



HAL
open science

Exploitation du répertoire d'effecteurs de *Leptosphaeria maculans* pour une diversification des sources de résistance à la nécrose du collet chez *Brassica napus*

Audren Jiquel

► To cite this version:

Audren Jiquel. Exploitation du répertoire d'effecteurs de *Leptosphaeria maculans* pour une diversification des sources de résistance à la nécrose du collet chez *Brassica napus*. Biologie végétale. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASB032 . tel-03718898

HAL Id: tel-03718898

<https://theses.hal.science/tel-03718898v1>

Submitted on 10 Jul 2022

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.

Exploitation du répertoire d'effecteurs de *Leptosphaeria maculans* pour une diversification des sources de résistance à la nécrose du collet chez *Brassica napus*

Exploitation of the Leptosphaeria maculans effector repertoire for diversification of resistances to blackleg in Brassica napus

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

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 09 juillet 2021, par
Audren JIQUEL

Composition du Jury

Jacqui Shykoff

Directrice de recherche, CNRS, Université Paris-Saclay

Présidente

Charles-Eric DUREL

Directeur de recherche, INRAE, Université d'Angers, Agrocampus Ouest

Rapporteur & Examineur

Véronique DECROOCQ

Directrice de recherche, INRAE, Université de Bordeaux

Rapporteur & Examinatrice

Martine LEFLON

Chef de projet, Terres Inovia

Examinatrice

Direction de la thèse

Thierry ROUXEL

Directeur de Recherche, INRAE, Université Paris-Saclay

Directeur de thèse

Sébastien FAURE

Chef de projet, Innolea

Co-encadrant de thèse

Remerciements

Pour commencer, j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont participé à l'aboutissement de ce projet de thèse, de près ou de loin, par leurs compétences scientifiques et/ou par leur soutien.

Tout d'abord, je souhaite remercier mes directeurs de thèse, Thierry Rouxel et Sébastien Faure, qui m'ont accompagnée durant ses trois années et un peu plus de thèse. Je n'oublie pas Marie-Hélène Balesdent, qui sans être mon encadrante officielle, a tout autant suivi mon projet. Grâce à leur patience, leur soutien et leurs conseils, ces pages sont aujourd'hui écrites. Mener un projet de thèse est une aventure, que je suis heureuse d'avoir partagée avec eux.

De plus, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse : Martine Leflon, Jacqui Shykoff, Véronique Decroocq et Charles-Eric Durel pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Pour leurs conseils avisés, j'aimerais également remercier les membres de mon comité de thèse : Claire Veneault-Fourrey, Benoît Moury et Cyrille Saintenac.

Durant mon projet de thèse, j'ai eu l'occasion de passer deux mois au sein d'Innolea, dont les membres m'ont chaleureusement accueillie. Ainsi, je remercie toute l'équipe Phéno et plus particulièrement Pierre Georges, Justine Mas et Anaëlle Briand pour leur accueil et pour avoir rendu possible ces expériences de criblage. Merci à Anaëlle notamment pour ces nombreuses heures de semis, repiquage, inoculation, notations... qui sont passées bien plus vite en discutant de tout et de rien. Cela n'aurait pas été pareil sans toi. Merci à Xavier pour m'avoir sorti du labo et permis d'enfiler des bottes pour aller dans les essais au champ sur colza, même si contrairement à ce que tu pensais, j'avais déjà été dans des essais au champ ! Merci également à Adrien Fior et Armand Wagner pour leurs conseils et expertise sur la description de la collection de génotypes d'Innolea. Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes travaillant à Innolea qui m'ont accueillie et qui m'ont permis de passer un séjour riche en expérimentations et agréable, malgré la période de confinement.

Passer trois années de thèse dans l'équipe EPLM, c'est un accueil chaleureux, des pauses café très animées et plus ou moins sérieuses. C'est aussi réaliser des inoculations, avec autant de personnes que la salle peut en contenir. Ce temps paraît bien loin, mais rassurez-vous, tôt ou tard cela reviendra ! Je tiens donc à remercier toute l'équipe, c'était un plaisir de venir travailler et de vous voir, notamment en ces périodes troublées de confinements à répétitions. J'aimerais remercier Elise pour son aide avec les analyses transcriptomiques, sans qui tout cela serait resté assez mystérieux, Bénédicte pour les conseils techniques sur des expériences qui refusaient de fonctionner, Laurent qui compte les spores de Lepto plus vite que son ombre et Michel qui m'a fait une place dans son bureau. Un merci également à Colin et Alex pour les débats parfois houleux mais toujours intéressants, et Julie et Mathilde pour les discussions souvent philosophiques.

Je souhaiterais remercier Elise (de nouveau !), Laëtitia, Nacera et la petite dernière Tinh-Suong pour les pauses café, toujours accompagnées de vos conseils bienveillants et de votre soutien moral. J'aimerais également remercier Jessica, Isabelle et Mylène pour le congrès à Saint-Malo, qui fut bien agréable en votre compagnie. De même, je souhaite remercier Valérie pour ce séjour à Glasgow. Assister au congrès MPMI et visiter Glasgow avec une fan de l'Ecosse (que je suis devenue) était très plaisant. Merci également pour ton soutien moral et ta bonne humeur toujours au rendez-vous !

De plus, je souhaite remercier tous les membres de l'unité Bioger. Merci à Anaïs et Clémentine pour les pauses thé et discussions, qui m'ont souvent changé les idées à des moments où j'en avais besoin. Aux nouveaux doctorants, je vous souhaite le meilleur pour la suite de vos thèses. Je remercie également ceux qui sont partis : Arthur, Camille, Guillaume, Lydie, Claire-Line, avec qui j'ai passé de bons moments. Merci également à tous ceux avec qui j'ai eu le plaisir de manger, discuter, marcher, pique-niquer...

Enfin, j'aimerais remercier toute ma famille, mon frère, mes parents, mon compagnon et mes amis, pour m'avoir encouragée, et pour avoir eu l'air intéressé par mon travail. Merci pour votre écoute et votre soutien. Pour tous ces moments qui permettent de se changer les idées et de tenir le cap, merci !

Sommaire

Introduction bibliographique	1
1. Généralités sur les champignons et oomycètes.....	2
1.1. Le règne des champignons.....	2
1.1.1. Phylogénie des organismes filamenteux.....	2
1.1.2. Répartition géographique.....	4
1.2. Interactions des champignons avec le vivant.....	5
1.2.1. Diversité de l'impact des agents phytopathogènes.....	5
1.2.2. Diversité des endophytes.....	8
1.2.3. Diversité des interactions symbiotiques.....	9
1.3. Modes de vie des organismes filamenteux en interaction avec les plantes.....	10
1.3.1. Infection par des agents pathogènes.....	10
1.3.2. Colonisation par les champignons endophytes.....	13
1.3.3. Colonisation par les champignons mycorhiziens.....	14
2. Un pathosystème complexe : <i>Brassica napus</i> - <i>Leptosphaeria maculans</i>.....	16
2.1. Une plante de grande culture : <i>Brassica napus</i>	16
2.1.1. Améliorations génétiques et importance du colza.....	17
2.1.2. Une culture sur plusieurs mois.....	19
2.1.3. Une plante soumise à de multiples bioagresseurs.....	20
2.2. Un champignon hémibiotrophe : <i>Leptosphaeria maculans</i>	21
2.2.1. Impacts sur la culture de colza.....	21
2.2.2. Diversité chez les Dothidéomycètes.....	21
2.3. Un cycle infectieux alternant modes de vie biotrophe et nécrotrophe.....	23
2.4. Contrôle de la maladie.....	25
3. Facteurs de colonisation de la plante.....	26
3.1. Effecteurs : trois types de molécules.....	26
3.1.1. Les petits ARN interférents.....	26
3.1.2. Les métabolites secondaires.....	27
3.1.3. Petites protéines secrétées.....	29

