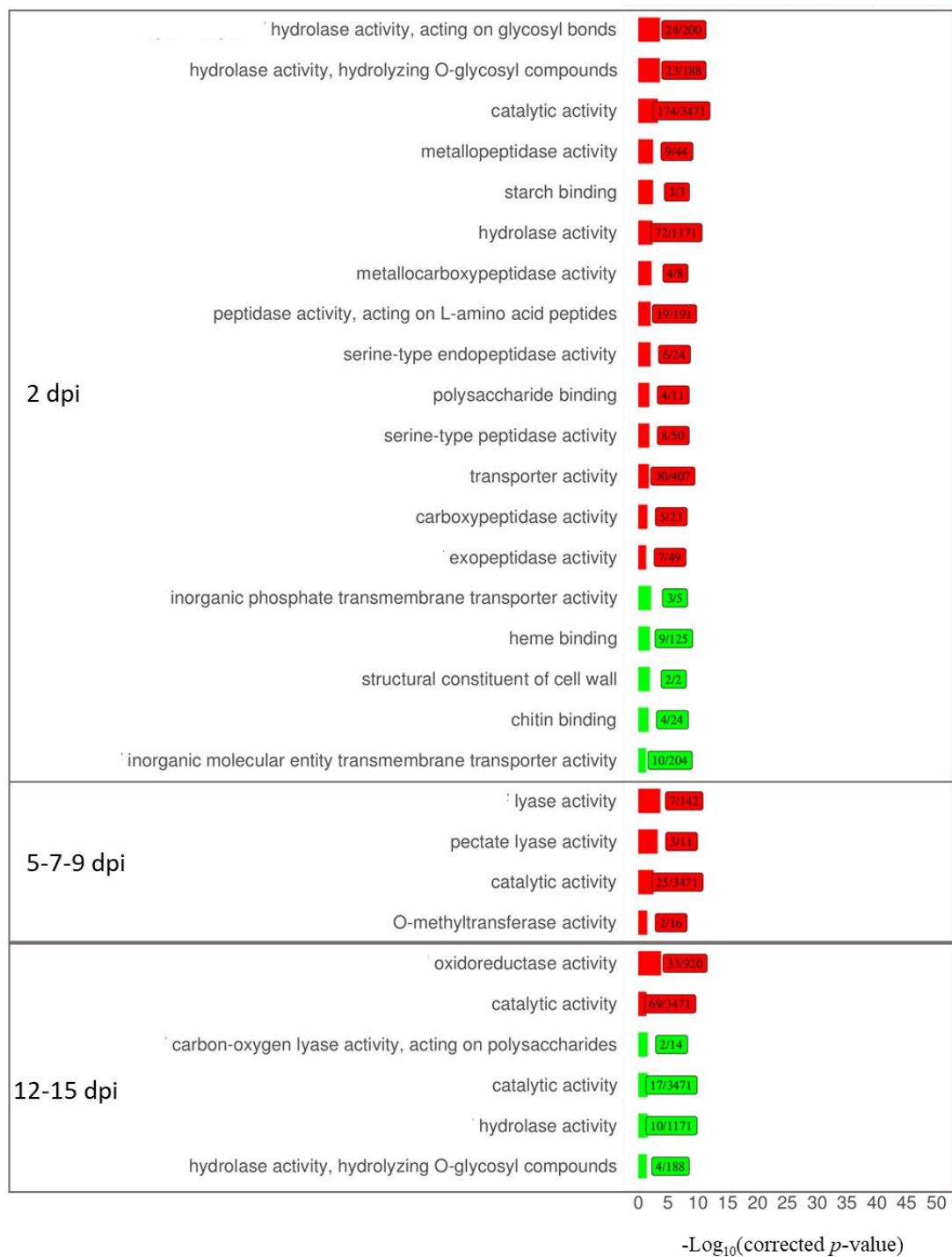


Fig S5: Detection of Gene Ontology enrichments (“Molecular Function” category) among *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ down-regulated gene set (green) or up-regulated gene set (red) during infection of cotyledons of *Brassica napus*.

For each of the three stages depicted in Fig. S4, (2 days post-inoculation (dpi), 5-7-9 dpi, and 12-15 dpi), GO enrichment in the set of genes up-regulated (red) or down-regulated (green) was identified using a hypergeometrical test with the Cytoscape tool Bingo. The y axis indicates the terms overrepresented in the Molecular function category. The x axis represents the $-\text{Log}_{10}(\text{corrected } p\text{-value})$ of the enrichment test. The numbers in the boxes indicate the number of genes assigned to the corresponding Molecular Function in the cluster (left) and the total number of genes associated to this Molecular Function term in the whole genome gene set (right).

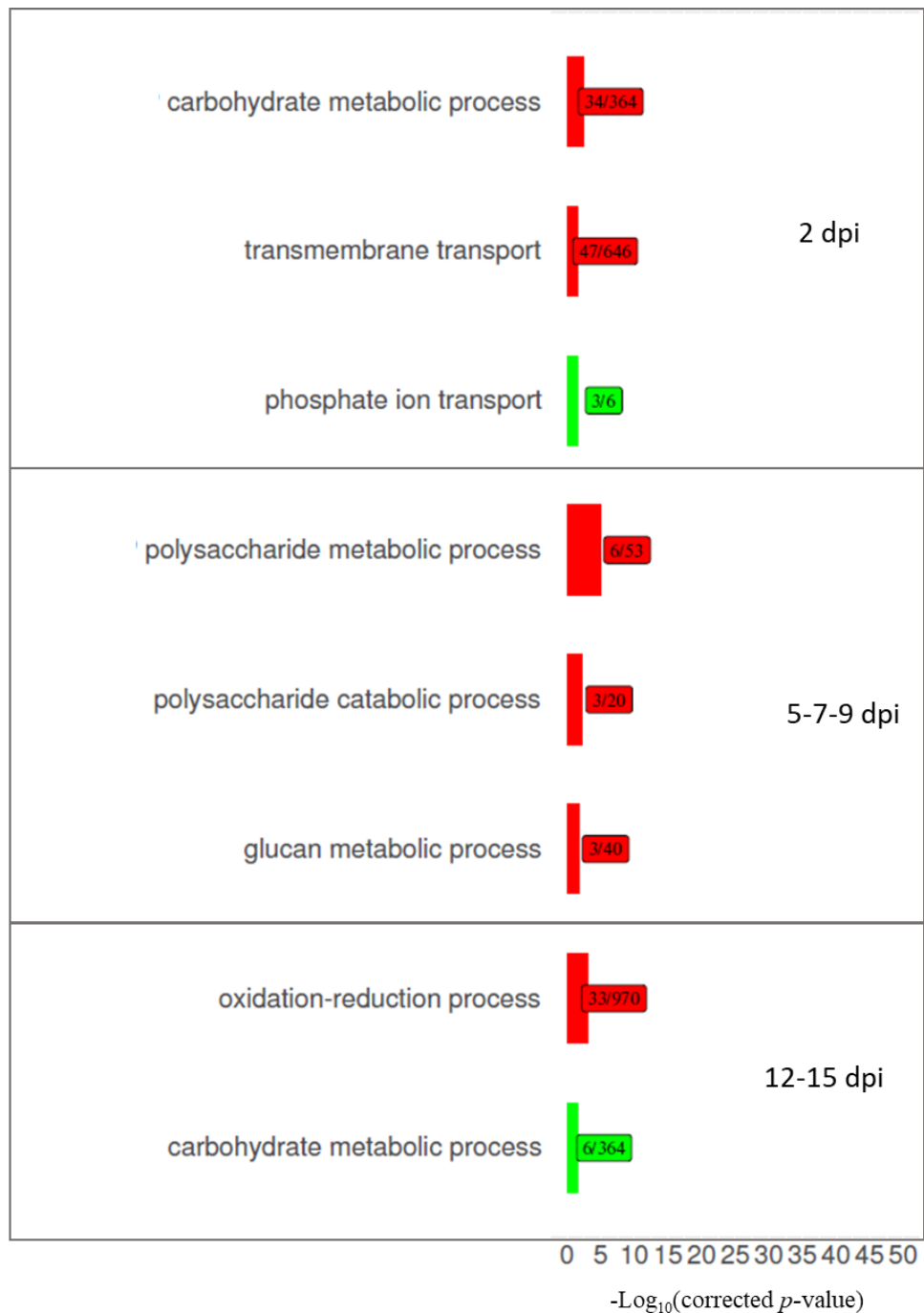


Fig S6: Detection of Gene Ontology enrichments (“Biological process” category) among *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ down-regulated gene set (green) or up-regulated gene set (red) during infection of cotyledons of *Brassica napus*.

For each of the three stages depicted in Fig. S4, (2 days post-inoculation (dpi), 5-7-9 dpi, and 12-15 dpi), GO enrichment in the set of genes up-regulated (red) or down-regulated (green) was identified using a hypergeometrical test with the Cytoscape tool Bingo. The y axis indicates the terms overrepresented in the Biological Process category. The x axis represents the $-\text{Log}_{10}(\text{corrected } p\text{-value})$ of the enrichment test. The numbers in the boxes indicate the number of genes assigned to the corresponding Biological Process in the cluster (left) and the total number of genes associated to this Biological Process term in the whole genome gene set (right).

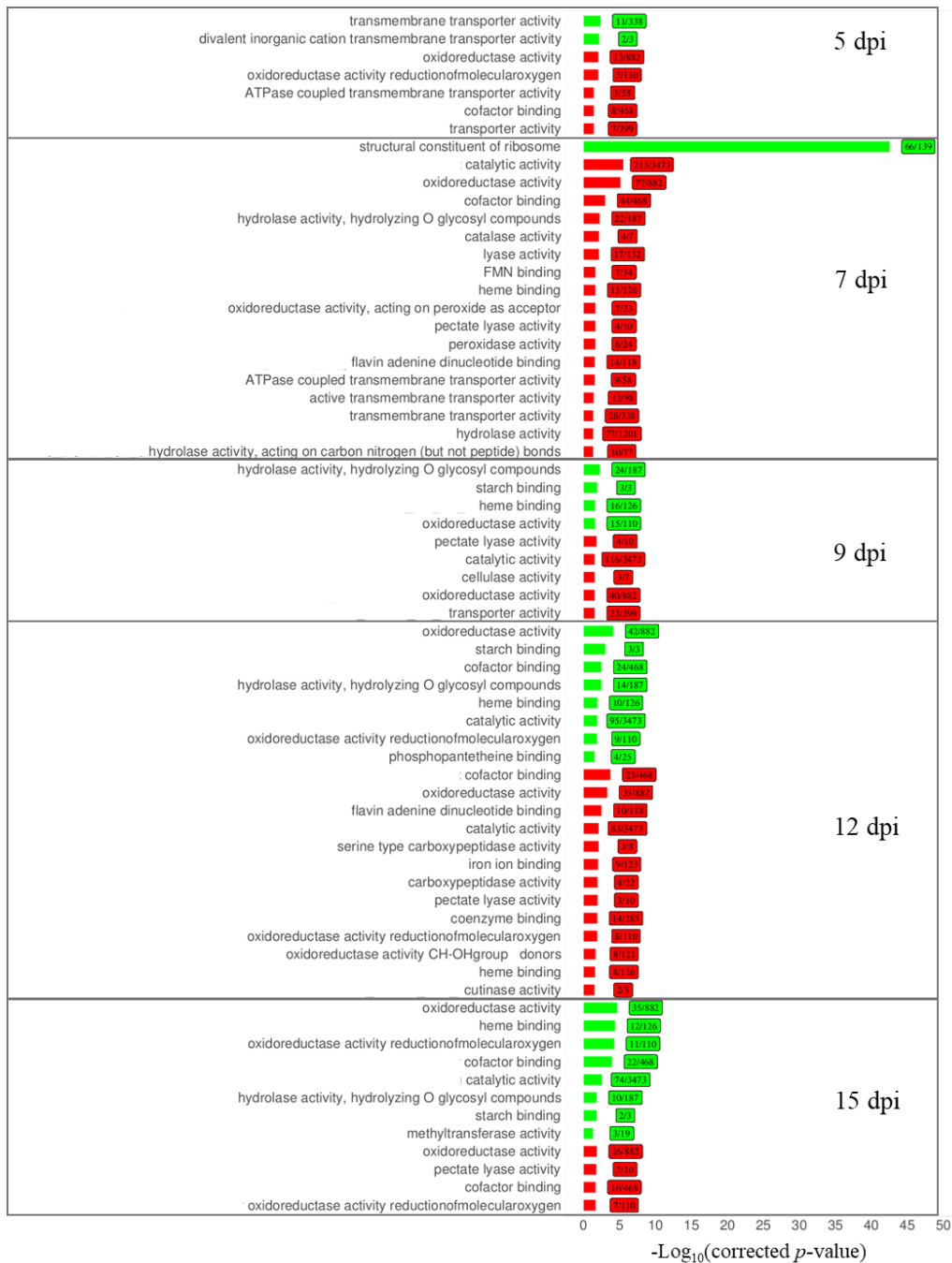


Fig S7: Detection of Gene Ontology enrichments (“Molecular Function” category) among *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) down-regulated gene set (green) or up-regulated gene set (red) during Mixed Species Inoculation (MSI) compared to Single Species Inoculation (SSI).

For each time point of the kinetics of infection (5, 7, 9, 12 or 15 days post-inoculation-dpi), GO enrichment in the set of genes up-regulated (red) or down-regulated (green) in Lmb during MSI compared to SSI was identified using a hypergeometrical test with the Cytoscape tool Bingo. The y axis indicates the terms overrepresented in the Molecular Function category. The x axis represents the $-\text{Log}_{10}(\text{corrected } p\text{-value})$ of the enrichment test. The numbers in the boxes indicate the number of genes assigned to the corresponding Molecular Function in the cluster (left) and the total number of genes associated to this Biological Process term in the whole genome gene set (right).

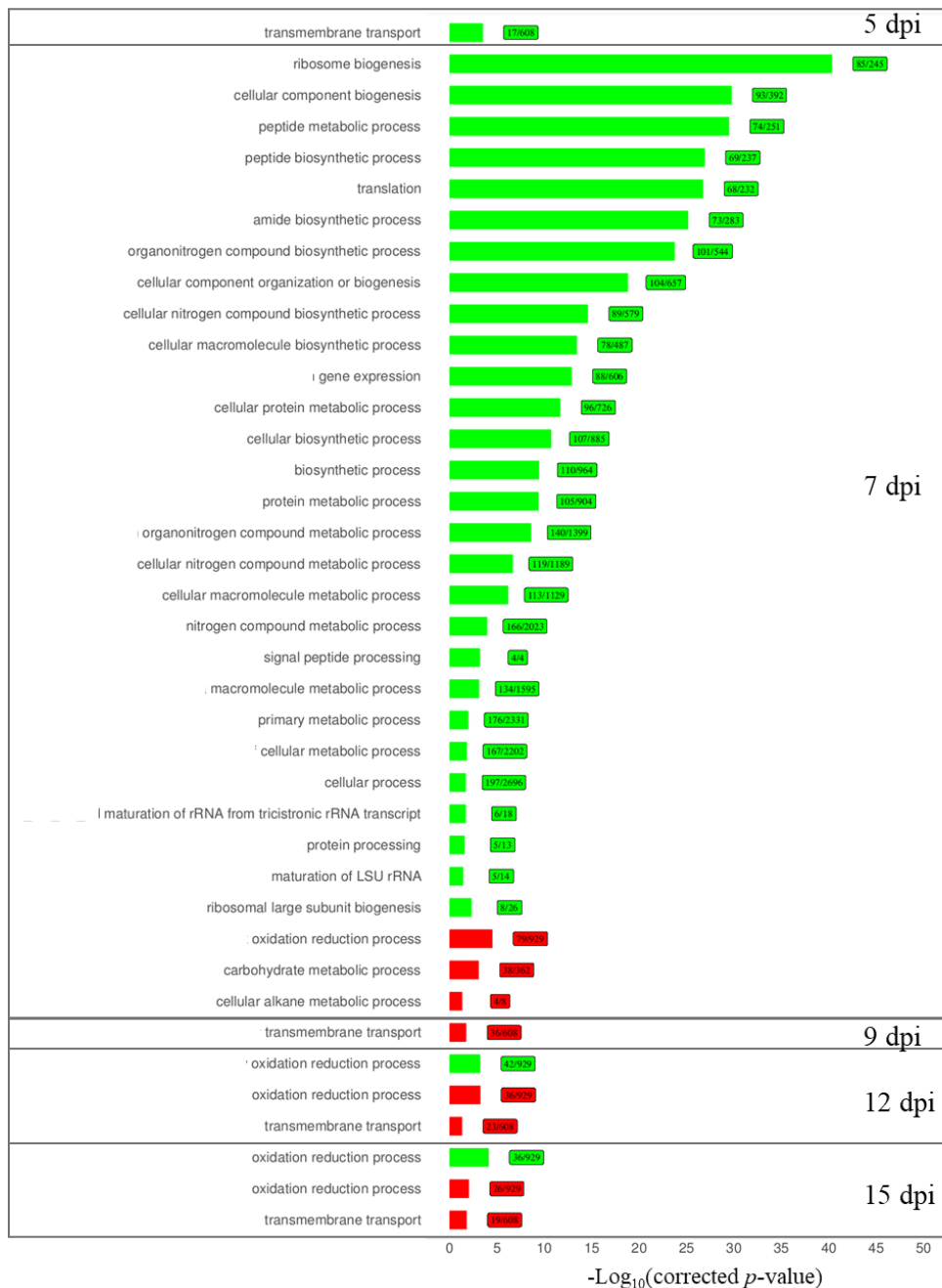


Fig S8: Detection of Gene Ontology enrichments (“Biological Process” category) among *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) down-regulated gene set (green) or up-regulated gene set (red) during Mixed Species Inoculation (MSI) compared to Single Species Inoculation (SSI).

For each time point of the kinetics of infection (5, 7, 9, 12 or 15 days post-inoculation-dpi), GO enrichment in the set of genes up-regulated (red) or down-regulated (green) in Lmb during MSI compared to SSI was identified using a hypergeometrical test with the Cytoscape tool Bingo. The y axis indicates the terms overrepresented in the Biological Process category. The x axis represents the $-\text{Log}_{10}(\text{corrected } p\text{-value})$ of the enrichment test. The numbers in the boxes indicate the number of genes assigned to the corresponding Biological Process in the cluster (left) and the total number of genes associated to this Biological Process term in the whole genome gene set (right).

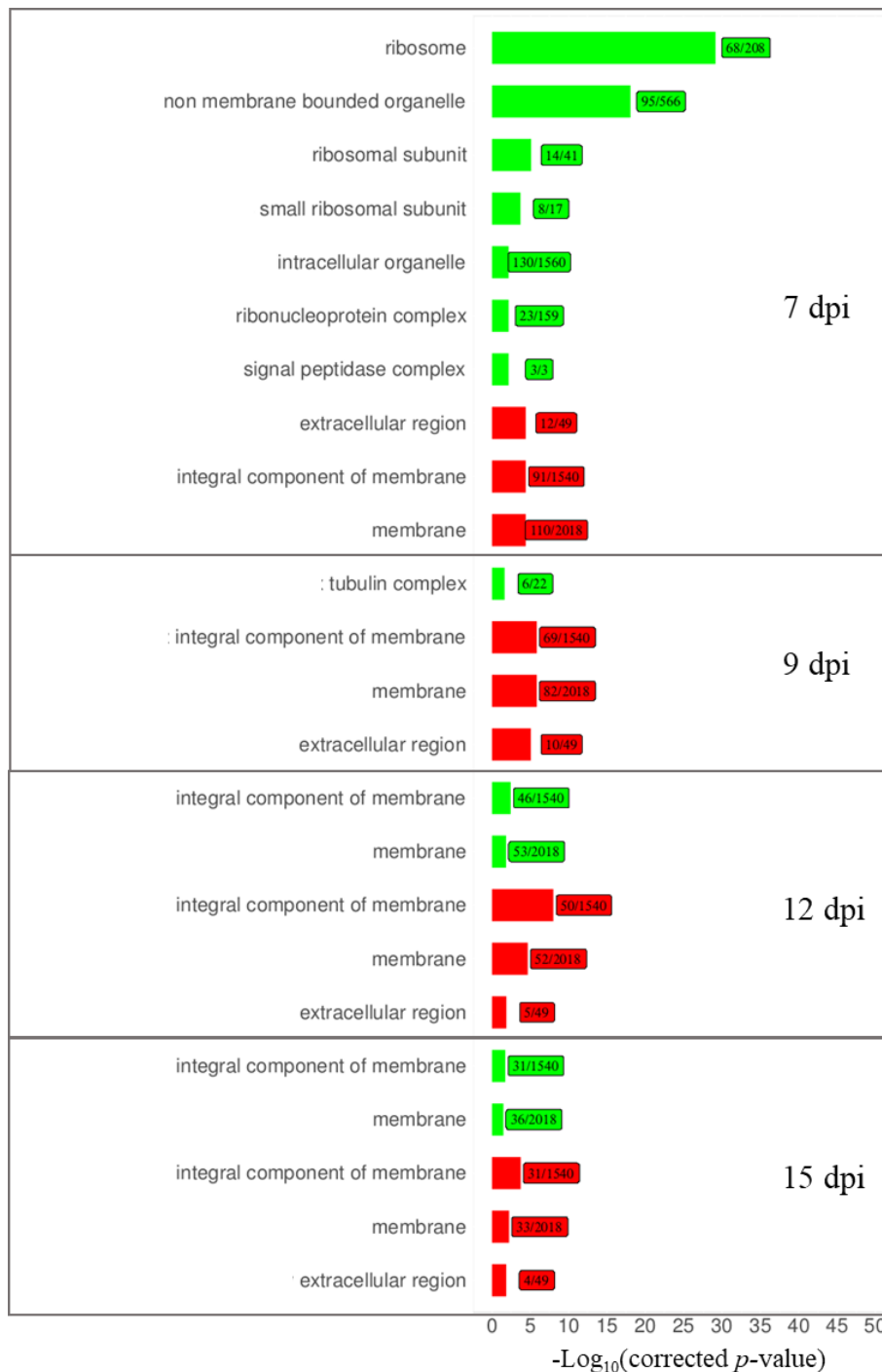


Fig S9: Detection of Gene Ontology enrichments (“Cellular Component” category) among *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) down-regulated gene set (green) or up-regulated gene set (red) during Mixed Species Inoculation (MSI) compared to Single Species Inoculation (SSI).

For each time point of the kinetics of infection (5, 7, 9, 12 or 15 days post-inoculation-dpi), GO enrichment in the set of genes up-regulated (red) or down-regulated (green) in Lmb during MSI compared to SSI was identified using a hypergeometrical test with the Cytoscape tool Bingo. The y axis indicates the terms overrepresented in the Cellular Component category. The x axis represents the $-\text{Log}_{10}(\text{corrected } p\text{-value})$ of the enrichment test. The numbers in the boxes indicate the number of genes assigned to the corresponding Cellular Component in the cluster (left) and the total number of genes associated to this Cellular Component term in the whole genome gene set (right).

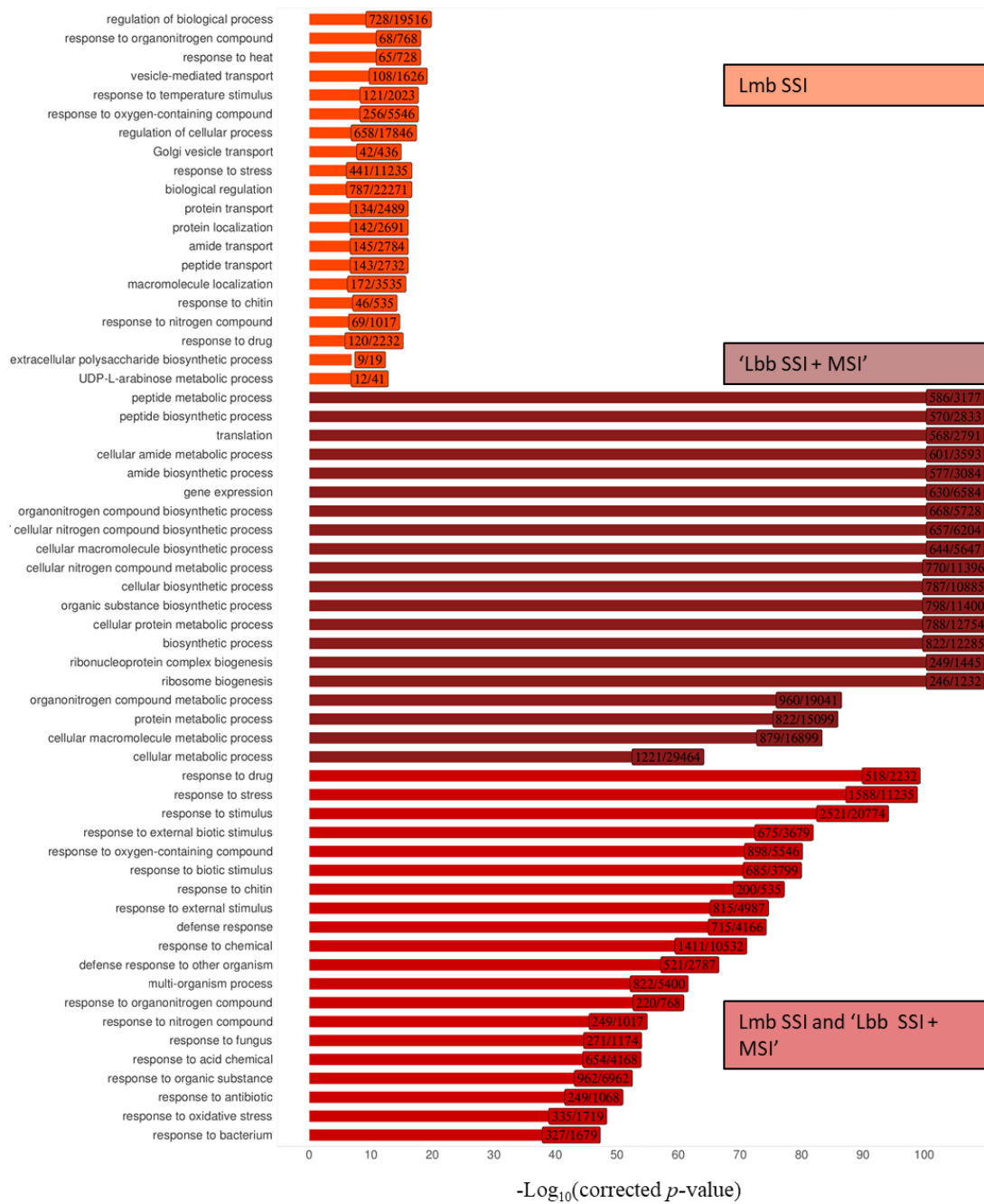


Fig S10: Top twenty enrichments of the Gene Ontology category “Biological Process” detected in the gene sets of *Brassica napus* up-regulated following inoculation with *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and/or *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

‘Lmb SSI’: Top twenty enrichments found in genes down-regulated compared to the mock inoculated plant following Single Species Inoculation (SSI) with Lmb. ‘Lbb SSI + MSI’: Top twenty enrichments found following Lbb SSI and Mixed Species Inoculation (Lmb + Lbb). ‘Lmb SSI’ and ‘Lbb SSI + MSI’: Top twenty enrichments found as a common response to all inoculation procedures. For the tree gene sets, enrichment analyses were done using a hypergeometrical test with the Cytoscape tool Bingo. The y axis indicates the overrepresented Biological Process terms. The x axis represents the resulting $-\text{Log}_{10}(\text{corrected } p\text{-value})$ of the enrichment test. The numbers in the boxes indicate the number of genes assigned to the corresponding Biological Process in the cluster (left) and the total number of genes associated to this Biological Process term in the whole gene set (right).



Fig S11: Top twenty enrichments of the Gene Ontology category “Molecular Function” detected in the gene sets of *Brassica napus* up-regulated following inoculation with *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and/or *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

‘Lmb SSI’: Top twenty enrichments found in genes down-regulated compared to the mock inoculated plant following Single Species Inoculation (SSI) with Lmb. ‘Lbb SSI + MSI’: Top twenty enrichments found following Lbb SSI and Mixed Species Inoculation (Lmb + Lbb). ‘Lmb SSI and ‘Lbb SSI + MSI’: Top twenty enrichments found as a common response to all inoculation procedures. For the tree gene sets, enrichment analyses were done using a hypergeometrical test with the Cytoscape tool Bingo. The y axis indicates the overrepresented Molecular Function terms. The x axis represents the resulting $-\text{Log}_{10}(\text{corrected } p\text{-value})$ of the enrichment test. The numbers in the boxes indicate the number of genes assigned to the corresponding Molecular Function term in the cluster (left) and the total number of genes associated to this Molecular Function term in the whole gene set (right).

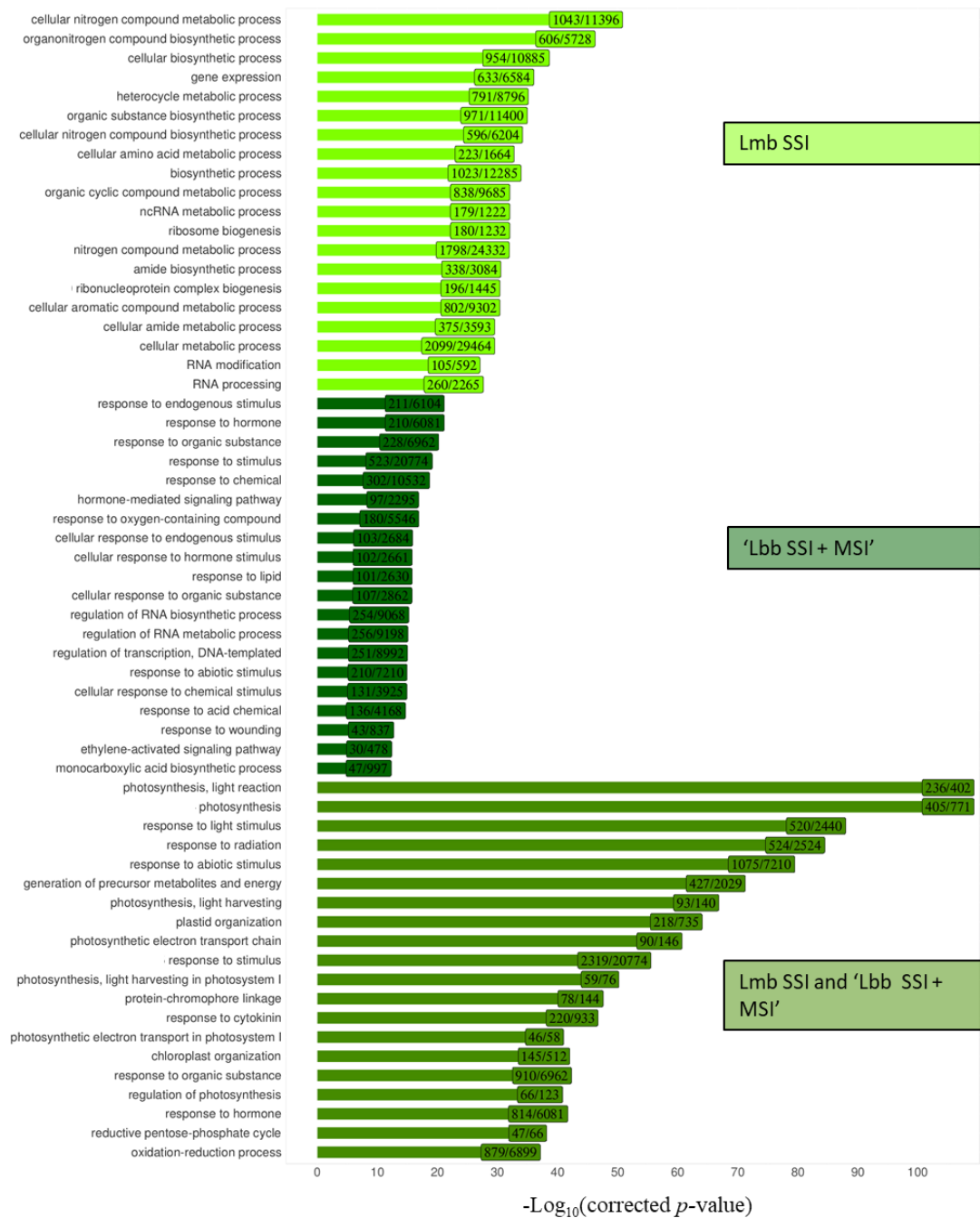


Fig S12: Top twenty enrichments of the Gene Ontology category “Biological Process” detected in the gene sets of *Brassica napus* down-regulated following inoculation with *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and/or *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

‘Lmb SSI’: Top twenty enrichments found in genes down-regulated compared to the mock inoculated plant following Single Species Inoculation (SSI) with Lmb. ‘Lbb SSI + MSI’: Top twenty enrichments found following Lbb SSI and Mixed Species Inoculation (Lmb + Lbb). ‘Lmb SSI and ‘Lbb SSI + MSI’: Top twenty enrichments found as a common response to all inoculation procedures. For the tree gene sets, enrichment analyses were done using a hypergeometrical test with the Cytoscape tool Bingo. The y axis indicates the overrepresented Biological Process terms. The x axis represents the resulting $-\text{Log}_{10}(\text{corrected } p\text{-value})$ of the enrichment test. The numbers in the boxes indicate the number of genes assigned to the corresponding Biological Process in the cluster (left) and the total number of genes associated to this Biological Process term in the whole gene set (right).

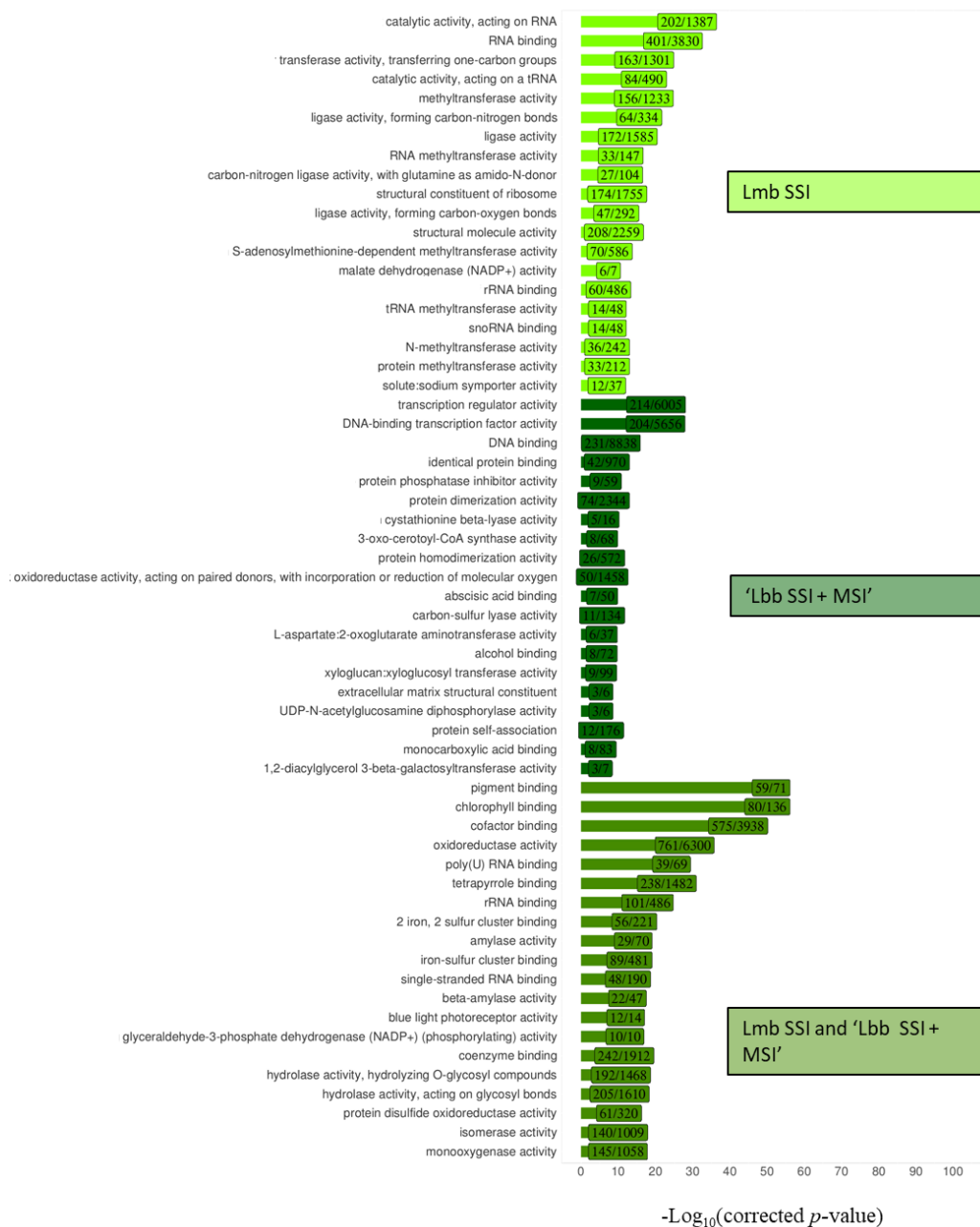


Fig S13: Top twenty enrichments of the Gene Ontology category “Molecular Function” detected in the gene sets of *Brassica napus* down-regulated following inoculation with *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb) and/or *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ (Lbb).

‘Lmb SSI’: Top twenty enrichments found in genes down-regulated compared to the mock inoculated plant following Single Species Inoculation (SSI) with Lmb. ‘Lbb SSI + MSI’: Top twenty enrichments found following Lbb SSI and Mixed Species Inoculation (Lmb + Lbb). ‘Lmb SSI and ‘Lbb SSI + MSI’: Top twenty enrichments found as a common response to all inoculation procedures. For the tree gene sets, enrichment analyses were done using a hypergeometrical test with the Cytoscape tool Bingo. The y axis indicates the overrepresented Molecular Function terms. The x axis represents the resulting $-\text{Log}_{10}(\text{corrected } p\text{-value})$ of the enrichment test. The numbers in the boxes indicate the number of genes assigned to the corresponding Molecular Function in the cluster (left) and the total number of genes associated to this Molecular Function term in the whole gene set (right).

Supplementary tables

Table S1: Results of read mapping from RNA-Seq of 52 samples corresponding to infection of cotyledons of *Brassica napus* by *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’, *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicacae’ and both species together.