3.2.	Effecteurs : leurs rôles selon le mode de vie du champignon.....	31
3.2.1.	Des sécrétomes liés aux modes de vie.....	31
3.2.2.	Des génomes à plusieurs vitesses	33
3.2.3.	Des vagues d'expression lors de l'infection	36
3.2.4.	Des modes d'action variés.....	39
4.	Facteurs de l'immunité végétale.....	43
4.1.	La résistance qualitative	43
4.1.1.	Le modèle gène-pour-gène	43
4.1.2.	Caractéristiques des gènes et protéines de résistance.....	47
4.2.	La résistance quantitative	50
4.2.1.	Les « Quantitative Trait Loci ».....	50
4.2.2.	Les relations QTLs-QTLs	53
5.	Un système en perpétuelle évolution	55
5.1.	La coévolution hôte-pathogène.....	55
5.2.	Le contournement rapide des résistances	59
5.3.	La recherche de nouvelles sources de résistances.....	62
6.	Objectifs de ce projet.....	64
Chapitre I : Caractérisation d'une interaction gène-pour-gène avec l'effecteur tardif		
LmSTEE98		67
1.	Introduction	68
2.	Article.....	70
3.	Résultats complémentaires.....	117
4.	Matériel et méthodes complémentaires.....	119
Chapitre II : Recherche de nouvelles sources de résistance aux effecteurs tardifs ...		121
1.	Introduction	122
2.	Article.....	125
3.	Résultats complémentaires.....	182
3.1.	Inactivation des effecteurs tardifs par CRISPR-Cas9.....	182
3.2.	Suppression de la mort cellulaire par les effecteurs tardifs	187
4.	Matériel et méthodes complémentaires.....	189

Chapitre III : Caractérisation de la résistance quantitative au champ.....	191
1. Introduction	193
2. Matériel et méthodes.....	195
3. Résultats	198
4. Discussion	216
Discussion et perspectives.....	225
1. Spécificité des effecteurs tardifs de <i>L. maculans</i>.....	228
1.1. Des vagues d'expression spécifiques des effecteurs tardifs	228
1.2. Une localisation génomique dans les isochores GC	231
2. Validation de l'approche de screening	238
2.1. Une approche novatrice et efficace	238
2.2. Les limites de cette approche	240
3. Des interactions gène-pour-gène impliquées dans la résistance quantitative.....	244
3.1. Un effecteur tardif impliqué dans une interaction « gène-pour-gène »	244
3.2. Des formes plus complexes de résistance quantitative	245
4. Durabilité des résistances aux effecteurs tardifs.....	248
4.1. Une capacité d'évolution restreinte.....	248
4.2. Une pression de sélection plus faible	250
5. Valorisation des résistances identifiées	252
5.1. Les criblages de ressources génétiques.....	252
5.2. Comment utiliser les sources de résistance identifiées ?	254
5.3. Comment caractériser les phénotypes intermédiaires et les valoriser ?	256
6. Optimiser l'évaluation de la résistance quantitative	257
Annexes	261
Annexe A : Echantillons du projet de transcriptomique Leptolife / MetaPhoR.....	262
Références	263

Index des figures

Introduction bibliographique

Figure 1 : Phylogénie des Eucaryotes.....	3
Figure 2 : Répartition géographique des communautés fongiques.....	4
Figure 3 : Symptômes causés par des champignons phytopathogènes.....	6
Figure 4 : Colonisation de la plante par les champignons phytopathogènes.....	11
Figure 5 : Colonisation de la plante par les champignons endophytes.....	13
Figure 6 : La colonisation racinaire par les quatre types de champignons mycorrhiziens.....	14
Figure 7 : Croisements interspécifiques entre espèces de <i>Brassicaceae</i>	16
Figure 8 : Importance relative de la culture de colza dans le monde.....	18
Figure 9 : Cycle de culture du colza en Europe de l'Ouest.....	19
Figure 10 : Symptômes de nécroses au collet sur tiges de colza, obtenus expérimentalement.....	21
Figure 11 : Phylogénie des principales classes d'Ascomycètes, focalisé sur les Dothidéomycètes.....	22
Figure 12 : Colonisation du mésophylle foliaire et du pétiole de <i>B. napus</i> par <i>L. maculans</i>	23
Figure 13 : Cycle infectieux de <i>Leptosphaeria maculans</i>	24
Figure 14 : Cluster de biosynthèse de la sirodesmine.....	28
Figure 15 : Tendances liées aux modes de vie dans la composition du sécrétome des champignons.....	32
Figure 16 : Exemple de structure en isochores du génome à deux vitesses de <i>L. maculans</i>	34
Figure 17 : Vagues d'expression d'effecteurs connus et putatifs de <i>L. maculans</i> lors de la colonisation du colza.....	38
Figure 18 : Principaux modes d'action connus des effecteurs fongiques.....	39
Figure 19 : Les différents rôles des effecteurs LysM.....	40
Figure 20 : Immunité végétale lors de l'infection par un champignon.....	44
Figure 21 : Modèle de Flor, illustré par le cas du pathosystème <i>L. maculans</i> / <i>B. napus</i>	45
Figure 22 : Principales classes d'analogues de gènes de résistance.....	48
Figure 23 : Echelle de notation G2.....	51
Figure 24 : Carte physique comparative montrant la relation homéologique entre les gènes sous-jacents aux QTL de résistance au phoma du colza.....	52
Figure 25 : Dichotomie entre résistance qualitative et quantitative, d'un point de vue moléculaire.....	54
Figure 26 : Le modèle zig-zag.....	56
Figure 27 : Comparaison du modèle zig-zag et du modèle d'invasion.....	58

Chapitre I : Caractérisation d'une interaction gène-pour-gène avec l'effecteur tardif LmSTEE98

Article

Figure I.1: Expression of <i>LmSTEE</i> genes in "over-expressed in cotyledons" (OEC) transformants during early stages of cotyledon colonization.....	83
Figure I.2: Resistance response of the rapeseed cultivars 'Yudal' and 'Dariot' to two "late" effector genes.....	85
Figure I.3: Generation of CRISPR-Cas9-mutated versions of <i>LmSTEE98</i> and effect of the mutations on their recognition by <i>RlmSTEE98</i> in cultivar 'Yudal'.....	87
Figure I.4: The inactivation of <i>LmSTEE98</i> by CRISPR-Cas9 method increases stem necrosis in 'Yudal' rapeseed stems.....	88
Figure I.5: Genetic mapping of the resistance gene <i>RlmSTEE98</i> in the 'Darmor-bzh' x 'Yudal' cross.....	89
Figure SI.1: Expression profiles of <i>LmSTEE</i> genes during rapeseed colonization.....	103
Figure SI.2: Mean disease ratings of three rapeseed cultivars following inoculation with <i>L. maculans</i> transformants expressing "late" effector genes in cotyledons.....	104
Figure SI.3: Expression of the mutated <i>LmSTEE98</i> gene in "overexpressed in cotyledons" (OEC) mutants during early stages of cotyledon colonization.....	105
Figure SI.4: <i>In vitro</i> growth and pathogenicity phenotypes of <i>L. maculans</i> <i>LmSTEE98</i> mutants.....	106
Figure SI.5: Expression of <i>LmSTEE98</i> in mutants during stem infection.....	107

Résultats complémentaires

Figure 28 : Localisation cellulaire de l'effecteur LmSTEE98.....	117
Figure 29 : Suppression de la mort cellulaire par LmSTEE98 en système hétérologue.....	118

Chapitre II : Recherche de nouvelles sources de résistance aux effecteurs tardifs

Figure 30 : Heatmap des analogues de gènes de résistance de <i>B. napus</i> lors de l'infection par <i>L. maculans</i>	123
--	-----

Article

Figure II.1: Heatmap representing the clustering of 35 late effector candidates of <i>Leptosphaeria maculans</i> , overexpressed during stem colonization	131
Figure II.2: Expression profiles of 15 late effector genes during cotyledon and stem colonization in controlled conditions.....	133
Figure II.3: Principal Coordinates Analysis of genotype diversity.....	136
Figure II.4: Resistance response of five oilseed rape cultivars towards late effector genes, observed at INRAE.....	138
Figure II.5: Reduced susceptibility of six oilseed rape cultivars towards "late" effector genes, observed at INRAE.....	140
Figure II.6: Genotypic diversity of resistant genotypes.....	142

Figure SII.1: Genes and effectors differentially expressed during stem/petiole colonization compared to cotyledon infection.....	158
Figure SII.2: Selection of 15 late effector candidates.....	158
Figure SII.3: Presence / absence analysis of 15 late effector candidates.....	159
Figure SII.4: Expression values of late effector genes in "over-expressed in cotyledons" (OEC) mutants during early stage of cotyledon colonization.....	160
Figure SII.5: Pathogenicity phenotypes of <i>L. maculans</i> "over-expressed in cotyledons" (OEC) transformants during early stages of cotyledon colonization.....	161
Figure SII.6: Validation of resistance responses of five oilseed rape cultivars towards late effector genes, at Innolea.....	162
Figure SII.7: Reduced susceptibility of six oilseed rape cultivars towards "late" effector genes, observed at INRAE.....	163

Résultats complémentaires

Figure 31 : Séquences protéiques prédites pour chacun des mutants CRISPR-Cas9 sélectionnés.....	183
Figure 32 : Croissance in vitro des mutants de <i>L. maculans</i> , inactivés par la méthode CRISPR-Cas9.....	184
Figure 33 : Phénotypes de pathogénie des mutants de <i>L. maculans</i> , inactivés par CRISPR-Cas9.....	185
Figure 34 : Effet de l'inactivation par CRISPR-Cas9 des six effecteurs candidats.....	186
Figure 35 : Suppression de la mort cellulaire par quatre des six effecteurs tardifs candidats.....	188

Chapitre III : Caractérisation de la résistance quantitative au champ

Figure III.1 : Notes G2 obtenues pour les deux génotypes de <i>B. napus</i> étudiés ici, lors d'essais au champ en 2014 et 2018.....	198
Figure III.2 : Dates de prélèvements ordonnées selon le nombre de degrés-jours à partir du 1er janvier.....	200
Figure III.3 : Profils d'expression des gènes de <i>L. maculans</i> , différenciellement exprimés lors de l'infection en conditions naturelles.....	202
Figure III.4 : Comparaison du nombre de gènes de <i>L. maculans</i> différenciellement exprimés entre années d'expérimentation.....	203
Figure III.5 : Profils d'expression des gènes différenciellement exprimés du cluster de la sirodesmine PL.....	205
Figure III.6 : Profils d'expression des effecteurs précoces et tardifs de <i>L. maculans</i> au champ.....	207
Figure III.7 : Heatmap des gènes de <i>B. napus</i> différenciellement exprimés entre un cultivar sensible et un cultivar présentant de la résistance quantitative en conditions d'infection naturelles.....	210
Figure III.8 : Enrichissement en Gene Ontology pour chacun des neuf clusters d'expression correspondant aux 12 886 gènes différenciellement exprimés entre 'Bristol' et 'Darmor'.....	211
Figure III.9 : Sélection de 11 gènes candidats, marqueurs de la résistance quantitative.....	213
Figure III.10 : Notes G2 des 15 génotypes testés dans le cadre du projet Ephas, en 2018.....	221

Discussion et perspectives

Figure 36 : Modèle théorique et simplifié des vagues d'expression d'effecteurs lors de la colonisation de la tige de colza par <i>Leptosphaeria maculans</i>	227
Figure 37 : Modèle simplifié des vagues d'expression d'effecteurs au cours de l'infection.....	229
Figure 38 : Proportions des différentes marques épigénétiques selon les vagues d'expression d'effecteurs.....	233
Figure 39 : Localisation génomique des six effecteurs tardifs sélectionnés dans ce projet.....	235
Figure 40 : Localisation génomique des cinq effecteurs tardifs <i>LmSTEE</i> et du gène <i>AvrLm4-7</i>	236
Figure 41 : Modèle simplifié des vagues d'expression des RGA au cours de l'infection par <i>L. maculans</i>	242

Index des tables

Introduction bibliographique

Tableau 1 : Relations gène-pour-gène connues entre <i>L. maculans</i> et <i>B. napus</i>	46
Tableau 2 : Sélection de gènes impliqués dans la résistance quantitative et montrant un fort effet phénotypique.....	50
Tableau 3 : Contournement des gènes <i>Rlm</i> de <i>B. napus</i>	61

Chapitre I : Caractérisation d'une interaction gène-pour-gène avec l'effecteur tardif LmSTEE98

Article

Table I.1: Characteristics of the "late" effector candidates of <i>Leptosphaeria maculans</i> studied here.....	80
Table I.2: PCR amplification and high-resolution melting (HRM) analysis of <i>LmSTEE</i> genes in <i>Leptosphaeria maculans</i> isolates.....	81
Table SI.1: Isolates used for polymorphism studies in <i>Leptosphaeria maculans</i> populations.....	108
Table SI.2: List of <i>Brassica napus</i> genotypes screened for resistance.....	111
Table SI.3: List of primers used in this study.....	114
Table SI.4: The top 20 BLAST results for each "late" effector.....	115
Table SI.5: PSI-BLAST results for each late effector against <i>Leptosphaeria biglobosa</i> proteins.....	116
Table SI.6: Cosegregation of resistance to LmSTEE98 and two molecular markers in the 'Darmor-bzh' x 'Yudal' doubled haploid population.....	116

Matériel et méthodes complémentaires

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées pour les expériences complémentaires (Chapitre I).....	119
--	-----

Chapitre II : Recherche de nouvelles sources de résistance aux effecteurs tardifs

Article

Table II.1: Characteristics of the "late" effector candidates studied here.....	132
Table II.2: PCR amplification and sequencing analysis of six effector genes in <i>Leptosphaeria maculans</i> isolates.....	134
Table SII.1: Data from Leptolife project, used for expression profiles of <i>LmSTEE</i> genes.....	164
Table SII. 2: Statistics of differential expression for late effector genes, using RNAseq controlled conditions data from Leptolife project.....	166
Table SII.3: Isolates used for polymorphism studies in <i>Leptosphaeria maculans</i> populations.....	170
Table SII.4: Twenty first BLASTp results details for each selected "late" effector.....	173
Table SII.5: BLASTp results details for each late effector against <i>Leptosphaeria biglobosa</i> proteins.....	174
Table SII.6: List of <i>Brassica napus</i> genotypes screened for resistance.....	175
Table SII.7: Results from the screening of a 130 genotypes collection.....	177

Table SII.8: Results from the confirmation tests for promising interactions.....	180
Table SII.9: List of primers used in this study.....	181

Matériel et méthodes complémentaires

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour les expériences complémentaires (Chapitre II).....	190
---	-----

Chapitre III : Caractérisation de la résistance quantitative au champ

Tableau III.1 : Données brutes de <i>L. maculans</i> issues des projets RNAseq (A) Leptolife et (B) Ephicas.....	199
Tableau III.2 : Données brutes de <i>B. napus</i> issues du projet RNAseq Ephicas.....	209
Tableau III.3 : Enrichissement en analogues de gènes de résistance (RGA) parmi les gènes différentiellement exprimés entre 'Darmor' et 'Bristol'.....	212
Tableau III.4 : Liste des gènes marqueurs candidats.....	215

Discussion et perspectives

Tableau 6 : Localisation génomique et marques chromatiniennes des 11 effecteurs tardifs étudiés.....	234
--	-----