ID		Biological samples description						fungal mapping results				relative fungal reads			Plant mapping results			
Project ID	Samples accession	ID	BIL ID	<i>B. napus</i> cultivar infected or <i>in vitro</i> flung structure	Plant tissue inoculated or <i>in vitro</i> flung structure	fungal species inoculated, isolate	* Prelevment time points	Replicates	Nb total of reads in the library	% of reads assigned to <i>L. maculans</i> , isolate JN3	Nb of reads assigned to <i>L. maculans</i> , isolate JN3	% of reads assigned to <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	Nb of reads assigned to <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	Nb of reads assigned to <i>L. maculans</i> , isolate JN3 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	relative % of reads assigned to <i>L. maculans</i> , isolate JN3 among all the fungal reads	relative % of reads assigned to <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14 among all the fungal reads	Nb total of reads assigned to <i>B. napus</i>	% of reads assigned to <i>B. napus</i>
Nd	Nd	AGK	BIL154	Darmor-BZH1	cotyledons center	H2O	2 DPI	1	75 177 902	0.00	1 028	0.00	379	1 625	73.06	26.94	62 460 258	83.08
Nd	Nd	AKA	BIL210	Darmor-BZH1	cotyledons center	H2O	2 DPI	2	71 598 728	0.00	596	0.00	20	765	96.75	3.25	58 492 382	81.69
Nd	Nd	AKF	BIL215	Darmor-BZH1	cotyledons center	H2O	5 DPI	2	71 268 443	0.00	130	0.00	254	480	33.85	66.15	59 292 870	83.20
Nd	Nd	AGV	BIL163	Darmor-BZH1	cotyledons center	H2O	5 DPI	1	74 601 392	0.00	415	0.00	122	630	77.28	22.72	63 104 570	84.59
Nd	Nd	AHE	BIL168	Darmor-BZH1	cotyledons center	H2O	7 DPI	1	69 993 439	0.00	25	0.00	14	70	64.10	35.90	59 446 908	84.93
Nd	Nd	AKL	BIL220	Darmor-BZH1	cotyledons center	H2O	7 DPI	2	88 679 005	0.01	7 171	0.00	22	8 412	99.69	0.31	73 908 088	83.34
Nd	Nd	AHR	BIL179	Darmor-BZH1	cotyledons center	H2O	9 DPI	1	74 883 891	0.03	21 229	0.00	21	25 425	99.90	0.10	60 983 535	81.44
Nd	Nd	ALB	BIL230	Darmor-BZH1	cotyledons center	H2O	9 DPI	2	75 555 887	0.00	681	0.00	20	860	97.15	2.85	63 474 315	84.01
Nd	Nd	AIF	BIL188	Darmor-BZH1	cotyledons center	H2O	12 DPI	1	68 945 296	0.00	644	0.00	401	1 286	61.63	38.37	56 922 621	82.56
Nd	Nd	ALL	BIL239	Darmor-BZH1	cotyledons center	H2O	12 DPI	2	74 036 963	0.02	17 678	0.00	18	20 564	99.90	0.10	61 471 007	83.03
Nd	Nd	AIL	BIL198	Darmor-BZH1	cotyledons center	H2O	15 DPI	1	77 062 998	0.00	390	0.00	121	634	76.32	23.68	63 530 403	82.44
Nd	Nd	AMB	BIL249	Darmor-BZH1	cotyledons center	H2O	15 DPI	2	82 784 933	0.00	784	0.00	54	1 027	93.56	6.44	68 996 997	83.34
Nd	Nd	AIT	BIL208	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	2 DPI	2	74 498 131	0.00	1 432	2.07	1 542 334	1 543 766	0.09	99.91	72 954 365	97.93
Nd	Nd	AGM	BIL156	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	2 DPI	1	80 969 628	0.00	2 695	3.54	2 868 785	2 871 480	0.09	99.91	78 098 148	96.45
Nd	Nd	AGS	BIL161	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	5 DPI	1	73 659 893	0.00	1 245	2.37	1 744 553	1 745 798	0.07	99.93	71 914 095	97.63
Nd	Nd	AKD	BIL213	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	5 DPI	2	77 966 320	0.00	895	1.30	1 011 898	1 012 793	0.09	99.91	76 953 527	98.70
Nd	Nd	AKI	BIL218	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	7 DPI	2	83 063 333	0.00	781	1.68	1 397 942	1 398 723	0.06	99.94	81 664 610	98.32
Nd	Nd	AHC	BIL166	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	7 DPI	1	77 091 306	0.00	1 180	3.41	2 626 651	2 627 831	0.04	99.96	74 463 475	96.59
Nd	Nd	AHM	BIL175	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	9 DPI	1	84 031 302	0.01	6303	8.93	7 502 560	7 509 063	0.09	99.91	76 522 239	91.06
Nd	Nd	AKS	BIL226	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	9 DPI	2	82 326 366	0.00	682	1.91	1 570 947	1 571 629	0.04	99.96	80 754 377	98.09
Nd	Nd	AIB	BIL184	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	12 DPI	1	79 246 991	0.05	39 297	50.63	40 124 162	40 163 459	0.10	99.90	39 083 532	49.32
Nd	Nd	ALG	BIL235	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	12 DPI	2	73 087 052	0.01	4 249	8.10	5 917 128	5 921 377	0.07	99.93	67 165 675	91.90
Nd	Nd	AQC	BIL194	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	15 DPI	1	90 252 741	0.06	56 499	73.25	66 112 557	66 169 056	0.09	99.91	24 083 685	26.68
Nd	Nd	ALS	BIL245	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	15 DPI	2	88 374 962	0.69	614 049	15.91	14 056 399	14 670 448	4.19	95.81	73 704 514	83.40
PRJEB21682SAMEA6086549	AGP	BIL158	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2	2 DPI	1	74 105 833	3.10	2 293 844	0.00	694	2 294 538	99.97	0.03	71 811 295	96.90	
PRJEB21682SAMEA6086549	AIR	BIL206	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2	2 DPI	2	74 260 743	2.06	1 532 671	0.00	801	1 533 472	99.95	0.05	72 727 271	97.94	
PRJEB21682SAMEA6086549	AGQ	BIL159	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2	5 DPI	1	74 849 258	1.35	1 013 318	0.00	386	1 013 704	99.96	0.04	73 835 554	98.65	
PRJEB21682SAMEA104153286	AKB	BIL211	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2	5 DPI	2	82 766 974	1.65	1 368 517	0.00	718	1 369 235	99.95	0.05	81 397 739	98.35	
PRJEB21682SAMEA6086549	AHA	BIL164	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2	7 DPI	1	78 240 411	7.37	5 765 158	0.00	3 540	5 768 698	99.94	0.06	72 471 713	92.63	
PRJEB21682SAMEA6086549	AKG	BIL216	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2	7 DPI	2	88 304 930	12.24	10 805 171	0.01	6 983	10 812 154	99.94	0.06	77 492 776	87.76	
PRJEB21682SAMEA6086549	AHG	BIL170	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2	9 DPI	1	87 600 313	52.02	45 569 791	0.03	22 759	45 592 550	99.95	0.05	42 007 763	47.95	
PRJEB21682SAMEA104153287	AKM	BIL221	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2	9 DPI	2	70 587 108	57.05	40 273 217	0.03	23 868	40 297 085	99.94	0.06	30 290 023	42.91	
PRJEB21682SAMEA6086549	AHS	BIL180	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2	12 DPI	1	71 671 634	81.04	58 085 469	0.04	26 879	58 112 348	99.95	0.05	13 559 286	18.92	
PRJEB21682SAMEA6086549	ALC	BIL231	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2	12 DPI	2	69 422 414	81.68	56 705 331	0.04	25 745	56 731 076	99.95	0.05	12 691 338	18.28	
PRJEB21682SAMEA6086549	AHI	BIL190	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2	15 DPI	1	86 504 338	80.95	70 025 188	0.04	33 119	70 058 307	99.95	0.05	16 446 031	19.01	
PRJEB21682SAMEA6086549	ALN	BIL241	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2	15 DPI	2	55 850 007	82.65	46 162 195	0.04	23 532	46 185 727	99.95	0.05	9 664 280	17.30	
Nd	Nd	AGN	BIL157	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	2 DPI	1	79 627 867	1.49	1 186 852	1.52	1 210 446	2 397 298	49.51	50.49	77 230 569	96.99
Nd	Nd	AIV	BIL209	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	2 DPI	2	81 615 893	0.75	611 910	1.00	814 132	1 426 042	42.91	57.09	80 189 851	98.25
Nd	Nd	AGT	BIL162	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	5 DPI	1	86 017 449	0.35	298 127	0.62	535 453	833 580	35.76	64.24	85 183 869	99.03
Nd	Nd	AKE	BIL214	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	5 DPI	2	83 547 284	0.33	278 860	0.75	628 787	907 647	30.72	69.28	82 639 637	98.91
Nd	Nd	AHD	BIL167	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	7 DPI	1	66 153 975	0.43	284 230	0.93	616 340	900 570	31.56	68.44	65 253 405	98.64
Nd	Nd	AKK	BIL219	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	7 DPI	2	101 013 881	0.17	175 188	0.59	597 121	772 309	22.68	77.32	100 241 572	99.24
Nd	Nd	AHP	BIL177	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	9 DPI	1	79 734 110	0.53	418 664	1.61	1 283 488	1 702 152	24.60	75.40	78 031 958	97.87
Nd	Nd	AKV	BIL228	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	9 DPI	2	89 139 821	0.28	246 850	0.95	848 115	1 094 965	22.54	77.46	88 044 856	98.77
Nd	Nd	AID	BIL186	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	12 DPI	1	94 187 711	1.06	999 242	5.33	5 024 011	6 023 253	16.59	83.41	88 164 458	93.61
Nd	Nd	ALI	BIL237	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	12 DPI	2	85 763 660	0.38	323 570	1.23	1 051 765	1 375 335	23.53	76.47	84 388 325	98.40
Nd	Nd	AQE	BIL196	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	15 DPI	1	64 653 623	3.85	2 489 302	32.64	21 100 755	23 590 057	10.55	89.45	41 063 566	63.51
Nd	Nd	ALV	BIL247	Darmor-BZH1	cotyledons center	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	15 DPI	2	88 953 102	0.87	773 865	5.29	4 706 766	5 480 631	14.12	85.88	83 472 471	93.84
Nd	Nd	AMM	BIL259	-	mycelium	JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	7D	1	18628593	0.98	182108	79.42	14794842	14976950	1.22	98.78	-	-
Nd	Nd	AQM	BIL263	-	mycelium	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	7D	2	23439573	0.31	72129	78.81	18471618	18543747	0.39	99.61	-	-
Nd	Nd	ASM	BIL328	-	mycelium	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	7D	1	19458892	0.30	58276	80.52	15668132	15726408	0.37	99.63	-	-
Nd	Nd	ASQ	BIL331	-	mycelium	<i>L. maculans</i> , isolate JN2 and <i>L. biglobosa</i> , isolate G12-14	7D	2	20977072	0.11	23216	79.84	16747995	16771211	0.14	99.86	-	-

Nd, submission ongoing

Table S2: Correlation of gene expression between biological replicates following Single Species Inoculation (SSI) of cotyledons of *Brassica napus* with *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb), *Leptosphaeria biglobosa* (Lbb) or following Mixed Species Inoculation (MSI) of Lmb and Lbb.

Days post-inoculation	^a R-squared from linear regression between both RNA-Seq biological replicates in Lmb		^a R-squared from linear regression between both RNA-Seq biological replicates in Lbb	
	SSI	MSI	SSI	MSI
2	0.87	0.87	0.91	0.89
5	0.90	0.85	0.91	0.87
7	0.94	0.84	0.94	0.91
9	0.96	0.85	0.91	0.92
12	0.99	0.86	0.95	0.91
15	0.97	0.91	0.95	0.94

^aCorrelations were measured by a linear regression applied on raw gene expression data of Lmb or Lbb. The R-squared (ranging from 0 to 1) between replicates of each sampled date is detailed

Table S3: Enrichment analyses of the proportion of genes encoding Small Secreted Proteins (SSP) in the DEGs sets detected in *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae’ during cotyledons infection.

	Total nb of genes	Number of SSP	^a percent
Genome	12,678	864	6.81%
DEGs	1,232	158	12% **
2 dpi up-regulated	238	19	7.98%
2 dpi down-regulated	578	56	9.68%
5-9 dpi up-regulated	119	49	41% **
5-9 dpi down-regulated	12	0	-
12-15 dpi up-regulated	46	7	15.21%
12-15 dpi down-regulated	240	27	11.25%

^a To detect if genes encoding SSPs were over-represented in DEGs their proportion was compared to those of SSPs in the entire gene set of Lbb by a Chi-Squared test (** : p-value < 0.001).

^b To detect if a specific enrichment of genes encoding SSPs was found in each group of DEGs (2 dpi; 5-9 dpi; 12-15 dpi), their proportion was compared to the proportion of SSPs in the total DEGs set by a Chi-Squared test (** : p-value < 0.001, * : p-value < 0.05).

Table S3: Impact of Mixed Species Inoculation (MSI) on the eight expression waves induced during the infectious cycle of *Leptosphaeria maculans* ‘brassicae’ (Lmb).

Gene set	^a Nb of genes	Nb and percentage of genes detected as DEG in MSI	^c Nb and percentage of DOWN-regulated genes in MSI	^d Nb and percentage of UP-regulated genes in MSI
<i>Leptosphaeria maculans</i> (isolate JN3) gene set	13,047	2310 ; 17.7%	1311 ; 56,7%	999 ; 4,3%
Gene set in involved in life cycle keys steps (Gay et al, 2020)	1,203	^b 623 ; 51.8% (**)	329 ; 52.8%	294 ; 47.2
Cluster 1 (early infection)	97	62 ; 64.0% ^{ov*}	14; 14%	48; 50% ^{ov**}
Cluster 2 (biotrophy)	148	129 ; 87.1% ^{ov**}	119; 80.4% ^{ov**}	10; 6.7%
Cluster 3 (necrotrophy)	87	59 ; 67.8% ^{ov*}	36; 41%	23; 26%
Cluster 4 (transition biotrophy to necrotrophy)	234	122 ; 52.1%		
Cluster 5 (stem)	128	41 ; 32.0% ^{un**}		
Cluster 6 (stem necrotrophy)	141	51 ; 36.2% ^{un**}		
Cluster 7 (stem and saprotrophy)	198	69 ; 34.9% ^{un**}		
Cluster 8 (saprotrophy)	170	90 ; 53.0%		

^a Total number of genes annotated in the Lmb genome and in the set of 1,203 genes specifically expressed during the infectious cycle (Gay et al, 2020). The detailed repartition of the 1,203 genes in the eight expression waves is described.

^b Number and percentage of genes detected as differentially expressed (DEGs) in Lmb during MSI conditions compared to SSI conditions in each gene set. The proportion of DEG in the 13,047 genes set was compared to the proportion of DEG in the 1,203 gene set by Chi-Squared test (**: p-value < 0.001, *: p-value < 0.05).

For each cluster, the proportion of DEGs was compared to the total proportion of DEGs in the 1,203 genes with a Chi-Squared test (**: p-value < 0.001, *: p-value < 0.05). The over- (ov) or an under- (un) representation of DEG in each cluster is detailed when a significant difference is observed. An over-representation of genes deregulated during MSI conditions was detected in the clusters 1, 2 and 3 (in bold).

^{c,d} To detect if DEGs were over-represented in either down-regulated or up-regulated in the clusters 1, 2 and 3, a second Chi-Squared test (**: p-value < 0.001, *: p-value < 0.05) was done by comparing the proportion of down- and up-regulated genes in each cluster to the down- and up-regulated genes in all the 1,203 genes set.

Discussion

Les déterminants moléculaires de la pathogénie chez *L. maculans* sont majoritairement étudiés par le prisme de l'analyse des effecteurs, et plus particulièrement des effecteurs précoces (AvrLm), impliqués dans l'infection primaire des feuilles du colza. Des données sur leur expression, sur leur localisation génomique (trouvés enrichis dans les isochores AT) (Rouxel et al., 2011) et sur la régulation épigénétique d'expression de certains d'entre eux (Soyer et al., 2014) ont apporté de nombreuses informations sur la phase de l'infection primaire des cotylédons ou feuilles par *L. maculans*, laquelle est aujourd'hui la phase la mieux décrite. La phase de colonisation de la tige (phase tardive de l'infection), a fait l'objet récemment d'une détection d'effecteurs exprimés à cette phase de l'infection et potentiellement impliqués dans l'établissement de la nécrose (les effecteurs tardifs, (Gervais et al., 2017)). Hormis les effecteurs, d'autres catégories de gènes ont été étudiées, selon des approches « gènes candidats », pour leur implication dans la pathogénie (exemple des gènes impliqués dans la production de la sirodesmine lors de la colonisation des tiges (Elliott et al., 2007), cf. Table S4, chap. II, pour un résumé). Bien que le cycle biologique de *L. maculans* soit bien décrit, les déterminants de la pathogénie lors de la colonisation endophyte dans les pétioles et les tiges, ainsi que les fonctions mobilisées lors de la vie saprophyte sur résidus de culture étaient méconnus voire inconnus.

La maladie de la nécrose du collet est aussi étudiée à une autre échelle *via* la recherche de l'implication des espèces de *Leptosphaeria* composant le complexe d'espèces (qui comprend deux espèces de *L. maculans* et trois espèces de *L. biglobosa* retrouvées sur colza) dans la maladie. Sur ce sujet, les études précédentes étaient orientées vers (i) la détection de la présence/absence des différentes espèces de *L. maculans* et *L. biglobosa* à travers le monde (Sprague et al., 2018 ; Hao et al., 2015 ; Dilmaghani et al., 2009 ; Fitt et al., 2006b), (ii) des analyses épidémiologiques et (iii) l'analyse, uniquement phénotypique, de l'interaction des espèces du complexe lors de l'infection primaire (Liu et al., 2007 ; Chen and Fernando, 2006 ; Liu et al., 2006; Mahuku et al., 1996).

En 2013, mon équipe d'accueil, en partenariat avec l'équipe IGEPP à INRAE de Rennes et le Genoscope ont initié un projet de séquençage transcriptomique et génomique dans le but d'éclairer par ces technologies haut-débit le comportement de *L. maculans* 'brassicae' dans les phases méconnues de son cycle de vie en association ou non avec *L. biglobosa* 'brassicae'.

C'est dans ce contexte que s'est inscrit mon projet de thèse. Grâce à ce jeu de données, j'avais pour objectifs de décrire les gènes impliqués dans les différentes étapes du cycle de vie

de *L. maculans*, y compris celles qui étaient peu ou pas explorées, en décrivant la régulation des effecteurs, élargi à tout le répertoire d'effecteurs candidats, mais aussi celle des gènes associés à d'autres catégories fonctionnelles. Mon second objectif était de décrire l'interaction entre les deux espèces du complexe trouvées en France coinfectant le colza : *L. maculans* 'brassicae' et *L. biglobosa* 'brassicae'. J'ai pu, grâce aux données transcriptomiques, déterminer finement l'impact de chaque espèce sur l'autre ainsi que sur l'expression des gènes de la plante hôte lors de coinfections. Etayés par d'autres expérimentations et observations phénotypiques et microscopiques, ces résultats s'inscrivent dans la description du cycle de vie de *L. maculans* en association avec son environnement biotique.

1. Les vagues d'expression corrélées au cycle infectieux de *L. maculans*

Les analyses transcriptomiques sont, à l'heure actuelle, très exploitées pour décrire l'expression de grands sets de gènes, considérés comme un miroir du comportement des agents pathogènes et de leur hôte au cours de cinétiques d'infection (Bhat et al., 2019 ; Lanver et al., 2018 ; Brown et al., 2017 ; Dobon et al., 2016 ; Kong et al., 2015 ; Kleemann et al., 2012 ; Duplessis et al., 2011b). Durant ma thèse, j'ai pu montrer que cette stratégie est aussi efficace pour décrire l'activité transcriptomique chez *L. maculans* sur la durée d'un cycle de vie long et complexe incluant des échantillons prélevés au champ soumis à des infestations naturelles.

J'ai établi un répertoire de gènes surexprimés à différents stades du cycle infectieux correspondant à 9% des gènes prédits chez *L. maculans*. Le regroupement de ces gènes dans 8 vagues d'expression retrace, et parfois redessine, les étapes du cycle de vie de *L. maculans* au niveau transcriptomique.

1.1. L'infection précoce hémibiotrophe

Les profils d'expression des gènes impliqués dans la phase d'infection primaire hémibiotrophe des cotylédons se décomposent en quatre vagues d'expression : 'pénétration et initiation de la colonisation', 'biotrophie', 'transition biotrophie-nécrotrophie' et 'nécrotrophie' (**Figure 19**). Chez les champignons phytopathogènes hémibiotrophes le nombre de vagues d'expression détecté par RNA-Seq sur les cinétiques d'infection primaire (allant de quelques heures à quelques jours) est très variable. Par exemple, les infections de *Z. tritici* ou *C. higginsianum* analysées par RNA-Seq sont découpées en 5 et 7 vagues d'expression sur 60 heures de cinétique et sur 21 jours de cinétique respectivement (Palma-Guerrero et al., 2016 ; O'Connell et al., 2012). La fréquence des échantillonnages, le choix des conditions contrôles et

des seuils statistiques ainsi que la méthode de clustering sont des paramètres qui peuvent varier selon la question biologique et la précision souhaitée. Les nombres de clusters ne peuvent donc pas être comparés directement entre les différentes études pour en déduire des réalités biologiques. Par contre, la cohérence entre les profils d'expression, les fonctions des gènes inclus dans ces clusters, et le stade infectieux associé au pic d'expression, sont des critères qui permettent d'abord de valider la méthode descriptive choisie et plus largement de comparer les cycles infectieux des différents champignons pathogènes au niveau transcriptomique.

Chez *L. maculans*, les fonctions enrichies au sein des quatre clusters de gènes identifiés durant la colonisation hémibiotrophe des cotylédons sont cohérentes avec les informations disponibles chez *L. maculans* et chez d'autres espèces de champignons phytopathogènes. Le cluster de la biotrophie présente des caractéristiques typiques de ce mode de vie avec un fort enrichissement en gènes codant des effecteurs candidats, associé à une sous-représentation des gènes impliqués dans les activités catalytiques (**Figure 19**). Certains gènes ont été caractérisés moléculairement pour leur implication dans la pathogénie. Par exemple, la production d'Acide Abscissique (ABA) durant la phase biotrophe sur cotylédons de colza a déjà été montrée chez *L. maculans* (Darma et al., 2019) mais aussi chez d'autres champignons (Izquierdo-Bueno et al., 2018 ; Spence et al., 2015). Nous retrouvons dans cette vague, l'expression concertée de tous les gènes de son cluster de biosynthèse. Pour autant, la fonction de l'ABA durant l'infection précoce n'est pas définie. Son effet, s'il y en a un, n'est pas indispensable lors de la colonisation précoce d'après les analyses menées sur un mutant altéré pour la production d'ABA (Darma et al., 2019). L'ABA est en revanche impliqué dans l'infection primaire de *Magnaporthe oryzae* sur le riz (Spence et al., 2015). Ces résultats soulignent l'importance de la validation fonctionnelle suite aux analyses transcriptomiques, mais aussi, bien souvent, l'absence de résultat conclusif suite aux analyses fonctionnelles, soit à cause de réalités biologiques différentes chez différents organismes, soit à cause de redondances fonctionnelles, soit enfin à cause d'une activité à un autre stade de l'infection des plantes que celui étudié suite à l'analyse fonctionnelle.

Les gènes impliqués dans la transition biotrophie-nécrotrophie sont détectés très nombreux et sont fortement enrichis en activités catalytiques impliquées dans la dégradation des polysaccharides et des protéines. Cette étape de transition est généralement très bien détectée en RNA-Seq chez d'autres champignons phytopathogènes hémibiotrophes et implique le même type de fonctions que celles détectées ici chez *L. maculans* (Rudd et al., 2015 ; Jupe et al., 2013 ; O'Connell et al., 2012). Enfin, durant la phase nécrotrophe stricte on retrouve chez *L.*

maculans, comme chez *Z. tritici* et chez *C. higginsianum* une diminution en gènes codant les effecteurs et une surreprésentation de gènes codant des enzymes de dégradation des carbohydrates (Rudd et al., 2015). Néanmoins peu de fonctions connues sont détectées parmi les gènes induits durant cette phase chez *L. maculans*, ce qui questionne la typicité de la nécrose induite sur cotylédons ou feuilles chez *L. maculans* par rapport à d'autres modèles.

1.2. Spécificité d'expression selon le mode de vie ou l'organe infecté

a) Réutilisation des gènes selon le mode de vie

L'un des apports de ce projet, est l'intégration des phases de colonisation des pétioles (en conditions contrôlées uniquement) et de la colonisation des tiges en conditions contrôlées et en conditions d'infection naturelle. L'addition de ces données a permis de révéler que deux sets de gènes sont réutilisés à différents stades du cycle infectieux selon une régulation « on/off ».

En effet, les gènes impliqués dans la transition entre la biotrophie et la nécrotrophie sont aussi induits durant les autres transitions biotrophie-nécrotrophie au cours du cycle de vie (**Figure 19**). De la même manière, les gènes impliqués dans la biotrophie présentent un pic d'expression dans les autres stades impliquant un mode de vie biotrophe du champignon (dans le pétiole à 7 jours, dans la tige et au collet avant l'établissement de la nécrose).

La réutilisation de gènes impliqués dans un mode trophique particulier, induit de manière récurrente au cours du cycle de vie, n'a pas encore été décrite chez d'autres espèces de champignons phytopathogènes. En effet, les analyses RNA-Seq sont en général calquées sur des cycles infectieux moins complexes, menées sur de courtes cinétiques et sur un seul organe en conditions contrôlées.

b) Induction spécifique des gènes selon l'organe infecté

D'autres vagues d'expression sont quant à elles spécifiques de l'organe infecté. Nous montrons ici que la colonisation de la tige nécessite un set de gènes différent de celui requis pour l'infection précoce des feuilles/cotylédons. Lors de la nécrose des tiges, nous distinguons spécifiquement, une forte proportion d'enzyme de dégradation du xylane, un composant principal des hémicelluloses, et de la cellulose, importants pour maintenir la rigidité dans les tissus de la tige (Brulé et al., 2016). De plus l'induction de l'homologue du facteur de transcription xlnR est détectée dans ce cluster. Il est responsable chez d'autres champignons de l'activation de gènes codant les enzymes de dégradation des sucres complexes (notamment du

xylane) chez différents champignons filamenteux pathogènes ou saprophytes (Llanos et al., 2019 ; Klaubauf et al., 2014).

On détecte aussi l'induction spécifique de plusieurs enzymes clefs de biosynthèse de métabolites secondaires comprenant entre autre, celles qui sont impliquées dans la biosynthèse de la phytotoxine 'sirodesmine' qui est déjà caractérisée comme impliquée spécifiquement dans l'établissement de la nécrose du collet (Elliott et al., 2007) et celles qui sont impliquées dans la biosynthèse de l'acide phoménoïque, qui présente aussi une toxicité mais dont la fonction est inconnue à ce jour (Elliott et al., 2013).

Ce descriptif des fonctions recrutées lors de la nécrose des tiges montre pour la première fois, les mécanismes inhérents aux symptômes nécrotiques induits au collet par *L. maculans*. L'établissement de la nécrose sur cotylédons au contraire, implique très peu de fonctions enrichies (dégradation des carbohydrates uniquement) et aucun cluster de métabolites secondaires. Il est possible, que lors de l'infection précoce, le passage à la nécrotrophie soit très bref, ou que les déterminants de la nécrotrophie soient atypiques par rapport à ceux qui sont utilisés par des nécrotrophes stricts, et que l'établissement de la reproduction asexuée engendre un arrêt de la nutrition nécrotrophe, alors que la colonisation asymptomatique des tissus se poursuit dans le pétiole puis la tige. Les symptômes nécrotiques causés par *L. maculans* sur cotylédons sont d'ailleurs caractéristiques (effondrement des tissus, couleur grise, nécrose « sèche ») comparé à ceux causés sur tige ou encore comparé aux symptômes causés par des champignons strictement nécrotrophes dont *L. biglobosa* (nécroses noires très étalées et entourées de zones chlorotiques).

Pour conclure, l'induction de ces sets de gènes dépend de l'organe infecté et/ou du mode de vie adopté par le champignon. Si un même set de gènes semble être recruté durant les différentes phases biotrophes, les mécanismes impliqués dans la nécrotrophie eux, sont différents selon le tissu infecté et restent encore obscurs durant la nécrose sur cotylédons ou feuilles. Durant ma thèse la réponse de la plante hôte dans ces mêmes conditions d'infection a été analysée uniquement lors de l'infection précoce des cotylédons dans le cadre de l'analyse de l'interaction avec *L. biglobosa*. Il serait néanmoins nécessaire d'approfondir les analyses transcriptomiques chez l'hôte pour mettre en regard l'expression des gènes fongiques et la réponse de la plante durant tout le cycle infectieux. Il serait alors possible de déterminer si, au même titre que le champignon, la plante induit ou réprime des sets de gènes similaires durant les différentes phases biotrophes et au contraire des sets de gènes différents et spécifiques lors des deux phases nécrotrophes.

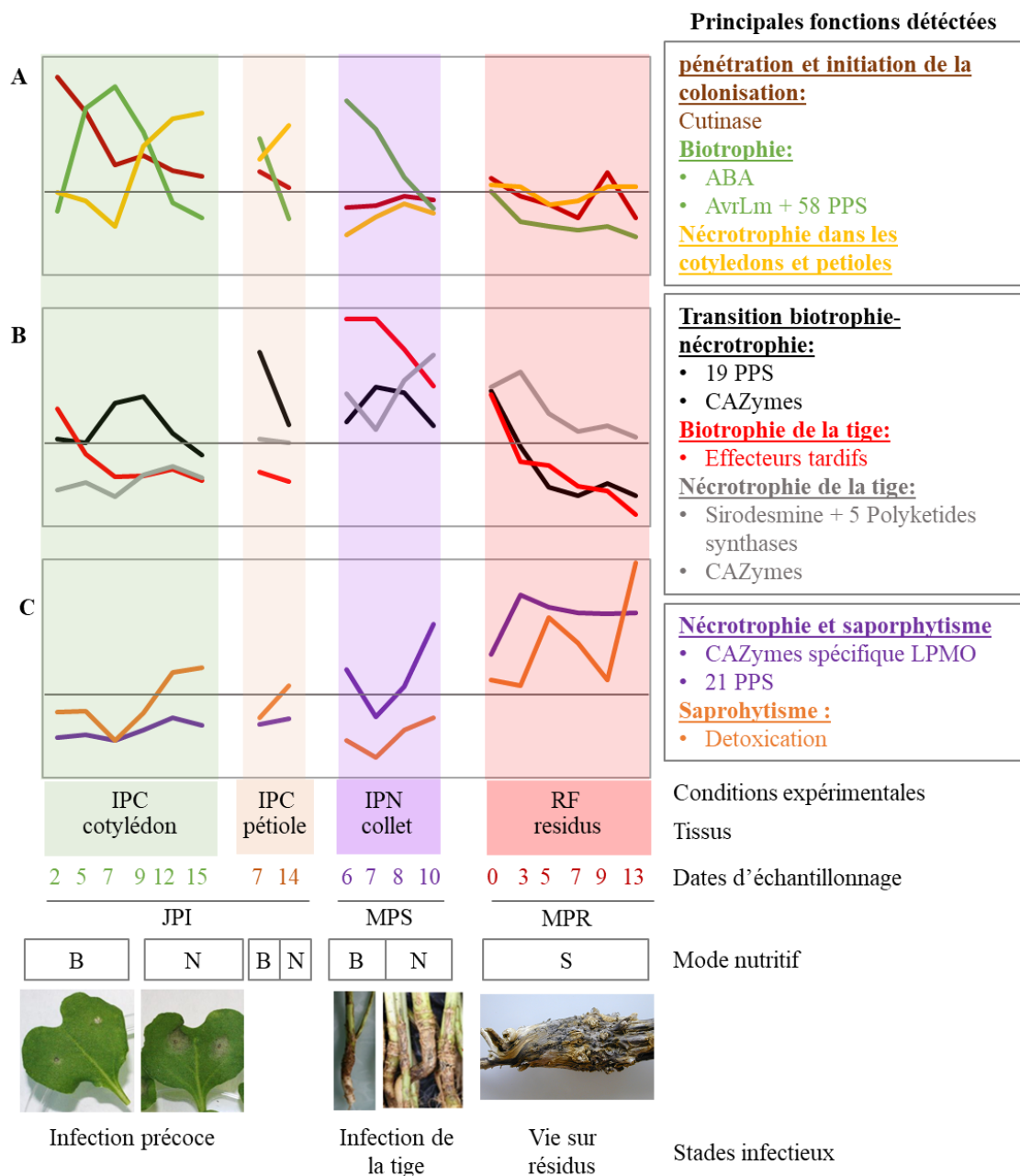


Figure 19 : Vue d'ensemble des huit vagues d'expression détectées au cours du cycle d'infection de *Leptosphaeria maculans*.

Chaque courbe représente la valeur moyenne de l'expression des gènes composant le cluster décrit. Les huit profils sont divisés en trois graphiques selon leur profil d'expression : (A) infection et colonisation précoce des cotylédons, (B) colonisation tardive des tiges, (C) développement sur les résidus de culture. Les caractéristiques associées à chaque échantillon sont indiquées : le mode de nutrition (B : biotrophie, N : nécrotrophie, S : saprotrophie) ; les conditions expérimentales : (i) IPN, Infection *in Planta* Naturelle ; IPC, Infection *in Planta* en condition Contrôlées ; RC, Résidus au Champ ; (ii) le type de tissu échantillonné est présenté par les photos et (iii) les points d'échantillonnage (JPI, Jours Post-Inoculation ; MPS, Mois Post-Semis ; MPR, Mois Post-Récolte). Nous n'avons pas inclus les feuilles infectées au champ ni les échantillons tiges infectées dans des conditions contrôlées, afin d'éviter toute redondance et de générer un modèle simplifié. Les principales fonctions des gènes identifiées dans chaque groupe sont indiquées à droite.

1.3. Le mode de vie saprophyte

Enfin, j'ai, pour la première fois, utilisé des données transcriptomiques pour décrire le mode de vie saprophyte chez *L. maculans* au cours d'une année de vie sur résidus de culture. Les quantités de transcrits assignés à *L. maculans* dans les différents prélèvements au cours de l'année sont variables et montrent une baisse à certains mois (avril) ou sur certains réplicats. *L. maculans* est cependant détecté tout au long de l'année et représente en moyenne 20% de la totalité des lectures. Des analyses de metabarcoding ont été réalisées sur des échantillons de résidus de culture sur deux années dans le cadre de la thèse de L. Kerdraon, et confirment, par une autre approche et sur d'autres années, la prédominance de *L. maculans* sur les résidus de colza pendant l'année suivant la récolte (Kerdraon et al., 2019b).

Parmi les fonctions induites au cours de la vie sur résidus, on détecte des gènes codant des enzymes lytiques de dégradation des polysaccharides (LPMO), des gènes codant des enzymes de détoxification des espèces réactives d'oxygène, et une forte proportion d'enzymes de dégradation de la cellulose et du xylane. Ces résultats confirment que *L. maculans* se développe bien sur résidus de culture selon un mode de vie saprophyte impliquant la dégradation active des résidus, ce qui n'avait jamais été montré jusqu'ici.

L. Kerdraon et al. (2020) ont montré précédemment que le microbiote fongique associé aux résidus de colza est, juste après la récolte, majoritairement constitué des agents pathogènes déjà présents dans l'hôte dont *L. biglobosa*, mais que ce microbiote change au cours d'une année pour laisser place à une colonisation par des espèces opportunistes présentes dans le sol (Kerdraon et al., 2019b, 2019a). *L. maculans* reste l'espèce majoritairement retrouvée toute l'année sur résidus, mais est donc confronté à une grande diversité de micro-organismes (161 genres de champignons détectés au cours d'une année, (Kerdraon et al., 2019b, 2019a)). Chez *L. maculans*, je n'ai pas détecté de gènes surexprimés sur résidus de culture ayant des activités spécifiquement antibactériennes ou antifongiques, comme c'est le cas chez d'autres décomposeurs (Feldman et al., 2020 ; Kombrink et al., 2019). Toutefois, plusieurs effecteurs sont spécifiquement produits durant cette phase saprophyte et pourraient comme chez des saprophytes stricts, intervenir dans la compétition entre micro-organismes sur résidus.

2. Intégration des données transcriptomiques, structurales et fonctionnelles pour l'étude des effecteurs précoces chez *L. maculans*

Au début de ma thèse, le constat que deux vagues d'expression de gènes codant des effecteurs interviennent durant le cycle infectieux de *L. maculans* était déjà établi mais sur un set restreint de gènes et de conditions. Les neuf gènes d'avirulence « *AvrLm* » étaient détectés exprimés pendant la phase biotrophe de la colonisation des feuilles. A ce titre ils composaient une première vague d'expression décrite comme vague d'expression des effecteurs « précoces ». Par ailleurs, Gervais et al. (2017), ont détecté par des analyses transcriptomiques, que des gènes codant des effecteurs candidats étaient exprimés à 14 jours après l'infection de la tige en conditions contrôlées. Ces analyses ont mené à la description d'une deuxième vague d'expression des effecteurs au cours du cycle de *L. maculans* dite vague d'expression des effecteurs « tardifs ».

J'ai montré dans mon premier article (Chap. 2 de ce manuscrit) que tous les sets de gènes induits au cours du cycle infectieux sont enrichis en effecteurs candidats de façon certes inégale, mais qui montre que ces derniers pourraient participer au dialogue moléculaire avec l'hôte à toutes les étapes du cycle infectieux, ou avec le microbiote durant la phase saprophyte.

Nous avons porté une attention particulière à la vague d'expression contenant les gènes codant les effecteurs « précoces » de *L. maculans*. Tout d'abord j'ai montré que tous les gènes d'avirulence sont coexprimés dans le cluster de la biotrophie qui présente, comme attendu, un pic d'expression à 7 jours post-inoculation lors de la phase biotrophe de l'infection sur cotylédons. Deux nouvelles informations ont été obtenues grâce aux données transcriptomiques. D'abord, comme décrit précédemment, les gènes de ce cluster montrent aussi un pic d'expression dans toutes les étapes biotrophes du cycle de vie, remettant en cause la notion d'effecteur « précoce » jusqu'alors postulée. Ensuite, ces gènes d'avirulence ont été détectés au sein d'une vague comprenant 67 gènes codant des effecteurs candidats dont 39 sont fortement coexprimés entre eux (*i.e.*, dépassant un seuil de corrélation supérieur à 0.80).

Ces données de coexpression peuvent être mises en corrélation avec les analyses fonctionnelles disponibles chez *L. maculans*. D'abord, dans le cadre de deux projets ANR (StructuralLep, 2014-2018, et STARLep, en cours) menés par I. Fudal dans l'équipe, la structure tridimensionnelle de deux protéines d'avirulence : *AvrLm4-7* (Blondeau et al., 2015) et *AvrLm5-9* (Lazar et al., 2020), ont été résolues par cristallographie. Alors que leur identité est faible en termes de séquence protéique, ces deux protéines partagent de fortes analogies

structurales entre elles, mais aussi, avec 11 autres protéines de *L. maculans*, identifiées par une recherche HMM basée sur les structures d'AvrLm4-7 et AvrLm5-9. De surcroit, ces protéines analogues correspondent toutes à des effecteurs validés (*ex AvrLm3, AvrLm5*) ou candidats. Cette famille structurale a été appelée la famille LARS (*Leptosphaeria* Avirulence-Suppressing). Neuf des gènes codant pour des membres de la famille LARS sont coexprimés dans le cluster de la biotrophie et les quatre autres sont coexprimés durant la transition entre la biotrophie et la nécrotrophie.

Deuxièmement, parmi les gènes d'avirulence appartenant à la famille LARS, trois d'entre eux sont impliqués dans une relation épistatique. La présence du gène d'avirulence *AvrLm4-7* masque la reconnaissance par la plante des effecteurs *AvrLm3* et *AvrLm5-9* (Ghanbarnia et al., 2018 ; Plissonneau et al., 2016).

On peut conclure qu'il existe une famille structurale d'effecteurs chez *L. maculans* qui pourraient avoir des fonctions ou des cibles végétales communes. Cependant, on distingue différents cas de figures. Tous les gènes appartenant à la famille structurale ne sont pas impliqués dans la relation épistatique avec *AvrLm3* et *AvrLm5-9* ni dans la même vague d'expression. Inversement, des dizaines d'autres effecteurs sont coexprimés dans la vague de la biotrophie ou celle de la transition biotrophie-nécrotrophie mais ne font pas partie des analogues structuraux.

D'un point de vue évolutif, on peut supposer que le décalage de l'expression de quatre effecteurs d'une même famille structurale, pourrait permettre d'échapper à la reconnaissance par un récepteur végétal potentiellement spécifiquement produit à 7 jpi. Par ailleurs le fait que des dizaines d'effecteurs candidats additionnels soient coexprimés dans la vague de la biotrophie notamment, laisse présager que d'autres groupes de gènes seraient impliqués dans des relations épistatiques différentes de celles déjà décrites et/ou constitueraient d'autres familles structurales agissant potentiellement sur d'autres cibles végétales.

3. Modèle de régulation complexe des gènes chez *L. maculans*

Plusieurs niveaux de régulation des gènes induits lors du cycle infectieux sont actuellement décrits chez les champignons phytopathogènes et incluent une régulation par la structure chromatinienne et une régulation transcriptionnelle par des facteurs de transcription incluant potentiellement un petit nombre de « master regulators ».

3.1. La régulation chromatinienne

La régulation chromatinienne intervient dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus. Le code épigénétique est complexe et composé de diverses marques de méthylation ou d'acétylation des histones permettant de moduler l'accès à la chromatine par les facteurs de transcription. Certains gènes d'intérêt (clusters de métabolites secondaires ou gènes codant des effecteurs) chez les champignons phytopathogènes ou endophytes sont associés à une régulation par les marques hétérochromatiniennes répressives H3K9me3 et H3K27me3. Ces gènes sont réprimés en l'absence de l'hôte par le dépôt de ces marques chez *Epichloë festucae*, *Fusarium graminearum* ou *L. maculans* (Studt et al., 2016 ; Chujo and Scott, 2014 ; Soyer et al., 2014 ; Connolly et al., 2013). Puis celles-ci seraient retirées à des moments précis au cours de l'infection pour permettre l'expression génique, comme cela a été démontré pour un set restreint d'effecteurs chez *Z. tritici in planta* (Soyer et al., 2019).