Liste des abréviations

A

AGO : Argonaute

B

BBCH : Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie

C

CAZymes : Carbohydrate-Active enZymes

CC : Coiled-coil

CFEM : Common in Fungal Extracellular Membrane

D

DAMP : Damage Associated Molecular Patterns

DICER

DON : Deoxinivalénol

DPI : days post inoculation

E

EGF : Epidermal growth factor

ET : Elements transposables

ETI : Effector-Triggered Immunity

ETP : epipolythiodioxopiperazine

ETS : Effector-Triggered Susceptibility

F

FPKM : Fragments per kilobase per million mapped reads

G

GWAS : Genome-Wide Association Study

H

HST : Host-Specific-Toxins

HR : Hypersensitive Response

I

IM : Invasion Model

IP : Invasion Patterns

IPC : in planta controlled conditions

IPF : in planta field conditions

IPR : Invasion Patterns Receptors

IPTR : IP-triggered response

J

JAZ : Jasmonate Zim-Domain

Jpi : Jours post-inoculation

L

LRR : Leucine-rich repeats

LysM : Lysine motif

M

MiSSP : Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins

MPH : months post-harvest

MPS : months post-sowing

MTI : MAMP-triggered immunity

MYA : Millions of years

N

NB-LRR : Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat

NBS : Nucleotide-binding site

NEP : Necrosis and Ethylene-inducing Peptide

NHST : Non-Host-Specific-Toxins

NLP : Nep1-Like Protein

NRPS : Non-Ribosomique Peptide Synthetase

O

OEC : Over-expressed in Cotyledons

P

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PKS : Polyketide Synthase

PPS : Petite Protéine Sécrétée

PRR : Pattern-Recognition Receptors

PTI : PAMP-Triggered Immunity

Q

QDR : Quantitative Disease resistance

QTL : Quantitative Trait Loci

R

RALF : Rapid Alkalinization Factor

RF : residues in field conditions

RIP : Repeat-Induced Point mutations

RISC : RNA-induced Silencing Complex

RGA : Resistance Gene Analog

RLCK : Receptor-Like Cytoplasmic Kinase

RLK : Receptor-like Kinase

RLP : Receptor-like protein

ROS : Reactive Oxygen Species

S

SAM : Sélection Assistée par Marqueurs

SP : Secreted Proteins

T

TIR : Toll and interleukin

TM-LRR : Transmembrane Leucine-Rich-Repeat

W

WAK : Wall-Associated Kinase

WAKL : Wall-Associated Kinase-like

Introduction bibliographique

Dans cette introduction bibliographique, des éléments généraux concernant les organismes filamenteux seront abordés dans un premier temps. Ils sont en effet importants pour l'étude du pathosystème *Leptosphaeria maculans* / *Brassica napus*, central à mon projet et développé dans une seconde partie. Les parties suivantes de l'introduction concerneront les organismes filamenteux, avec des exemples plus spécifiques de *L. maculans* ou des *Brassicaceae*.

1. Généralités sur les champignons et oomycètes

Les organismes filamenteux, ici définis comme les champignons « vrais » (*Fungi*) et les oomycètes, sont très diversifiés, par leur répartition géographique, les milieux qu'ils colonisent, les interactions qu'ils entretiennent avec le monde vivant et leurs différents modes de vie. Nous aborderons ces multiples aspects dans cette première partie.

1.1. Le règne des champignons

1.1.1. Phylogénie des organismes filamenteux

Les champignons constituent un règne très vaste, avec actuellement environ 120 000 espèces identifiées (Hawksworth & Lücking, 2017), dont approximativement 10 000 espèces de champignons phytopathogènes (Zeilinger *et al.*, 2016). Toutefois, ce nombre pourrait être très largement sous-estimé. En effet, certaines études portent le nombre d'espèces de champignons à 1,5 millions, voire jusqu'à 10 millions d'espèces fongiques (Blackwell, 2011; Hawksworth & Lücking, 2017).

Sous le terme « champignons » sont classés différents groupes phylogénétiquement assez éloignés, déterminés par compilation de nombreuses études phylogénomiques (Keeling & Burki, 2019). En effet, les oomycètes appartenant aux Stramenopiles, sont distingués des champignons « vrais » ou *Fungi* se situant parmi les Opisthocontes, qui regroupent les champignons et les metazoaires (Figure 1A).

Le règne des *Fungi* est actuellement constitué de huit divisions ; les *Cryptomycota*, les *Microsporidia*, les *Blastocladiomycota*, les *Chytridiomycota*, les *Zoopagomycota*, les *Mucoromycota*, les *Ascomycota* et les *Basidiomycota* (Figure 1B). Ces deux dernières divisions sont celles qui comportent le plus d'espèces fongiques, avec notamment deux tiers des espèces fongiques connues appartenant aux *Ascomycota* (Spatafora *et al.*, 2017; Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019).

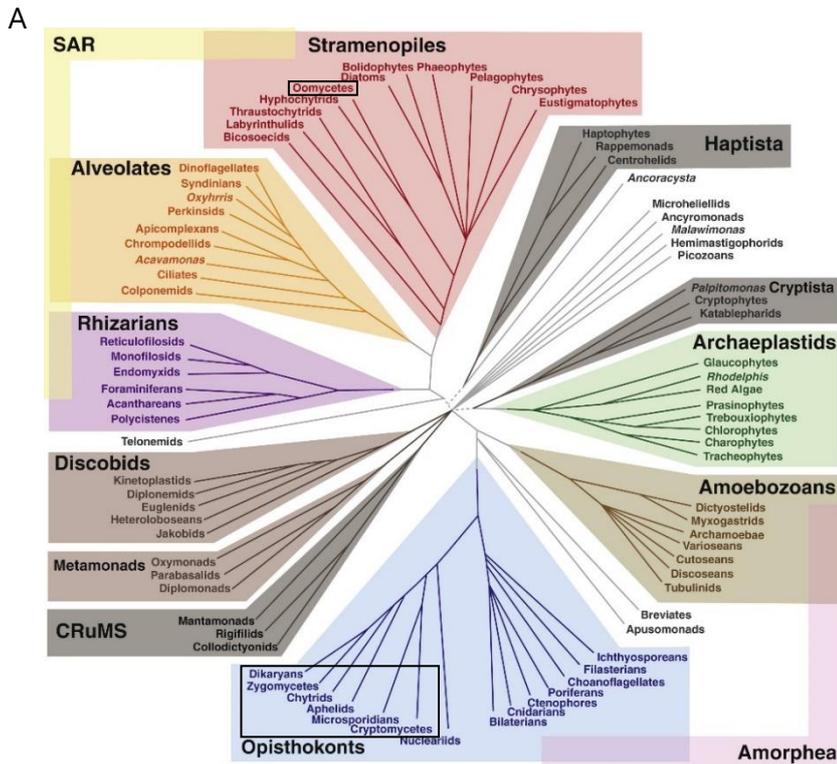
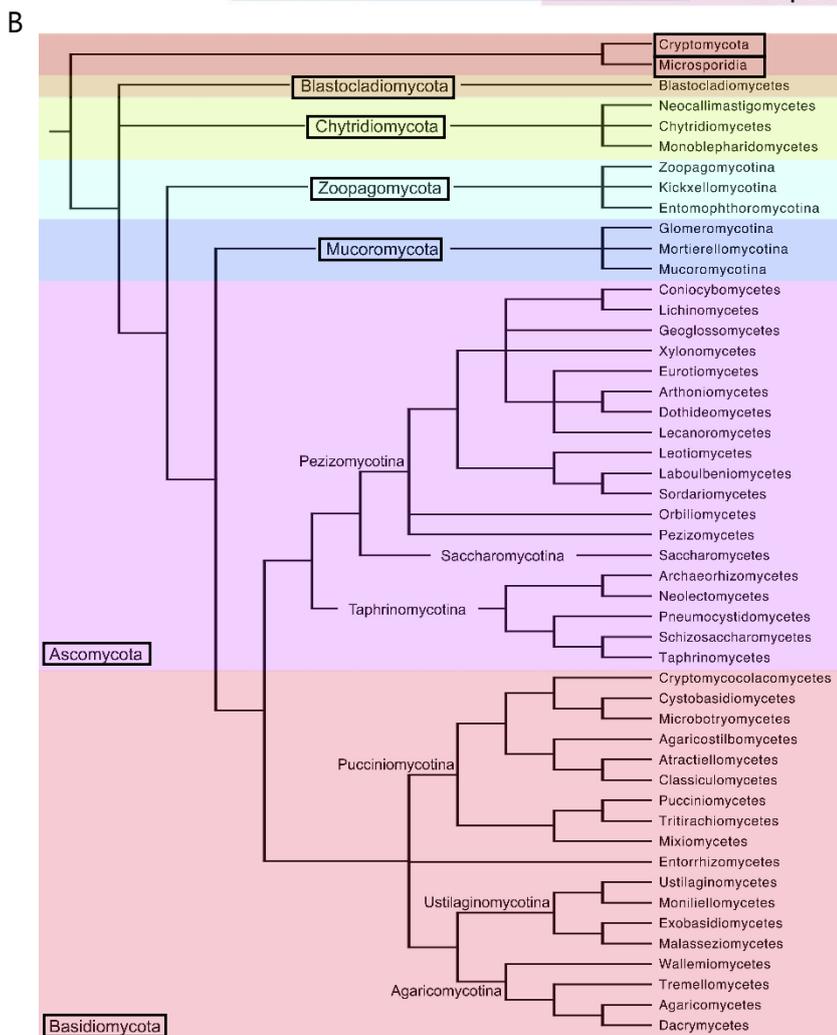


Figure 1 : Phylogénie des Eucaryotes

A) Les groupes consensus sont signalés en couleur, tandis que les groupes plus controversés sont en gris. Les Opisthocoentes, les Amibozoaires et deux petites lignées sont groupés sous le nom « Amorphea ». Les Stramenopiles, les Alveolates et les Rhizariens, forment le supergroupe « SAR ». Oomycètes et *Fungi* sont encadrés en noir (D'après Keeling et Burki, 2019).

(B) Phylogénie du règne des *Fungi*, constitué de huit divisions, encadrées en noir (D'après Spatafora *et al.*, 2017).



1.1.2. Répartition géographique

Organismes décomposeurs, symbiotiques ou bien pathogènes, les organismes filamenteux occupent une grande diversité de milieux et de climats (Figure 2). Une étude récente a permis de regrouper les données disponibles sur les communautés fongiques caractérisées à travers le monde (Větrovský *et al.*, 2020). Ainsi, des communautés fongiques sont présentes sur tous les continents, incluant même l'Antarctique.

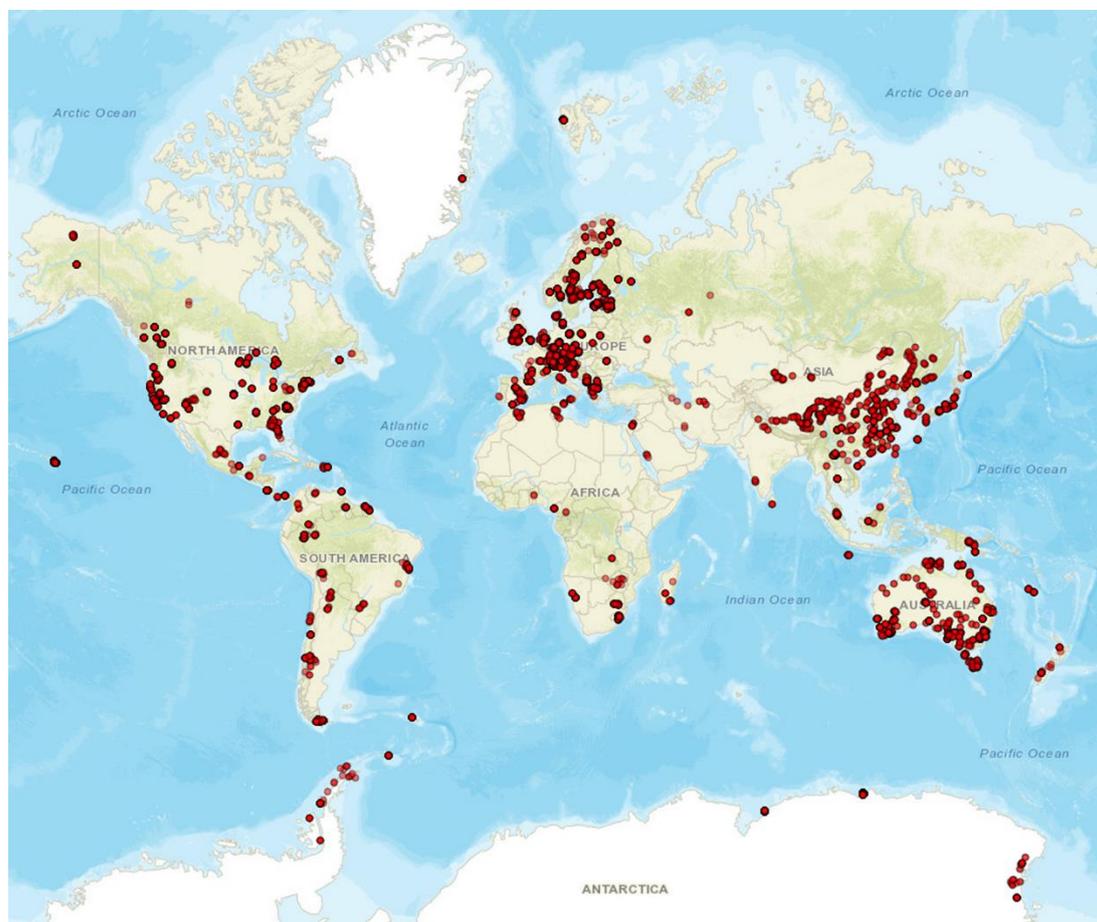


Figure 2 : Répartition géographique des communautés fongiques

Chaque point représente un ou des échantillons pour lesquels la composition de la communauté fongique a été étudiée (D'après Větrovský *et al.*, 2020).

Une méta-analyse compilant de nombreuses études sur le microbiome a révélé l'importance du climat sur la structure des communautés fongiques à l'échelle mondiale (Větrovský *et al.*, 2019). La diversité des champignons semble être plus faible dans les tropiques, avec notamment une richesse en espèces plus faible (nombre d'espèces par unité de surface). Dans les régions tempérées, la diversité fongique est plus importante dans les hautes latitudes. Ainsi, le climat structure les communautés fongiques les plus communes à travers le monde. Les champignons ectomycorhiziens, capables d'établir une symbiose avec certaines espèces végétales (cf. 1.3.1) semblent avoir des niches écologiques plus restreintes que les champignons phytopathogènes. Cela semble dû à leurs besoins optimaux de température et de précipitations plus strictes.

En revanche, la plus faible diversité des plantes hôtes et de leurs conditions de croissance ne semblent pas expliquer cette différence de diversité des niches écologiques entre ectomycorhizes et champignons phytopathogènes. Ces différentes informations sont importantes à prendre en compte pour tenter de prédire l'évolution des communautés de microorganismes, pathogènes ou mutualistes, face aux changements climatiques en cours et à venir (Větrovský *et al.*, 2019).

D'une manière générale, les champignons constituent un règne complexe et diversifié, en termes de milieux colonisés et de mode de vie. Parmi les champignons, les Ascomycètes et notamment les Dothidéomycètes occupent une place importante, ces derniers étant constitués de 19000 espèces, soit 10% des espèces fongiques connues (Schoch *et al.*, 2009).