Récemment, la cartographie épigénétique des marques répressives H3K9me3 et H3K27me3 établie chez *L. maculans* a permis de montrer directement à l'échelle du génome la répartition non-aléatoire de ces deux marques (Soyer et al., 2020). Les régions riches en AT sont enrichies en marque hétérochromatinienne répressive H3K9me3 et la marque H3K27me3 est détectée majoritairement dans les régions riches en gènes (**Figure 20**).

En utilisant les données générées par Soyer et al. (2020), nous avons pu corréler la présence de ces marques à l'expression des gènes *in planta* (**Figure 20**). Nous avons montré dans mon premier article que les gènes de la vague de la biotrophie sont enrichis en gènes colocalisant avec la marque répressive constitutive H3K9me3 *in vitro* (33%), ce qui, à ce jour est une spécificité de *L. maculans* (**Figure 20**). Les gènes exprimés aux autres stades de la colonisation de la plante ou des résidus sont, eux, enrichis en gènes colocalisant avec la marque répressive facultative H3K27me3, ce qui est communément retrouvé chez d'autres champignons phytopathogènes (**Figure 20**).

Ces résultats suggèrent qu'au moins deux niveaux de régulation chromatinienne interviennent dans la régulation transcriptomique des huit clusters de gènes. Il faut souligner ici que la vague d'expression de la biotrophie est celle qui contient le plus de gènes codant les effecteurs, en général, et le plus grand nombre d'effecteurs hautement coexprimés en particulier. L'environnement H3K9me3 des gènes présents dans cette vague pourrait favoriser un contrôle plus strict de leur expression et/ou permettre l'expression/répression de ces gènes à plusieurs reprises au cours du cycle infectieux.

3.2. La détection des facteurs de transcription exprimés pendant l'infection

La stratégie d'analyse menée durant ma thèse (sélection des gènes uniquement induits *in planta* suivi d'un clustering en vague d'expression) semble adaptée pour détecter des facteurs de transcription potentiellement très « spécialisés » et responsables du contrôle de l'expression d'un set restreint de gènes, notamment concernant les régulateurs des clusters de métabolites secondaires (ABA, sirodesmine) dont la structure en cluster permet une expression concomitante dans une même vague.

Au contraire, je ne détecte pas, dans les vagues spécifiques de l'infection, de facteurs de transcription généraux (ie, des « master regulators » régulant des centaines de gènes impliqués dans de nombreux processus de la pathogénie ou du métabolisme primaire), déjà décrits chez *L. maculans* ou chez d'autres espèces, tels que LmStuA (Soyer et al., 2015) ou LmPf2 (actuellement en cours de caractérisation fonctionnelle chez *L. maculans* (C. Clairet et al, in prep)). L'inactivation ou le silencing de ces gènes provoque un défaut de pathogénie et un phénotype altéré en condition *in vitro* (Soyer et al., 2015). Tous deux régulent directement ou indirectement des gènes codant des effecteurs, mais aucun des deux n'est détecté dans mes analyses car ils sont potentiellement écartés du fait de leur expression en condition *in vitro*.

Des méthodes plus spécifiques sont généralement utilisées pour détecter les facteurs de transcription impliqués dans un processus donné ou des régulateurs généraux. Notamment, la création de réseaux de régulation de gènes permet de détecter, d'après leurs caractéristiques topologiques, des régulateurs centraux. Ce type d'analyse serait mieux adapté pour une analyse plus exhaustive des régulateurs transcriptionnels généraux et spécifiques chez *L. maculans*.

3.3. Le double contrôle de la régulation transcriptionnelle

Dans le but de réaliser une analyse intégrée de la régulation des gènes chez *L. maculans*, C. Clairet a combiné l'analyse de la régulation épigénétique par KMT1 (responsable du dépôt de la marque H3K9me3) et du contrôle transcriptionnel par le facteur de transcription LmPf2. Il a généré des transformants surexprimant le facteur de transcription *LmPf2* (nommés *o_LmPf2*), un mutant inactivé pour *KMT1* ($\Delta KMT1$) et des transformants surexprimant *LmPf2* dans le mutant $\Delta KMT1$ (*oLmPf2_ΔKMT1*). Des séquençages RNA-Seq ont été réalisés en condition *in vitro* sur ces souches et ont fait l'objet d'un article en préparation. J'ai été impliquée dans l'analyse des données RNA-Seq chez les transformants étudiés. L'article est présenté en **Annexe 1**.

Les sets de gènes sous le contrôle de LmPf2 ou de KMT1 individuellement sont tous deux enrichis en gènes codant des effecteurs candidats, comme cela est déjà décrit chez *L. maculans* ou chez d'autres espèces (Rybak et al., 2017 ; Soyer et al., 2014). Le mutant $\Delta KMT1$ présente le plus faible nombre de gènes dérégulés. Contrairement à ce qui aurait été attendu, aucun gène d'avirulence n'est détecté surexprimé chez les transformants surexprimant le facteur de transcription et seul un de ces gènes (*AvrLm3*) est détecté surexprimé en l'absence des marques H3K9me3 chez le mutant $\Delta KMT1$.

Au contraire, chez les transformants *oLmPf2_ΔKMT1*, nous détectons *in vitro* le plus fort taux de gènes surexprimés (931, **Figure 20** ; contre 129 chez $\Delta KMT1$ et 202 chez *oLmPf2*) comparé à la souche sauvage. De plus, six des neuf gènes d'avirulence (*AvrLm*), sont détectés exprimés *in vitro* chez ces transformants.

Ces résultats ont permis de montrer que les deux mécanismes agiraient de concert pour activer l'expression de certains gènes chez *L. maculans*, mettant en évidence un double contrôle de la régulation de ces gènes qui nécessite à la fois une décompaction de la chromatine et l'action d'un facteur de transcription spécifique pour induire leur expression.

Là encore, la collaboration au cours de ma thèse avec C. Clairet a permis d'intégrer dans son analyse (**Annexe 1**) une corrélation entre la régulation des gènes *in vitro* et leur expression *in planta* (**Figure 20**). Nous avons pu montrer que 44% des gènes présents dans la vague de la biotrophie subissent un double contrôle par KMT1 et LmPf2 *in vitro*. Au contraire, cet enrichissement n'est pas détecté parmi les gènes composant les autres vagues d'expression, qui colocalisent plus particulièrement avec les marques H3K27me3 *in vitro* et subissent probablement d'autres mécanismes de régulation.

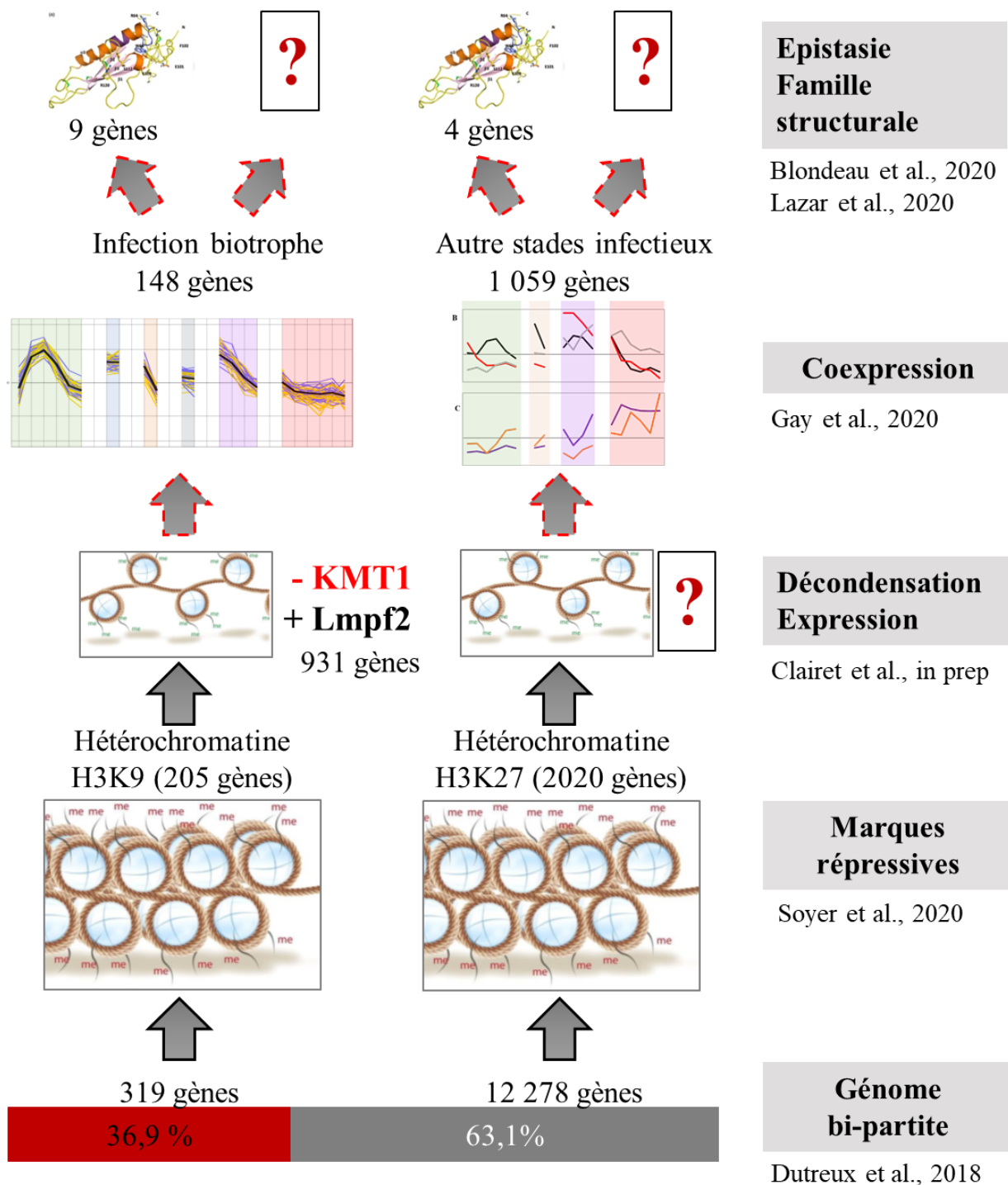


Figure 20 : Bilan des données -omiques permettant de modéliser la régulation *in planta* des gènes de la pathogénie chez *L. maculans*.

Le génome de *L. maculans* est composé de grands isochores riches en AT qui composent 36,9% du génomes et contiennent 319 gènes (rectangle rouge). Soyer et al. (2020) ont montré que les régions riches en AT sont enrichies en marque hétérochromatinienne H3K9me3, et que les régions riches en gènes (rectangle gris) sont enrichies en marque hétérochromatinienne facultative H3K27me3. Les régions associées aux marques H3K9me3 contiennent au total 205 gènes (enrichis dans les isochores en AT) et celles associées aux marques H3K27me3 contiennent 2020 gènes (Soyer et al., 2020). Dans les

conditions *in vitro*, C. Clairet et al. (in prep) ont montré que 931 gènes sont soumis à un double contrôle et nécessitent le retrait des marques H3K9me3 déposées par KMT1 et l'action d'un facteur de transcription (LmPf2) pour leur expression. L'expression des gènes impliqués dans la biotrophie au cours du cycle infectieux décrite dans mon premier article est représentée. Ce set composé de 148 gènes est enrichi en gènes soumis au double contrôle par KMT1 et LmPf2 (66 gènes) et en gènes localisés dans les isochores AT décorés par les marques H3K9me3. Une famille structurale (LARS) composée de 13 analogues a été identifiée chez *L. maculans* (Lazar et al., 2020). L'expression des gènes codant 9 de ces effecteurs LARS est détectée dans la vague de la biotrophie. La moyenne de l'expression des gènes au sein des sept autres vagues d'expression décrite dans mon premier article est présentée. Le contrôle de décondensation et de la transcription de ces gènes n'a pas été analysé. Aucune famille structurale ou fonctionnelle n'a été décrite parmi les gènes composant les sept autres vagues.

3.4. Bilan et limites du modèle de régulation

Les analyses transcriptomiques *in planta*, réalisées durant ma thèse, ont donc été mises en regard avec les différentes informations -omiques générées chez *L. maculans* dans l'équipe : localisation génomique (Dutreux et al., 2018), cartographie des marques épigénétiques (Soyer et al., 2020), régulation transcriptomique (C Clairet et al., **Annexe 1**) et analyses structurales (Lazar et al., 2020 ; Blondeau et al., 2015) (**Figure 20**).

Le modèle de régulation des gènes d'avirulence est aujourd'hui élargi aux gènes de la biotrophie (**Figure 20**). Ce cluster de gènes comprend un enrichissement en gènes situés dans les isochores AT, en gènes associés à la marque H3K9me3 *in vitro* et en gènes sous le contrôle de LmPf2 et KMT1 *in vitro* (**Figure 20**). Parmi eux, neuf gènes font partie de la famille structurale LARS et trois d'entre eux sont impliqués dans une relation épistatique. Tous ces éléments permettent d'élaborer un modèle de régulation, qui néanmoins reste incomplet et indirect, car tous les gènes du cluster ne répondent pas à ces critères et les analyses sur la régulation épigénétique ont été menées uniquement en conditions *in vitro*.

Le modèle de régulation des gènes compris dans les autres vagues d'expression est quant à lui plus lacunaire encore, mais il était inexistant avant ma thèse (**Figure 20**). L'analyse fonctionnelle de la protéine KMT6, responsable du dépôt de la marque H3K27me3, est actuellement en cours. On ne sait pas encore si son action est nécessaire à la dérégulation des sept autres vagues d'expression. De plus la diversité des profils d'expression, suppose que la régulation épigénétique n'agit probablement pas seule et que plusieurs facteurs de transcription pourraient intervenir pour réguler l'expression de ces différents sets de gènes.

Par ailleurs, pour l'heure, aucune donnée de cartographie des marques épigénétique ou encore du contrôle par des facteurs de transcription n'est disponible dans les conditions *in planta* mais elles seraient nécessaires pour confirmer le modèle proposé ici.

4. Décryptage des interactions biotiques entre *L. maculans* 'brassicae' et *L. biglobosa* 'brassicae'

La coinfection du colza par les deux espèces *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae' (Lbb) et *Leptosphaeria maculans* 'brassicae' (Lmb) est réabordée régulièrement mais reste mal connue. A l'aide de données transcriptomiques, j'avais pour objectif de déterminer quel type d'interaction se produit entre les trois partenaires (incluant la plante hôte) au cours d'une partie du cycle infectieux, en particulier lors de la colonisation des feuilles. Des études antérieures, menées lors de tests de coinfections, suggéraient que Lbb aurait un effet inhibiteur sur Lmb, y compris en conditions naturelles d'infection, amenant certains auteurs à suggérer que Lbb serait un agent de biocontrôle potentiel contre Lmb (Liu et al., 2007 ; Chen and Fernando, 2006 ; Liu et al., 2006 ; Mahuku et al., 1996).

4.1. Détection des interactions au sein du complexe d'espèces par les analyses transcriptomiques

Les analyses transcriptomiques et biologiques m'ont permis de décrire précisément l'interaction qui intervient lors de coinfections concomitantes et equi-concentrées en spores de Lmb et Lbb sur cotylédons en conditions contrôlées (**Figure 21, conditions 1,2,3**).

Trois conclusions majeures peuvent être apportées à la suite de ces analyses : (i) Lbb n'est pas impacté par la présence de Lmb lors de la coinfection et met en place son mode de vie nécrotrophe entre 2 jpi et 5 jpi ; (ii) la plante hôte répond à la coinfection de manière identique à la réponse à Lbb seul, et active ses voies de défense entre 2 jpi et 5 jpi ; (iii) à ce même moment, Lmb est fortement impacté par la coinfection, et subit une inhibition selon tous les critères de notre analyse (transcriptomique, phénotypique, suivi de biomasse).

L'impact inhibiteur observé sur Lmb est donc concomitant à l'activation de voies de défense par *B. napus* et à l'induction de la nécrotrophie chez Lbb (**Figure 21**). Ces deux phénomènes pourraient être l'un ou l'autre, ou concomitamment la cause de l'inhibition observée. En effet, *in planta*, nous ne pouvons pas dissocier l'effet de la nécrose de l'effet de la réponse de la plante sur Lmb. C'est pourquoi les conditions *in vitro*, ont aussi été utilisées en tant que contrôle de l'interaction en l'absence de l'hôte. Il en résulte qu'en condition de co-

culture *in vitro*, l'effet inhibiteur de Lbb est aussi observé. Il se manifeste uniquement sur la croissance mycélienne de Lmb et n'inhibe pas sa germination *in vitro* (**Figure 21, condition 3**). Comme sur cotylédons, aucun gène n'est détecté différenciellement exprimé chez Lbb en condition de coculture avec Lmb (comparé à la condition de culture témoin de Lbb seul). Là encore, il n'y a donc pas d'induction de voies par Lbb, potentiellement défavorables, activées spécifiquement en présence de Lmb.

Cette analyse approfondie de la coinfection concomittante sur *B. napus*, confirme et affine la compétition déjà observée en conditions contrôlées entre Lmb et *L. biglobosa* spp (Liu et al., 2007 ; Chen and Fernando, 2006 ; Liu et al., 2006). Cependant, l'hypothèse d'une compétition indirecte, comme proposée par Liu et al (2007, 2006) ne peut pas être confirmée ici car elle est détectée en présence et en absence de l'hôte. Par ailleurs, cette inhibition ne semble pas être activée directement par l'induction de certains gènes chez Lbb, mais semble être plutôt un phénomène passif intrinsèque à la croissance de Lbb. Nous montrons aussi qu'aucun effet réciproque quel qu'il soit (bénéfique ou inhibiteur) de Lmb n'est perçu par Lbb.

4.2. Variabilité de l'interaction selon les conditions d'infection

Pour affiner nos hypothèses, des tests complémentaires menés *in planta* et *in vitro* ont été effectués (**Figure 21, condition 4, 5, 6**).

Un autre niveau de complexité a ainsi été détecté lors de tests d'inoculation complémentaires durant lesquels j'ai fait varier la concentration de Lbb ou le délai de l'inoculation par Lbb. Ces tests complémentaires menés *in planta* et *in vitro* ajoutent deux cas de figures supplémentaires analysés uniquement par suivi de biomasse et observations macros et microscopiques : la croissance de Lmb est partiellement inhibée lors de co-inoculations concomitantes mais moins concentrées en spores de Lbb (**Figure 21, condition 4**), et elle est normale lors de l'inoculation séquentielle de Lbb 2 jours après l'inoculation de Lmb (**Figure 21, condition 5**). Pour toutes les conditions testées, Lbb n'est, quant à lui, pas impacté par la coinfection.

Une première hypothèse étayée par les observations et mesures sur ces différentes conditions peut être proposée. Les interactions observées ne semblent pas dépendre du substrat sur lequel est mené le test c'est-à-dire le milieu de culture synthétique ou la plante (**Figure 21**). Si la réponse de la plante n'a pas d'impact sur les phénotypes observés, l'hypothèse d'une compétition indirecte *via* la réponse précoce de l'hôte peut être minorée par rapport à des effets plus directs entre les deux champignons. Par ailleurs, on ne détecte pas de phénomène évident

d'antibiose qui serait induite par la diffusion de molécules toxiques/antibiotiques lorsque les espèces sont mises en contact. En effet, il n'y a pas de front d'exclusion important lors de la confrontation (**Figure 21, condition 6**), ni d'inhibition de la germination en conditions de culture liquide ou solide, ni d'induction de gènes spécifiquement chez Lbb en réponse à Lmb.

L'hypothèse la plus probable serait donc que Lbb assimilerait des ressources plus efficacement et au détriment de Lmb. Ce phénomène expliquerait l'effet inhibiteur quantitatif dépendant de la quantité initiale de pycnidiospores de Lbb (**Figure 21, condition 4**). On peut ajouter, que ce phénomène inhibiteur ne s'applique que lorsque l'inoculation est concomitante, et donc en début de croissance mycélienne *in vitro* ou en début de phase biotrophe *in planta*. Deux jours de croissance suffisent à Lmb pour outrepasser l'effet inhibiteur de Lbb, permettant sans doute d'exploiter les ressources disponibles avant que Lbb ne les épuise, ou permettant de modifier à son avantage l'environnement physiologique de la plante au point d'infection (**Figure 21, condition 5**).

Durant ma thèse, je me suis attachée à détailler les gènes impliqués chez l'une et l'autre espèces au cours de l'interaction avec l'hôte, en me focalisant sur les catégories de gènes spécifiquement dédiées à la pathogénie. Or d'après ces résultats, il est possible que la compétition soit un phénomène impliquant le métabolisme primaire de Lmb et Lbb. On peut en particulier envisager que l'épuisement des ressources nutritives ne soit pas global mais concerne quelques ou un élément vital pour Lmb. Par exemple, la disponibilité du fer ou des sources de carbone est mise en avant chez d'autres interactions antagonistes chez les champignons (Haas et al., 2008) ou chez les bactéries (Giorni et al., 2009). Pour valider cette hypothèse, il serait possible dans un premier temps, d'approfondir les données transcriptomiques des conditions contrôles *in vitro* pour détecter la fonction des gènes induits et tenter de décrire le mode nutritif de chaque espèce en l'absence de l'hôte. Ensuite, des tests de croissance et de co-cultures, sur différents milieux, éventuellement composés d'extrait végétaux pour mimer le substrat végétal, ou de différentes compositions en sucres et nutriments pourraient être réalisées pour déterminer quel rôle le substrat peut avoir dans l'interaction.


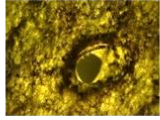

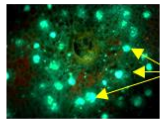
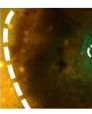
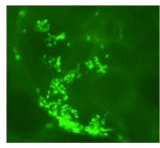
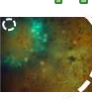
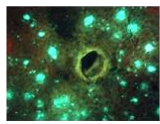
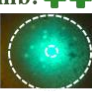
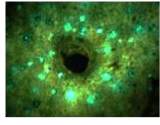


	<i>In vitro</i>	Cotylédons 5-9 jpi	Cotylédons 9-15 jpi	
1 Lbb seul- contrôle	Lbb 	Nécrose Induction défenses	Nécrose Induction défenses	<i>L. biglobosa</i> , 14 jpi  Nécrose
2 Lmb seul- contrôle	Lmb 	Biotrophie Pas de réponse de l'hôte	Nécrose + pynides Induction défenses	GFP- <i>L. maculans</i> 14 jpi  Nécrose Pynides
3 Lmb + Lbb	Lmb: --- 	--- Induction défenses	--- Induction défenses	 Pycnidiospores non germées
4 Lmb + Lbb- 100x	Lmb: ++ 	++ Induction défenses	++ Induction défenses	 Nécrose Pynides
5 Lmb + Lbb-2 jpi	Lmb: +++ 	+++ Induction défenses	+++ Induction défenses	 Nécrose Pynides
6 Confrontation	Lmb  Lbb	+++ Induction défenses	+++ Induction défenses	 Lmb Nécrose pynides Nécrose Lbb

Figure 21 : Bilan des phénotypes observés dans les différentes conditions de co-inoculations testées *in vitro* et *in planta*.

Six conditions sont décrites : les conditions témoins (1.) Lmb seul et (2.) Lbb seul ; (3.) la coinfection concomitante à la même concentration de suspension de pycnidiospores de Lmb et de Lbb (Lmb + Lbb) ; (4.) la coinfection concomitante avec une suspension de Lbb 100 fois moins concentrée que Lmb ; (5.) la post-infection de Lbb, 2 jours après l'inoculation de Lmb, et (6.) la confrontation. Toutes les conditions ont été réalisées *in vitro* et *in planta*. La description des conditions *in planta* est découpée en deux étapes : 5 à 9 jours post-inoculation et 12 à 15 jours post-inoculation. Dans les conditions témoin, le mode de vie adopté par Lmb ou Lbb est décrit (biotrophie ou nécrotrophie) ainsi que la réponse de la plante, déduite des analyses transcriptomiques (« pas de réponse » ou « induction des défenses » ; indisponibles dans les conditions 4, 5, 6). Pour les conditions 3 à 6, le niveau de croissance (normale : +++, atténuée : ++, ou inhibée : ---) de Lmb est décrit. Il résulte des analyses transcriptomiques, phénotypiques et des mesures de biomasses. Les photos représentent le phénotype final *in vitro* et *in planta* (sous lumière blanche pour observer Lbb, ou sous filtre GFP). *In vitro*, le point d'inoculation initial est représenté par un cercle rouge, le front de migration mycélien est représenté par le trait en pointillé. *In planta*, la blessure centrale représente le point d'inoculation. A 14 jpi, on distingue les pycnidies issues de la reproduction asexuée après l'induction typique de la nécrose chez Lmb (grossissement X10) excepté pour la condition 3, où seules les pycnidiospores issues de la suspension initiale sont visibles (grossissement X40).

4.3. Influence potentielle de l'environnement biotique sur l'interaction

Si des hypothèses ont pu être formulées suite aux analyses menées durant ma thèse, elles ne sont pas suffisantes pour décrire de manière exhaustive les interactions entre Lmb et Lbb. L'influence de la température sur le complexe est par exemple un paramètre largement pris en compte dans d'autres études (Dawidziuk et al., 2012a, 2012b ; Lô-Pelzer et al., 2009 ; Huang et al., 2003). Pour approfondir ces résultats, la méthodologie de coinfection en conditions contrôlées sur cotylédons, désormais maîtrisée dans l'équipe, pourrait être davantage exploitée. Divers paramètres abiotiques (température, concentration, délais d'inoculation) mais aussi biotiques (souches inoculées, organes inoculés, génotype végétal, autres espèces du complexe) pourraient être testés. Cela permettrait de décomposer le plus finement possible les paramètres impliqués dans ces interactions dynamiques entre les deux espèces. Un modèle de l'interaction plus exhaustif pourrait ainsi être établi.

Quelques pistes ont déjà été exploitées au sein de l'équipe (par V. Laval et N. Jacques) notamment concernant l'environnement biotique de Lmb. La co-inoculation avec deux autres souches de Lbb a été testée et semble générer les mêmes phénotypes que ceux observés avec la souche utilisée dans le projet LeptoLife. Une étude récente a cependant montré qu'une population de 14 isolats de *L. biglobosa* prélevés en Angleterre présente une vitesse de croissance supérieure à celle de *L. maculans* (Newbery et al., 2020). Or ce n'est pas un phénomène détecté dans mes analyses avec les souches de Lbb utilisées. Ces résultats supposent que la composante populationnelle devrait être évaluée. Des souches représentatives de la population française pourraient être utilisées dans des tests cotylédonaires en série afin d'estimer la diversité des interactions, et en déduire si elle est homogène ou au contraire variable selon les souches utilisées.

L'impact d'autres agents pathogènes nécrotrophes isolés sur colza, *Alternaria brassicae* et *Alternaria brassicicola*, ont été testés en coinfection avec Lmb (N. Jacques). Les résultats préliminaires montrent aussi un effet inhibiteur sur Lmb mais contrairement à la coinfection avec Lbb, cet effet inhibiteur est détecté y compris lorsque les spores de Lmb sont en concentration 100 fois supérieures à celles des *Alternaria*. Ces espèces semblent être particulièrement capables d'induire rapidement des nécroses de grande taille, ce qui questionne de nouveau sur l'impact de la mise en place d'un environnement défavorable (appauvrissement en nutriments, présence de composés toxiques...) qui empêcherait *L. maculans* de se développer sur des tissus nécrotiques lors de l'initiation de son cycle de vie.

5. Mise en perspective de l'interaction avec les données épidémiologiques

Avant ma thèse un modèle épidémiologique d'infection du colza par Lmb et Lbb au cours d'une année de culture avait été établi par Fitt et al (2006) proposant un modèle de séparation temporelle entre les deux cycles infectieux de Lmb et Lbb. L'hypothèse soutenue par les auteurs était que les ascospores issues de la reproduction sexuée sur les résidus seraient libérées plus tôt chez Lmb en automne. Lmb coloniserait alors les feuilles puis les pétioles et tiges avant le pic d'infection par Lbb (West and Fitt, 2005; Huang et al., 2003) et la compétition, qu'elle soit trophique ou autre, n'aurait pas lieu *in planta*, puisque que *L. maculans* aurait eu suffisamment de temps pour coloniser les tissus avant l'arrivée de Lbb. Le concept de niche temporelle est effectivement une hypothèse formulée pour expliquer la coinfection au sein d'autres complexes d'espèces pour lesquels une compétition est observée (Marchetto and Power, 2018). Dans le complexe d'espèces *Erysiphe* sp., il a été démontré que les agents pathogènes du chêne, *E. quercicola* et *E. alphitoides* sont présents en proportion inverse au printemps ou à la fin du cycle infectieux, ce qui illustre le concept de niches écologiques temporelles (Hamelin et al., 2016). Cependant, la fréquence relative entre les deux espèces au printemps ne semble pas, tout comme dans le cas de l'interaction Lmb-Lbb, liée de manière significative à la gravité de la maladie en fin de saison (Marçais et al., 2016).

Mes travaux montrent des résultats très reproductibles lors de tests en conditions contrôlées de coinfections décalées ou concomitantes appuyant la possibilité d'une co-existence des deux espèces en cas de décalage temporel de l'infection. Toutefois, dans les conditions du champ, nous ne pouvons pas confirmer l'existence de niches écologiques temporelles car l'incidence de l'infection primaire de Lmb sur feuille, si elle est effectivement variable selon les années et les conditions climatiques, n'a jamais été corrélée significativement à la présence, l'absence ou à un potentiel décalage de l'infection par Lbb (et réciproquement pour l'incidence de Lbb) (Jacques et al., 2020). Les conditions contrôlées permettent donc de mettre en évidence une interaction réelle, mais qui correspond à une condition probablement minoritaire lors d'infections naturelles qui ne peut pas révéler toute la complexité des facteurs en jeu pour la réussite de l'infection précoce.

Enfin, l'étude de l'interaction durant l'étape précoce de l'infection n'est pas suffisante pour décrire son impact sur l'incidence de la nécrose du collet en fin de cycle. Il serait nécessaire de mener des analyses transcriptomiques et phénotypiques dans les stades plus tardifs du cycle infectieux. Durant ma thèse, je ne disposais pas d'un set de données complet (conditions contrôles et en coinfection) me permettant de décrypter cette interaction durant ces phases

tardives. Malgré la compétition observée durant les phases précoces, nous détectons une majorité de transcrits assignés à Lmb au niveau du collet dans les conditions d'infections naturelles qui restent toutefois aussi associés à une quantité non-négligeable de transcrits assignés à Lbb. L'interaction détectée durant l'infection précoce pourrait donc être contrebalancée par l'établissement de nouvelles interactions au sein du complexe lors de la coinfection du pétiole ou de la tige qui aboutirait à un pattern différent de celui observé sur feuille.

Conclusions et perspectives

Mon projet de thèse a permis de décrire de façon exhaustive le cycle de vie de *L. maculans* à l'aide d'approches transcriptomiques et d'y ajouter un nouveau niveau de description en intégrant l'impact de la coinfection avec *L. biglobosa*, un membre du complexe d'espèces.

J'ai démontré l'apport du RNA-Seq pour décrire les interactions bi- et tri-partites entre *L. maculans*, *L. biglobosa* et l'hôte. En effet, j'ai détaillé précisément leur interaction durant l'infection précoce, montrant les impacts diversifiés de cette interaction biotique sur la croissance et l'activité transcriptomique de *L. maculans*. Si leur interaction durant les autres étapes de l'infection n'a pas été décryptée, souvent à cause de quantités insuffisantes (ou trop variables d'une répétition à l'autre) des lectures de *L. biglobosa*, le suivi transcriptomique au champ a permis d'explorer les infections de la tige sur plusieurs mois, ou la colonisation des résidus de culture sur une année qui montrent la coexistence à long terme des deux espèces à chaque étape, avec une présence majoritaire de *L. maculans*.

La description de la pathogénie de *L. biglobosa* est parcellaire (par manque de lectures RNA-Seq ou de conditions additionnelles), mais j'ai pu décrire les différentes étapes clés du cycle infectieux chez *L. maculans*, y compris pour la première fois lors d'infections naturelles. La variabilité de la quantité de lectures dans ces conditions naturelles n'a pas permis d'étudier les étapes d'infections très précoces des feuilles ou des tiges. Celles analysables montrent une bonne corrélation avec les inoculations obtenues en conditions contrôlées validant ainsi la pertinence des conditions contrôlées pour étudier l'expression génique de *L. maculans* dans les tiges de colza. J'ai donc généré des répertoires de gènes répartis dans huit vagues d'expression recouvrant le cycle long et complexe de *L. maculans*. Notamment, une nouvelle vision de la régulation des gènes codant les effecteurs a été apportée. Ils sont impliqués dans plus de deux vagues d'expression (contrairement à ce qui était supposé avant ma thèse) et certains sont réutilisés à différents stades infectieux, ce qui appuie leur importance pour le champignon.

Par ailleurs l'intégration de ces données dans plusieurs projets menés au sein de l'équipe ou avec des collaborateurs européens, a permis, et permettra, de renseigner l'expression ou la coexpression de sets de gènes d'intérêts. Ce fût déjà le cas durant ma thèse concernant les gènes localisés dans certaines régions hétérochromatiniennes, concernant les effecteurs composant une famille structurale récemment décrite ou concernant les gènes soumis à double contrôle transcriptionnel et chromatinien. Ces analyses intégratives commencent à dessiner un pattern biologique très cohérent et parcimonieux permettant d'établir un modèle de régulation de plus en plus élaboré.

Mes résultats permettront aussi de sélectionner de nouveaux gènes d'intérêts, en amont, pour approfondir leur implication dans la pathogénie (exemple de la sélection de nouveaux effecteurs tardifs candidats par A. Jiquel, thèse en cours).

Enfin plusieurs questions restent en suspens et nécessiteraient de nouvelles analyses ou expérimentations. Notamment, la mise en miroir de la réponse de la plante à l'infection de *L. maculans* permettrait d'avoir une vision complète du dialogue moléculaire dans ce pathosystème. A l'inverse de l'orientation prise pendant ma thèse, des descriptions du métabolisme primaire de chaque espèce fongique, en condition *in vitro*, pourraient apporter de nouvelles hypothèses sur les phénotypes de compétition observés. Enfin, à plus long terme, l'exploration des phases plus tardives de l'interaction entre les deux espèces serait nécessaire pour étayer les hypothèses épidémiologiques.

Références

- Abdelfattah, A., Nicosia, M.G.L.D., Cacciola, S.O., Droby, S., and Schena, L. (2015). Metabarcoding analysis of fungal diversity in the phyllosphere and carposphere of olive (*Olea europaea*). *PLoS ONE* 10, e0131069.
- Aliferis, K.A., Cubeta, M.A., and Jabaji, S. (2013). Chemotaxonomy of fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex performing GC/MS metabolite profiling. *Metabolomics* 9, 159–169.
- Aneja, M., Gianfagna, T.J., and Hebbar, P.K. (2005). *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67, 304–307.
- Aoki, T., O'Donnell, K., and Geiser, D.M. (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. *J. Gen. Plant Pathol.* 80, 189–201.
- Baetsen-Young, A., Wai, C.M., VanBuren, R., and Day, B. (2020). *Fusarium virguliforme* transcriptional plasticity is revealed by host colonization of maize versus soybean. *Plant Cell* 32, 336–351.
- Bais, H.P., Fall, R., and Vivanco, J.M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* 134, 307–319.
- Balesdent, M.-H., Gall, C., Robin, P., and Rouxel, T. (1992). Intraspecific variation in soluble mycelial protein and esterase patterns of *Leptosphaeria maculans* French isolates. *Mycol. Res.* 96, 677–684.
- Balesdent, M.-H., Fudal, I., Ollivier, B., Bally, P., Grandaubert, J., Eber, F., Chèvre, A.-M., Leflon, M., and Rouxel, T. (2013). The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytol.* 198, 887–898.
- Balint-Kurti, P. (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol. Plant Pathol.* 20, 1163–1178.
- Baroncelli, R., Talhinhos, P., Pensec, F., Sukno, S.A., Le Floch, G., and Thon, M.R. (2017). The *Colletotrichum acutatum* species complex as a model system to study evolution and host specialization in plant pathogens. *Front. Microbiol.* 8.
- Becker, M.G., Zhang, X., Walker, P.L., Wan, J.C., Millar, J.L., Khan, D., Granger, M.J., Cavers, J.D., Chan, A.C., Fernando, D.W.G., et al. (2017). Transcriptome analysis of the *Brassica napus*-*Leptosphaeria maculans* pathosystem identifies receptor, signaling and structural genes underlying plant resistance. *Plant J.* 90, 573–586.
- Belozerskaya, T.A., Gessler, N.N., and Aver'yanov, A.A. (2015). Melanin pigments of fungi. In *Fungal Metabolites*, J.-M. Merillon, and K.G. Ramawat, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–29.
- Bhat, N.N., Padder, B.A., Barthelson, R.A., and Andrabi, K.I. (2019). Compendium of *Colletotrichum graminicola* responsive infection-induced transcriptomic shifts in the maize. *Plant Gene* 17, 100166.
- Blondeau, K., Blaise, F., Graille, M., Kale, S.D., Linglin, J., Ollivier, B., Labarde, A., Lazar, N., Daverdin, G., Balesdent, M.-H., et al. (2015). Crystal structure of the effector AvrLm4-7 of *Leptosphaeria maculans* reveals insights into its translocation into plant cells and recognition by resistance proteins. *Plant J.* 83, 610–624.

- Boddy, L., and Hiscox, J. (2017). Fungal ecology: principles and mechanisms of colonization and competition by saprotrophic fungi. In *The Fungal Kingdom*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 293–308.
- Bok, J.W., and Keller, N.P. (2004). *LaeA*, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* 3, 527–535.
- Brown, N.A., Evans, J., Mead, A., and Hammond-Kosack, K.E. (2017). A spatial temporal analysis of the *Fusarium graminearum* transcriptome during symptomless and symptomatic wheat infection. *Mol. Plant Pathol.* 18, 1295–1312.
- Brulé, V., Rafsanjani, A., Pasini, D., and Western, T.L. (2016). Hierarchies of plant stiffness. *Plant Sci.* 250, 79–96.
- Cai, X., Huang, Y., Jiang, D., Fitt, B.D.L., Li, G., and Yang, L. (2018). Evaluation of oilseed rape seed yield losses caused by *Leptosphaeria biglobosa* in central China. *Eur. J. Plant Pathol.* 150, 179–190.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., and Keller, N.P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 447–459.
- Chen, X. (2020). Pathogens which threaten food security: *Puccinia striiformis*, the wheat stripe rust pathogen. *Food Secur.* 12, 239–251.
- Chen, Y., and Fernando, W.G.D. (2006). Induced resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease of canola (*Brassica napus*) caused by a weakly virulent isolate of *Leptosphaeria biglobosa*. *Plant Dis.* 90, 1059–1064.
- Chujo, T., and Scott, B. (2014). Histone H3K9 and H3K27 methylation regulates fungal alkaloid biosynthesis in a fungal endophyte-plant symbiosis. *Mol. Microbiol.* 92, 413–434.
- Clairret, C., Gay, E.J., Simon, A., Lapalu, L., Blaise, F., Marais, C.L., Balesdent, M-H., Soyer, J.L., and Fudal, I., (2020). Regulation of effector gene expression as concerted waves in *Leptosphaeria maculans* : a two-players game. In Prep
- Connolly, L.R., Smith, K.M., and Freitag, M. (2013). The *Fusarium graminearum* Histone H3 K27 methyltransferase KMT6 regulates development and expression of secondary metabolite gene clusters. *PLoS Genet.* 9.
- Copley, T.R., Duggavathi, R., and Jabaji, S. (2017). The transcriptional landscape of *Rhizoctonia solani* AG1-IA during infection of soybean as defined by RNA-Seq. *PLoS ONE* 12, e0184095.
- Couch, B.C., and Kohn, L.M. (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* 94, 683–693.
- Dallery, J.-F., Lapalu, N., Zampounis, A., Pigné, S., Luyten, I., Amselem, J., Wittenberg, A.H.J., Zhou, S., de Queiroz, M.V., Robin, G.P., et al. (2017). Gapless genome assembly of *Colletotrichum higginsianum* reveals chromosome structure and association of transposable elements with secondary metabolite gene clusters. *BMC Genomics* 18, 667.
- Dallery, J.-F., Zimmer, M., Halder, V., Suliman, M., Pigné, S., Le Goff, G., Gianniou, D.D., Trougakos, I.P., Ouazzani, J., Gasperini, D., et al. (2020). Inhibition of jasmonate-mediated plant defences by the fungal metabolite higginsianin B. *J. Exp. Bot.* 71, 2910–2921.
- Darma, R., Lutz, A., Elliott, C.E., and Idnurm, A. (2019). Identification of a gene cluster for the synthesis of the plant hormone abscisic acid in the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet. Biol.* 130, 62–71.