1.2. Interactions des champignons avec le vivant

Les champignons étant des organismes hétérotrophes, ils ont besoin de sources carbonées externes pour pouvoir produire leur propre énergie, à l'inverse des organismes autotrophes, comme les plantes. Dans cette partie, nous nous focaliserons sur la diversité des champignons pathogènes, endophytes et symbiotiques, sans aborder celle des champignons saprotrophes, qui se nourrissent de matière organique morte.

1.2.1. Diversité de l'impact des agents phytopathogènes

Parmi les maladies des plantes, celles provoquées par les champignons et oomycètes ont le plus d'impact sur les cultures, les organismes filamenteux étant responsables de 70 à 80% d'entre elles (Zeilinger *et al.*, 2016). A l'échelle du globe, les pertes annuelles liées à des maladies fongiques sont estimées à un tiers des récoltes alimentaires. Si de sévères épidémies, causées par des *Fungi* et des oomycètes, touchaient simultanément les cinq cultures principales (riz, blé, maïs, pomme-de-terre et soja), les récoltes, fortement impactées, permettraient de ne nourrir que 39% de la population mondiale (Almeida *et al.*, 2019).

Les maladies des plantes sont de plusieurs types puisqu'elles provoquent des dégâts en culture sur les espèces de grandes cultures, les potagères, mais également les cultures pérennes. D'autres maladies sont dites « maladies de conservation », tandis que d'autres peuvent être indirectement problématiques lors de la consommation de végétaux infectés. Les organes touchés et les symptômes sont très diversifiés d'une maladie fongique à l'autre (Figure 3).

Parmi les grandes cultures, le riz et le blé peuvent être très impactés par certains organismes phytopathogènes. *Magnaporthe oryzae* peut provoquer de 10 à 35% de perte de récolte pour les cultures de riz, tandis que *Puccinia graminis* peut entraîner des pertes pouvant aller jusqu'à 70% des cultures de blé (Fisher *et al.*, 2013). Un exemple historique est celui de *Phytophthora infestans*, causant le mildiou de la pomme de terre, qui a été introduit en Europe dans les années 1840. Originaire du continent américain, cette maladie est tristement connue pour la grande famine qu'elle a engendrée dès 1845, entraînant des centaines de milliers de morts en Irlande tout particulièrement (Yoshida *et al.*, 2013; Goss *et al.*, 2014). De nos jours, cet oomycète phytopathogène provoque toujours des pertes de culture, pouvant aller de 5 à 78% (Fisher *et al.*, 2013).

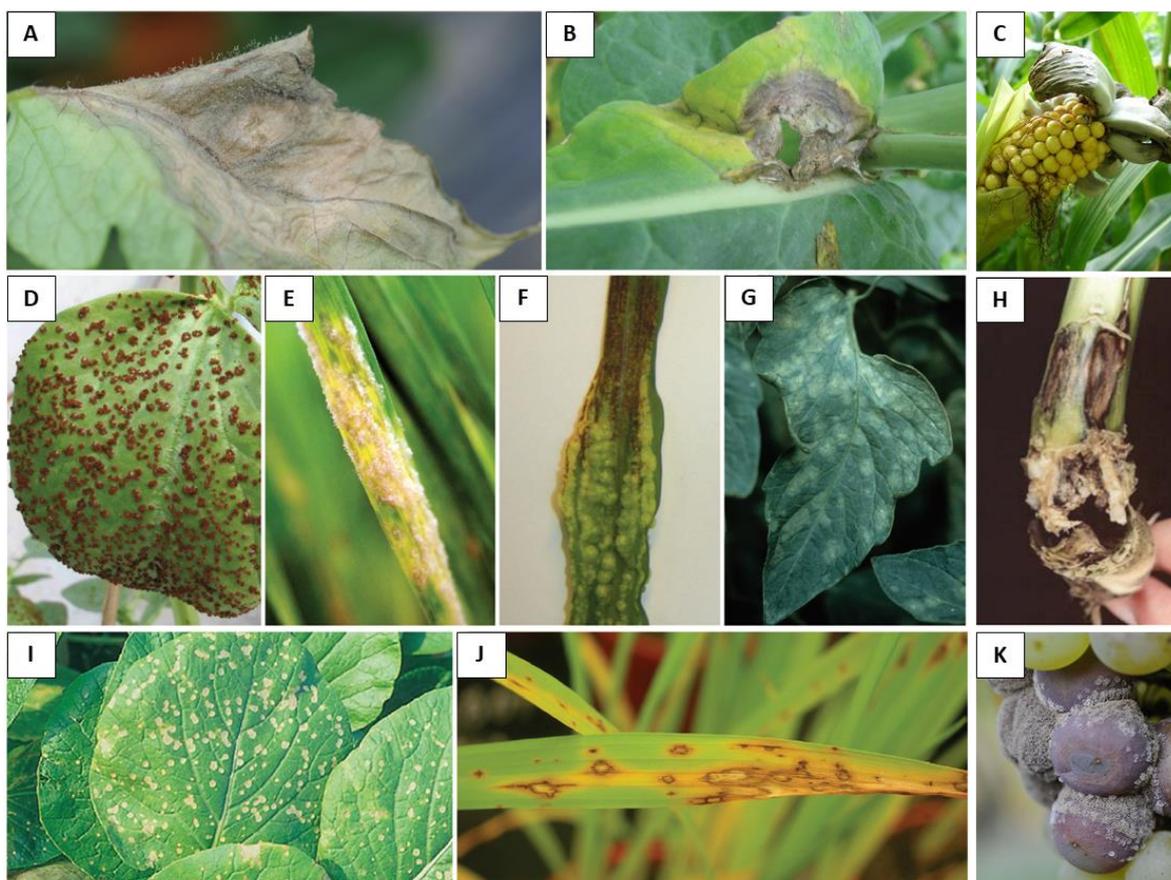


Figure 3 : Symptômes causés par des champignons phytopathogènes

(A) *Botrytis cinerea* infectant la tomate (Lo Presti *et al.*, 2015), (B) *Sclerotinia sclerotiorum* infectant le colza (Lo Presti *et al.*, 2015), (C) *Ustilago maydis* infectant un épi de maïs (K. Hirdes^[1]), (D) *Uromyces viciae-fabae* infectant le pois (Lo Presti *et al.*, 2015), (E) *Blumeria graminis* infectant l'orge (Lo Presti *et al.*, 2015), (F) *Ustilago maydis* infectant les feuilles de maïs (Lo Presti *et al.*, 2015), (G) *Cladosporium fulvum* infectant la tomate (Lo Presti *et al.*, 2015), (H) *Leptosphaeria maculans* infectant le colza (Fitt *et al.*, 2006) (I) *Colletotrichum higginsianum* infectant la moutarde épinard (Lo Presti *et al.*, 2015), (J) *Magnaporthe oryzae* infectant le riz (Lo Presti *et al.*, 2015) et (K) *Botrytis cinerea* infectant le raisin (D. Blancard, INRA^[2]).

Par ailleurs, les organismes filamenteux sont également problématiques sur plantes pérennes. Par exemple, les ormes ont été dévastés par la graphiose, provoquée par le Sordariomycète *Ophiostoma ulmi*. Une première épidémie dans les années 1900 décima 30 à 40% des ormes en Europe. Une seconde épidémie dans les années 1990 entraîna la mort de 30 millions d'ormes, rien qu'en Grande-Bretagne (Brasier & Webber, 2019). D'autres maladies sont problématiques comme la mort subite du chêne provoquée par l'oomycète *Phytophthora ramorum* (Carleson *et al.*, 2015) ou bien le chancre coloré du platane, provoqué par le Sordariomycète *Ceratocystis platani* (Brilli *et al.*, 2020), bien connu pour avoir causé la mort de nombreux platanes le long du canal du midi.