- Dawidziuk, A., Kaczmarek, J., Podlesna, A., Kasprzyk, I., and Jedryczka, M. (2012a). Influence of meteorological parameters on *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* spore release in central and eastern Poland. *Grana* 51, 240–248.
- Dawidziuk, A., Kaczmarek, J., and Jedryczka, M. (2012b). The effect of winter weather conditions on the ability of pseudothecia of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* to release ascospores. *Eur. J. Plant Pathol.* 134, 329–343.
- Dean, R., Kan, J. a. L.V., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Pietro, A.D., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., et al. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 414–430.
- Dilmaghani, A., Balesdent, M.H., Didier, J.P., Wu, C., Davey, J., Barbetti, M.J., Li, H., Moreno-Rico, O., Phillips, D., Despeghel, J.P., et al. (2009). The *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathol.* 58, 1044–1058.
- Djonovic, S., Vargas, W.A., Kolomiets, M.V., Horndeski, M., Wiest, A., and Kenerley, C.M. (2007). A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiol.* 145, 875–889.
- Dobon, A., Bunting, D.C.E., Cabrera-Quio, L.E., Uauy, C., and Saunders, D.G.O. (2016). The host-pathogen interaction between wheat and yellow rust induces temporally coordinated waves of gene expression. *BMC Genomics* 17, 380.
- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548.
- Dong, Y., Li, Y., Zhao, M., Jing, M., Liu, X., Liu, M., Guo, X., Zhang, X., Chen, Y., Liu, Y., et al. (2015). Global genome and transcriptome analyses of *Magnaporthe oryzae* epidemic isolate 98-06 uncover novel effectors and pathogenicity-related genes, revealing gene gain and lose dynamics in genome evolution. *PLoS Pathog.* 11, e1004801.
- Dubey, A., and Jeon, J. (2017). Epigenetic regulation of development and pathogenesis in fungal plant pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 18, 887–898.
- Duplessis, S., Cuomo, C.A., Lin, Y.-C., Aerts, A., Tisserant, E., Veneault-Fourrey, C., Joly, D.L., Hacquard, S., Amselem, J., Cantarel, B.L., et al. (2011a). Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9166–9171.
- Duplessis, S., Hacquard, S., Delaruelle, C., Tisserant, E., Frey, P., Martin, F., and Kohler, A. (2011b). *Melampsora larici-populina* transcript profiling during germination and timecourse infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 808–818.
- Dutreux, F., Da Silva, C., d'Agata, L., Couloux, A., Gay, E.J., Istace, B., Lapalu, N., Lemainque, A., Linglin, J., Noel, B., et al. (2018). De novo assembly and annotation of three *Leptosphaeria* genomes using Oxford Nanopore MinION sequencing. *Sci. Data* 5, 180235.
- Eckert, M., Maguire, K., Urban, M., Foster, S., Fitt, B., Lucas, J., and Hammond-Kosack, K. (2005). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene DsRed and the jellyfish gene gfp. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 67–74.
- Elliott, C.E., Gardiner, D.M., Thomas, G., Cozijnsen, A., Van de Wouw, A., and Howlett, B.J. (2007). Production of the toxin sirodesmin PL by *Leptosphaeria maculans* during infection of *Brassica napus*. *Mol. Plant Pathol.* 8, 791–802.

- Elliott, C.E., Callahan, D.L., Schwenk, D., Nett, M., Hoffmeister, D., and Howlett, B.J. (2013). A gene cluster responsible for biosynthesis of phomonoic acid in the plant pathogenic fungus, *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genet. Biol.* 53, 50–58.
- Feldman, D., Yarden, O., and Hadar, Y. (2020). Seeking the roles for fungal small-secreted proteins in affecting saprophytic lifestyles. *Front. Microbiol.* 11.
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., and Gurr, S.J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186–194.
- Fitt, B.D.L., Huang, Y.-J., van den Bosch, F., and West, J.S. (2006a). Coexistence of related pathogen species on arable crops in space and time. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 163–182.
- Fitt, B.D.L., Brun, H., Barbetti, M.J., and Rimmer, S.R. (2006b). World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on Oilseed rape (*Brassica napus*). *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 3–15.
- Fouché, S., Badet, T., Oggenfuss, U., Plissonneau, C., Francisco, C.S., and Croll, D. (2020). Stress-driven transposable element de-repression dynamics and virulence evolution in a fungal pathogen. *Mol. Biol. Evol.* 37, 221–239.
- Franceschetti, M., Maqbool, A., Jiménez-Dalmaroni, M.J., Pennington, H.G., Kamoun, S., and Banfield, M.J. (2017). Effectors of filamentous plant pathogens: commonalities amid diversity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 81.
- Freitag, M. (2017). Histone methylation by SET domain proteins in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 413–439.
- Friesen, T.L., Faris, J.D., Solomon, P.S., and Oliver, R.P. (2008). Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cell. Microbiol.* 10, 1421–1428.
- Fudal, I., Ross, S., Gout, L., Blaise, F., Kuhn, M.L., Eckert, M.R., Cattolico, L., Bernard-Samain, S., Balesdent, M.H., and Rouxel, T. (2007). Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of *AvrLm6*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 20, 459–470.
- Gacek-Matthews, A., Berger, H., Sasaki, T., Wittstein, K., Gruber, C., Lewis, Z.A., and Strauss, J. (2016). KdmB, a Jumonji histone H3 demethylase, regulates genome-wide H3K4 trimethylation and is required for normal induction of secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *PLoS Genet.* 12, e1006222.
- Gardiner, D.M., Cozijnsen, A.J., Wilson, L.M., Pedras, M.S.C., and Howlett, B.J. (2004). The sirodesmin biosynthetic gene cluster of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Microbiol.* 53, 1307–1318.
- Gervais, J. (2017). Identification et analyse fonctionnelle des effecteurs tardifs impliqués dans la colonisation systémique du colza par *Leptosphaeria maculans*. Thèse, Université Paris-Sud Orsay, France, 234 pp.
- Gervais, J., Plissonneau, C., Linglin, J., Meyer, M., Labadie, K., Cruaud, C., Fudal, I., Rouxel, T., and Balesdent, M.-H. (2017). Different waves of effector genes with contrasted genomic location are expressed by *Leptosphaeria maculans* during cotyledon and stem colonization of oilseed rape. *Mol. Plant Pathol.* 18, 1113–1126.
- Ghanbarnia, K., Fudal, I., Larkan, N.J., Links, M.G., Balesdent, M.-H., Profotova, B., Fernando, W.G.D., Rouxel, T., and Borhan, M.H. (2015). Rapid identification of the *Leptosphaeria maculans*

avirulence gene *AvrLm2* using an intraspecific comparative genomics approach. *Mol. Plant Pathol.* *16*, 699–709.

Ghanbarnia, K., Ma, L., Larkan, N.J., Haddadi, P., Fernando, W.G.D., and Borhan, M.H. (2018). *Leptosphaeria maculans* AvrLm9: a new player in the game of hide and seek with AvrLm4-7. *Mol. Plant Pathol.* *19*, 1754–1764.

Giorni, P., Magan, N., and Battilani, P. (2009). Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains from maize. *Int. J. Food Microbiol.* *130*, 213–218.

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

Grandaubert, J., Lowe, R.G.T., Soyer, J.L., Schoch, C.L., Van de Wouw, A.P., Fudal, I., Robbertse, B., Lapalu, N., Links, M.G., Ollivier, B., et al. (2014). Transposable element-assisted evolution and adaptation to host plant within the *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex of fungal pathogens. *BMC Genomics* *15*, 891.

Guyon, K., Balagué, C., Roby, D., and Raffaele, S. (2014). Secretome analysis reveals effector candidates associated with broad host range necrotrophy in the fungal plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *BMC Genomics* *15*, 336.

Haas, H., Eisendle, M., and Turgeon, B.G. (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* *46*, 149–187.

Hacquard, S., Kracher, B., Maekawa, T., Vernaldi, S., Schulze-Lefert, P., and Van Themaat, E.V.L. (2013). Mosaic genome structure of the barley powdery mildew pathogen and conservation of transcriptional programs in divergent hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E2219–E2228.

Hacquard, S., Kracher, B., Hiruma, K., Münch, P.C., Garrido-Oter, R., Thon, M.R., Weimann, A., Damm, U., Dallery, J.-F., Hainaut, M., et al. (2016). Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nat. Commun.* *7*, 1–13.

Haddadi, P., Ma, L., Wang, H., and Borhan, M.H. (2016). Genome-wide transcriptomic analyses provide insights into the lifestyle transition and effector repertoire of *Leptosphaeria maculans* during the colonization of *Brassica napus* seedlings. *Mol. Plant Pathol.* *17*, 1196–1210.

Hamelin, F.M., Bisson, A., Desprez-Loustau, M.-L., Fabre, F., and Mailleret, L. (2016). Temporal niche differentiation of parasites sharing the same plant host: oak powdery mildew as a case study. *Ecosphere* *7*, e01517.

Hammond, K.E., Lewis, B.G., and Musa, T.M. (1985). A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathol.* *34*, 557–565.

Hao, L., Song, P., Huangfu, H., and Li, Z. (2015). Genetic diversity and differentiation of *Leptosphaeria biglobosa* on oilseed rape in China. *Phytoparasitica* *43*, 253–263.

Hawksworth, D.L., and Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. In *The Fungal Kingdom*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 79–95.

Heijden, M.G.A. van der, Martin, F.M., Selosse, M.-A., and Sanders, I.R. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol.* *205*, 1406–1423.

- Huang, Y.J., Toscano-Underwood, C., Fitt, B.D.L., Hu, X.J., and Hall, A.M. (2003). Effects of temperature on ascospore germination and penetration of oilseed rape (*Brassica napus*) leaves by A- or B-group *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker). *Plant Pathol.* 52, 245–255.
- Huang, Y.-J., Evans, N., Li, Z.-Q., Eckert, M., Chèvre, A.-M., Renard, M., and Fitt, B.D.L. (2006). Temperature and leaf wetness duration affect phenotypic expression of *Rlm6*-mediated resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol.* 170, 129–141.
- Inglis, D.O., Binkley, J., Skrzypek, M.S., Arnaud, M.B., Cerqueira, G.C., Shah, P., Wymore, F., Wortman, J.R., and Sherlock, G. (2013). Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC Microbiol.* 13, 91.
- Izquierdo-Bueno, I., González-Rodríguez, V.E., Simon, A., Dalmais, B., Pradier, J.-M., Le Pêcheur, P., Mercier, A., Walker, A.-S., Garrido, C., Collado, I.G., et al. (2018). Biosynthesis of abscisic acid in fungi: identification of a sesquiterpene cyclase as the key enzyme in *Botrytis cinerea*. *Environ. Microbiol.* 20, 2469–2482.
- Jacques, N., Balesdent, M.-H., Rouxel, T., and Laval, V. (2020). New quantitative specific real-time PCR assays shed light on the epidemiology of two species of the *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex. *Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1111/ppa.13323>
- Jashni, M.K., Dols, I.H.M., Iida, Y., Boeren, S., Beenen, H.G., Mehrabi, R., Collemare, J., and de Wit, P.J.G.M. (2015). Synergistic action of a metalloprotease and a serine protease from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity, and enhances fungal virulence. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 996–1008.
- Jeon, J., Park, S.-Y., Chi, M.-H., Choi, J., Park, J., Rho, H.-S., Kim, S., Goh, J., Yoo, S., Choi, J., et al. (2007). Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nat. Genet.* 39, 561–565.
- Johnson, R.D., and Lewis, B.G. (1990). DNA polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37, 417–424.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Jones, D.A., Bertazzoni, S., Turo, C.J., Syme, R.A., and Hane, J.K. (2018). Bioinformatic prediction of plant-pathogenicity effector proteins of fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 46, 43–49.
- De Jonge, R., Bolton, M.D., Kombrink, A., van den Berg, G.C.M., Yadeta, K.A., and Thomma, B.P.H.J. (2013). Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen. *Genome Res.* 23, 1271–1282.
- Jupe, J., Stam, R., Howden, A.J.M., 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.
- Jiquel, A., Gervais, J., Geistodt-Kiener, A., Delourme, R., Gay, E.J., Ollivier, B., Fudal, I., Faure, S., Balesdent, M.-H., and Rouxel T. “Late” effectors of *Leptosphaeria maculans* as tools to identify novel and durable race-specific resistance genes in *Brassica napus*. (Soumis).
- Van Kan, J.A.L. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* 11, 247–253.
- Kawahara, Y., Oono, Y., Kanamori, H., Matsumoto, T., Itoh, T., and Minami, E. (2012). Simultaneous RNA-Seq analysis of a mixed transcriptome of rice and blast fungus interaction. *PLoS ONE* 7, e49423.

- Keller, N.P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nat. Rev. Microbiol.* *17*, 167–180.
- Kerdraon, L., Laval, V., and Suffert, F. (2019a). Microbiomes and pathogen survival in crop residues, an ecotone between plant and soil. *Phytobiomes J.* *3*, 246–255.
- Kerdraon, L., Balesdent, M.-H., Barret, M., Laval, V., and Suffert, F. (2019b). Crop residues in wheat-oilseed rape rotation system: a pivotal, shifting platform for microbial meetings. *Microb. Ecol.* *77*, 931–945.
- Klaubauf, S., Narang, H.M., Post, H., Zhou, M., Brunner, K., Mach-Aigner, A.R., Mach, R.L., Heck, A.J.R., Altelaar, A.F.M., and de Vries, R.P. (2014). Similar is not the same: Differences in the function of the (hemi-)cellulolytic regulator XlnR (Xlr1/Xyr1) in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* *72*, 73–81.
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L.J., Takahara, H., Neumann, U., van Themaat, E.V.L., van der Does, H.C., Hacquard, S., Stüber, K., Will, I., Schmalenbach, W., et al. (2012). Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathog.* *8*, e1002643.
- Kloppholz, S., Kuhn, H., and Requena, N. (2011). A Secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Curr. Biol.* *21*, 1204–1209.
- Koch, E., Badawy, H.M.A., and Hoppe, H.H. (1989). Differences between aggressive and non-aggressive single spore lines of *Leptosphaeria maculans* in cultural characteristics and phytotoxin production. *J. Phytopathol.* *124*, 52–62.
- Kombrink, A., Tayyrov, A., Essig, A., Stöckli, M., Micheller, S., Hintze, J., van Heuvel, Y., Dürig, N., Lin, C., Kallio, P.T., et al. (2019). Induction of antibacterial proteins and peptides in the *coprophilous* mushroom *Coprinopsis cinerea* in response to bacteria. *ISME J.* *13*, 588–602.
- Kong, W., Chen, N., Liu, T., Zhu, J., Wang, J., He, X., and Jin, Y. (2015). Large-scale transcriptome analysis of cucumber and *Botrytis cinerea* during infection. *PLoS ONE* *10*, e0142221.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* *128*, 693–705.
- Kuo, H.-C., Hui, S., Choi, J., Asiegbu, F.O., Valkonen, J.P.T., and Lee, Y.-H. (2014). Secret lifestyles of *Neurospora crassa*. *Sci. Rep.* *4*, 5135.
- Kuzdraliński, A., Szczerba, H., Tofil, K., Filipiak, A., Garbarczyk, E., Dziadko, P., Muszyńska, M., and Solarska, E. (2014). Early PCR-based detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. poae* on stem bases of winter wheat throughout Poland. *Eur. J. Plant Pathol.* *140*, 491–502.
- Lamichhane, J.R., and Venturi, V. (2015). Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. *Front. Plant Sci.* *6*, 385.
- Lanver, D., Müller, A.N., Happel, P., Schweizer, G., Haas, F.B., Franitza, M., Pellegrin, C., Reissmann, S., Altmüller, J., Rensing, S.A., et al. (2018). The biotrophic development of *Ustilago maydis* studied by RNA-Seq analysis. *Plant Cell* *30*, 300–323.
- Lazar, N., Mesarich, C.H., Petit-Houdenot, Y., Talbi, N., Sierra-Gallay, I.L. de la, Zélie, E., Blondeau, K., Gracy, J., Ollivier, B., Blaise, F., et al. (2020). A new family of structurally conserved fungal effectors displays epistatic interactions with plant resistance proteins. *BioRxiv* 2020.12.17.423041.

- Leclair, S., Ansan-Melayah, D., Rouxel, T., and Balesdent, M.-H. (1996). Meiotic behaviour of the minichromosome in the phytopathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Curr. Genet.* *30*, 541–548.
- Leontovyčová, H., Trdá, L., Dobrev, P.I., Šašek, V., Gay, E., Balesdent, M.-H., and Burketová, L. (2020). Auxin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* is associated with enhanced transcription of indole-3-pyruvate decarboxylase *LmIPDC2* and tryptophan aminotransferase *LmTAM1*. *Res. Microbiol.* *171*, 174–184.
- Liu, S., Liu, R., Latunde-Dada, A.O., Cools, H.J., Foster, S.J., Huang, Y., and Fitt, B.D.L. (2007). Comparison of *Leptosphaeria biglobosa*-induced and chemically induced systemic resistance to *L. maculans* in *Brassica napus*. *Chin. Sci. Bull.* *52*, 1053–1062.
- Liu, S.Y., Liu, Z., Fitt, B.D.L., Evans, N., Foster, S.J., Huang, Y.J., Latunde-Dada, A.O., and Lucas, J.A. (2006). Resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) induced by *L. biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments. *Plant Pathol.* *55*, 401–412.
- Liu, Z., Latunde-Dada, A.O., Hall, A.M., and Fitt, B.D.L. (2014). Phoma stem canker disease on oilseed rape (*Brassica napus*) in China is caused by *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae.’ *Eur. J. Plant Pathol.* *140*, 841–857.
- Llanos, A., Déjean, S., Neugnot-Roux, V., François, J.M., and Parrou, J.-L. (2019). Carbon sources and XlnR-dependent transcriptional landscape of CAZymes in the industrial fungus *Talaromyces versatilis*: when exception seems to be the rule. *Microb. Cell Factories* *18*, 14.
- 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.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., and Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* *42*, D490–D495.
- Lô-Pelzer, E., Aubertot, J.N., David, O., Jeuffroy, M.H., and Bousset, L. (2009). Relationship between severity of blackleg (*Leptosphaeria maculans*/*L. biglobosa* species complex) and subsequent primary inoculum production on oilseed rape stubble. *Plant Pathol.* *58*, 61–70.
- Lorrain, C., Marchal, C., Hacquard, S., Delaruelle, C., Pétrowski, J., Petre, B., Hecker, A., Frey, P., and Duplessis, S. (2018). The rust fungus *Melampsora larici-populina* expresses a conserved genetic program and distinct sets of secreted protein genes during infection of its two host plants, larch and poplar. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *31*, 695–706.
- Lowe, R.G.T., Cassin, A., Grandaubert, J., Clark, B.L., Van de Wouw, A.P., Rouxel, T., and Howlett, B.J. (2014). Genomes and transcriptomes of partners in plant-fungal-interactions between canola (*Brassica napus*) and two *Leptosphaeria* species. *PloS One* *9*, e103098.
- Lyu, X., Shen, C., Fu, Y., Xie, J., Jiang, D., Li, G., and Cheng, J. (2015). Comparative genomic and transcriptional analyses of the carbohydrate-active enzymes and secretomes of phytopathogenic fungi reveal their significant roles during infection and development. *Sci. Rep.* *5*, 1–16.
- Ma, L.-J., van der Does, H.C., Borkovich, K.A., Coleman, J.J., Daboussi, M.-J., Di Pietro, A., Dufresne, M., Freitag, M., Grabherr, M., Henrissat, B., et al. (2010). Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* *464*, 367–373.
- Mahuku, G.S., Hall, R., and Goodwin, P.H. (1996). Co-infection and induction of systemic acquired resistance by weakly and highly virulent isolates of *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *49*, 61–72.

- Marçais, B., Piou, D., Dezette, D., and Desprez-Loustau, M.-L. (2016). Can oak powdery mildew severity be explained by indirect effects of climate on the composition of the *Erysiphe* pathogenic complex? *Phytopathology* *107*, 570–579.
- Marchetto, K.M., and Power, A.G. (2018). Coinfection timing drives host population dynamics through changes in virulence. *Am. Nat.* *191*, 173–183.
- May, C.L., Potage, G., Andrivon, D., Tivoli, B., and Outreman, Y. (2009). Plant disease complex: antagonism and synergism between pathogens of the ascochyta blight complex on pea. *J. Phytopathol.* *157*, 715–721.
- Mazáková, J., Urban, J., Zouhar, M., and Ryšánek, P. (2017). Analysis of *Leptosphaeria* species complex causing phoma leaf spot and stem canker of winter oilseed rape (*Brassica napus*) in the Czech Republic. *Crop Pasture Sci.* *68*, 254–264.
- Mendes-Pereira, E., Balesdent, M.-H., Brun, H., and Rouxel, T. (2003). Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*-*L. biglobosa* species complex. *Mycol. Res.* *107*, 1287–1304.
- Möller, M., and Stukenbrock, E.H. (2017). Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* *15*, 756–771.
- Mougou-Hamdane, A., Giresse, X., Dutech, C., and Desprez-Loustau, M.-L. (2010). Spatial distribution of lineages of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods. *Ann. For. Sci.* *67*, 212.
- Neik, T.X., Ghanbarnia, K., Ollivier, B., Scheben, A., Severn-Ellis, A., Larkan, N.J., Haddadi, P., Fernando, W.G.D., Rouxel, T., Batley, J., et al. (2020). Two independent approaches converge to the cloning of a new *Leptosphaeria maculans* avirulence effector gene, *AvrLmS-Lep2*. *BioRxiv* 2020.10.02.322479.
- Newbery, F., Ritchie, F., Gladders, P., Fitt, B.D.L., and Shaw, M.W. (2020). Inter-individual genetic variation in the temperature response of *Leptosphaeria* species pathogenic on oilseed rape. *Plant Pathol.* *69*, 1469–1481.
- Niehaus, E.-M., Münsterkötter, M., Proctor, R.H., Brown, D.W., Sharon, A., Idan, Y., Oren-Young, L., Sieber, C.M., Novák, O., Pěňčík, A., et al. (2016). Comparative “Omics” of the *Fusarium fujikuroi* species complex highlights differences in genetic potential and metabolite synthesis. *Genome Biol. Evol.* *8*, 3574–3599.
- O’Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., Kleemann, J., Torres, M.F., Damm, U., Buiate, E.A., Epstein, L., Alkan, N., et al. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Genet.* *44*, 1060–1065.
- Ohm, R.A., Feau, N., Henrissat, B., Schoch, C.L., Horwitz, B.A., Barry, K.W., Condon, B.J., Copeland, A.C., Dhillon, B., Glaser, F., et al. (2012). Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen dothideomycetes fungi. *PLoS Pathog.* *8*, e1003037.
- Palma-Guerrero, J., Torriani, S.F.F., Zala, M., Carter, D., Courbot, M., Rudd, J.J., McDonald, B.A., and Croll, D. (2016). Comparative transcriptomic analyses of *Zymoseptoria tritici* strains show complex lifestyle transitions and intraspecific variability in transcription profiles. *Mol. Plant Pathol.* *17*, 845–859.
- Parlange, F., Daverdin, G., Fudal, I., Kuhn, M.-L., Balesdent, M.-H., Blaise, F., Grezes-Besset, B., and Rouxel, T. (2009). *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents *Rlm4*-mediated recognition through a single amino acid change. *Mol. Microbiol.* *71*, 851–863.

- Peiris, D., Dunn, W.B., Brown, M., Kell, D.B., Roy, I., and Hedger, J.N. (2007). Metabolite profiles of interacting mycelial fronts differ for pairings of the wood decay basidiomycete fungus, *Stereum hirsutum* with its competitors *Coprinus micaceus* and *Coprinus disseminatus*. *Metabolomics* 4, 52.
- Peres, N.A., Timmer, L.W., Adaskaveg, J.E., and Correll, J.C. (2005). Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.* 89, 784–796.
- Petit-Houdenot, Y., Degrave, A., Meyer, M., Blaise, F., Ollivier, B., Marais, C.-L., Jauneau, A., Audran, C., Rivas, S., Veneault-Fourrey, C., et al. (2019). A two genes - for - one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*. *New Phytol.* 223, 397–411.
- Petre, B., Lorrain, C., Stukenbrock, E.H., and Duplessis, S. (2020). Host-specialized transcriptome of plant-associated organisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 56, 81–88.
- Plissonneau, C., Daverdin, G., Ollivier, B., Blaise, F., Degrave, A., Fudal, I., Rouxel, T., and Balesdent, M.-H. (2016). A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytol.* 209, 1613–1624.
- Plissonneau, C., Benevenuto, J., Mohd-Assaad, N., Fouché, S., Hartmann, F.E., and Croll, D. (2017). Using population and comparative genomics to understand the genetic basis of effector-driven fungal pathogen evolution. *Front. Plant Sci.* 8.
- Porto, B.N., Caixeta, E.T., Mathioni, S.M., Vidigal, P.M.P., Zambolim, L., Zambolim, E.M., Donofrio, N., Polson, S.W., Maia, T.A., Chen, C., et al. (2019). Genome sequencing and transcript analysis of *Hemileia vastatrix* reveal expression dynamics of candidate effectors dependent on host compatibility. *PLoS ONE* 14, e0215598.
- Promptutha, I., Hyde, K.D., McKenzie, E.H.C., Peberdy, J.F., and Lumyong, S. (2010). Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? *Fungal Divers.* 41, 89–99.
- Prusky, D., Alkan, N., Mengiste, T., and Fluhr, R. (2013). Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 155–176.
- Raffaele, S., and Kamoun, S. (2012). Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 417–430.
- Ravensdale, M., Rocheleau, H., Wang, L., Nasmith, C., Ouellet, T., and Subramaniam, R. (2014). Components of priming-induced resistance to *Fusarium* head blight in wheat revealed by two distinct mutants of *Fusarium graminearum*. *Mol. Plant Pathol.* 15, 948–956.
- Rose, J.K.C., 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.
- Rouxel, T., Penaud, A., Pinochet, X., Brun, H., Gout, L., Delourme, R., Schmit, J., and Balesdent, M.-H. (2003). A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 871–881.
- Rouxel, T., Grandaubert, J., Hane, J.K., Hoede, C., van de Wouw, A.P., Couloux, A., Dominguez, V., Anthouard, V., Bally, P., Bourras, S., et al. (2011). Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nat. Commun.* 2, 202.
- Rovenich, H., Boshoven, J.C., and Thomma, B.P. (2014). Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 20, 96–103.

- Rudd, J.J., Kanyuka, K., Hassani-Pak, K., Derbyshire, M., Andongabo, A., Devonshire, J., Lysenko, A., Saqi, M., Desai, N.M., Powers, S.J., et al. (2015). Transcriptome and metabolite profiling of the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions and a variation on the hemibiotrophic lifestyle definition. *Plant Physiol.* *167*, 1158–1185.
- Rybak, K., See, P.T., Phan, H.T.T., Syme, R.A., Moffat, C.S., Oliver, R.P., and Tan, K.-C. (2017). A functionally conserved Zn₂Cys₆ binuclear cluster transcription factor class regulates necrotrophic effector gene expression and host-specific virulence of two major Pleosporales fungal pathogens of wheat. *Mol. Plant Pathol.* *18*, 420–434.
- Sánchez-Vallet, A., Mesters, J.R., and Thomma, B.P.H.J. (2015). The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* *39*, 171–183.
- Schotanus, K., Soyer, J.L., Connolly, L.R., Grandaubert, J., Happel, P., Smith, K.M., Freitag, M., and Stukenbrock, E.H. (2015). Histone modifications rather than the novel regional centromeres of *Zymoseptoria tritici* distinguish core and accessory chromosomes. *Epigenetics Chromatin* *8*, 41.
- Shoemaker, R.A., and Brun, H. (2001). The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Can. J. Bot.* *79*, 412–419.
- Smith, K.M., Kothe, G.O., Matsen, C.B., Khlafallah, T.K., Adhvaryu, K.K., Hemphill, M., Freitag, M., Motamedi, M.R., and Selker, E.U. (2008). The fungus *Neurospora crassa* displays telomeric silencing mediated by multiple sirtuins and by methylation of histone H3 lysine 9. *Epigenetics Chromatin* *1*, 5.
- Soanes, D.M., Alam, I., Cornell, M., Wong, H.M., Hedeler, C., Paton, N.W., Rattray, M., Hubbard, S.J., Oliver, S.G., and Talbot, N.J. (2008). Comparative genome analysis of filamentous fungi reveals gene family expansions associated with fungal pathogenesis. *PLoS ONE* *3*, e2300.
- 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*, 1784.
- Soyer, J.L., Ghalid, M.E., Glaser, N., Ollivier, B., Linglin, J., Grandaubert, J., Balesdent, M.-H., Connolly, L.R., Freitag, M., Rouxel, T., et al. (2014). Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genet.* *10*, e1004227.
- Soyer, J.L., Hamiot, A., Ollivier, B., Balesdent, M.-H., Rouxel, T., and Fudal, I. (2015). The APSES transcription factor LmStuA is required for sporulation, pathogenic development and effector gene expression in *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Plant Pathol.* *16*, 1000–1005.
- Soyer, J.L., Grandaubert, J., Haueisen, J., Schotanus, K., and Stukenbrock, E.H. (2019). *In planta* chromatin immunoprecipitation in *Zymoseptoria tritici* reveals chromatin-based regulation of putative effector gene expression. *BioRxiv* 544627.
- Soyer, J.L., Clairet, C., Gay, E.J., Lapalu, N., Rouxel, T., Stukenbrock, E.H., and Fudal, I. (2020). Genome-wide mapping of histone modifications in two species of *Leptosphaeria maculans* showing contrasting genomic organization and host specialization. *BioRxiv* 2020.05.08.084566.
- Spanu, P.D. (2012). The Genomics of obligate (and nonobligate) biotrophs. *Annu. Rev. Phytopathol.* *50*, 91–109.
- Spanu, P.D., and Panstruga, R. (2017). Editorial: biotrophic plant-microbe interactions. *Front. Plant Sci.* *8*.

- Spence, C.A., Lakshmanan, V., Donofrio, N., and Bais, H.P. (2015). Crucial roles of abscisic acid biogenesis in virulence of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front. Plant Sci.* *6*.
- Sperschneider, J., Dodds, P.N., Gardiner, D.M., Manners, J.M., Singh, K.B., and Taylor, J.M. (2015). Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi. *PLoS Pathog.* *11*, e1004806.
- Sperschneider, J., Gardiner, D.M., Dodds, P.N., Tini, F., Covarelli, L., Singh, K.B., Manners, J.M., and Taylor, J.M. (2016). EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytol.* *210*, 743–761.
- Sperschneider, J., Dodds, P.N., Singh, K.B., and Taylor, J.M. (2018). ApoplastP: prediction of effectors and plant proteins in the apoplast using machine learning. *New Phytol.* *217*, 1764–1778.
- Sprague, S.J., Marcroft, S.J., Lindbeck, K.D., Ware, A.H., Khangura, R.K., and Van de Wouw, A.P., (2018). Detection, prevalence and severity of upper canopy infection on mature *Brassica napus* plants caused by *Leptosphaeria maculans* in Australia. *Crop Pasture Sci.* *69*, 65–78.
- Stonard, J.F., Latunde-Dada, A.O., Huang, Y.-J., West, J.S., Evans, N., and Fitt, B.D.L. (2010). Geographic variation in severity of phoma stem canker and *Leptosphaeria maculans*/ *L. biglobosa* populations on UK winter oilseed rape (*Brassica napus*). *Eur. J. Plant Pathol.* *126*, 97.
- Studt, L., Rösler, S.M., Burkhardt, I., Arndt, B., Freitag, M., Humpf, H.-U., Dickschat, J.S., and Tudzynski, B. (2016). Knock-down of the methyltransferase Kmt6 relieves H3K27me3 and results in induction of cryptic and otherwise silent secondary metabolite gene clusters in *Fusarium fujikuroi*. *Environ. Microbiol.* *18*, 4037–4054.
- Suffert, F., Sache, I., and Lannou, C. (2011). Early stages of *Septoria tritici* blotch epidemics of winter wheat: build-up, overseasoning, and release of primary inoculum. *Plant Pathol.* *60*, 166–177.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., and Fisher, M.C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* *31*, 21–32.
- Testa, A.C., Oliver, R.P., and Hane, J.K. (2016). OcculterCut: A comprehensive survey of AT-Rich regions in fungal genomes. *Genome Biol. Evol.* *8*, 2044–2064.
- Tollenaere, C., Susi, H., and Laine, A.-L. (2016). Evolutionary and epidemiological implications of multiple infection in plants. *Trends Plant Sci.* *21*, 80–90.
- Tör, M., Lotze, M.T., and Holton, N. (2009). Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *J. Exp. Bot.* *60*, 3645–3654.
- Toscano-Underwood, C., Huang, Y.J., Fitt, B.D.L., and Hall, A.M. (2003). Effects of temperature on maturation of pseudothecia of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* on oilseed rape stem debris. *Plant Pathol.* *52*, 726–736.
- Tucker, S.L., and Talbot, N.J. (2001). Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* *39*, 385–417.
- Tymon, L., and Johnson, D.A. (2014). Fungicide resistance of two species of *Alternaria* from potato in the Columbia basin of Washington. *Plant Dis.* *98*, 1648–1653.
- Urquhart, A.S., and Idnurm, A. (2019). Limitations of transcriptome-based prediction of pathogenicity genes in the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *FEMS Microbiol. Lett.* *366*.

- Van de Wouw, A.P., Thomas, V.L., Cozijnsen, A.J., Marcroft, S.J., Salisbury, P.A., and Howlett, B.J. (2008). Identification of *Leptosphaeria biglobosa* ‘canadensis’ on *Brassica juncea* stubble from northern New South Wales, Australia. *Australas. Plant Dis. Notes* 3, 124–128.
- Van de Wouw, A.P., and Howlett, B.J. (2011). Fungal pathogenicity genes in the age of ‘omics.’ *Mol. Plant Pathol.* 12, 507–514.
- Van de Wouw, A.P., Lowe, R.G.T., Elliott, C.E., Dubois, D.J., and Howlett, B.J. (2014). An avirulence gene, *AvrLmJ1*, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Mol. Plant Pathol.* 15, 523–530.
- Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., and Pieterse, C.M.J. (2009). Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* 70, 1581–1588.
- Vanheule, A., Audenaert, K., Warris, S., van de Geest, H., Schijlen, E., Höfte, M., De Saeger, S., Haesaert, G., Waalwijk, C., and van der Lee, T. (2016). Living apart together: crosstalk between the core and supernumerary genomes in a fungal plant pathogen. *BMC Genomics* 17, 670.
- Verma, S., Gazara, R.K., Nizam, S., Parween, S., Chattopadhyay, D., and Verma, P.K. (2016). Draft genome sequencing and secretome analysis of fungal phytopathogen *Ascochyta rabiei* provides insight into the necrotrophic effector repertoire. *Sci. Rep.* 6, 24638.
- Vincenot, L., Balesdent, M.H., Li, H., Barbetti, M.J., Sivasithamparam, K., Gout, L., and Rouxel, T. (2008). Occurrence of a new subclade of *Leptosphaeria biglobosa* in Western Australia. *Phytopathology* 98, 321–329.
- Walsh, K., Korimbocus, J., Boonham, N., Jennings, P., and Hims, M. (2005). Using Real-time PCR to discriminate and quantify the closely related wheat pathogens *Oculimacula yallundae* and *Oculimacula aciformis*. *J. Phytopathol.* 153, 715–721.
- West, J.S., and Fitt, B.D.L. (2005). Population dynamics and dispersal of *Leptosphaeria maculans* (blackleg of canola). *Australas. Plant Pathol.* 34, 457–461.
- West, J.S., Kharbanda, P.D., Barbetti, M.J., and Fitt, B.D.L. (2001). Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathol.* 50, 10–27.
- Winter, D.J., Ganley, A.R.D., Young, C.A., Liachko, I., Schardl, C.L., Dupont, P.-Y., Berry, D., Ram, A., Scott, B., and Cox, M.P. (2018). Repeat elements organise 3D genome structure and mediate transcription in the filamentous fungus *Epichloë festucae*. *PLoS Genet.* 14, e1007467.
- Wolpert, T.J., and Lorang, J.M. (2016). Victoria Blight, defense turned upside down. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 95, 8–13.
- Xu, X.-M., Nicholson, P., Thomsett, M.A., Simpson, D., Cooke, B.M., Doohan, F.M., Brennan, J., Monaghan, S., Moretti, A., Mule, G., et al. (2007a). Relationship between the fungal complex causing fusarium head blight of wheat and environmental conditions. *Phytopathology* 98, 69–78.
- Xu, X.-M., Monger, W., Ritieni, A., and Nicholson, P. (2007b). Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. *Plant Pathol.* 56, 943–956.
- Zeng, J., Xu, T., Cao, L., Tong, C., Zhang, X., Luo, D., Han, S., Pang, P., Fu, W., Yan, J., et al. (2018). The Role of Iron competition in the antagonistic action of the rice endophyte *Streptomyces sporocinereus* OsiSh-2 against the pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Microb. Ecol.* 76, 1021–1029.

Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., and Xu, J.-R. (2013). Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics* *14*, 274.

Zuluaga, A.P., Vega-Arreguín, J.C., Fei, Z., Ponnala, L., Lee, S.J., Matas, A.J., Patev, S., Fry, W.E., and Rose, J.K.C. (2016). Transcriptional dynamics of *Phytophthora infestans* during sequential stages of hemibiotrophic infection of tomato. *Mol. Plant Pathol.* *17*, 29–41.

Annexe 1

Regulation of effector gene expression as concerted waves in *Leptosphaeria maculans*: a two-players game

C. Clairet¹, E.J. Gay¹, A. Simon¹, N. Lapalu¹, F. Blaise¹, C.L. Marais¹, M.-H. Balesdent¹, J.L. Soyer^{1*}, and I. Fudal^{1*}

¹Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR BIOGER, 78850, Thiverval-Grignon, France

*To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jessica.soyer@inrae.fr; isabelle.fudal@inrae.fr

ABSTRACT

During infection, phytopathogenic fungi secrete a set of molecules collectively known as effectors, involved in overcoming the host immune defense system and in disease establishment. Effector genes are concertedly expressed as waves during infection. However, little is known about how coordinated expression of effector genes is regulated. Since many effector genes are located in repeat-rich regions, the role of chromatin remodeling in the regulation of effector expression was recently investigated. In *Leptosphaeria maculans*, causing stem canker of oilseed rape, we established that the repressive histone modification H3K9me3 (trimethylation of Lysine 9 of Histone H3), deposited by the histone methyltransferase KMT1, was involved in the regulation of expression of genes highly expressed during infection, including effectors. Nevertheless, inactivation of *KMT1* did not induce expression of these genes at the same level as observed during infection of oilseed rape, suggesting that a second regulator, such as a transcription factor (TF), might be involved. Pf2, a TF belonging to the Zn2Cys6 fungal specific TF family, was described in several Dothideomycete species as essential for pathogenicity and effector gene expression. We identified the orthologue of Pf2 in *L. maculans*, LmPf2, and investigated the role of LmPf2 together with KMT1 in *L. maculans*, by inactivating and over-expressing *LmPf2* in a WT strain and a $\Delta kmt1$ mutant. Functional analyses of the corresponding transformants highlighted an essential role of LmPf2 in the establishment of pathogenesis. Transcriptomic analyses during axenic growth showed that LmPf2 is involved in the control of effector gene expression. We observed an enhanced effect of the over-expression of LmPf2 on effector gene expression in a $\Delta kmt1$ background, suggesting

a synergic role between KMT1 and LmPf2. Altogether, our findings allowed us to establish an effector gene regulatory model both *in planta* and *in vitro*.

INTRODUCTION

During infection, plant pathogenic fungi secrete a set of molecules, collectively known as effectors, involved in overcoming the host immune defense system, nutrient uptake and, eventually, symptom development (Lo Presti *et al.*, 2015). Effectors mainly correspond to small secreted proteins, often cysteine-rich, with no homology to other known proteins in the databases, but also to secondary metabolites and siRNA (Weiberg *et al.*, 2013; Lo Presti *et al.*, 2015; Collemare *et al.*, 2019). Effector genes of filamentous plant pathogens are often located in transposable elements (TEs)-rich regions of the genomes, such as dispensable chromosomes or telomeres (Sánchez-Vallet *et al.*, 2018). Transcriptomic data generated during different stages of plant infection highlighted concerted waves of effector gene expression over the course of infection, according to the infection structure, to the host-plant infected or to the species or strain studied (e.g. Sanchez-Vallet *et al.*, 2018; Haueisen *et al.*, 2019; Gay *et al.*, 2020). Little is known about how coordinated expression of effector genes is regulated. Based on observation that many effector genes are located in TE-rich regions, and up-regulated during host penetration/infection, the role of chromatin remodeling in the regulation of effector expression was recently investigated. Analyses in plant-interacting fungi have shed light on two histone methyltransferases, KMT1 and KMT6, as involved in the regulation of effector genes (Chujo & Scott 2014; Soyer *et al.*, 2014; Soyer *et al.*, 2019).

Leptosphaeria maculans, the causal agent of stem canker of oilseed rape (*Brassica napus*), displays a complex life cycle with alternating phases of saprophytism, asymptomatic growth and necrotrophy. Notably, it grows as a necrotroph on two different plant organs, leaf and stem, with the latter resulting in lodging (Rouxel and Balesdent, 2005). During infection of oilseed rape, several waves of genes are expressed, including predicted effector genes (Gay *et al.*, 2020). Of particular interest, a specific set of effector genes is expressed during the asymptomatic stages occurring on both leaves and stems, including the nine avirulence genes (*AvrLm*) identified so far, these genes all being located in TE-rich regions (*AvrLm1*, *AvrLm2*, *AvrLm3*, *AvrLm4-7*, *AvrLm5-9*, *AvrLm6*, *AvrLm10*, *AvrLm11*, *AvrLmS-Lep2*; Gout *et al.*, 2006; Fudal *et al.*, 2007; Parlange *et al.*, 2009; Balesdent *et al.*, 2013; van de Wouw *et al.*, 2013; Plissonneau *et al.*, 2016; Ghanbarnia *et al.*, 2015, 2018; Petit-Houdenot *et al.*, 2019; Neik *et al.*, 2020). The genome of *L. maculans* displays a bipartite structure with gene-rich regions and TE-rich regions, which represent one third of the genome (Rouxel *et al.*, 2011). One thousand and

seventy putative effector genes were predicted in *L. maculans* genome (Gay *et al.*, 2020). In a recent study, we generated a map of the distribution of three histone modifications, either associated with gene expression (H3K4me2, dimethylation of Lysine 4 of histone H3) or gene silencing (H3K9me3 and H3K27me3, trimethylation of Lysine 9 and Lysine 27 of Histone H3) during axenic growth (Soyer *et al.*, 2020) and highlighted an enrichment of effector genes in both types of heterochromatin domains. Integrative analysis of ChIP-seq data *in vitro* with transcriptomic analyses performed throughout the life cycle of *L. maculans* pinpoint that *L. maculans* genes over-expressed at any stage of *B. napus* infection are enriched in heterochromatin domains *in vitro* (Gay *et al.*, 2020). In a previous study, silencing of *KMT1* had led to an over-expression of more than 30% of the genes located in TE-rich environments normally silenced in axenic culture in the WT strain, specifically effector genes. ChIP-qPCR analyses showed that over-expression of at least two effector genes was associated with a decrease of the repressive histone modification H3K9me3 in the genomic environment of these genes (Soyer *et al.*, 2014). Altogether, these analyses revealed that chromatin structure, via the dynamic of chromatin remodeling, was an important regulatory layer of effector genes up-regulated during host infection and located in TE-rich regions. Nevertheless, at least in *L. maculans*, inactivation of *KMT1*, while inducing expression of effector genes *in vitro*, did not induce expression of these genes at the same level as observed during infection of oilseed rape, suggesting that a second regulator, such as a transcription factor (TF), might be involved. Soyer *et al.* (2015a) proposed a model of dual control of effector gene expression: chromatin condensation represses effector gene expression *in vitro*; after chromatin loosening upon infection, one or several TFs could bind effector gene promoters resulting in their concerted expression. Synergic involvement of chromatin modifications and TF(s) in fungal effector gene expression remains poorly understood and an unexplored field of investigation.

In filamentous plant pathogens, only a few TFs influencing effector gene expression have been identified so far (see for review Tan and Oliver, 2017). Among them, AbPf2, a Zn2Cys6 TF, was first described in *Alternaria brassicicola*, in which it regulates, directly or indirectly, expression of 33 genes encoding secreted proteins including eight putative effectors (Cho *et al.*, 2013). In *Parastagonospora nodorum*, PnPf2 positively regulates two necrotrophic effector genes, *SnToxA* and *SnTox3*, and the orthologue of *SnToxA*, *ToxA*, is regulated by PtrPf2 in *Pyrenophora tritici-repentis* (Rybak *et al.*, 2017). In this species, a recent transcriptomic analysis comparing the WT and the *PnPf2* mutant during axenic culture and infection of wheat

revealed an involvement of *PnPf2* in the regulation of twelve effector-encoding genes and of genes associated with plant cell wall degradation and nutrient assimilation (Jones *et al.*, 2019).

Here, we investigated the involvement of the homolog of Pf2 in *L. maculans*, LmPf2, in the control of effector gene expression. We hypothesized that removal of H3K9me3 in the genomic environment of effector genes was a pre-requisite for induction of their expression through the action of one, or several, TFs during infection. We inactivated *LmPf2* via CRISPR-Cas9 and over-expressed *LmPf2* in two different genetic backgrounds: (i) a wild type strain; (ii) a strain in which the gene encoding KMT1 is inactivated. We characterized the corresponding transformants for their growth, sporulation and pathogenicity. We performed a RNA-Seq analysis in order to decipher the respective involvement of LmPf2 and KMT1 in gene regulation. We found out that KMT1 and LmPf2 are acting together to specifically control, directly or indirectly, at least part of two different sets of genes expressed as concerted waves at two infection time points.

MATERIAL AND METHODS

Fungal culture

The reference isolates JN2 and JN3 were used as hosts for genetic transformations (Balesdent *et al.*, 2001). We also used a JN2 strain constitutively expressing *eGFP* (Sâsêk *et al.*, 2012) which was crossed with our mutants in order to follow the colonization of oilseed rape by the mutants. Fungal cultures and conidia production were performed as previously described (Ansan-Melayah *et al.*, 1995). For DNA/RNA extractions, mycelium was grown on V8-juice agar medium at 25°C in the dark for seven days and then plugs were transferred into 150 ml of Fries liquid medium in 500 ml Roux flasks. Tissues were harvested after growing for seven days at 25°C.

Pathogenicity and growth assays

Pathogenicity assays were performed on cotyledons of 15-day-old plantlets of *B. napus*, Es-Astrid. Plants were incubated in a growth chamber at 16/24°C (night/day) with a 16h photoperiod. Symptoms were scored on 10-12 plants, with two biological replicates, 13 days post inoculation (dpi) using the IMAScore rating scale comprising six infection classes (IC), where IC1 to IC3 correspond to various levels of resistance of the plant and IC4 to IC6 to susceptibility (Balesdent *et al.*, 2001). Growth assays were performed by deposition of a 5 mm plug at the center of 90 mm Petri dishes (containing 20 ml of V8-juice agar medium or MMII

medium). Radial growth was measured at nine days after incubation in a growth chamber (25°C) on four biological replicates and statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis test (Guo *et al.*, 2013).

Vector construction and fungal transformation

Vectors pLAU2 and pLAU53 conferring respectively hygromycin and geneticin resistance were used to perform CRISPR-Cas9 gene inactivation, as described by Idnurm *et al.* (2017). DNA fragments coding for gRNA which target genes of interest were designed using the CRISPOR prediction tool and *L. maculans* as reference genome (<http://crispor.tefor.net/>; **Table S1**; Dutreux *et al.*, 2018). The gRNA were chosen not to match on any other genes. The DNA fragment coding for gRNA was amplified using primers MAI0309 and MAI0310 and then inserted into the *XhoI* site of plasmid pLAU53 using Gibson assembly (**Table S1**; Silayeva and Barnes, 2018). Hence, plasmids Plau53-KMT1 and Plau53-LmPf2 were generated to inactivate *LmKMT1* and *LmPf2*.

Over-expression plasmids were obtained using the pBht2 vector conferring resistance to hygromycin (Mullins *et al.*, 2001). *EF1 α* promoter was amplified using EF1aProSac1F and EF1aProKpnIR primers and genomic DNA of JN3 isolate as template, and then inserted into *KpnI-SacI* digested pBht2 to obtain pBht2-promEF1a vector. *LmPf2* gene and its terminator were then amplified using surex_*LmPf2*_Gibs_F and surex_*LmPf2*_Gibs_R primers and inserted in 3' of the *EF1 α* promoter in the *HindIII* digested pBht2-promEF1a vector using Gibson assembly to obtain pBht2-surexLmPf2 (**Table S1**).

The constructs were introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* strain C58-pGV2260 by electroporation (1.5 kV, 200 ohms and 25 mF). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation (ATMT) of *L. maculans* was performed as previously described (Gout *et al.*, 2006). Transformants were plated on minimal medium complemented with geneticin (50 mg/l) for pLAU53-gRNA or hygromycin (50 mg/l) for pBht2-surexLmPf2 and pLAU2-Cas9 and cefotaxime (250 mg/l). For the CRISPR-Cas9 gene inactivation, construct containing *Cas9* (pLAU2-Cas9) was first introduced into a JN3 strain and transformants were selected for hygromycin resistance and this strain was subsequently transformed with pLAU53-gRNA directed against *KMT1* or *LmPf2*. Transformants were selected for geneticin, hygromycin and cefotaxime resistance. Mutations in the targeted genes were checked in the transformants by PCR amplifying with specific primers (**Table S1**) and sequencing. For the *LmPf2* over-

expression, pBht2-*surexLmPf2* was introduced into JN2 and $\Delta km1$. Correct insertions of *surexLmPf2* construction were checked in transformants by PCR amplification (**Table S1**).

Fungal crosses

Purification in order to eliminate *Cas9* gene and gRNA encoding gene from the CRISPR-Cas9 mutants were performed by crossing mutants with JN2 isolate (expressing or not *GFP*; **Table S2**). Crosses were performed as described by Balesdent *et al.* (2002). Progeny was harvested and plated on V8-juice agar medium. Mycelium was collected and DNA extracted. PCR and sequencing were performed to select progeny with the targeted CRISPR-Cas9 mutation but without *Cas9* and gRNA.

DNA and RNA manipulation

Genomic DNA was extracted from conidia or from mycelium grown in Fries liquid culture with the DNAeasy 96 plant Kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France). PCR amplifications were performed as previously described (Fudal *et al.*, 2007). To identify mutation arising in the sequence of the gene targeted by the CRISPR-Cas9 strategy, sequencing was performed by Eurofins Genomics (Anzinger, Ebersberg, Germany). Total RNA was extracted from mycelium grown for one week in Fries liquid medium, and from cotyledons of Es-Astrid infected by *L. maculans* seven dpi as previously described (Fudal *et al.*, 2007).

Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) were performed using a model CFX96 Real Time System (BIORAD; Hercules, CA, USA) and Absolute SYBR Green ROX dUTP Mix (ABgene, Courtaboeuf, France) as previously described (Fudal *et al.*, 2007). For each condition tested, two different RNA extractions from two different biological samples and two reverse transcriptions for each biological replicate were performed. Primers used for qRT-PCR are described in **Table S1**. Ct values were analyzed as described by Muller *et al.* (2002) or using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). *β -tubulin* was used as a constitutively expressed reference gene.

Confocal microscopy and binocular observation

Cotyledons of a susceptible cultivar (Es-Astrid) infected by strains expressing *GFP* were observed at two different time points (5 and 7 dpi) using a DM5500B Leica TCS SPE laser scanning confocal microscope and a 20x HCX Fluotar Leica objective lens. GFP was excited at 488 nm and emission was captured with a 505–530 nm broad-pass filter. The detector

gain was set-up between 700 and 900. Calibrations of gain settings were performed with multiple control leaves and with a range of background fluorescence. All images represent at least four scans. Infected cotyledons were also observed at 8 and 13 dpi using a Leica MZ16F fluorescent binocular coupled with a Leica DFC300FX camera.

Western Blot

Total proteins were extracted from 10-100 mg lyophilized mycelium. Mycelium was ground using beads and Mixer Mill MM 400 (Retsch, Éragny, France). Total proteins were treated as described by Petit-Houdenot *et al.* (2019). Proteins were transferred on a PVDF membrane according to the manufacturer's protocol (Trans-Blot® Turbo™ Rapid Transfer System, BIORAD, Les-Ulis, France) using a small protein transfer program. The PVDF membrane was incubated in TBS 1X containing 5% milk, 0.05% tween 20 for one hour to saturate membrane. The membrane was then incubated at 4°C over-night in TBS 1% containing 0.05% Tween 20, milk 1% and H3K9me3 antibody (1:5000; 39062 ActiveMotif, La Hulpe, Belgium Germany). PVDF membrane was washed as described by Petit-Houdenot *et al.* (2019) and was then incubated in TBS 1X + 0.05% Tween 20 + milk 1% + antiRabbit IgG II^R (goat anti-rabbit, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne) and washed as previously. Finally, membrane was incubated 1min in 1 mL enzyme solution (Clarity™ Western ECL, BIORAD, Les-Ulis, France) and 1 mL Luminol/enhancer solution (Clarity™ Western ECL, BIORAD, Les-Ulis, France) and observed using ChemiDoc (ChemiDoc™ Imaging Systems, BIORAD, Les-Ulis, France).

Gene annotation, domain prediction and gene expression

The Pf2 orthologue of *L. maculans* had been previously identified by Rybak *et al.* (2017). As it had been identified on a previous version of the *L. maculans* genome, we have performed a new search, using the protein sequence of Pf2 from *P. nodorum* and the NCBI BLASTP program (Altschul *et al.*, 1990). Functional domains were identified using Pfam (Finn *et al.*, 2014; <https://pfam.xfam.org/>). Alignments were performed with COBALT (Papadopoulos and Agarwala, 2007). To determine the expression profile of avirulence genes, *KMT1* and *LmPf2* during axenic growth and infection of oilseed rape, we used previously generated RNA-Seq datasets (Gay *et al.*, 2020). We used RNA-Seq from mycelium grown 7 days in V8-media (EBI accession numbers ERS4810062 and ERS4810063). Infections of oilseed rape were performed using JN2. We used RNA-Seq data from i) cotyledons of cultivar Darmor-bzh sampled 2, 5, 7, 9, 12 and 15 dpi (corresponding to EBI accession numbers SAMEA6086549, SAMEA104153286 and SAMEA104153287); ii) petiole of cultivar Darmor-

bzh sampled 7 and 14 dpi (EBI accession numbers SAMEA104153278, ERS4810043, ERS4810044, ERS4810045); iii) stem of cultivar Bristol sampled 14 and 28 dpi (EBI accession numbers SAMEA104153293, ERS4810064, ERS4810065, ERS4810066, ERS4810067, ERS4810068).

RNA-Seq and statistical analysis

Eight different transformants (i.e., two mutants inactivated for *KMT1* or *LmPf2* and two transformants in which *LmPf2* was over-expressed in a JN2 background (JN2_oPf2) or a $\Delta kmt1$ background ($\Delta kmt1$ _oPf2, **Table 1**) were grown in Fries medium during 7 days and harvested for RNA extraction. Two RNA extractions corresponding to two biological replicates were performed for each transformant. About 150 mg of mycelium was used per extraction. Libraries were prepared from all biological replicates, individually, according to the Illumina TruSeq protocol (Illumina, San Diego, CA, USA). Libraries including polyA enrichment were performed and sequenced using 150 pb paired-end strategy on an HiSeq2000 Illumina sequencer at the Genewiz sequencing facility (Leipzig, Germany) with an input of 2 μ g total RNA. Raw sequencing data are available under the SRA accession number xxxxx. Quality of the reads was checked and improved using Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014). The resulting reads were treated to remove adaptors and reads below 30 bp and filtered reads were mapped against the *L. maculans* genome using STAR (Dobin *et al.*, 2013; Dutreux *et al.*, 2018) with default parameters. Read alignments were stored in SAM format, and indexing, sorting, and conversion to BAM format were performed using SAMtools v0.1.19 (Li *et al.*, 2009). Genes with a number of reads > 15 in at least one condition were kept for statistical analysis. Differential expression analyses were made using R (R Core Team, 2017) and the package EdgeR (Robinson *et al.*, 2010). Genes with a log₂ Fold Change ≤ -1.5 or ≥ 1.5 and an associated false discovery rate ≤ 0.05 were considered as differentially expressed (McCarthy *et al.*, 2012).

Gene Ontology enrichment analysis

Gene Ontology (GO) annotation of *L. maculans* encoding genes were retrieved from Dutreux *et al.* (2018). Gene ontology term enrichment analysis of the differentially expressed genes in our transformants was performed with the plug-in Biological networks Gene ontology (BinGo; v3.0.3) of the cytoscape software (Shannon *et al.*, 2003). List of genes submitted to BINGO were considered as significantly enriched for a given GO term with an associated False Discovery Rate ≤ 0.01 for the biological processes. All statistical analyses were done in R (www.r-project.org).

To analyze distribution of the differentially expressed genes in different waves of expression during infection, we used previously identified expression groups defined by Gay *et al.* (2020). To analyze distribution of the differentially expressed genes in different domains associated with euchromatin or heterochromatin, we used previously generated genome-wide chromatin map (Soyer *et al.*, 2020), available under the GEO accession number GSE150127. In order to assess significant enrichment of differentially expressed genes in H3K4me2-, H3K9me3- or H3K27me3-domains, a Chi² test was applied to compare the expected proportion of a given category of genes across the entire genome to the observed distribution of the gene category in H3K4me2-, H3K9me3- or H3K27me3-domains. Enrichment was considered significant with a *P* value < 0.05; analyses were done using R, version 3.0.2 (www.r-project.org).

RESULTS

Identification of a *Pf2* orthologue and analysis of *KMT1* and *LmPf2* expression in *Leptosphaeria maculans*

In order to analyze involvement of Pf2 in the regulation of *L. maculans* gene expression, we firstly identified *Pf2* orthologue in *L. maculans*. The gene encoding Pf2 in *P. nodorum*, *PnPf2*, was identified by Rybak *et al.* (2017) and phylogenetic analysis showed that the closest orthologue of *PnPf2* was found in *L. maculans* (Genbank Accession XP_003838593.1). In the recent *L. maculans* genome reannotation, this Genbank Accession corresponded to gene ID *Lmb_jn3_06039*, located on SuperContig6 (Dutreux *et al.*, 2018). A bidirectional Best Hit with BLASTp confirmed orthology between *PnPf2* and *Lmb_jn3_06039* (**Figure 1**). *Lmb_jn3_06039* (hereinafter referred to as *LmPf2*) encodes a 658 amino acids protein sharing 67% identity with *PnPf2*. A Zn2Cys6-type DNA-binding domain was predicted in both proteins (IPR001138; **Figure 1**).

LmPf2	MATNP TTTT VPVKRACDSCHRRKVKCIGEGTAPCKNCVSAGLACTYNAV PQ KKGPKGSRKVLSELRENQRNAQLAAGYPS	80
PnPf2	MSSSS TS APVKRACD --- RRKVKCIGEGTNPCKNCL SAG LACTYNAI PQ KKGPKGSRKVLSELRENQRNAQLAAGFPP	77
LmPf2	ELGFDGRALTASFARTPGLLAPGLVESCIIEYFFAHVYSEPLLRQRAQETAMNMDRSTESYCVIVALCAYVMIKANMKV	160
PnPf2	DVG YDGR TLSTTFARAQGLL PNGLVDTCLDFF FANVY PSTPV LHRQKAQELAVN MER STEAYCLIVSLCAYVMIHANMKV	157
LmPf2	SPTMLPRPEMAQMSNV SFGH ILLEESVVRQGYDFRENPHLTVLTSYFYSGCYFGLGRENTAWAYLRDAT TQ AHILGMH	240
PnPf2	PSNMFSRPEVAQMSNMTLGH ALLEESVR -----	185
LmPf2	DEDTYKHDPMDISRKRVL Y WLLFIAERNFALHKKRPI S LYPTIHPPTLDEASSDRQFASGLELMINMYKI ID DTFINLWN	320
PnPf2	-----	
LmPf2	RVH THANPAWIAQLQTQL A EAV PAYLDCNEAQ SVE IRVTQH W LRAQAWQLC VTQ GLVSSVTS SD SPLTFKYPIE I ARDLLT	400
PnPf2	-----L SEAV PAYLECTEAQ GVE IRIT Q QWLKAMAWQLC VCQ GLVSSVTNDN CM TFKYPIE I SRDLLT	248
LmPf2	ATHQFSQQSMEVHGAGLI-----EKLFDVACCLTDVVAVTS	436
PnPf2	MTHQFSQQAMEVHGAE L ILRSRNPCHLDTEGPPSSV S FNFLARRILGNVLLILDHLLTWLQIEKLFDIACCLADVVAVTS	328
LmPf2	FSPDAFALGPRDYVSRFLTLISTLRGGQSRYL P LLLAKLSEVLPNLPLPRSLNLPQGVSTSSIGLSGTGSPTVPSNVGDD	516
PnPf2	FSPDAFALGPRDYVSRFLTLISTLRGGHSRYL P LLLAKLSEVLPNLPLPRSLNLPQTL P PASTISMSTG TG --TVPSNITDD	406
LmPf2	FSAMGQGTSPSYPSNDLIRRLAAQTG --- AQLPFNPPQHSSYPAPTS ----- HVEDLSLYDTSHSTHSSGSVP	582
PnPf2	YSAMPATSSPSYPSSELIRRLAAQTGT F ESRRRSV P VRYRTQP Q RIAFFLICAKEQLHYTRTIRVYHVTTELPNSLSPVR	486
LmPf2	RSTSATPG -- PYEPSMSQSR TQ IVGHSTMQIPTSH PQ NHMQSHHVEESAGTAVGAIGWLHKGNGVEGCKLPDSPAQ	658
PnPf2	ADSNL T FATQPYAIAPHFSR PD CL-----	510

Figure 1: Identification of a PnPf2 orthologue in *Leptosphaeria maculans*. Alignment between LmPf2 from *Leptosphaeria maculans* and PnPf2 from *Parastagonospora nodorum* was performed using COBALT (Papadopoulos and Agarwala, 2007). The black bar corresponds to the Zn2Cys6-type DNA binding domain identified using Pfam as described in Finn *et al.* (2014; <https://pfam.xfam.org/>). LmPf2 and PnPf2 share 67% identity.

In a previous analysis, we identified the gene encoding KMT1 in *L. maculans* (Soyer *et al.*, 2014), which gene ID is *Lmb_jn3_09141* in the new genome annotation. We investigated the expression profile of *LmPf2* and *KMT1* during axenic growth and at different stages of oilseed rape infection in controlled conditions and compared their expression profiles to that of the avirulence genes of *L. maculans* (**Figure 2**). As previously described, expression of *L. maculans* avirulence genes was silenced during axenic growth. During cotyledon infection, their expression increased strongly during the asymptomatic stage (between two and nine dpi), culminating at seven dpi and then, expression slowly decreased with appearance of necrotic symptoms (between 12 and 15 dpi; **Figure 2**). Likewise, *LmPf2* was not expressed during axenic growth while its expression was already high at 2 dpi, peaked at 7 dpi, and decreased until 15 dpi. *KMT1* was inversely expressed with a high expression during axenic growth, no

expression during early infection (between two and nine dpi), and was up-regulated at 12 dpi when avirulence gene expression decreased. In contrast, during petiole and stem infection, avirulence genes and *LmPf2* were highly expressed during the asymptomatic growth on petioles (7dpi) and on stems (14 and 28 dpi), while at these stages, *KMT1* was not over-expressed. To summarize, *LmPf2* showed an expression profile similar to that of the *L. maculans* avirulence genes while expression of *KMT1* was inversely correlated during axenic growth and cotyledon infection (**Figure 2**).

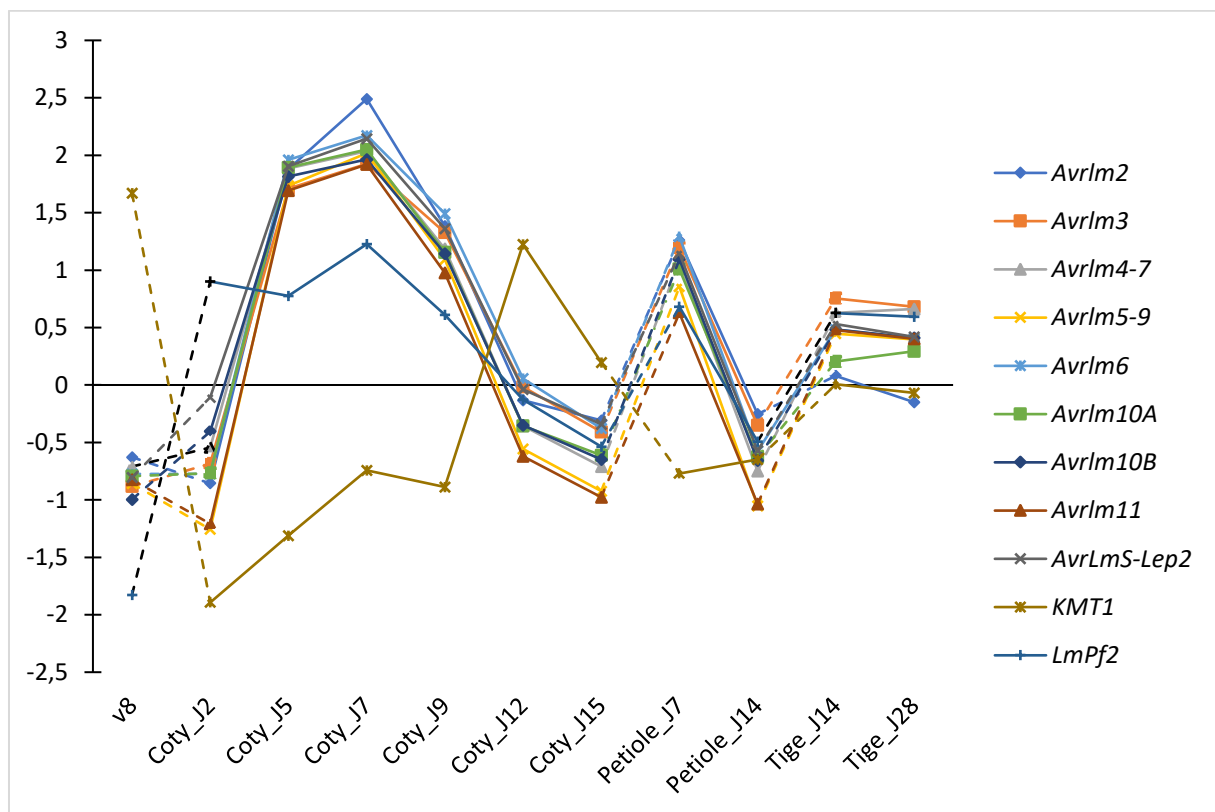


Figure 2: Expression profile of *Leptosphaeria maculans* avirulence genes, the *LmPf2* transcription factor and *KMT1* during axenic growth, infection of oilseed rape cotyledons, petioles and stem. Mycelium was obtained by growing the WT strain JN3 on V8-agar medium for 7 days. Oilseed rape was inoculated by the WT strain JN3 and sampled at different time points and on different organs (cotyledons at 2, 5, 7, 9, 12 and 15 days post infection, petiole at 7 and 14 dpi and stem at 14 and 28 dpi). The expression level of nine avirulence genes, *LmPf2* and *KMT1* is represented by the log₂ of RPKM (Reads Per Kilobase Per Million mapped reads) centered and reduced (Gay *et al.*, 2020).

Inactivations of *LmPf2* and *KMT1* do not induce morphological, conidiation or pigmentation defects while *LmPf2* over-expression induces developmental defects

Inactivation of *LmPf2* was performed using the CRISPR-Cas9 strategy and 16 transformants resistant to both hygromycin and geneticin were obtained and sequenced for the *LmPf2* gene. Among the 16 transformants, 12 had no mutations in *LmPf2* compared to the WT, three displayed a 1-bp deletion and one had a 5-bp deletion near the cleavage site (**Figure 3A**). These mutations resulted, at the protein level, in frame-shifts leading to two different truncated proteins: 175 amino-acids and 238 amino-acids respectively for the 1-bp and the 5-bp deletions compared to the 658 amino-acids length of the WT protein (**Figures 3B, C**). The two mutants were crossed with JN2-GFP in order to obtain $\Delta LmPf2$ and $\Delta LmPf2$ -GFP mutants without *Cas9* and CRISPR guide RNA (**Table S2**). The four corresponding mutants are hereinafter referred to as $\Delta LmPf2_A$, $\Delta LmPf2_A$ -GFP, $\Delta LmPf2_B$ and $\Delta LmPf2_B$ -GFP (A corresponding to the 1-bp and B to the 5-bp deletion). The four $\Delta LmPf2$ mutants were able to produce conidia (Table 1) and their hyphae showed the same dark coloration, corresponding to melanin production, as the WT after 14 days of growth on V8-juice agar medium (**Figure S1**). After nine days of growth on V8-agar plate, only $\Delta LmPf2_B$ showed a significantly higher growth rate than the WT (Kruskal Wallis, *P value* <0.05; **Table 1**) indicating that *LmPf2* inactivation did not lead to growth defect. To summarize, no major defect in conidia production, growth rate or morphology was associated with the inactivation of *LmPf2*.

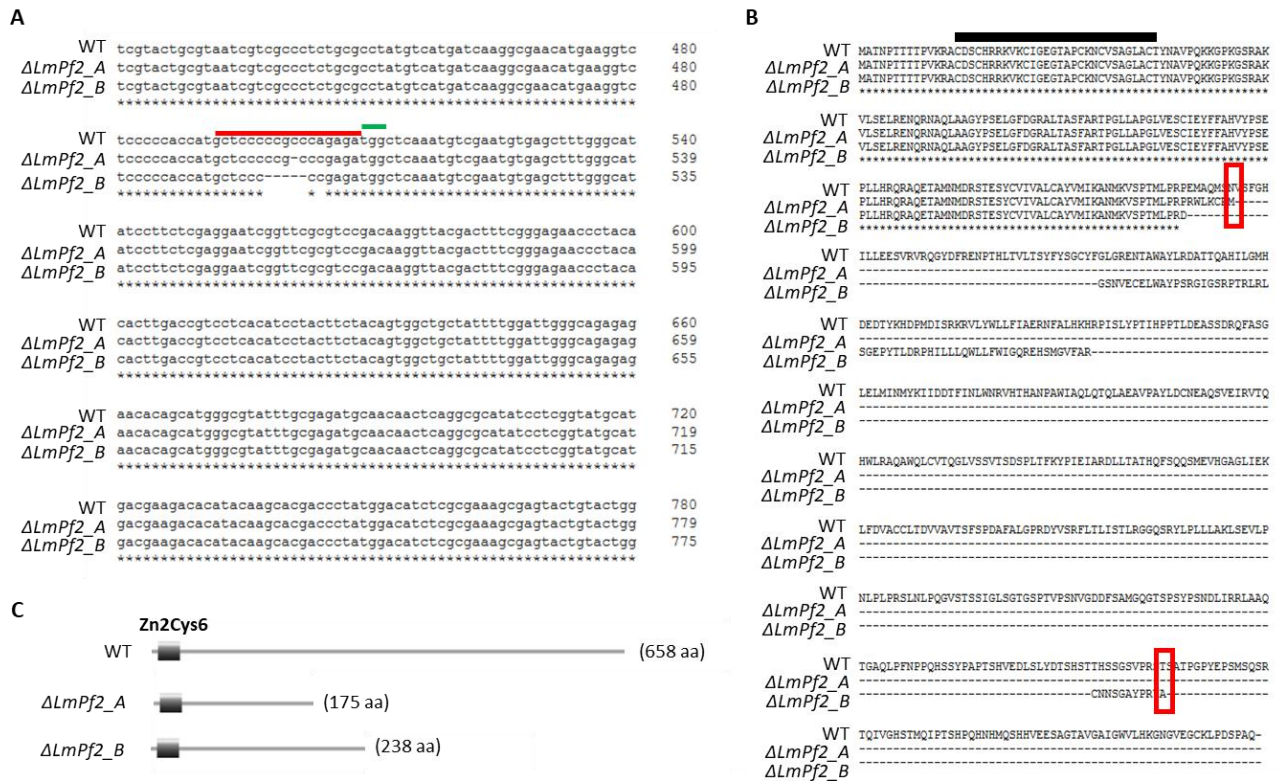


Figure 3: Effect of the *LmPf2* mutations on *LmPf2* protein sequence. **A:** Alignment of the *LmPf2* gene in the WT isolate JN3 and in two *LmPf2* mutants, $\Delta LmPf2_A$ and B, showing respectively a 1-bp and 5-bp deletion. The PAM (Protospacer Adjacent Motif) is highlighted in green and the region targeted by the guide RNA is highlighted in red. **B:** Protein sequence of *LmPf2* in the WT isolate and in the two *LmPf2* mutants. The DNA-binding Domain is indicated by a black bar. The red frames indicate the location of the stop codons in the mutant versions of the protein. **C:** *LmPf2* protein length and domains identified with Pfam as described in Finn *et al.* (2014; <https://pfam.xfam.org/>).

Table 1: Effect of *KMT1* and *LmPf2* inactivations and of *LmPf2* over-expression on mycelial growth, conidia production, pathogenicity and effector gene expression in *Leptosphaeria maculans*

Isolate / transformants ^a	Radial growth	conidia/ml	Pathogenicity assay using conidia ^b	Pathogenicity assay using mycelium plugs ^c	Effector gene expression during axenic growth ^d	
	9 days post inoculation on V8 medium (mm)				<i>AvrLm6</i>	<i>AvrLm4-7</i>
WT	60.5 (± 2.24)	4.50E+07	4.83 (± 0.28)	pathogenic	1	1
$\Delta kmt1$	50.25 (± 1.94)	4.00E+07	3.09 (± 0.35)	pathogenic	9.70E-02 (± 0.22)	2.37E+02 (± 27)
$\Delta LmPf2_A$	56.13 (± 0.9)	1.53E+08	1 (± 0)	non pathogenic	4.60E-02 (± 0)	0
$\Delta LmPf2_B$	80 (± 0.8)*	1.08E+08	1 (± 0)	non pathogenic	6.30E-03 (± 0)	4.10E-03 (± 0)
JN2_oPf2_14	77.38 (± 0.76)	0	not enough conidia	pathogenic	3.05E+00 (± 0.14)	2.50E-01 (± 0.20)
JN2_oPf2_24	73.5 (± 1.19)	0	not enough conidia	pathogenic	2.68E+00 (± 0.19)	7.00E-02 (± 0.02)
$\Delta kmt1_oPf2_8$	68.38 (± 1.03)	2.00E+07	4 (± 0)	pathogenic	2.61E+01 (± 3.4)	4.73E+02 (± 8.6)
$\Delta kmt1_oPf2_22$	53.75 (± 1.06)	1.25E+06	not enough conidia	non pathogenic	1.30E+04 (± 107.79)	2.31E+03 (± 24.64)

^a $\Delta LmPf2_A$ and B are two *LmPf2* mutants; JN2_oPf2_14 and JN2_oPf2_24 correspond to *LmPf2* over-expressing transformants in a JN2 background (with respectively a 600-fold and 150-fold over-expression of *LmPf2* compared to the WT); $\Delta kmt1_oPf2_8$ and $\Delta kmt1_oPf2_22$ correspond to *LmPf2* over-expressing transformants in a $\Delta kmt1$ mutant background (with respectively a 150-fold and 600-fold expression of *LmPf2* compared to the $\Delta kmt1$ mutant). ^bPathogenicity tests were performed on the susceptible cultivar Es-Astrid. Disease rate is expressed as the mean scoring using the IMAScore rating scale comprising six infection classes (IC), where IC1 to IC3 correspond to various levels of resistance of the plant and IC4 to IC6 to susceptibility (Balesdent et al., 2005). ^cAbility to induce symptoms on cotyledons; ^dMycelium was obtained by growing the WT strain and transformants in Fries liquid medium for 7 days. Two biological replicates per condition were generated. Total RNA was extracted. Expression of *AvrLm6* and *AvrLm4-7* was measured by qRT-PCR and expressed relatively to *LmβTubulin* expression and to expression of *AvrLm6* or *AvrLm4-7* in the WT isolate JN3 using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). *: transformants statistically different from the WT, Kruskal Wallis test, P-value < 0.05.

In a previous study, Soyer *et al.* (2014) silenced expression of *KMT1* (with a residual expression of 16% compared to the WT). Silencing of *KMT1* led to an over-expression of effector genes located in TE-rich regions, notably avirulence genes, during axenic growth. This over-expression was associated, at least for two avirulence genes, with a decrease of H3K9me3

at their loci. Here, we took advantage of the availability of the CRISPR-Cas9 strategy to better investigate involvement of *KMT1* in the regulation of *L. maculans* gene expression. Twenty-five transformants resistant to hygromycin and geneticin were obtained and sequenced for the *KMT1* gene. Among the 25 transformants, 24 had no mutations in *KMT1* compared to the WT and one had a 1-bp insertion resulting, at the protein level, in a truncated protein of 144 aa (while the WT protein had a length of 516 amino-acids; **Figure 4A and B**). Both functional domains of *KMT1* (Pre-SET and SET) were absent from the truncated protein (Pfam analysis; Finn *et al.*, 2014; <https://pfam.xfam.org/>; **Figure 4C**) and loss of H3K9me3 was confirmed in the $\Delta kmt1$ mutant strain by Western blot analysis (**Figure 4D; Figure S2**). The $\Delta kmt1$ mutant was crossed with JN2-GFP in order to obtain $\Delta kmt1$ and $\Delta kmt1$ -GFP mutants without *Cas9* and CRISPR guide RNA (**Table S2**). The two corresponding mutants are hereinafter referred to as $\Delta kmt1$ and $\Delta kmt1$ -GFP mutants. $\Delta kmt1$ was not significantly altered in its axenic growth, morphology or conidia production (**Table 1; Figure S1**).