Lors de leur conservation, les récoltes sont encore sujettes aux maladies. Sur fruits, les pertes après-récoltes ont été estimées à 20% aux Etats-Unis et jusqu'à 50% dans les pays en voie de développement, toutes maladies post-récoltes confondues (Dutot *et al.*, 2013). Par exemple, les pommes qui sont conservées jusqu'à plusieurs mois après récolte dans des chambres aux conditions contrôlées peuvent être infectées par plusieurs champignons, dont les plus communs sont *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*. *Mucor piriformis* ou encore *Alternaria alternata* figurent également parmi les maladies post-récoltes problématiques pour les récoltes de pomme (Dutot *et al.*, 2013).

D'autres champignons, en plus d'être dommageables pour les cultures, le sont pour la santé humaine ou pour celle des animaux d'élevages. C'est le cas du Sordariomycète *Claviceps purpurea*, dont les organes de fructification, des sclérotés, contiennent des alcaloïdes toxiques (Menzies & Turkington, 2015). Connus depuis le Moyen-Age pour causer la maladie nommée « mal des ardents » à l'époque, *C. purpurea* semble de nouveau problématique, au Canada notamment. D'une année à l'autre, l'impact de la maladie sur les cultures est variable, allant de 2 à 15% des échantillons de blé dur infectés par des sclérotés, au Saskatchewan (Canada). De même, plusieurs espèces du genre *Fusarium*, agents pathogènes des céréales notamment, produisent des mycotoxines lors de l'infection de l'hôte (Polak-Śliwińska & Paszczyk, 2021). Parmi celles-ci, le déoxinivalénol (DON ou vomitoxine) est un sesquiterpénoïde, toxique pour la plante, qui provoque des vomissements et des ralentissements de croissance chez les animaux et les humains se nourrissant de céréales infectées par *Fusarium* sp. Ainsi, ces champignons phytopathogènes entraînent des pertes de récolte au champ, et en aval de la production, avec notamment des problèmes de santé lorsque les lots de grains dépassent les seuils réglementaires de mycotoxines pour l'alimentation humaine et animale.

1.2.2. Diversité des endophytes

A la différence des agents pathogènes, les champignons endophytes colonisent les feuilles ou les racines de leur hôte sans provoquer de symptômes visibles (Lo Presti *et al.*, 2015). Toutefois, les contours du mode de vie endophyte sont difficiles à établir et peuvent varier selon l'espèce colonisée ou bien selon d'autres facteurs encore mal définis. Certains peuvent ainsi être considérés comme endophytes ou bien comme symbiontes. En revanche, endophytes et champignons mycorhiziens ne mettent pas en place le même type de structure lors de la colonisation de la plante. C'est sur ce critère que peuvent être distingués les endophytes des champignons mycorhiziens (cf. parties 1.3.2 et 1.3.3).

Néanmoins, les endophytes peuvent avoir des effets bénéfiques pour la plante. Par exemple, chez *Epichloë festucae*, la production d'alcaloïdes est induite lors de la colonisation des feuilles de ses hôtes, des *Poaceae*. Ces alcaloïdes jouent un rôle de protection de la plante contre les insectes et les herbivores. Dans les épis de la plante, le mode de vie du champignon peut changer, et il devient pathogène (Tanaka *et al.*, 2012).

De même, les espèces du genre *Trichoderma*, souvent considérées comme des champignons telluriques mais prenant parfois un mode de vie endophyte, sont maintenant utilisées en tant qu'agents de biocontrôle pour la protection des cultures (Mukherjee *et al.*, 2012; Nakkeeran *et al.*, 2016). En effet, ces espèces ont un rôle de protection de l'hôte végétal, par induction des résistances systémiques de la plante, par mycoparasitisme et par production de métabolites antifongiques (Zeilinger & Omann, 2007). Elles améliorent également la résistance aux stress (Zeilinger *et al.*, 2016).

De façon similaire, le champignon endophyte *Piriformospora indica* contribue à la stimulation de la croissance des plantes, atténue les effets des stress salins, et induit les mécanismes de résistance aux agents pathogènes (Lahrmann *et al.*, 2013). A l'inverse, l'infection asymptomatique par les champignons endophytes *Colletotrichum musae* et *Fusarium moniliforme* entraîne une diminution de l'efficacité photosynthétique chez le bananier et le maïs respectivement (Arnold, 2007).

Les interactions entre plantes hôtes et champignons endophytes sont donc assez diversifiées et ne sont pas toutes en faveur de l'hôte.

1.2.3. Diversité des interactions symbiotiques

A la différence des organismes pathogènes ou endophytes, les organismes symbiotiques entretiennent une relation bénéfique avec leur hôte, qui permet aux deux organismes de tirer avantage de cette interaction. Les organismes symbiotiques, en étendant le réseau racinaire de leur hôte, captent dans le sol de l'eau et des nutriments comme le phosphore et l'azote organique, et les fournissent à la plante, en échange de sources de carbone issues de la photosynthèse (Oldroyd, 2013; Zeilinger *et al.*, 2016). Tout comme certains champignons endophytes, les symbioses mycorhiziennes peuvent également avoir un rôle de protection de la plante contre les champignons phytopathogènes telluriques, par compétition directe et indirecte (Wehner *et al.*, 2010).

Parmi les champignons mycorhiziens, il convient de distinguer quatre types de mycorhizes (Brundrett & Tedersoo, 2018). Les deux types les plus étudiés sont les mycorhizes à arbuscules (71% des espèces végétales) ou endomycorhizes et les ectomycorhizes (2%) (Buscot, 2015; Brundrett & Tedersoo, 2018). Deux autres types de mycorhizes sont plus spécifiques. Ce sont les mycorhizes éricoïdes (2%) et les mycorhizes d'orchidées (10%). Concernant les espèces végétales qui ne sont pas associées à l'un de ces quatre types de mycorhizes, 8% d'entre elles sont non-hôtes de champignons mycorhiziens et 7% sont de manière variable non-mycorhizées ou hôtes de champignons endomycorhiziens (Brundrett & Tedersoo, 2018).

Faisant tous partie des Glomeromycotina (division des Mucoromicota), les champignons endomycorhiziens, regroupent environ 300 espèces et constituent la majorité des symbioses mycorhiziennes. Les quelques 6000 espèces de champignons ectomycorhiziens, souvent associées aux arbres des forêts boréales et tempérées (Brundrett & Tedersoo, 2018), eux sont phylogénétiquement diversifiés.

Ainsi, ce mode de vie est présent chez plusieurs classes ; les Pezizomycètes (division des Ascomycètes), les Agaricomycètes (division des Basidiomycètes) et les Mucoromicotina (anciennement Endogonomycètes, division des Mucoromycota), d'après Tedersoo and Smith (2017).

Dans l'étude d'un pathosystème, il est intéressant de savoir si l'espèce végétale en question est capable de former des symbioses mycorhiziennes. Ainsi, les espèces de la famille des *Brassicaceae* sont souvent considérées comme non-hôtes des champignons endomycorhiziens. Toutefois, plusieurs espèces du genre *Thlaspi* sont capables de former des endomycorhizes (Cosme *et al.*, 2018). Parmi les *Brassicaceae* cultivées, *Brassica rapa* est non-hôte, tandis que *Brassica oleracea* et *Brassica napus* sont capables de former des symbioses endomycorhiziennes dites « rudimentaires », respectivement avec *Glomus fasciculatus* (Hirrel *et al.*, 1978) et *Glomus caledonium* (Tommerup, 1984), sans que l'on sache si elles sont totalement fonctionnelles (Cosme *et al.*, 2018).

1.3. Modes de vie des organismes filamenteux en interaction avec les plantes

La diversité des organismes filamenteux va de pair avec la diversité de leurs modes de vie. De même qu'en 1.2, nous aborderons les modes de vie et de colonisation des champignons qui interagissent avec des hôtes végétaux vivants, à l'exclusion donc des champignons au mode de vie saprotrophe.