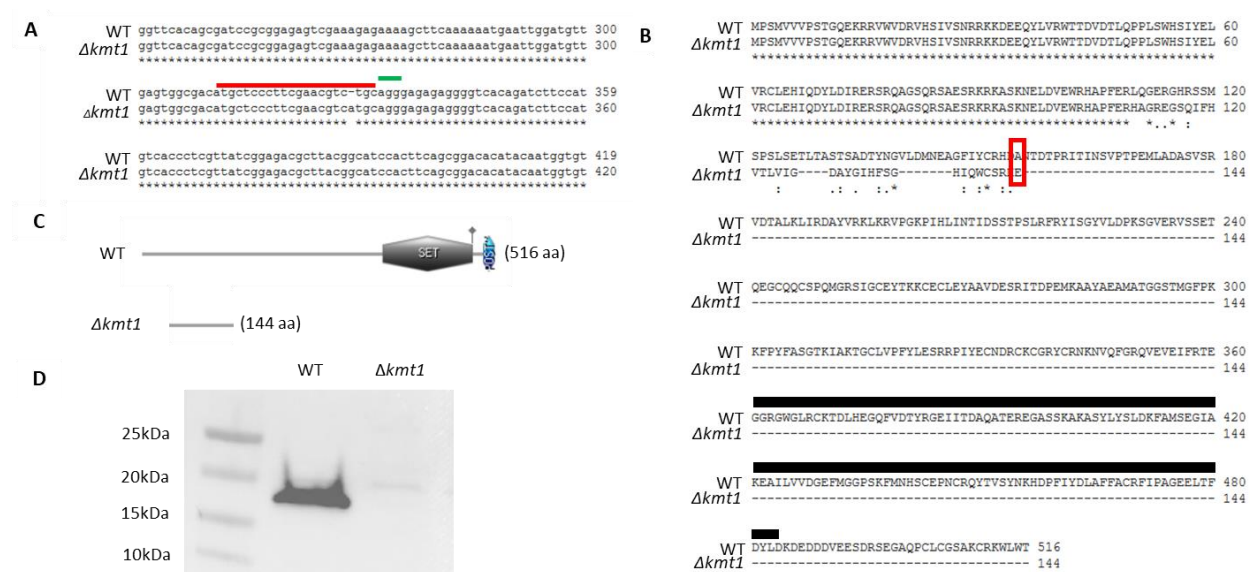


Figure 4: Effect of the *kmt1* mutation on the *KMT1* protein sequence and function. **A:** Sequence alignment of the *KMT1* gene in the WT isolate JN3 and in the $\Delta kmt1$ mutant (showing a 1-bp insertion). The PAM (Protospacer Adjacent Motif) is highlighted in green and the region targeted by the guide RNA is highlighted in red. **B:** Protein sequence of *KMT1* in the WT isolate JN3 and in the $\Delta kmt1$ mutant. The red frame indicates the stop in the mutant version of the protein. The black bar indicates the SET domain which has been lost in the truncated protein. **C:** *KMT1* protein length and domains identified with Pfam as described in Finn *et al.* (2014; <https://pfam.xfam.org/>). **D:** Western Blot analysis of H3K9 tri-methylation in the WT isolate JN3 and $\Delta kmt1$. Nuclear proteins were extracted from mycelium, separated by SDS-PAGE, blotted and probed with antibodies against H3K9me3.

We over-expressed *LmPf2* in two different genetic backgrounds: in the WT isolate JN2 and in the $\Delta kmt1_6$ mutant. Twenty-five transformants were recovered for each transformation and named respectively JN2_oPf2 and $\Delta kmt1_oPf2$. We measured expression of *LmPf2* during axenic growth by qRT-PCR in the transformants. Among the transformants, eight JN2_oPf2 transformants showed a 15 to 18,000-fold increase of expression of *LmPf2* compared to the WT while *LmPf2* expression increased 15 to 700-fold in seven $\Delta kmt1_oPf2$ transformants (**Figure S3**). For further analyses, we selected two transformants from each genetic background with similar *LmPf2* expression levels (150 and 600 times more expression than in the WT isolate JN2 or the $\Delta kmt1_6$ transformant; **Figure S3**): JN2_oPf2_14, JN2_oPf2_24, $\Delta kmt1_oPf2_8$ and $\Delta kmt1_oPf2_22$. Over-expression of the *LmPf2* gene did not induce any growth defect even though the thallus was denser and harbored a white coloration suggesting that the mutants were unable to produce melanin. Over-expression of *LmPf2* had a critical impact on conidiation excepted for $\Delta kmt1_oPf2_8$ transformant which was able to produce conidia but to a lesser extend than the WT isolate (**Table 1; Figure S1**).

LmPf2 and KMT1 are involved in the pathogenicity of *L. maculans*

We inoculated $\Delta LmPf2$, $\Delta LmPf2$ -GFP, $\Delta kmt1$, $\Delta kmt1$ -GFP, *LmPf2*-overexpressing transformants and the WT strain on cotyledons of a susceptible cultivar of oilseed rape (Es-Astrid). $\Delta kmt1$ and $\Delta kmt1$ -GFP showed reduced symptoms compared to the WT, indicating a decrease of pathogenicity (**Figure 5A-C; Figure S4; Table 1**). Cotyledons infected with $\Delta kmt1$ -GFP were observed from 5 to 13 dpi, which allowed us to distinguish living plant cells, fungal hyphae, and production of pycnidia. The $\Delta kmt1$ -GFP transformant was able to colonize the plant and to produce pycnidia but induced less symptoms than the WT (**Figure 5C; Figure S4**). The $\Delta LmPf2$ mutants were not able to invade the cotyledon further than the inoculation site, and consequently, did not induce any visible symptom (**Figure 5; Figure S4; Table 1**). $\Delta LmPf2$ mutants started producing pycnidia 5 dpi at the inoculation site whereas the WT started producing pycnidia at 7 dpi (**Figure 5A, B**). Altogether, our results indicate that both KMT1 and *LmPf2* are involved in infection establishment. We also performed pathogenicity assays using plugs of mycelium grown in axenic culture to cope with the fact that the over-expressing transformants did not produce enough inoculum to test their infectious abilities. Results obtained for the inactivated mutants corroborated results obtained with the use of pycnidia suspension as inoculum. All the over-expressing transformants, except $\Delta kmt1_oPf2_22$, were able to produce symptoms on oilseed rape cotyledons (**Table 1**).

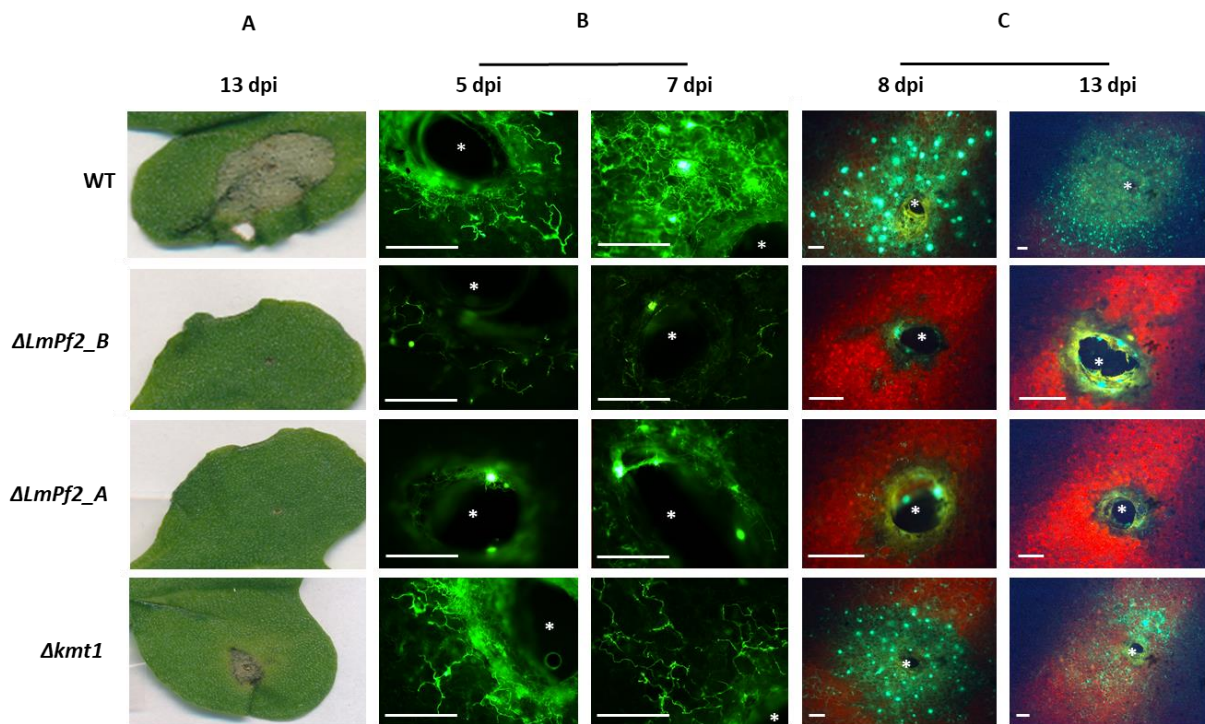


Figure 5: Effect of *LmPf2* and *kmt1* inactivations on pathogenicity of *Leptosphaeria maculans*. The WT isolate JN3 and mutants inactivated for *LmPf2* or *KMT1* were inoculated on cotyledons of the susceptible cultivar of oilseed rape Es-Astrid. **A.** Pictures of symptoms at 13 dpi. **B.** Fluorescence images of cotyledons infected by GFP mutants and WT isolate JN3 at 5 and 7 dpi using a confocal microscope. **C.** Fluorescence images of cotyledons infected by GFP mutants and WT isolate JN3 at 8 and 13 dpi using a fluorescence binocular. Infection site (needle hole) is indicated by a white asterisk. Scale bars represent 1 mm. dpi = days post inoculation.

LmPf2 and KMT1 are involved in the control of effector gene expression

We investigated expression of two avirulence genes (*AvrLm4-7* and *AvrLm6*) in the $\Delta kmt1$ and the $\Delta LmPf2$ mutants, in the transformants over-expressing *LmPf2* and in the WT strain during axenic growth by qRT-PCR (**Figure 6; Table 1**). During axenic growth, these genes are not expressed (Rouxel *et al.*, 2011). In the $\Delta kmt1$ mutant, as for the WT, *AvrLm6* was not expressed during axenic growth. On the contrary, *AvrLm4-7* was strongly over-expressed compared to the WT strain (237-fold more expressed; **Table 1**). *AvrLm4-7* and *AvrLm6* were not expressed in the $\Delta LmPf2$ mutants during the axenic culture, which is similar to expression of these genes in the WT strain (**Table 1**). Over-expression of *LmPf2* induced a huge increase of expression of both *AvrLm4-7* and *AvrLm6* during axenic culture in a $\Delta kmt1$ background (Table 1; Figure 6; with a maximum of 2,300-fold increase for *AvrLm4-7* and of 13,000-fold increase for *AvrLm6*). As inactivation of *KMT1* induces a slight increase of *AvrLm* genes expression while over-expression of *LmPf2* in a $\Delta kmt1$ background induces a much stronger

expression increase during axenic culture, we conclude that KMT1 has a repressive effect on the expression of *AvrLm* genes while LmPf2 has an activating effect that expression.

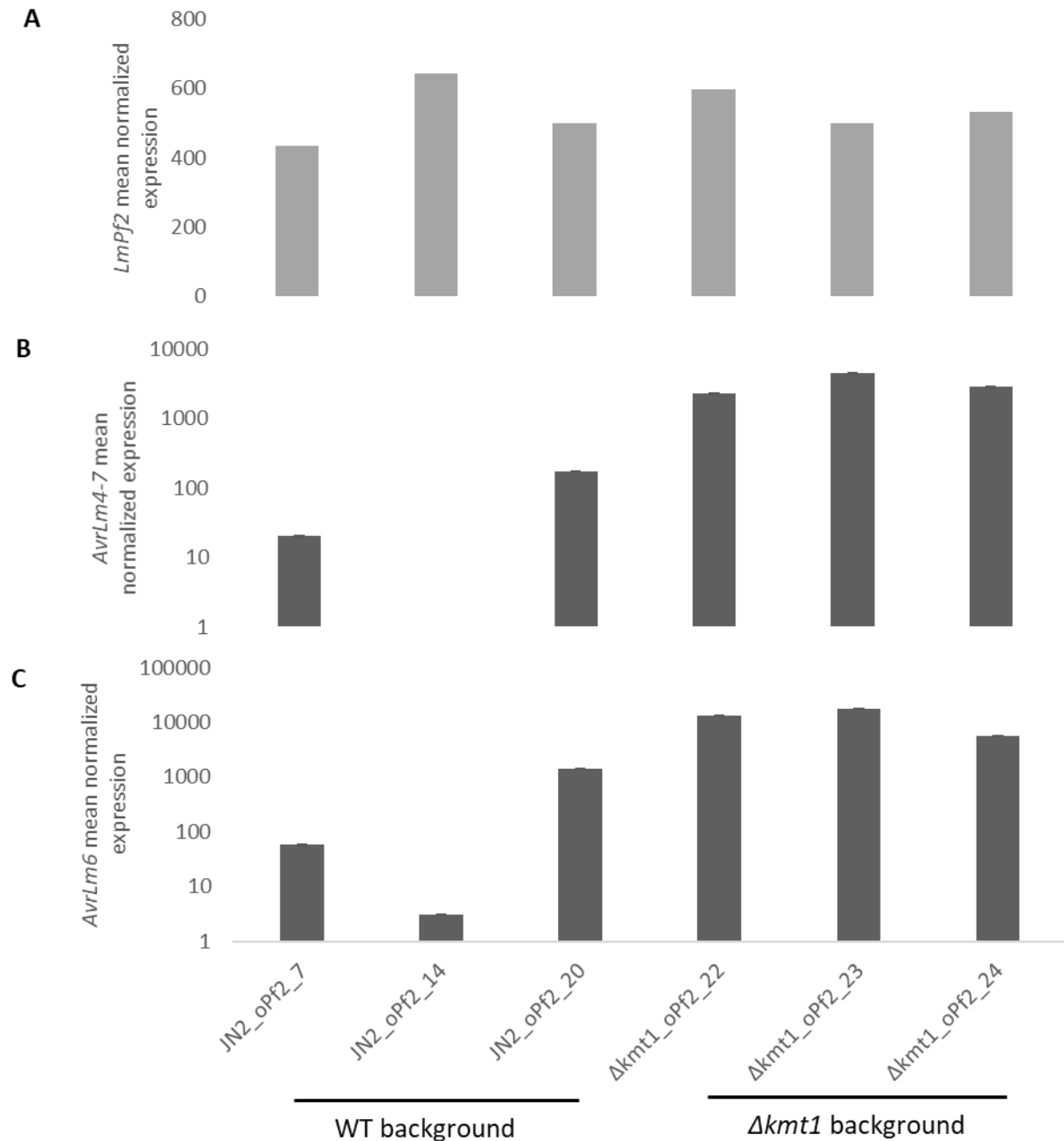


Figure 6: Influence of *LmPf2* overexpression on the expression of two *Leptosphaeria maculans* avirulence genes during axenic growth. Expression of **A.** *LmPf2*, **B.** *AvrLm4-7* and **C.** *AvrLm6* was measured by qRT-PCR using *Lm β Tubulin* as a constitutive gene for normalization and expression in the WT isolate JN3 or $\Delta kmt1$ mutant as reference ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ method). Each value is the average of two biological replicates (two extractions from different biological replicates) and two technical replicates (two RT-PCR). JN2_oPf2 correspond to *LmPf2* over-expressing transformants in a JN2 background; $\Delta kmt1$ _oPf2 correspond to *LmPf2* over-expressing transformants in a $\Delta kmt1$ mutant background.

To investigate whether a stronger over-expression of *LmPf2* in a WT background would result in a higher increase of expression of the two avirulence genes, we also investigated expression of these avirulence genes in JN2_oPf2 transformants (JN2_oPf2_22 and JN2_oPf2_25) in which *LmPf2* was over-expressed 10,000 and 18,000 times compared to the WT strain (**Figure S5**). The strong *LmPf2* over-expression induced an higher up-regulation of *AvrLm4-7* and *AvrLm6* expression during axenic culture (with a maximum of 1,000-fold increase for *AvrLm4-7* and of 5,000-fold increase for *AvrLm6*). Nevertheless, it did not reach the same level as the one obtained when over-expressing *LmPf2* in a $\Delta kmt1$ background.

We then investigated expression of four avirulence genes (*AvrLm4-7*, *AvrLm6*, *AvrLm10A* and *AvrLm11*) in the $\Delta LmPf2$, the $\Delta kmt1$ mutants and the WT strain during infection of oilseed rape at 7 dpi (when expression of *L. maculans* effectors reaches a peak in the WT strain). Inactivation of *LmPf2* strongly decreases expression of the four avirulence genes (1,000 to 2,000-fold less expressed in the $\Delta LmPf2$ mutant than in the WT) or even abolishes their expression (**Table 2**). On the contrary, inactivation of *KMT1* did not alter avirulence gene expression *in planta* (**Table 2**), corroborating previous results obtained by the silencing of *KMT1* in *L. maculans* (Soyer *et al.*, 2014) and consistent with the repressive action of *KMT1* on effector gene expression during axenic culture. Altogether, our results confirm that *KMT1* represses avirulence gene expression during axenic culture and highlights that *LmPf2* is involved in induction of their expression *in planta*.

Table 2: Effect of *LmPf2* and *KMT1* inactivation on avirulence gene expression during infection of oilseed rape cotyledons

Isolate/ transformants	expression <i>in planta</i> 7 dpi ^a			
	<i>AvrLm4-7</i>	<i>AvrLm6</i>	<i>AvrLm10A</i>	<i>AvrLm11</i>
WT	3.25.10 ¹	7.41.10 ¹	2.92.10 ¹	1.96.10 ²
$\Delta LmPf2_A$	nd ^b	4.58.10 ⁻²	2.49.10 ⁻²	7.64.10 ⁻²
$\Delta LmPf2_B$	4.08.10 ⁻³	6.27.10 ⁻³	3.25.10 ⁻²	9.55.10 ⁻²
$\Delta kmt1$	1.03	4.23	1.93	5.23

Expression of *AvrLm4-7*, *AvrLm6*, *AvrLm10A* and *AvrLm11* at 7 dpi of cotyledons of the susceptible cultivar Es-Astrid by $\Delta LmPf2$ and $\Delta kmt1$ mutants, and the WT isolate JN3.

^aGene expression levels are relative to *Lmftubulin* and calculated as described by Muller *et al.* (2002). Each value is the average of two biological replicates (two extractions from different biological replicates) and two technical replicates (two RT-PCR).

^bnd: not detected. dpi: days post inoculation.

KMT1 and LmPf2 control expression of genes involved in pathogenicity

To further investigate involvement of LmPf2 and KMT1 in the regulation of *L. maculans* genes, notably effector genes, we performed RNA-Seq analyses during axenic growth of inactivated mutants, over-expressing transformants and the WT strain (i.e., JN2, $\Delta kmt1$, $\Delta LmPf2_A$, $\Delta LmPf2_B$, *JN2_oPf2_14*, *JN2_oPf2_24*, $\Delta kmt1_oPf2_8$ and $\Delta kmt1_oPf2_22$; **Table 1**). Eighteen million reads were obtained, on average, for each sample, that were filtered based on their quality using Trimmomatic and mapped on the *L. maculans* genome. Between 79.5% and 88% paired-end reads were uniquely mapped, except for one technical replicate of the $\Delta LmPf2_A$ mutant for which only 39% of paired-end reads were mapped (**Table S3**). We then plotted the $\log_2(\text{RPKM}+1)$ of each sample and observed that technical replicates were consistent and that biological replicates of the same sample correlated, except for the $\Delta kmt1_oPf2$ transformants (**Figure 7**; **Figure S6**). Based on that observation, data from biological replicates were merged for further analyses of gene expression, except for $\Delta kmt1_oPf2_8$ and $\Delta kmt1_oPf2_22$ that were considered separately for subsequent statistical analyses.

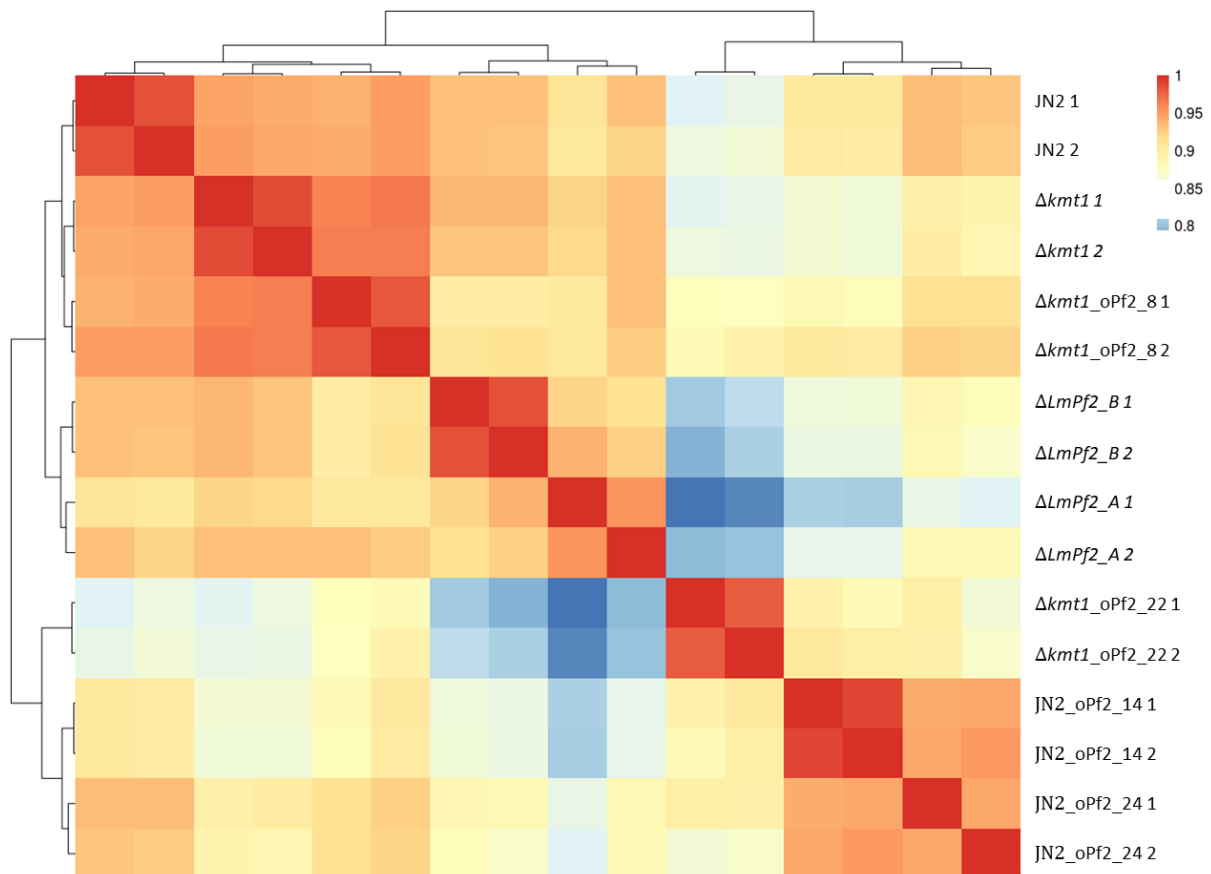


Figure 7: Hierarchical clustering of the pairwise Pearson correlation between the 18 RNA-Seq conditions. Each gene with an RPKM count > 2 in at least one condition was kept for the correlation analysis. In each condition, the average of the RPKMs of the replicates was computed and then Log₂ transformed. A pairwise Pearson correlation was applied between the conditions. The resulting Pearson correlation matrix was clustered by a hierarchical clustering (represented by the tree) with the ward.D2 method. The Pearson correlation results are represented by the color scale. Heatmap of log₂(RPKM) of each RNA-Seq biological and technical replicate were plotted. JN2 is the WT strain; $\Delta LmPf2_A$ and $-B$ are the *LmPf2* mutants; JN2_oPf2_14 and JN2_oPf2_24 correspond to *LmPf2* over-expressing transformants (with respectively 600-fold and 150-fold expression of *LmPf2* compared to JN2); $\Delta kmt1_oPf2_8$ and $\Delta kmt1_oPf2_22$ correspond to *LmPf2* over-expressing transformants in a $\Delta kmt1$ mutant background (with respectively 150-fold and 600-fold expression of *LmPf2* compared to the $\Delta kmt1$ mutant).

Among the different transformants, the transformant $\Delta kmt1$ showed the fewest DE (differentially expressed) genes compared to the WT strain, while the transformant $\Delta kmt1_oPf2_22$ exhibited the greatest number of DE genes (**Table 3**). In the genome of *L. maculans*, a GO annotation could be assigned to 5,076 genes of the 13,047 predicted genes (Dutreux *et al.*, 2018). No GO enrichment was identified among the DE genes in $\Delta kmt1$ or $\Delta LmPf2$ mutants. Genes up-regulated in the transformants over-expressing *LmPf2*, regardless of the genetic background, were enriched in GO categories associated with uptake of nutrients

(e.g. starch, glucose, oligosaccharide metabolic process; Tables S4, S5). All seven GO categories enriched in the genes up-regulated due to over-expression of *LmPf2* in the $\Delta kmt1_8$ mutant (transformant $\Delta kmt1_oPf2_8$) were also identified when over-expressing *LmPf2* in the $\Delta kmt1_22$ mutant (transformant $\Delta kmt1_oPf2_22$; **Table S5**). Thus, while *LmPf2* was considerably more over-expressed in $\Delta kmt1_oPf2_22$ compared to $\Delta kmt1_oPf2_8$ and although they did not group together (Figures 7 and S6), over-expression of *LmPf2* influenced genes involved in similar processes. Five GO categories were found enriched solely among genes up-regulated in $\Delta kmt1_oPf2_22$ (**Table S5**). No GO enrichment was identified for genes down-regulated in the $\Delta kmt1$ mutant and the $\Delta kmt1_oPf2_8$ transformant. A similar GO category (GO:0055114) was detected as enriched in the $\Delta LmPf2$ mutant, the *oPf2_JN2* and $\Delta kmt1_oPf2_22$ transformants, encompassing genes involved in oxido-reduction processes (**Table S6**).

Table 3: Genes encoding effectors or located in particular chromatin domains differentially expressed after inactivation of *KMT1* or *LmPf2* or over-expression of *LmPf2*

		Total genes	Effector genes	H3K4me2 genes	H3K9me3 genes	H3K27me3 genes	H3K9me3/H3K27me3 genes
Up-regulated	$\Delta kmt1$	129	22*	22 [#]	3	64*	4*
	$\Delta LmPf2$	202	20	68 [#]	4	57*	5*
	<i>JN2_oPf2</i>	247	46*	46 [#]	2	101*	6*
	$\Delta kmt1_oPf2_8$	275	59*	38 [#]	11*	144*	15*
	$\Delta kmt1_oPf2_22$	931	154*	233 [#]	25*	329*	24*
Down-regulated	$\Delta kmt1$	143	27*	35 [#]	10*	42*	9*
	$\Delta LmPf2$	225	40*	58 [#]	4	88*	10*
	<i>JN2_oPf2</i>	277	19	110 [#]	1	60*	3
	$\Delta kmt1_oPf2_8$	158	23*	32 [#]	11*	47*	6*
	$\Delta kmt1_oPf2_22$	861	83	364 [#]	11	182*	14*

indicates genes statistically under-represented in a given category and * indicates genes statistically enriched in a given category. Statistical analyses were performed using ChIP2, *P value* < 0.05. H3K4me2: di-methylation of lysine 4 of histone H3 (H3K4me2, euchromatin environment); H3K9me3: tri-methylation of lysine 9 of histone H3; H3K27me3: tri-methylation of lysine 27 of histone H3. Chromatin domains were detected by ChIP-seq during axenic growth of the WT isolate JN3 by Soyer *et al.* (2020).

We also investigated whether inactivation of *kmt1*, *LmPf2*, or over-expression of *LmPf2* influenced expression of pathogenicity-related genes predicted in *L. maculans* (either SSP-genes, secondary metabolite encoding genes and CAZymes). Among the 10 previously cloned Avirulence genes of *L. maculans*, seven were deregulated in at least one of the transformants (**Table 4**). Inactivation of KMT1 or over-expression of LmPf2 in the WT strain had little effect on expression of these genes while over-expression of LmPf2 in mutants inactivated for KMT1 led to up-regulation of seven AvrLm genes compared to the WT, during axenic culture (**Table 3**). We also found four so-called “LmSTEE” effector genes of *L. maculans* (Gervais *et al.*, 2017) deregulated in these transformants. As AvrLm genes are all associated with H3K9me3 in the WT strain, we wanted to know whether we could observe the same synergic effect of KMT1 and LmPf2 on SSP genes located in H3K9me3-domains (**Table S7**). In the genome of *L. maculans*, 37 genes encode SSP associated with H3K9me3 during axenic culture (Soyer *et al.*, 2020; **Table S7**). Inactivation of *KMT1* led to up-regulation of three effector gene compared to the WT and over-expression of *LmPf2* in a WT background resulted in up-regulation of two effector genes located in a H3K9me3-domain. The over-expression of *LmPf2* in a strain in which *KMT1* is inactivated resulted in up-regulation of 20 out of the 37 SSP genes located in a H3K9me3 domain (**Table S7**). This analysis strengthens the hypothesis that KMT1 and the transcription factor LmPf2 have a synergistic effect in regulating the expression of genes encoding effectors localized in a H3K9me3 genomic context.

Table 4: Influence of *KMT1* and *LmPf2* inactivations, and *LmPf2* over-expression on known genes of *Leptosphaeria maculans*.

ID	name	TE ^a	H3K4me2 ^b	H3K9me3 ^b	H3K27me3 ^b	KMT1 ^c	LmPf2 ^c	oPf2_JN2 ^c	oPf2_KMT1 ^c	oPf2_KMT1_8 ^c	oPf2_KMT1_22 ^c
Lmb_jn3_13126	AvrLm1	-	-	all_included	-	-	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_07874	AvrLm10_1	yes	-	all_included	-	down	-	-	-	down	up
Lmb_jn3_07875	AvrLm10_2	yes	-	all_included	all_included	-	down	-	up	up	up
Lmb_jn3_12994	AvrLm11	yes	-	all_included	-	-	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_07863	AvrLm2	yes	-	5'_included	-	down	-	-	-	-	up
Lmb_jn3_00001	AvrLm3	yes	-	all_included	-	up	-	-	up	up	up
Lmb_jn3_03262	AvrLm4-7	yes	-	all_included	-	-	-	-	up	up	up
Lmb_jn3_10106	AvrLm5	yes	-	all_included	-	-	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_07862	AvrLm6	yes	-	all_included	-	-	-	-	up	up	up
Lmb_jn3_08343	AvrLm5	yes	-	all_included	-	-	-	-	up	up	up
Lmb_jn3_07299	DIM2	-	5'_included	-	3'_included	-	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_12532	HP1	-	all_included	-	-	-	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_09141	KMT1	-	3'_included	-	overlap	-	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_11454	LmCys2	yes	-	all_included	-	-	-	-	up	up	up
Lmb_jn3_06039	LmPf2	-	overlap	-	all_included	-	down	up	up	up	up
Lmb_jn3_03177	LmStee1	yes	-	3'_included	all_included	-	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_04778	LmStee30	-	overlap	-	all_included	-	up	-	-	-	-
Lmb_jn3_08094	LmStee35	yes	-	all_included	-	-	down	up	-	-	-
Lmb_jn3_00617	LmStee78	-	all_included	-	-	-	-	up	up	-	up
Lmb_jn3_11364	LmStee98	-	-	-	all_included	-	down	-	down	down	down

^aGenes located in a TE-rich genomic context (Dutreux *et al.*, 2018);

^bGenes associated with H3K4me2, H3K9me3 or H3K27me3 during axenic culture in the wild type strain (Soyer *et al.*, 2020)

^cGenes deregulated in a given transformant compared to the WT strain during axenic culture (this analysis).

In the genome of *L. maculans*, 27 genes encode NRPS or PKS genes, 12 of which are associated with H3K27me3 *in vitro* (Soyer *et al.*, 2020). Contrary to SSP-genes, genes encoding PKS and NRPS of *L. maculans* do not appear to be regulated by KMT1 and / or LmPf2 (**Table S8**). In the genome of *L. maculans*, 372 genes encode CAZYmes and 109 are deregulated in at least one of the transformants generated in this study (**Table S9**). Genes deregulated (either up- or down-expressed compared to the WT strain) in the strains JN2-oPf2, $\Delta kmt1_oPf2_8$ or $\Delta kmt1_oPf2_22$ are significantly enriched in genes encoding CAZYmes (**Table S9**).

Recent transcriptomic analyses throughout the life cycle of *L. maculans* have highlighted that synchronous waves of genes, including effector genes, are expressed (Gay *et al.*, 2020.). Among these waves, four were specifically expressed during oilseed rape infection. Here, we investigated two of the four waves of genes concertedly expressed during infection and determined whether they were up-regulated in $\Delta kmt1$, $\Delta kmt1_oPf2_22$ or JN2_oPf2 or down-regulated in $\Delta LmPf2$ to investigate the respective effect of H3K9me3 removal and LmPf2 involvement in gene regulation. Respectively 4, 9 and 14 genes of wave 2 were differentially regulated in $\Delta kmt1$, JN2_oPf2 and $\Delta LmPf2$ indicating that H3K9me3 removal or *LmPf2* over-expression alone lead to limited wave 2 effector genes up-regulation. In contrast, sixty-six genes

from wave 2 (71%) were specifically up-regulated in $\Delta kmt1_oPf2_22$ on 931 genes up-regulated in total representing a 9.94-time enrichment in wave 2 effector genes (Khi²; $pValue=2.20E^{-16}$). Interestingly, half of these genes were located in H3K27me3 or in no particular compartment indicating that H3K9me3 removal and *LmPf2* over-expression do not only target H3K9me3 enriched genes. We did not identify any genes of wave 3 up-regulated in $\Delta kmt1$ indicating that H3K9me3 do not actively repress these genes. Surprisingly, we identified 16, 19 and 20 of wave 3 genes respectively up-regulated in JN2_oPf2, $\Delta LmPf2$ and $\Delta kmt1_oPf2_22$ confirming the limited impact of H3K9me3 removal on this set of genes. Furthermore, the 16 and 19 genes specifically up-regulated in JN2_oPf2 and $\Delta LmPf2$ transformants represented respectively an 11.6-time enrichment and an 15-time enrichment (Khi²; $pValue=2.20E^{-16}$) whereas the 20 genes of wave 3 up-regulated in $\Delta kmt1_oPf2_22$ represented a 3.8-time enrichment (Khi²; $pValue= 3,68E^{-10}$; **Figure 8**). Altogether these results indicate that genes of wave 2 are under H3K9me3 and *LmPf2* double control whereas genes of wave 3 are under *LmPf2* control only.

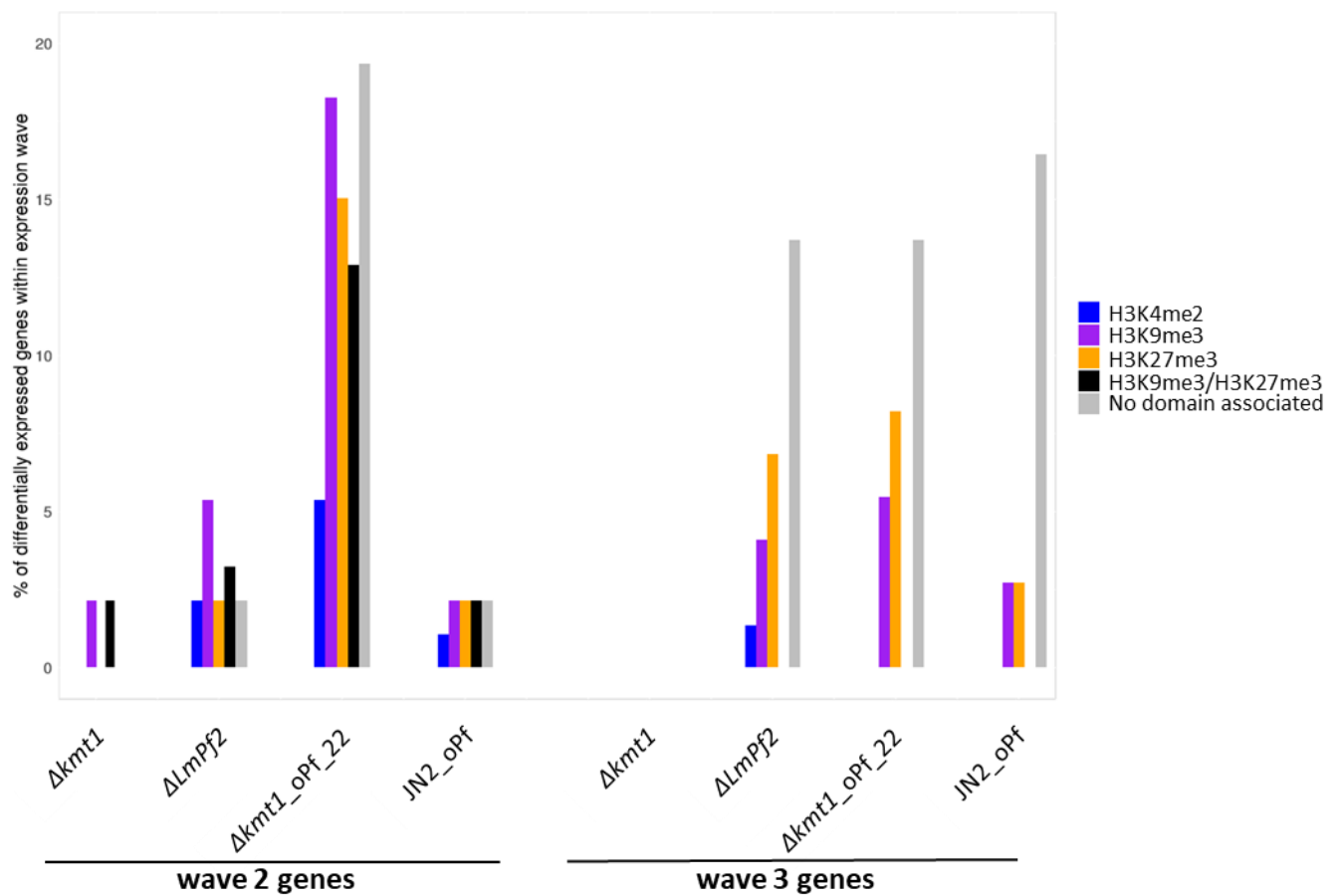


Figure 8: Influence of KMT1 and LmPf2 on expression of genes specifically expressed during infection. RNA-Seq analysis of differentially up-regulated genes in $\Delta kmt1$, $\Delta kmt1_oPf2_22$ and JN2_oPf2 transformants and down-regulated in $\Delta LmPf2$ depending on their chromatin environment and compared to genes concertedly expressed as wave 2 and wave 3 during *Leptosphaeria maculans* life-cycle. Histograms representing % of genes belonging to each wave of concertedly expressed genes in each transformant depending on their chromatin environment. On the left, genes concertedly expressed at 7 DPI during early infection on cotyledons of susceptible cultivar Darmor (including avirulence genes; wave 2). On the right, genes concertedly expressed between 9 and 12 DPI (wave 3) during early infection on cotyledons of a susceptible cultivar Darmor-bzh. DPI = Days Post Inoculation.

DISCUSSION

Here we demonstrated that LmPf2, a Zn₂Cys₆ TF, is involved in the establishment of infection and in the control of effector gene expression in *L. maculans*. We also determined that this TF is able to differentially regulate two sets of effector genes, expressed at different time points, depending on the chromatin condensation state regulated by H3K9me3 deposition via KMT1. Furthermore, *LmPf2* presents an inverted expression profile compared to *KMT1* which suggests an opposite role on effector gene expression. To our knowledge, this is the first evidence of a double control involving both the chromatin structure and specific TF on expression of effector genes in a fungal species. Altogether, these results allowed us to draw a model for the double control of effector gene expression mediated by KMT1 and LmPf2 in *L. maculans*. The next step forward will be to investigate whether LmPf2 directly binds on effector gene promoters.

LmPf2* and *KMT1* inactivations lead to pathogenicity defects in *L. maculans

In this study, we investigated function of *LmPf2* and *KMT1* in *L. maculans*. CRISPR-Cas9 inactivation of *LmPf2* and *KMT1* induced pathogenicity defects while the mutants were not altered in their growth or conidiation. We conclude that, in *L. maculans*, LmPf2 and KMT1 are specifically involved in the establishment of oilseed rape infection by *L. maculans*. This is in accordance with previous results obtained for three other Pleosporales species *A. brassicicola*, *P. tritici repentis* and *P. nodorum* in which Pf2 is also essential for establishment of infection (Cho *et al.*, 2013; Rybak *et al.*, 2017). Other fungal TF were also reported as involved in the establishment of infection (Michielse *et al.*, 2009, IpCho *et al.*, 2010; Zahiri *et al.*, 2010; Soyer *et al.*, 2015. B). KMT1 was also demonstrated to be involved in several cellular processes in fungi. Histone modifications enzymes are more and more documented for their ability to express concertedly, large portion of genomic compartments (Gacek and Strauss, 2012). In a fungal endophyte, *Epichloë festucea*, KMT1 is able to regulate symbiosis-specific alkaloids bioprotective metabolites synthesis and to be crucial for mutualistic interaction establishment (Chujo and Scott, 2014). Despite the fact that KMT1 has been demonstrated to be crucial for pathogenicity establishment and effector and pathogenicity gene regulation in *B. cinerea* and *L. maculans* (Soyer *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). The role of KMT1 in phytopathogenic fungi during infection remain poorly understood. H3K9me3 has also been described to regulate secondary metabolism, via the inactivation of the KdmA demethylase responsible for H3K9me3 removal in *A. nidulans* (Gacek-Matthews *et al.*, 2015).

***LmPf2* and *KMT1* inactivations lead to changes in effector gene expression**

$\Delta kmt1$ mutant exhibited *AvrLm6* up-regulation *in vitro*. This is consistent with our previous finding that *DIM5* (*KMT1*) partial inactivation via RNAi led to avirulence genes up-regulation and H3K9me3 depletion. H3K9me3 is known to regulate secondary metabolism and alkaloid production in several fungi and even in a species related to *L. maculans*, *Epichloe festucae*, harboring a bipartite genome structure as well (Gacek and Strauss, 2012; Chujo et al., 2014). Soyer *et al.* (2014) determined that the silencing of *KMT1* allowed up-regulation of 30% of the genes specifically located in H3K9me3 whereas in this study we only identified five genes located in a H3K9me3 context specifically up-regulated in the $\Delta kmt1$ mutant. Soyer *et al.* (2014) were using DNA oligoarrays for their transcriptomic analysis and a previous annotation of *L. maculans* genome. Furthermore, the complete inactivation of *KMT1* could have led to H3K27me3 relocation at H3K9me3 previous placements, as previously reported for *Neurospora crassa* or *Zymoseptoria tritici*, that phenomenon being less pronounced after silencing of *KMT1* (Basenko *et al.*, 2015; Möller *et al.*, 2019). The inactivation of *KMT1* also induced expression of genes which were located in H3K4me2 and in no particular environment indicating that H3K9me3 removal not only modify gene expression in its environment but also in other compartments due to a structural role of H3K9me3 in genome organization as previously described in *N. crassa* (Winter *et al.*, 2018).

In this study, we also determined that *LmPf2* inactivation led to effector gene expression defect *in planta*. Furthermore, *LmPf2* over-expression led to effector genes up-regulation. Altogether these results indicate that *LmPf2* specifically regulates effector gene expression in *L. maculans*. Once again, these results are in accordance with previous studies that described *Pf2* as a regulator of effector gene expression in three Pleosporales species. *Pf2*, was reported to regulate expression of 33 genes encoding secreted proteins including eight putative effectors in *Alternaria brassicicola* (Cho *et al.*, 2013). In *Parastagonospora nodorum*, *PnPf2* positively regulates two necrotrophic effector genes, *SnToxA* and *SnTox3* and the orthologue of *SnToxA*, *ToxA*, is regulated by *PtrPf2* in *Pyrenophora tritici-repentis* (Rybak *et al.*, 2017). This can confirm the conserved function of *Pf2* on effector gene regulation in several phytopathogenic fungi.

***LmPf2* over-expression leads to an up-regulation of effector-encoding genes and genes in an heterochromatin context**

In this study, we observed that up-regulated genes in JN2_oPf2 transformants were statistically enriched in SSP-encoding genes, and genes located in a heterochromatin context (enriched in H3K9me3 or H3K27me3). Furthermore, we determined that the inactivation of *KMT1* combined with an over-expression of *LmPf2* induced expression of avirulence genes. We thus conclude that *LmPf2* specifically regulate effector genes which are mostly located in H3K9me3 and H3K27me3 environments. In addition, avirulence genes up-regulation was much higher in a $\Delta kmt1$ than in a WT background. Finally, we observed that *LmPf2* and *KMT1* were inversely expressed during infection. This indicate that *AvrLm* genes in *L. maculans* are under double control of both H3K9me3 and *LmPf2*. Histone modifications H3K9me3 and H3K27me3 have been identified as important regulators of effector and secondary metabolism gene expression in some fungi (Strauss and Reyes-Dominguez, 2011; Chujo and Scott, 2014; Connolly *et al.*, 2013; Soyer *et al.*, 2015. A). But to our knowledge this is the first study focusing on both a transcription factor and a chromatin remodeler. We now need to determine if that model of double control of effector gene expression involving a specific TF and a chromatin remodeler could be generalized to other pathogenic fungi with two speed genome structures or if it remains very specific of *L. maculans*. In *F. oxysporum*, two specific transcription factors, FTF1 and FTF2, have been described for their ability to regulate all effector genes located on a particular pathogenicity dispensable chromosome (van der Does *et al.*, 2016). Such differences in effector genes regulation could indicate that phytopathogenic fungi use their incredible genome plasticity in very different ways to regulates effector genes during infection.

***LmPf2* controls different sets of genes according to their chromatin context**

Effector genes are known to need a tight regulation to permit fungus escaping plant recognition and manipulating host cell (Raffaele et Kamoun, 2012; Hacquard *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012; Gervais *et al.*, 2017; Haueisen *et al.*, 2018). In this study, we determined the respective impact of chromatin remodeling and *LmPf2* on effector gene expression. We determined that, in a WT background, *LmPf2* over-expression leads to over-expression of wave 3 effector genes. In contrast, in a $\square kmt1$ background, *LmPf2* over-expression leads to over-expression of wave 2 effector genes including six of the nine cloned avirulence genes. Since *KMT1* is lowly expressed at the peak of expression of wave 2 effector genes (7DPI), we can hypothesize that H3K9me3 is removed at these effector gene loci during early infection and allow direct or indirect control by *LmPf2*. Furthermore, the inverted expression of *KMT1* and

LmPf2 during *L. maculans* life cycle supports our model of the double regulation. Other specific TFs could act in addition to *LmPf2* to concertedly express all genes of wave 2. We propose the following regulation model: (i) *in vitro*, wave 2 and 3 genes are tightly repressed by H3K9me3 deposited by *KMT1*. (ii) at the onset of infection, H3K9me3 is removed and *LmPf2* is highly expressed, specifically activating wave 2 genes possibly because of a better direct or indirect affinity for wave 2 promoters. (iii) At 9 DPI, *KMT1* starts being re-expressed leading to a deposition of H3K9me3 on wave 2 genes first, possibly because of their high level of H3K9me3 *in vitro* or their specific localization in TE-rich compartments. At this stage, *LmPf2* is not involved anymore on the control of wave 2 gene expression and starts activating wave 3 genes (**Figure 9**). These different sets of genes could be differentially controlled by *LmPf2* indirectly taking into account the diversity of TF-encoding genes differentially expressed depending on the chromatin condensation state.

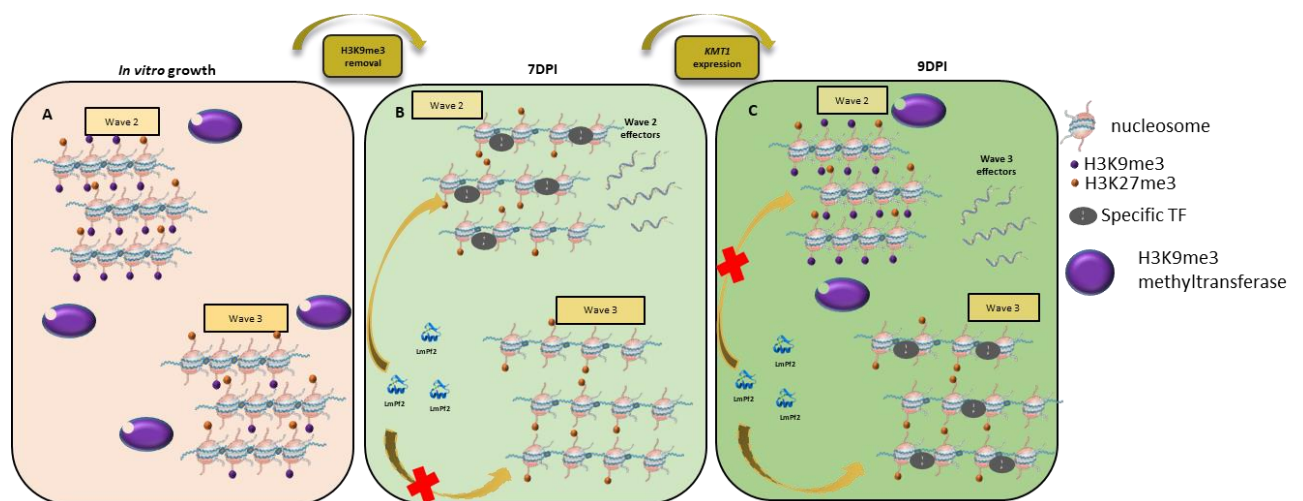


Figure 9: Model of key players of effector gene regulation as concerted waves during the early stage of *Leptosphaeria maculans* colonization of oilseed rape and *in vitro* growth. During *Leptosphaeria maculans*' life cycle, *LmPf2* and *KMT1* are able to regulate effector gene expression respectively acting on effector gene expression activation and chromatin condensation. **A:** During axenic growth effector waves repertoire are tightly repressed by H3K9me3 maintained by *KMT1*. **B:** At 7 DPI H3K9me3 is fully removed and heterochromatin is loosened. At this stage *LmPf2* is highly expressed and is able to regulate specifically 71% of Wave 2 effector genes probably because of a better affinity for wave 2 effector promoters. Between 7 DPI and 9 DPI *KMT1* is being expressed and start heterochromatin recondensation by H3K9me3 redeposition. **C:** Wave 2 effector genes are being recondense and *LmPf2* start acting on (22 -26%) of Wave 3 effector genes, provoking their up-regulation. DPI = Days Post Inoculation.

ACCESSION NUMBERS

All sequenced reads have been deposited with the Short Read Archive under accession numbers XXXX.

REFERENCES

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410.
- Ansan-Melayah, D. (inra, Balesdent, M.H., Buee, M., Rouxel, T., 1995. Genetic characterization of AvrLm1, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology (USA)*.
- Balesdent, M.H., Attard, A., Ansan-Melayah, D., Delourme, R., Renard, M., Rouxel, T., 2001. Genetic Control and Host Range of Avirulence Toward *Brassica napus* Cultivars Quinta and Jet Neuf in *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 91, 70–76.
- Balesdent, M.H., Attard, A., Kühn, M.L., Rouxel, T., 2002. New Avirulence Genes in the Phytopathogenic Fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 92, 1122–1133.
- Balesdent, M.-H., Fudal, I., Ollivier, B., Bally, P., Grandaubert, J., Eber, F., Chèvre, A.-M., Leflon, M., Rouxel, T., 2013. The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytologist* 198, 887–898.
- Basenko, E.Y., Sasaki, T., Ji, L., Prybol, C.J., Burckhardt, R.M., Schmitz, R.J., Lewis, Z.A., 2015. Genome-wide redistribution of H3K27me3 is linked to genotoxic stress and defective growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, E6339–E6348.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.
- Van der Biezen, E.A., Jones, J.D., 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.* 23, 454–456.
- Cho, Y., Ohm, R.A., Grigoriev, I.V., Srivastava, A., 2013. Fungal-specific transcription factor AbPf2 activates pathogenicity in *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* 75, 498–514.
- Chujo, T., Scott, B., 2014. Histone H3K9 and H3K27 methylation regulates fungal alkaloid biosynthesis in a fungal endophyte-plant symbiosis: K9 and K27 methylation regulates symbiosis. *Molecular Microbiology* 92, 413–434.
- Connolly, L.R., Smith, K.M., Freitag, M., 2013. The *Fusarium graminearum* Histone H3 K27 Methyltransferase KMT6 Regulates Development and Expression of Secondary Metabolite Gene Clusters. *PLoS Genetics* 9, e1003916.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-Seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.

- Dutreux, F., Da Silva, C., d'Agata, L., Couloux, A., Gay, E.J., Istace, B., Lapalu, N., Lemainque, A., Linglin, J., Noel, B., Wincker, P., Cruaud, C., Rouxel, T., Balesdent, M.-H., Aury, J.-M., 2018. De novo assembly and annotation of three *Leptosphaeria* genomes using Oxford Nanopore MinION sequencing. *Scientific Data* 5.
- Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E.L.L., Tate, J., Punta, M., 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* 42, D222-230.
- Fudal, I., Ross, S., Gout, L., Blaise, F., Kuhn, M.L., Eckert, M.R., Cattolico, L., Bernard-Samain, S., Balesdent, M.H., Rouxel, T., 2007. Heterochromatin-Like Regions as Ecological Niches for Avirulence Genes in the *Leptosphaeria maculans* Genome: Map-Based Cloning of *AvrLm6*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 459–470.
- Gacek, A., Strauss, J., 2012. The chromatin code of fungal secondary metabolite gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol* 95, 1389–1404.
- Gacek-Matthews, A., Noble, L.M., Gruber, C., Berger, H., Sulyok, M., Marcos, A.T., Strauss, J., Andrianopoulos, A., 2015. KdmA, a histone H3 demethylase with bipartite function, differentially regulates primary and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*: Histone H3K9 demethylase function in growth. *Molecular Microbiology* 96, 839–860.
- Gay, E.J., Soyer, J.L., Lapalu, N., Linglin, J., Fudal, I., Da Silva, C., Wincker, P., Aury, J.-M., Cruaud, C., Levrel, A., Lemoine, J., Delourme, R., Rouxel, T., Balesdent, M.-H., 2020. Large-scale transcriptomics to dissect two years of the life of a fungal phytopathogen interacting with its host plant. *bioRxiv*
- Ghanbarnia, K., Ma, L., Larkan, N.J., Haddadi, P., Fernando, W.G.D., Borhan, M.H., 2018. *Leptosphaeria maculans* AvrLm9: a new player in the game of hide and seek with AvrLm4-7. *Molecular Plant Pathology* 19, 1754–1764.
- Gervais, J., Plissonneau, C., Linglin, J., Meyer, M., Labadie, K., Cruaud, C., Fudal, I., Rouxel, T., Balesdent, M.-H., 2017. Different waves of effector genes with contrasted genomic location are expressed by *Leptosphaeria maculans* during cotyledon and stem colonization of oilseed rape. *Molecular plant pathology* 18, 1113–1126.
- Gout, L., Fudal, I., Kuhn, M.-L., Blaise, F., Eckert, M., Cattolico, L., Balesdent, M.-H., Rouxel, T., 2006. Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Microbiology* 60, 67–80.
- Guo, S., Zhong, S., Zhang, A., 2013. Privacy-preserving Kruskal-Wallis test. *Comput Methods Programs Biomed* 112, 135–145.
- Hacquard, S., Joly, D.L., Lin, Y.-C., Tisserant, E., Feau, N., Delaruelle, C., Legué, V., Kohler, A., Tanguay, P., Petre, B., Frey, P., Van de Peer, Y., Rouzé, P., Martin, F., Hamelin, R.C., Duplessis, S., 2012. A comprehensive analysis of genes encoding small secreted proteins identifies candidate effectors in *Melampsora larici-populina* (poplar leaf rust). *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 279–293.
- Hauelsen, J., Möller, M., Eschenbrenner, C.J., Grandaubert, J., Seybold, H., Adamiak, H., Stukenbrock, E.H., 2019. Highly flexible infection programs in a specialized wheat pathogen. *Ecology and Evolution* 9, 275–294.

Idnurm, A., Urquhart, A.S., Vummadi, D.R., Chang, S., Van de Wouw, A.P., López-Ruiz, F.J., 2017. Spontaneous and CRISPR/Cas9-induced mutation of the osmosensor histidine kinase of the canola pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Biology and Biotechnology* 4.

IpCho, S.V.S., Tan, K.-C., Koh, G., Gummer, J., Oliver, R.P., Trengove, R.D., Solomon, P.S., 2010. The Transcription Factor StuA Regulates Central Carbon Metabolism, Mycotoxin Production, and Effector Gene Expression in the Wheat Pathogen *Stagonospora nodorum*. *Eukaryotic Cell* 9, 1100–1108.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079.

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

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

McCarthy, D.J., Chen, Y., Smyth, G.K., 2012. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res* 40, 4288–4297.

Michielse, C.B., van Wijk, R., Reijnen, L., Manders, E.M.M., Boas, S., Olivain, C., Alabouvette, C., Rep, M., 2009. The Nuclear Protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* Is Required for Parasitic Growth. *PLoS Pathogens* 5, e1000637.

Möller, M., Schotanus, K., Soyer, J., Haueisen, J., Happ, K., Stralucke, M., Happel, P., Smith, K.M., Connolly, L.R., Freitag, M., Stukenbrock, E.H., 2019. Destabilization of chromosome structure by histone H3 lysine 27 methylation.

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

Mullins, E.D., Chen, X., Romaine, P., Raina, R., Geiser, D.M., Kang, S., 2001. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Fusarium oxysporum*: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer. *Phytopathology* 91, 173–180.

O’Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., Kleemann, J., 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics* 44, 1060–1065.

Papadopoulos, J.S., Agarwala, R., 2007. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* 23, 1073–1079.

Parlange, F., Daverdin, G., Fudal, I., Kuhn, M.-L., Balesdent, M.-H., Blaise, F., Grezes-Besset, B., Rouxel, T., 2009. *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents *Rlm4*-mediated recognition through a single amino acid change. *Mol. Microbiol.* 71, 851–863.

- Petit-Houdenot, Y., Degrave, A., Meyer, M., Blaise, F., Ollivier, B., Marais, C.-L., Jauneau, A., Audran, C., Rivas, S., Veneault-Fourrey, C., Brun, H., Rouxel, T., Fudal, I., Balesdent, M.-H., 2019. A two genes - for - one gene interaction between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica napus*. *New Phytol.* 223, 397–411.
- Plissonneau, C., Rouxel, T., Chèvre, A.-M., Van De Wouw, A.P., Balesdent, M.-H., 2018. One gene-one name: the AvrLmJ1 avirulence gene of *Leptosphaeria maculans* is AvrLm5. *Molecular plant pathology* 19, 1012–1016.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.
- Rouxel, T., Balesdent, M.H., 2005. The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Molecular Plant Pathology* 6, 225–241.
- Rouxel, T., Grandaubert, J., Hane, J.K., Hoede, C., van de Wouw, A.P., Couloux, A., Dominguez, V., Anthouard, V., Bally, P., Bourras, S., Cozijnsen, A.J., Ciuffetti, L.M., Degrave, A., Dilmaghani, A., Duret, L., Fudal, I., Goodwin, S.B., Gout, L., Glaser, N., Linglin, J., Kema, G.H.J., Lapalu, N., Lawrence, C.B., May, K., Meyer, M., Ollivier, B., Poulain, J., Schoch, C.L., Simon, A., Spatafora, J.W., Stachowiak, A., Turgeon, B.G., Tyler, B.M., Vincent, D., Weissenbach, J., Amselem, J., Quesneville, H., Oliver, R.P., Wincker, P., Balesdent, M.-H., Howlett, B.J., 2011. Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nature Communications* 2.
- Rybak, K., See, P.T., Phan, H.T., Syme, R.A., Moffat, C.S., Oliver, R.P., Tan, K.-C., 2017. A functionally conserved Zn₂Cys₆ binuclear cluster transcription factor class regulates necrotrophic effector gene expression and host-specific virulence of two major Pleosporales fungal pathogens of wheat. *Molecular plant pathology* 18, 420–434.
- Sánchez-Vallet, A., Fouché, S., Fudal, I., Hartmann, F.E., Soyer, J.L., Tellier, A., Croll, D., 2018. The Genome Biology of Effector Gene Evolution in Filamentous Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 56, 21–40.
- Šašek, V., Nováková, M., Dobrev, P.I., Valentová, O., and Burketová, L. (2012). β-aminobutyric acid protects *Brassica napus* plants from infection by *Leptosphaeria maculans*. Resistance induction or a direct antifungal effect? *Eur. J. Plant Pathol.* 133, 279–289.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504.
- Silayeva, O., Barnes, A.C., 2018. Gibson Assembly facilitates bacterial allelic exchange mutagenesis. *J. Microbiol. Methods* 144, 157–163.
- Soyer, J.L., El Ghalid, M., Glaser, N., Ollivier, B., Linglin, J., Grandaubert, J., Balesdent, M.-H., Connolly, L.R., Freitag, M., Rouxel, T., Fudal, I., 2014. Epigenetic Control of Effector Gene Expression in the Plant Pathogenic Fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genetics* 10, e1004227.
- Soyer, J.L., Rouxel, T., Fudal, I., 2015. A Chromatin-based control of effector gene expression in plant-associated fungi. *Current Opinion in Plant Biology* 26, 51–56.

- Soyer, J.L., Hamiot, A., Ollivier, B., Balesdent, M.-H., Rouxel, T., Fudal, I., 2015. B The APSES transcription factor LmStuA is required for sporulation, pathogenic development and effector gene expression in *Leptosphaeria maculans*: Functional analysis of LmStuA from *L. maculans*. *Molecular Plant Pathology* 16, 1000–1005.
- Soyer, J.L., Grandaubert, J., Haueisen, J., Schotanus, K., Stukenbrock, E.H., 2019. In planta chromatin immunoprecipitation in *Zymoseptoria tritici* reveals chromatin-based regulation of putative effector gene expression. *bioRxiv* 544627.
- Stergiopoulos, I., de Wit, P.J.G.M., 2009. Fungal Effector Proteins. *Annual Review of Phytopathology* 47, 233–263.
- Strauss, J., Reyes-Dominguez, Y., 2011. Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genetics and Biology* 48, 62–69.
- Tan, K.-C., Oliver, R.P., 2017. Regulation of proteinaceous effector expression in phytopathogenic fungi. *PLoS pathogens* 13, e1006241.
- van der Does, H.C., Fokkens, L., Yang, A., Schmidt, S.M., Langereis, L., Lukasiewicz, J.M., Hughes, T.R., Rep, M., 2016. Transcription factors encoded on core and accessory chromosomes of *Fusarium oxysporum* induce expression of effector genes. *PLoS genetics* 12, e1006401.
- Winter, D.J., Ganley, A., Young, C., Liachko, I., Schardl, C., Dupont, P., Berry, D., Ram, A., Scott, B., Cox, M., 2018. Repeat elements organize 3D genome structure and mediate transcription in the filamentous fungus *Epichloë festucae*. *bioRxiv* 339010.
- Wouw, A.P.V. de, Lowe, R.G.T., Elliott, C.E., Dubois, D.J., Howlett, B.J., 2014. An avirulence gene, *AvrLmJ1*, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Molecular Plant Pathology* 15, 523–530.
- Zahiri, A., Heimel, K., Wahl, R., Rath, M., Kämper, J., 2010. The *Ustilago maydis* Forkhead Transcription Factor Fox1 Is Involved in the Regulation of Genes Required for the Attenuation of Plant Defenses During Pathogenic Development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 1118–1129.
- Zhang, X., Liu, X., Zhao, Y., Cheng, J., Xie, J., Fu, Y., Jiang, D., Chen, T., 2016. Histone H3 Lysine 9 Methyltransferase DIM5 Is Required for the Development and Virulence of *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology* 7.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors wish to thank all members of the “Effectors and Pathogenesis of *L. maculans*” group. C. Clairet and E. Gay were funded by a PhD salary from the University Paris-Saclay. This work was partly funded by the “Plant Health and Environment” division of INRAE (ChromaDyn Project). The “Effectors and Pathogenesis of *L. maculans*” group benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007).

Supplementary figures

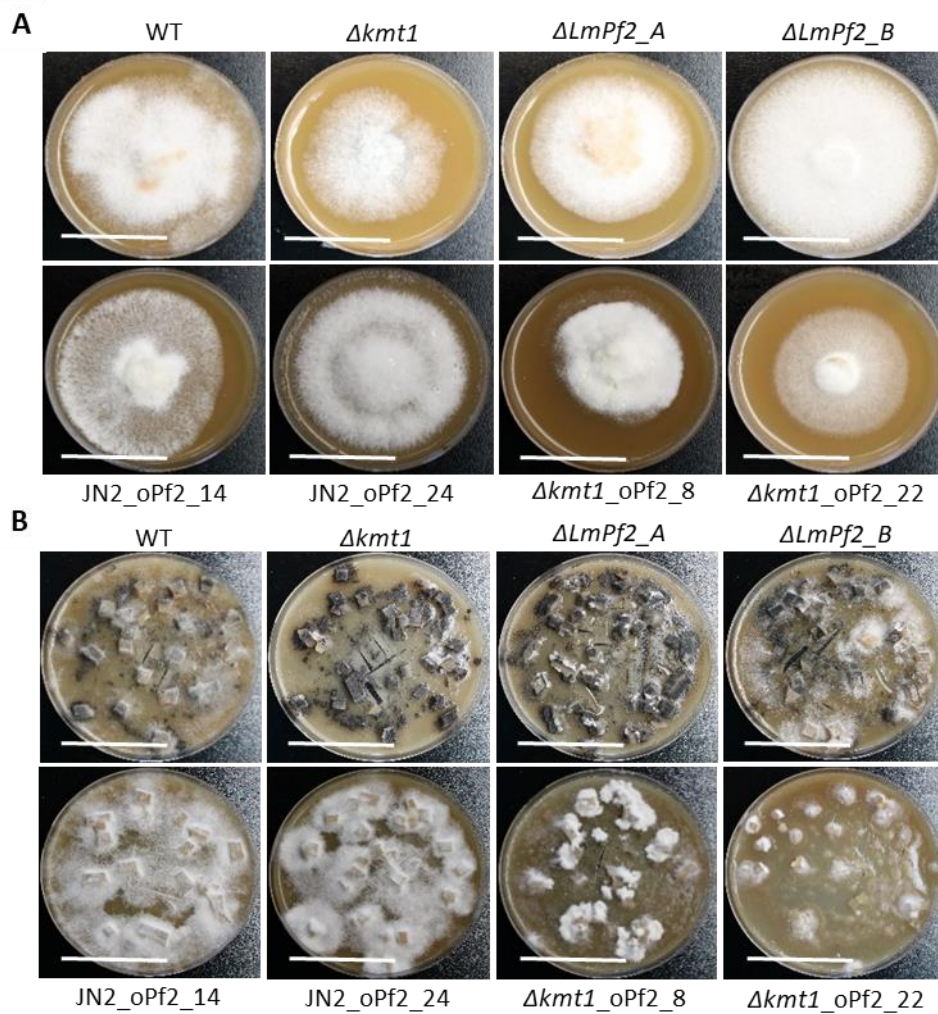


Figure S1: Morphological characterization of *LmPf2* mutants, *KMT1* mutants and transformants overexpression *LmPf2*. **A:** Transformant thallus morphology on V8 agar medium at 6 days after inoculation. Scale bars correspond to 25 mm. **B:** Transformant thallus morphology during conidiation on V8 agar 14 days after inoculation. Scale bars correspond to 45 mm. The transformants overexpressing *LmPf2* were obtained in a WT background (JN2) and in a $\Delta kmt1$ background.

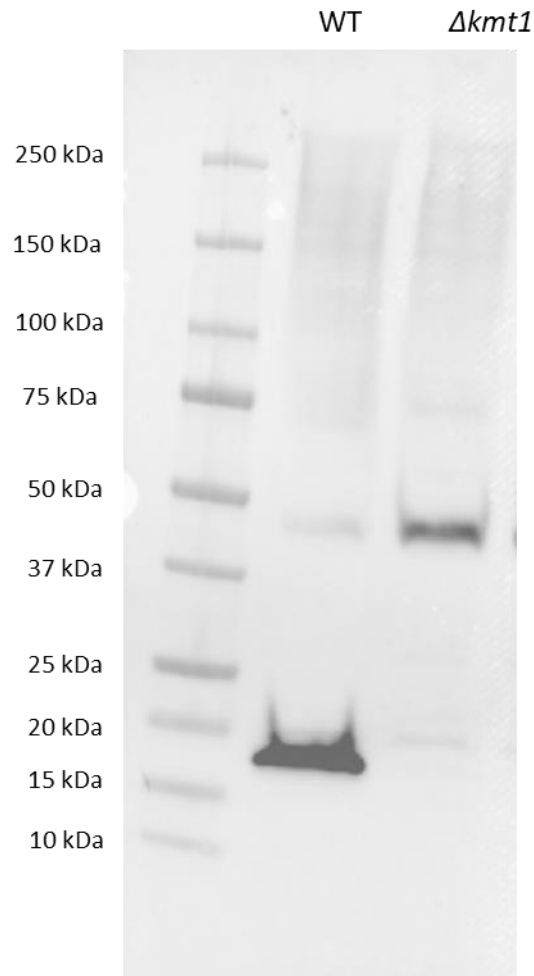


Figure S2: Western Blot analysis of H3K9 tri-methylation in the WT isolate JN3 and $\Delta kmt1$. Nuclear proteins were extracted from mycelium, separated by SDS-PAGE, blotted and probed with antibodies against H3K9me3

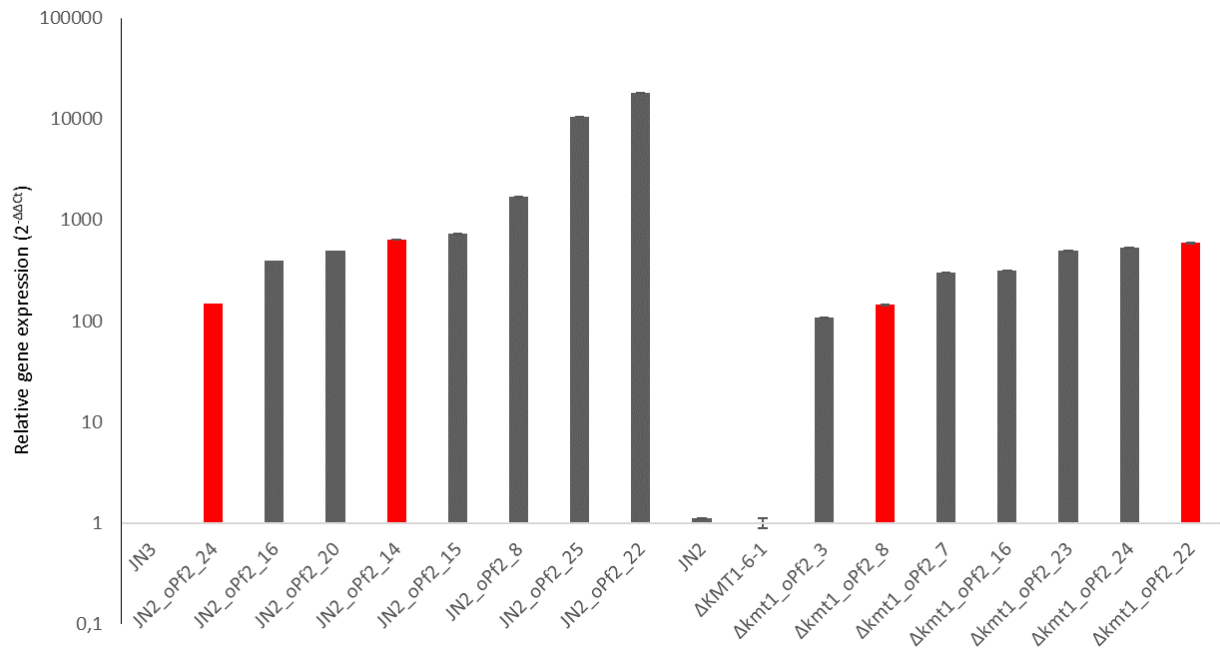


Figure S3: Level of *LmPf2* expression in the *Leptosphaeria maculans* transformants over-expressing *LmPf2* during axenic growth. Mycelium was obtained by growing JN2 and JN3 strains and transformants in Fries liquid medium for 7 days. Two biological replicates per condition were generated. Total RNA was extracted. Expression of *LmPf2* was measured by qRT-PCR and expressed relatively to *LmβTubulin* expression and to expression of *LmPf2* in the strain before transformation using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Red bars correspond to transformants which were selected for further characterization (JN2_oPf2_14, JN2_oPf2_24, $\Delta kmt1_oPf2_8$ and $\Delta kmt1_oPf2_22$).

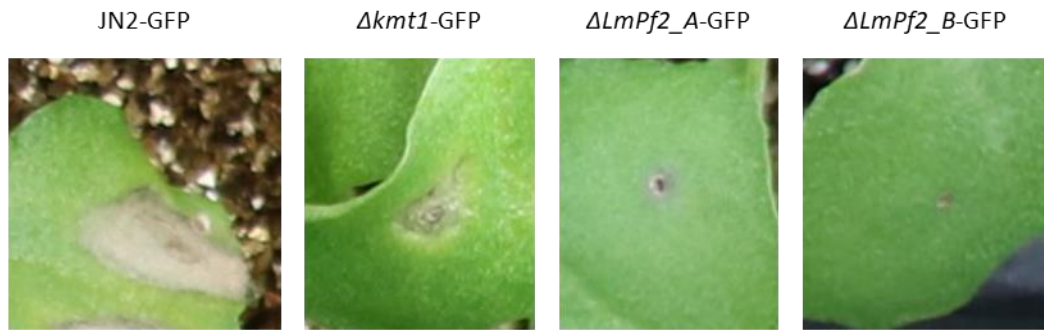
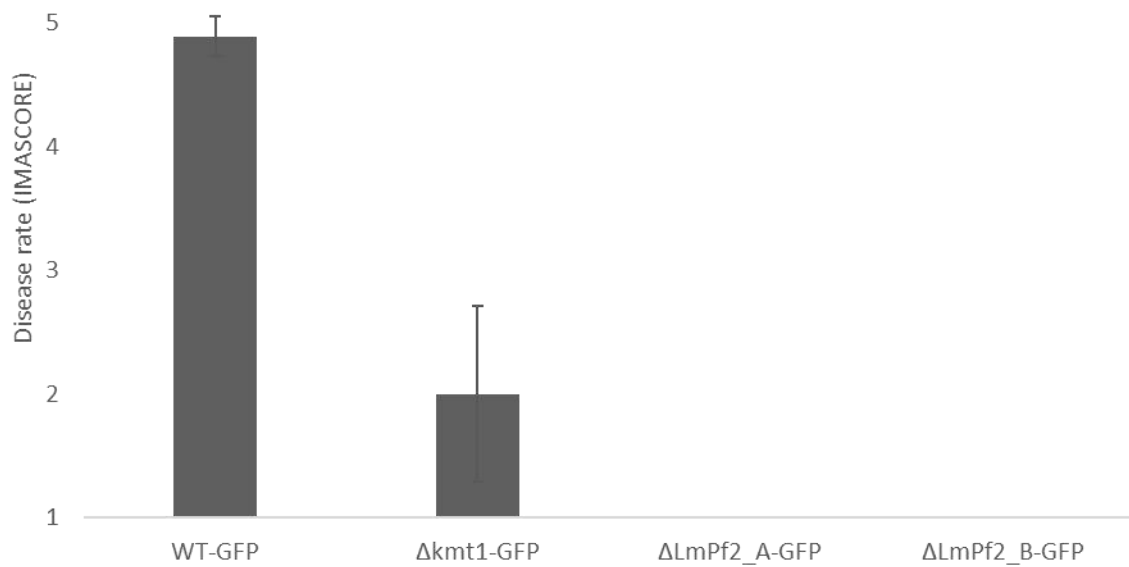
A**B** 6

Figure S4: Pathogenicity assays using a JN2-GFP transformant, and $\Delta kmt1$ and $\Delta LmPf2$ transformants after crossing with JN2-GFP. **A:** Photos of symptoms and **B:** Symptoms rating at 14 DPI on the susceptible cultivar of oilseed rape Es-Astrid after inoculation with three different CRISPR-Cas9 mutants and the JN2-GFP transformant. Disease rate is expressed as the mean scoring using the IMAScore rating scale comprising six infection classes (IC), where IC1 to IC3 correspond to various levels of resistance of the plant and IC4 to IC6 to susceptibility (Balesdent *et al.*, 2005).

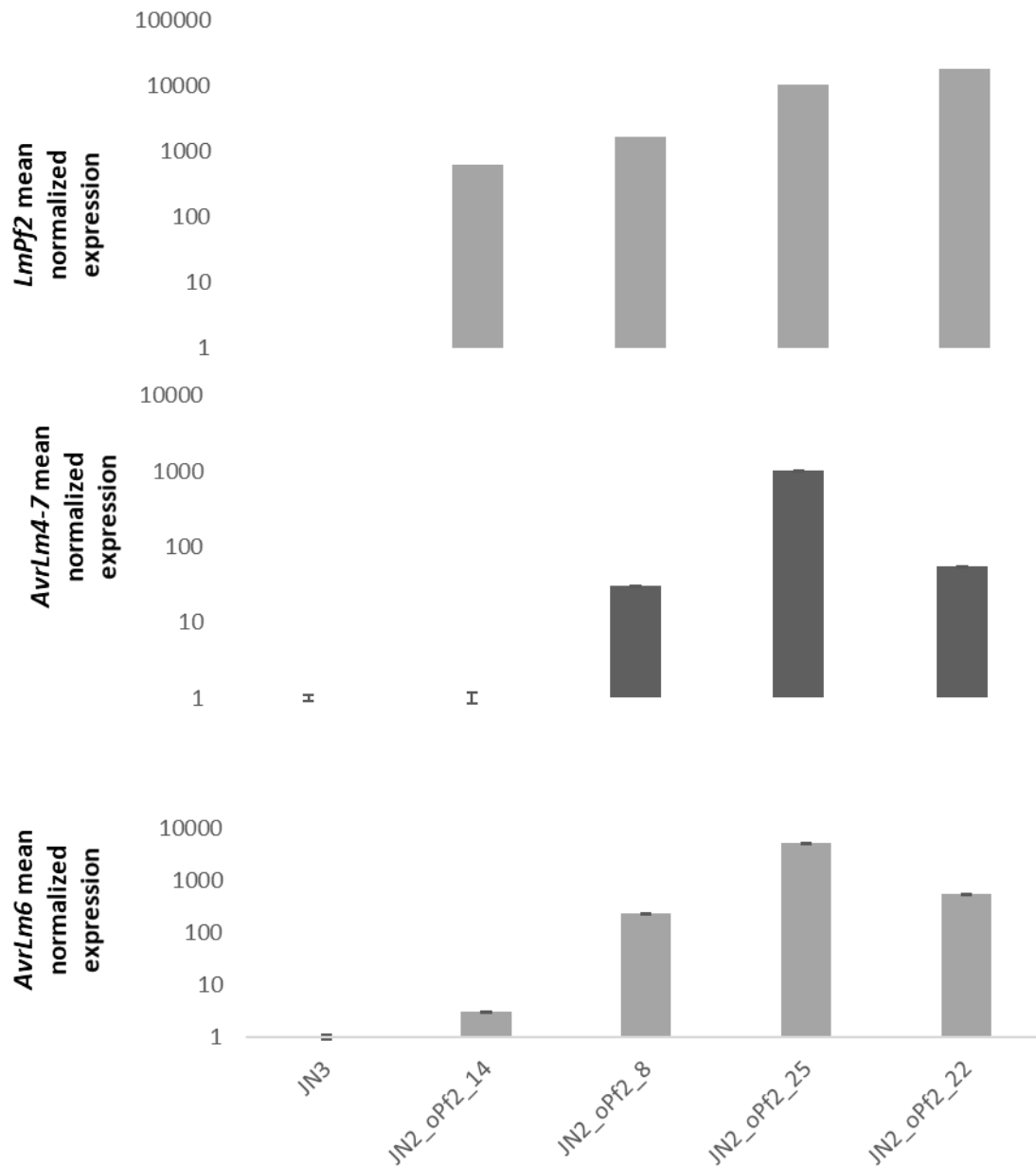


Figure S5: Influence of *LmPf2* over-expression on the expression of two *L. maculans* avirulence genes during axenic growth. Mycelium was grown in Fries liquid medium during seven days. Expression of **A: *LmPf2***, **B: *AvrLm4-7*** and **C: *AvrLm6*** was measured by qRT-PCR using *LmβTubulin* as a constitutive reporter gene and expression in JN2 as reference ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ method). Each value is the average of two biological replicates (two extractions from different biological replicates) and two technical replicates (two RT-PCR).

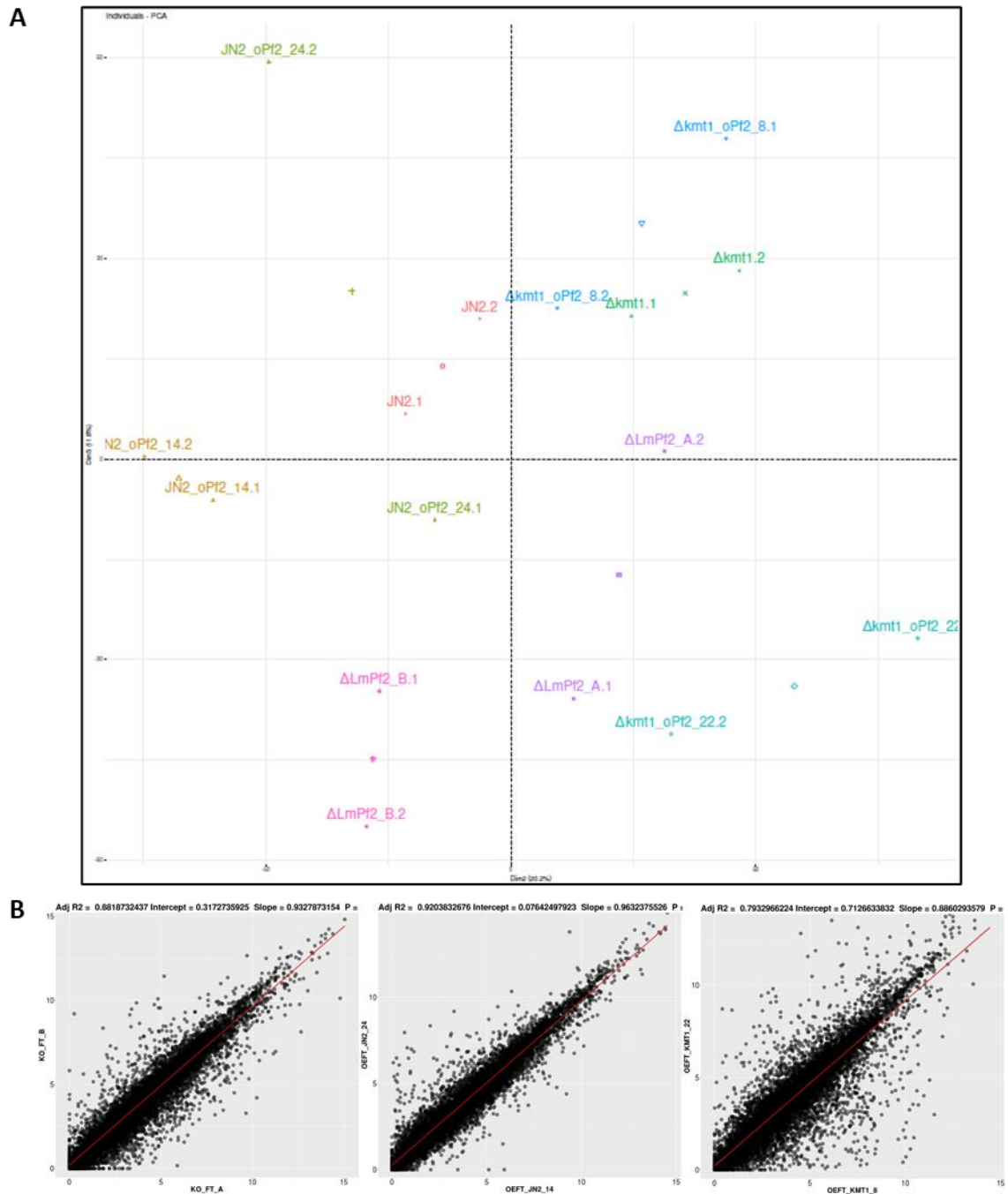


Figure S6: Reproducibility of RNA-Seq replicates. **A:** $\log_2(\text{RPKM})$ PCA of all samples. Legend labels: WT = JN2; $\Delta kmt1_X = \Delta kmt1_A$ and B; $\Delta LmPf2_X = \Delta LmPf2_A$ and B; JN2_oPf2_X = JN2_oPf2_14 and 24 ; and $\Delta kmt1_oPf2_X = \Delta kmt1_oPf_8$ and 22. **B:** Scatterplot obtained with $\log_2(\text{RPKM})$ of three biological replicates. Left panel = $\Delta LmPf2_A$ vs $\Delta LmPf2_B$; middle panel = JN2_oPf2_14 vs JN2_oPf2_24; and right panel = $\Delta kmt1_oPf2_8$ vs $\Delta kmt1_oPf2_22$.

Supplementary tables :

Table S1: Primers used in the study

Name of the primer	DNA sequence	function	construction
gRNA against <i>LmPf2</i>	GAAACCTAATCAATCAACAGCA TGCTGATGAGTCCGTGAGGACG AAACGAGTAAGCTCGTCCATGC TCCCCGCCAGAGAGTTTTAG AGCTAGAAATAGC	<i>Lmpf2</i> CRISPR-CAS9 directed inactivation	CRISPR-Cas9
gRNA against <i>KMT1</i>	GAAACCTAATCAATCAACGGAG CACTGATGAGTCCGTGAGGACG AAACGAGTAAGCTCGTCTGCTC CCTTCGAACGTCTGCGTTTTAGA GCTAGAAATAGC	<i>KMT1</i> CRISPR-CAS9 directed inactivation	
MAI0309	ACCTCTAATCGAAACCTAATCA ATCAAC	Amplification of gRNA coding sequence	
MAI0310	ATTTTAACTTGCTATTTCTAGCT CTAAAAC	Amplification of gRNA coding sequence	
verif_CRISPR_LmPf2_F	CCACTCCAGTCAAGCGGGC	<i>LmPf2</i> mutation detection	
verif_CRISPR_LmPf2_R	AATTGGCGGTTCGGACGATGC	<i>LmPf2</i> mutation detection	
verif_CRISPR_KMT1_F	GCCCTCCATGGTTGTGGTGC	<i>KMT1</i> mutation detection	
verif_CRISPR_KMT1_R	ACCCCGGAAATGCTAGCCGA	<i>KMT1</i> mutation detection	
EF1aProSac1F	GAGAGAGAGCTCGGCACTCGTA AGGAGTATGAGC	<i>EF1a</i> promoter amplification and cloning	<i>Lmpf2</i> overexpression
EF1aProKpnIR	GAGAGAGGTACCGTTGGCGGTG TTGTGATGG	<i>EF1a</i> promoter amplification and cloning	
surex_LmPf2_Gibs_F	AGTCGACCTGCAGGCATGCAAT GGTACCAATCCCACCACC	<i>LmPf2</i> amplification and cloning	
surex_LmPf2_Gibs_R	GTAACGACGCGCCAGTGCCAA GTTGGGGGAGAGTACATACTG	<i>LmPf2</i> amplification and cloning	
LmPf2_primer_Up	ATGGCTACCAATCCCACCACC	<i>LmPf2</i> sequence verification	
LmPf2_Seq1_F	CCGCCAATTCGCGTCTGGCC	<i>LmPf2</i> sequence verification	
LmPf2_primer_Low	CAGTATGTACTCTCCCCAAC	<i>LmPf2</i> sequence verification	
β Tubulin_F	AAGAACTCATCCTACTTCGA	qPCR	
β Tubulin_R	TGAATAGCTCCTGAATGG	qPCR	
AvrLm4-7_F	GCCCTGCATAACTACCGAC	qPCR	
AvrLm4-7_R	TCCTGGCCAAATATAACTCC	qPCR	
AvrLm6_F	AAACGGCACTATTACGAAAA	qPCR	
AvrLm6_R	GATTAGGCGAGAAGCAAGT	qPCR	
AvrLm10.A_F	ACAGGAGAACACTGACGGCT	qPCR	
AvrLm10.A_R	GCATGGACTATCGTAGCGTTAT	qPCR	
AvrLm11_F	TGCGTTTCTTGCTTCCTATATTT	qPCR	
AvrLm11_R	CAAGTTGGATCTTCTCATTTCG	qPCR	

Table S2: Crosses performed for mutant purification

	CRISPR-Cas9 mutation	Compatible isolate used for crosses ^a	Name of the selected progenies ^b	Additional transformation
$\Delta kmt1$ 6-1	1-bp insertion	JN2 ^a	$\Delta KMT1$	<i>LmPf2</i> over-expression
		JN2-GFP	$\Delta KMT1$ -GFP	no
$\Delta LmPf2$ 1-2	1-bp deletion	JN2-GFP	$\Delta LmPf2_A$	no
		JN2-GFP	$\Delta LmPf2_A$ -GFP	no
$\Delta LmPf2$ 4-2	5-bp deletion	JN2-GFP	$\Delta LmPf2_B$	no
		JN2-GFP	$\Delta LmPf2_B$ -GFP	no

^aPurification by crossing with an isolate of opposite mating type with or without GFP. ^bSelected progenies purified (without Cas9 and gRNA).

Table S3: RNA-Seq read informations

	Total numbers of paired reads	Paired reads after pre-processing ^a	% paired reads kept	STAR mapping Uniquely mapped reads ^b
JN2-1	1,49E+07	1,24E+07	83,28%	81,76%
JN2-2	2,35E+07	1,95E+07	83,14%	83,75%
Δ kmt1-1	1,71E+07	1,42E+07	83,23%	83,12%
Δ kmt1-2	1,72E+07	1,43E+07	83,06%	85,79%
Δ LmPf2_A-1	1,66E+07	1,37E+07	82,76%	83,92%
Δ LmPf2_A-2	1,59E+07	1,31E+07	82,51%	38,76%
Δ LmPf2_B-1	1,59E+07	1,32E+07	82,84%	81,68%
Δ LmPf2_B-2	1,62E+07	1,33E+07	82,17%	81,20%
JN2_oPf_14-1	2,43E+07	2,01E+07	82,73%	79,73%
JN2_oPf_14-2	2,32E+07	1,92E+07	82,86%	79,11%
JN2_oPf_24-1	2,48E+07	2,06E+07	83,02%	80,51%
JN2_oPf_24-1	2,42E+07	2,01E+07	83,17%	82,96%
Δ kmt1_oPf_8-1	2,23E+07	1,85E+07	82,81%	84,44%
Δ kmt1_oPf_8-2	2,23E+07	1,85E+07	83,04%	82,61%
Δ kmt1_oPf_22-1	2,48E+07	2,08E+07	83,98%	75,19%
Δ kmt1_oPf_22-2	2,11E+07	1,75E+07	83,00%	71,57%

^a Paired reads were treated with Trimmomatic. Sequencing adaptors and too short reads (<30 bp) were removed.

^b Reads were then mapped against *L. maculans*

Table S4. GO categories enriched in genes up-regulated in JN2_oPf2 transformants

GO-ID	FDR	nb. of genes with the GO term among the genes up-regulated in JN2_oPf2 transformants	nb. of genes with a GO annotation among the genes up-regulated in JN2_oPf2 transformants	proportion in the up-regulated genes	nb. of genes with the given GO in the genome	nb. of genes with a GO annotation in the genome	proportion in the genome	description
5975	4,94E-04	19	77	2,47E-01	362	5076	7,13E-02	carbohydrate metabolic process
5976	2,27E-02	6	77	7,79E-02	51	5076	1,00E-02	polysaccharide metabolic process

GO annotation of *L. maculans* genes were retrieved from Durtreux et al. (2018). Analysis of GO enrichment among the genes up-regulated in JN2_oPf2

Table S5. GO categories enriched in genes up-regulated in $\Delta kmt1_oPf2$ transformants

Type of transformant	GO-ID	FDR	nb. of genes with the GO term among the genes up-regulated in $\Delta kmt1_oPf2$ transformants	nb. of genes with a GO annotation among the genes up-regulated in $\Delta kmt1_oPf2$ transformants	proportion in the up-regulated genes	nb. of genes with the given GO in the genome	nb. of genes with a GO annotation in the genome	proportion in the genome	description
$\Delta kmt1_oPf_8$	5982	4,99E-02	5	86	5,81E-02	35	5076	1,69E-02	starch metabolic process
	5985	4,99E-02	5	86	5,81E-02	35	5076	1,69E-02	sucrose metabolic process
	5984	4,99E-02	5	86	5,81E-02	38	5076	1,69E-02	disaccharide metabolic process
	44042	4,99E-02	5	86	5,81E-02	40	5076	1,69E-02	glucan metabolic process
	6073	4,99E-02	5	86	5,81E-02	40	5076	1,69E-02	cellular glucan metabolic process
	44264	4,99E-02	5	86	5,81E-02	42	5076	1,69E-02	cellular polysaccharide metabolic process
	9311	4,99E-02	5	86	5,81E-02	43	5076	1,69E-02	oligosaccharide metabolic process
$\Delta kmt1_oPf_22$	5975	2,33E-03	39	262	1,49E-01	362	5076	7,13E-02	carbohydrate metabolic process
	44264	2,33E-03	11	262	4,20E-02	42	5076	8,27E-03	cellular polysaccharide metabolic process
	5976	2,33E-03	12	262	4,58E-02	51	5076	1,00E-02	polysaccharide metabolic process
	5982	2,33E-03	10	262	3,82E-02	35	5076	6,90E-03	starch metabolic process
	5985	2,33E-03	10	262	3,82E-02	35	5076	6,90E-03	sucrose metabolic process
	5984	3,86E-03	10	262	3,82E-02	38	5076	7,49E-03	disaccharide metabolic process
	44042	4,42E-03	10	262	3,82E-02	40	5076	7,88E-03	glucan metabolic process
	6073	4,42E-03	10	262	3,82E-02	40	5076	7,88E-03	cellular glucan metabolic process
	90305	6,37E-03	20	262	7,63E-02	147	5076	2,90E-02	nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis
	9311	6,37E-03	10	262	3,82E-02	43	5076	8,47E-03	oligosaccharide metabolic process
	44262	2,67E-02	13	262	4,96E-02	83	5076	1,64E-02	cellular carbohydrate metabolic process
	42545	2,90E-02	3	262	1,15E-02	3	5076	5,91E-04	cell wall modification
	6040	2,90E-02	7	262	2,67E-02	27	5076	5,32E-03	amino sugar metabolic process
	55085	4,99E-02	49	262	1,87E-01	608	5076	1,20E-01	transmembrane transport

GO annotation of *L. maculans* genes were retrieved from Durtreux et al. (2018). Analysis of GO enrichment among the genes up-regulated in $\Delta kmt1_oPf2$

Table S6. GO categories enriched in genes down-regulated in the mutants inactivated for LmPf2, the transformants over-expressing LmPf2 in the WT isolate JN3 and in the transformants over-expressing LmPf2 in the mutant inactivated for KMT1

Type of transformant	GO-ID	FDR	nb. of genes with the GO term among the genes up-regulated in the transformants	nb. of genes with a GO annotation among the genes up-regulated in the transformants	proportion in the up-regulated genes	nb. of genes with the given GO in the genome	nb. of genes with a GO annotation in the genome	proportion in the genome	description
<i>ΔLmPf2</i>		8,86E-04	33	84	3,93E-01	911	5076	1,79E-01	oxidation-reduction process
<i>JN2_oPf2</i>	55114	1,50E-04	45	121	3,72E-01	911	5076	1,79E-01	
<i>Δkmt1_oPf2</i>		1,93E-10	118	344	3,43E-01	911	5076	1,79E-01	

GO annotation of *L. maculans* genes were retrieved from Durtreux et al. (2018). Analysis of GO enrichment among the genes down-regulated in the different

Table S7. Deregulation of SSP-genes located in a H3K9me3 genomic context, in vitro, in the different transformants generated in this study.

ID	Name	H3K9me3 ^a	KMT1 ^b	LmPf2 ^b	oPf2_JN2 ^b	oPf2_KMT1_8 ^b	oPf2_KMT1_22 ^b
Lmb_jn3_00001	AvrLm3	all_included	up	-	-	up	up
Lmb_jn3_00461	-	5'_included	-	-	-	up	up
Lmb_jn3_00495	-	all_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_02425	-	overlap	-	-	up	-	-
Lmb_jn3_02685	-	3'_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_03238	-	all_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_03261	-	3'_included	-	-	-	down	down
Lmb_jn3_03262	AvrLm4-7	all_included	-	-	-	up	up
Lmb_jn3_03263	-	5'_included	-	-	-	-	up
Lmb_jn3_03815	-	5'_included	-	-	-	-	up
Lmb_jn3_04095	-	all_included	-	-	-	-	up
Lmb_jn3_04096	-	all_included	-	-	-	-	up
Lmb_jn3_05067	-	all_included	-	-	-	up	up
Lmb_jn3_05316	-	overlap	down	-	-	down	-
Lmb_jn3_05547	-	all_included	-	-	-	up	up
Lmb_jn3_05821	-	5'_included	down	-	-	down	down
Lmb_jn3_07073	-	5'_included	down	down	-	down	down
Lmb_jn3_07512	-	overlap	-	down	-	-	-
Lmb_jn3_07862	AvrLm6	all_included	-	-	-	up	up
Lmb_jn3_07863	AvrLm2	5'_included	down	-	-	-	up
Lmb_jn3_07874	AvrLm10_1	all_included	down	-	-	down	up
Lmb_jn3_07916	-	all_included	-	-	-	-	up
Lmb_jn3_08094	LmStee35	all_included	-	down	up	-	-
Lmb_jn3_08095	-	all_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_08343	AvrLmS	all_included	-	-	-	up	up
Lmb_jn3_08794	-	5'_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_09746	-	all_included	-	-	-	-	up
Lmb_jn3_10106	AvrLm5	all_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_10387	-	overlap	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_10841	-	5'_included	-	-	-	-	up
Lmb_jn3_11454	LmCys2	all_included	-	-	-	up	up
Lmb_jn3_11990	-	all_included	up	-	-	up	up
Lmb_jn3_12121	-	5'_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_12660	-	5'_included	up	-	-	up	up
Lmb_jn3_12986	-	all_included	-	-	-	up	up
Lmb_jn3_12994	AvrLm11	all_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_13126	AvrLm1	all_included	-	-	-	-	-

^aGenes associated with H3K4me2, H3K9me3 or H3K27me3 during axenic culture in the wild type strain (Soyer et al., 2020)

^bGenes deregulated in a given transformant compared to the WT strain during axenic culture (this analysis).

Table S8. Effect of KMT1, LmPf2 inactivation, or LmPf2 overexpression, on genes encoding PKS or NRPS.

ID	Predicted PKS or NRPS	H3K4me2 ^a	H3K9me3 ^a	H3K27me3 ^a	KMT1 ^b	LmPf2 ^b	oPf2_JN2 ^b	oPf2_KMT1_8 ^b	oPf2_KMT1_22 ^b
Lmb_jn3_00988	SirP (sirodesmin)	overlap	-	all_included	-	-	-	-	down
Lmb_jn3_00998	PKS1	-	-	5'_included	-	-	-	-	up
Lmb_jn3_01173	PKS14	-	-	all_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_01181	PKS13	-	-	5'_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_02066	NPS2 (siderophore)	overlap	-	overlap	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_02092	NPS8 (Phomalide)	5'_included	3'_included	5'_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_02584	PKS4	-	-	all_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_03490	NPS1	-	-	all_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_05162	PKS12	-	-	all_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_05348	PKS2 (Phomenoic acid)	overlap	-	overlap	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_05352	NPS5	3'_included	-	-	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_06412	PKS11	-	-	all_included	down	down	down	down	down
Lmb_jn3_06609	NPS11	5'_included	-	-	down	-	-	-	down
Lmb_jn3_06945	NPS4	5'_included	-	overlap	-	-	-	-	down
Lmb_jn3_07864	PKS6	5'_included	3'_included	overlap	-	-	up	-	-
Lmb_jn3_08572	Lys2	5'_included	-	3'_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_09218	Maa12	5'_included	-	-	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_10094	NPS6 (siderophore)	overlap	-	5'_included	down	-	-	-	-
Lmb_jn3_10429	NPS3	-	-	-	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_10603	NPS12	-	-	all_included	-	-	-	-	up
Lmb_jn3_10827	NPS7	-	-	all_included	-	-	-	down	down
Lmb_jn3_11296	PKS8	all_included	-	-	-	-	-	-	up
Lmb_jn3_11304	PKS9	5'_included	-	-	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_11345	PKS10 (melanin)	-	-	all_included	-	-	-	-	down
Lmb_jn3_11562	PKS5 (ABA)	-	-	all_included	-	-	-	-	down
Lmb_jn3_11822	NPS10	overlap	-	all_included	-	-	-	-	-
Lmb_jn3_12570	PKS7	-	-	5'_included	-	-	-	-	-

^aGenes associated with H3K4me2, H3K9me3 or H3K27me3 during axenic culture in the wild type strain (Soyer et al., 2020)

^bGenes deregulated in a given transformant compared to the WT strain during axenic culture (this analysis).

Annexe 2 : Bilan d'activité

Articles scientifiques publiés

- Dutreux F, Da Silva C, d'Agata L, Couloux A, **Gay E J**, et al. “*De novo* assembly and annotation of three *Leptosphaeria* genomes using Oxford Nanopore MinION sequencing”; Scientific data 5:180235
- Leontovyčová, H., Trdá, L., Dobrev, P.I., Šašek, V., **Gay, E.**, Balesdent, M.-H., and Burketová, L. (2020). Auxin biosynthesis in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* is associated with enhanced transcription of indole-3-pyruvate decarboxylase LmIPDC2 and tryptophan aminotransferase LmTAM1. Res. Microbiol. 171, 174–184.

Articles scientifiques en cours de soumission

- **Gay, E.J.**, Soyer, J.L., Lapalu, N., Linglin, J., Fudal, I., Da Silva, C., Wincker, P., Aury, J.-M., Cruaud, C., Levrel, A., et al. (2020). Large-scale transcriptomics to dissect two years of the life of a fungal phytopathogen interacting with its host plant. BioRxiv 2020.10.13.331520.
- Soyer, J.L., Clairet, C., **Gay, E.J.**, Lapalu, N., Rouxel, T., Stukenbrock, E.H., and Fudal, I. (2020). Genome-wide mapping of histone modifications in two species of *Leptosphaeria maculans* showing contrasting genomic organization and host specialization. BioRxiv 2020.05.08.084566.
- Jiquel, A., Gervais, J., Geistodt-Kiener, A., Delourme, R., **Gay, E.J.**, Ollivier, B., Fudal, I., Faure, S., Balesdent, M.H., and Rouxel, T. (soumis). “Late” effectors of *Leptosphaeria maculans* as tools to identify novel and durable race-specific resistance genes in *Brassica napus*.

Articles scientifiques en cours de preparation

- **Gay, E.J.**, Jacques, N., Lapalu, N., Cruaud, C., Laval, V., Rouxel, T., and Balesdent, M.H. Antagonistic interactions between the two phytopathogens *Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa*: only a question of location and timing.
- Clairet, C., **Gay, E.J.**, Simon, A., Lapalu, N., Blaise F., Marais C.L., Balesdent, M.H., Soyer, J.L., and Fudal, I. (2020). Regulation of effector gene expression as concerted waves in *Leptosphaeria maculans*: a two-players game.

Présentations orales

Journées Jean Chevaugeon, Aussois, janv 2018 :

Analyse de l'interaction entre les membres d'un complexe d'espèces pathogènes du colza (*L. maculans* et *L. biglobosa*) par une approche transcriptomique

Journée des doctorants SPE, Nice, juin 2018 :

Comparative transcriptomic in members of a species complex to highlight determinants of pathogenic lifestyles

International Symposium on Environmental and Agronomical Genomics, Paris, nov 2018

Effectors at play: metatranscriptomic approaches to decipher the life cycle of a fungal phytopathogen

30th Fungal Genetics Conference at Asilomar, March 12, 2019

Presentation orale au "Dothideomycetes Comparative Genomics workshop":

Effectors at play: metatranscriptomic approaches to decipher the life cycle of a fungal phytopathogen

Présentations de posters

30th Fungal Genetics Conference at Asilomar, March 12, 2019

Effectors at play: metatranscriptomic approaches to decipher the life cycle of a fungal phytopathogen

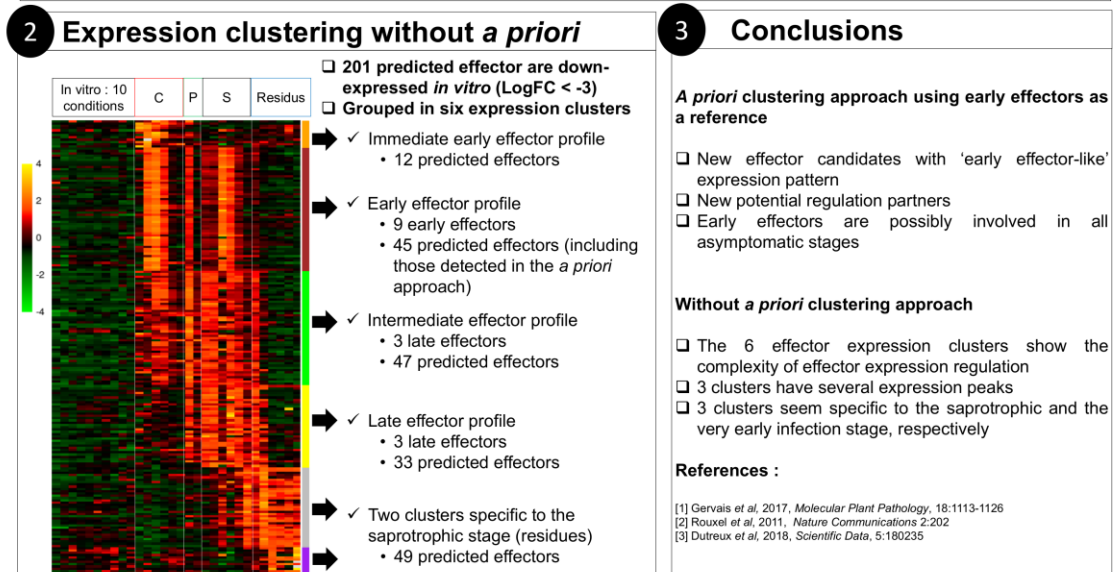
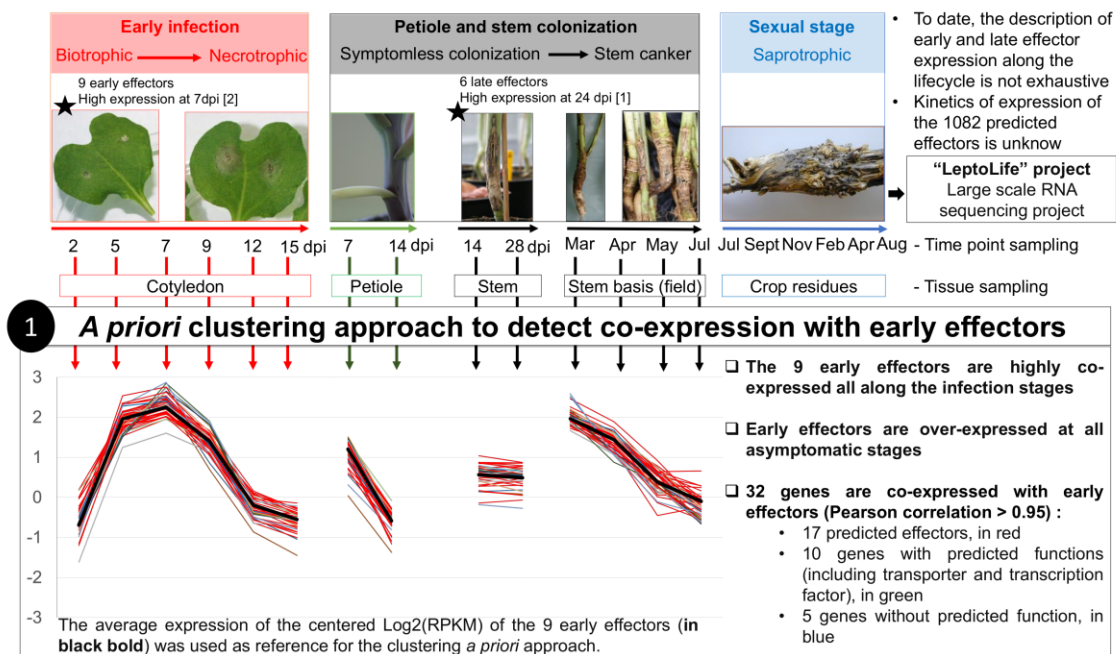


Elise J. Gay^{1,2}, Nicolas Lapalu², Régine Delourme³, Thierry Rouxel², Marie-Hélène Balesdent²
¹Université Paris-Sud, 91400 Orsay, France
²UMR BIOGER, INRA, AgroParisTech, Uni Paris-Saclay, Thiverval-Grignon, 78850, France
³UMR IGEPP, INRA, Campus Beaulieu, Rennes, 35042 France

615T





Leptosphaeria maculans is a hemibiotrophic fungal pathogen of *Brassica napus*. This fungus has a complex infection cycle encompassing several necrotrophic and endophytic/biotrophic stages. In the course of interactions, hundreds of small secreted proteins (effector candidates) are needed by fungal pathogens to avoid plant recognition and complete their lifecycle. During *L. maculans* life cycle, 9 "early effectors" and 6 "late effectors" [1, 2] have previously been described. Given that the *L. maculans* genome contains a predicted set of 1082 effectors [3] and that *L. maculans* has a long and complex lifecycle we assumed that more complex waves of effector expression might exist. We investigated this hypothesis by two different strategies based on large scale transcriptomic data.



30th Fungal Genetics Conference at Asilomar, March 12, 2019

Deciphering the tripartite interaction *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa*-*Brassica napus*.





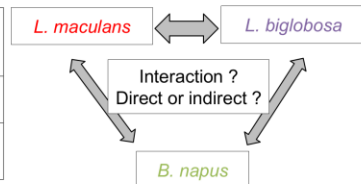

Deciphering the tripartite interaction *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa*-*Brassica napus*

Elise J. Gay^{1,2}, Nicolas Lapalu¹, Thierry Rouxel¹, Marie-Hélène Balesdent¹
¹ UMR BIOGER, INRA, AgroParisTech, Uni Paris-Saclay, Thiverval-Grignon, F-78850, France
² Université Paris-Sud, 91400 Orsay, France

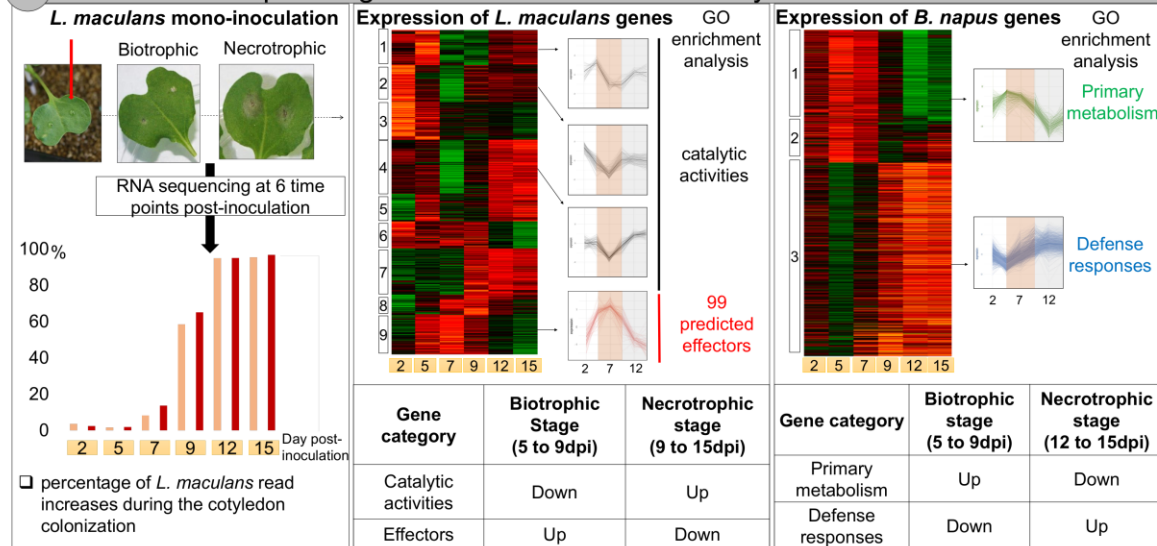
767W



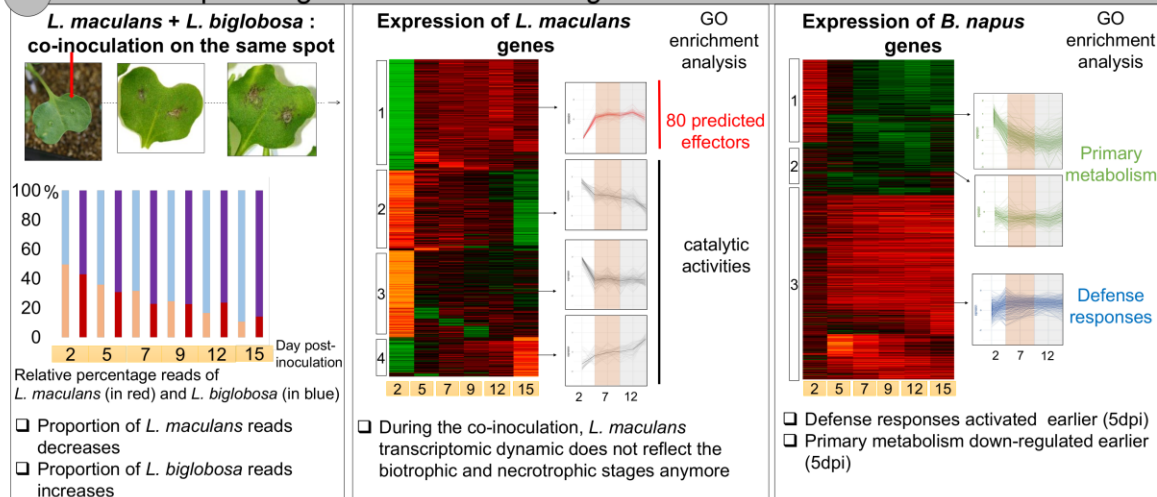
Species Complex [1,2]	Host plant	Symptoms on young leaves	Asymptomatic migration from leaves to stem	Symptoms on stem	Plant responses [3]
<i>L. maculans</i>	<i>B. napus</i>	Hemibiotrophic	Yes	Basis stem canker	Partially known
<i>L. biglobosa</i>	<i>B. napus</i>	Necrotrophic	Yes	Upper necrotic lesions	Unknown



1 RNA sequencing : kinetics of *L. maculans* cotyledons colonization



2 RNA sequencing : kinetics of the *L. biglobosa* and *L. maculans* co-inoculation



3 When co-inoculated : direct or indirect interaction ?

- **Growth competition hypothesis** : *L. biglobosa* grows faster and outcompete *L. maculans* which can not complete its biotrophic stage

□ **Indirect interaction hypothesis** : The plant response to *L. biglobosa* at 5dpi is efficient against *L. maculans*

References : [1] Liu, S.Y et al., 2006, *Plant Pathology* 55: 401-412. ; [2] Fitt et al., 2006, *Eur J Plant Pathol* 114: 3-15; [3] Haddadi et al., 2016, *Molecular Plant Pathology* 17: 1196-1210

Titre : Dissection transcriptomique de la biologie de *Leptosphaeria maculans* lors de ses interactions avec son hôte (le colza) et avec un membre du complexe d'espèces, *Leptosphaeria biglobosa*.

Mots clés : Transcriptomique, Pathogénèse, Coinfection, Complexe d'espèces, *Leptosphaeria*, *Brassica napus*

Résumé : *Leptosphaeria maculans* est un champignon pathogène responsable de la nécrose du collet chez le colza. Son cycle de vie est long et complexe car composé d'une succession d'étapes de colonisation asymptomatiques puis nécrotiques des différents tissus de l'hôte, depuis la colonisation hémibiotrophe des feuilles à l'automne à la nécrose du collet au printemps. Après ces phases infectieuses dans des tissus végétaux vivants, *L. maculans* vit en tant que saprophyte dans les résidus de culture. Jusqu'ici, l'étude des déterminants moléculaires de la pathogénie chez *L. maculans* s'est concentrée sur l'analyse d'une classe spécifique de gènes, codant pour des « effecteurs », et cela durant une seule partie du cycle : l'infection précoce des feuilles. A l'heure actuelle il n'y a pas de vue d'ensemble des gènes impliqués dans la pathogénie durant tout le cycle infectieux. Aussi, le cycle de vie de *L. maculans* est intimement lié à celui de *Leptosphaeria biglobosa*, une espèce proche mais moins pathogène. *L. biglobosa* coinfecte le colza avec *L. maculans* durant tout leur cycle de vie, mais son impact sur *L. maculans* est mal connu. Récemment, 420 échantillons biologiques, collectés durant toutes les étapes du cycle de vie de *L. maculans*, ont été séquencés par RNA-Seq. Ils incluent des conditions *in vitro* et *in planta*, à la fois dans un environnement contrôlé (en coinfection ou non avec *L. biglobosa*) et en conditions d'infection naturelle. Les objectifs de ma thèse étaient :

(i) d'identifier le plus exhaustivement possible, par des approches transcriptomiques, les gènes induits chez *L. maculans* durant l'entièreté de son cycle infectieux et (ii) de déterminer l'impact de l'interaction biotique avec *L. biglobosa*. J'ai d'abord montré que 9 % des gènes prédits chez *L. maculans* sont induits spécifiquement lors de l'infection. Ils sont répartis en huit vagues d'expression redécoupant le cycle tel que décrit dans la littérature et révèlent, pour certains stades, une décomposition transcriptomique encore plus complexe, qui dépend de l'organe colonisé ou du type trophique adopté par le champignon. Je démontre aussi l'importance de la régulation épigénétique puisque toutes les vagues d'expression sont enrichies en gènes localisés dans un environnement génomique de type hétérochromatinien. Lorsque le troisième partenaire, *L. biglobosa*, entre en jeu en début de cycle, l'expression des gènes chez *L. maculans* stagne et est accompagnée de l'arrêt de la colonisation. Cet effet inhibiteur est cependant restreint à des conditions de co-inoculations rarement observées lors des infections naturelles. Mon projet de thèse constitue ainsi une première description transcriptomique du cycle de vie de *L. maculans* dans son intégralité et en interaction avec son environnement biotique.

Title: Transcriptomic dissection of the biology of *Leptosphaeria maculans* during its interactions with its host (oilseed rape) and with a member of the species complex *Leptosphaeria biglobosa*.

Keywords : Transcriptomic, Pathogenesis, Coinfection, Species complex, *Leptosphaeria*, *Brassica napus*

Abstract: *Leptosphaeria maculans* is a pathogenic fungus responsible for the stem canker disease of oilseed rape. Its life cycle is long and complex and is composed of a succession of asymptomatic and necrotic colonisation stages of the host tissues, from the hemibiotrophic colonisation of leaves in autumn to the stem canker development in spring. After these infectious stages on living plant tissue, *L. maculans* survives as a saprophyte within crop residues. So far, the study of the molecular determinants of *L. maculans* pathogenesis was focused on a specific class of genes, encoding "effector" proteins, and focused on the early infection on leaves. At present there is no global view of the genes involved in the pathogenesis during the entire infection cycle. In addition, the life cycle of *L. maculans* is closely related to that of *Leptosphaeria biglobosa*, a closely related, less pathogenic species. *L. biglobosa* co-infects the oilseed rape plants along with *L. maculans* throughout the fungal life cycles, but its impact on *L. maculans* is poorly understood. Recently, 420 biological samples, collected during all stages of the life cycle of *L. maculans*, have been sequenced by RNA-Seq, including *in vitro* and *in planta* conditions, both in controlled environments (whether or not co-infected with *L. biglobosa*) or under natural infection. The objectives of my thesis were:

(i) to identify as exhaustively as possible, using transcriptomic approaches, the genes induced in *L. maculans* during its entire infectious cycle and, (ii) to determine the impact of the biotic interaction with *L. biglobosa*. I first showed that 9% of the predicted genes in *L. maculans* are induced specifically during infection. These are clustered into eight waves of expression, outlining the cycle as described in the literature and revealing, for some stages, a more complex transcriptomic subdivision, depending on the organ infected or on the lifestyle adopted by the fungus. I also demonstrate the importance of epigenetic regulation since all the waves of expression are enriched with genes located in a heterochromatin environment. When the third partner, *L. biglobosa*, co-infects the leaves at the beginning of the cycle, the gene expression in *L. maculans* stagnates and the plant colonisation by *L. maculans* is inhibited. However, this inhibitory effect is conditioned by strict conditions of co-inoculations, rarely observed during natural infections. My thesis project thus constitutes a first transcriptomic description of the life cycle of *L. maculans* in its entirety and in interaction with its biotic environment.