1.3.1. Infection par des agents pathogènes

Parmi les champignons phytopathogènes, deux modes de vie peuvent être distingués ; la biotrophie et la nécrotrophie. D'un point de vue purement physiologique, les champignons biotrophes sont définis comme des organismes dérivant leur énergie à partir de cellules végétales vivantes, tandis que les champignons nécrotrophes obtiennent leur énergie à partir de cellules dont ils entraînent la mort (Lewis, 1973; Oliver & Ipcho, 2004). Entre champignons biotrophes et nécrotrophes, tout un continuum existe. Ainsi, les champignons hémibiotrophes alternent entre mode de vie biotrophe et nécrotrophe au cours du cycle infectieux (Perfect & Green, 2001). Qu'ils soient biotrophes ou nécrotrophes, les champignons filamenteux sont des organismes hétérotrophes. Ils dépendent donc de substrats carbonés, vivants ou inertes, pour leur développement.

Les champignons phytopathogènes présentent des modes de vie diversifiés, et forment des structures d'infections variées. Chez certains champignons hémibiotrophes comme les Sordariomycètes *Colletotrichum* spp. et *M. oryzae*, un appressorium mélanisé, exerce une forte pression sur la paroi végétale, ce qui permet la pénétration des hyphes dans les cellules végétales et permet ainsi aux hyphes de croître par invagination dans les cellules végétales (Figure 4). Chez certains champignons nécrotrophes, des structures d'infection peuvent également être formées, permettant de pénétrer dans les tissus de la plante par sécrétion d'enzymes de dégradation de la paroi végétale (Lo Presti *et al.*, 2015). Tous les champignons ne développent pas d'appressorium. C'est notamment le cas de l'hémibiotrophe *L. maculans*, qui pénètre dans les tissus par les blessures et les stomates de la plante (Hammond *et al.*, 1985).

Après la pénétration, suit la colonisation des tissus de l'hôte. Les champignons nécrotrophes, comme *B. cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum* tuent les cellules au fur et à mesure de la colonisation, avec dans certains cas, le remplacement des cellules par les hyphes. De façon similaire aux champignons endomycorhiziens, les champignons biotrophes non-apoplastiques forment des haustoria dans les cellules végétales. Ces structures restent entourées de la membrane des cellules végétales, appelée membrane extrahaustoriale. Enfin, certains champignons hémibiotrophes comme *M. oryzae* et *Colletotrichum* spp. développent d'abord des hyphes biotrophes puis des hyphes nécrotrophes, bien plus fins que les premiers (Lo Presti *et al.*, 2015).

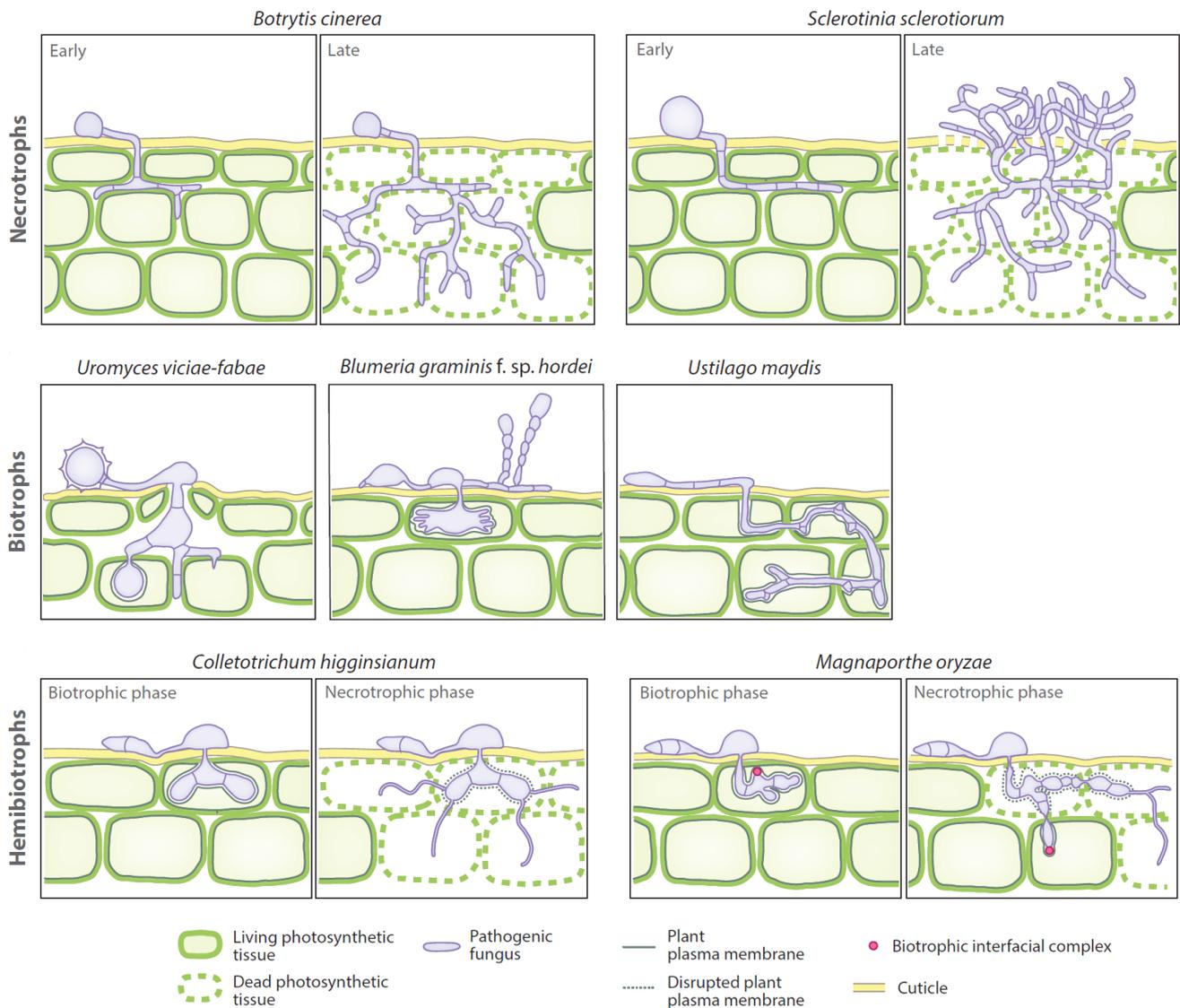


Figure 4 : Colonisation de la plante par les champignons phytopathogènes

Les champignons nécrotrophes tuent les cellules végétales en sécrétant des protéines et des métabolites toxiques. Les champignons biotrophes forment, ou non selon les espèces, un haustorium permettant au champignon de se nourrir. Les champignons hémibiotrophes commencent par une phase biotrophe puis deviennent nécrotrophes (D'après Lo Presti *et al.*, 2015).

Qu'il s'agisse de champignons pathogènes ou symbiotiques, les relations trophiques ou les interactions avec la plante passent par le biais de cocktails de protéines produites par le champignon, nommées effecteurs (cf. partie 3.1), sécrétées soit dans les espaces intercellulaires, soit dans la cellule elle-même. Ce pool de molécules est appelé sécrétome (cf. partie 3.2.1). Les caractéristiques de ce sécrétome semblent dépendantes du mode de vie du champignon. Les champignons nécrotrophes et hémibiotrophes présentent plus d'enzymes de dégradation des parois végétales que les champignons biotrophes et symbiotiques. De même, les champignons ayant le plus grand nombre de protéines sécrétées (notion développée en partie 3), impliquées dans l'infection de la plante, sont surreprésentés parmi les hémibiotrophes. Cela s'explique probablement par le fait qu'ils combinent deux modes de vies (Lo Presti *et al.*, 2015).

Toutefois, certains organismes échappent à cette dichotomie entre agents pathogènes et endophytes / symbiontes. Par exemple, *S. sclerotiorum* est un champignon phytopathogène pour les plantes dicotylédones, comme le colza. En revanche, c'est un champignon endophyte dans les plantes monocotylédones (Tian *et al.*, 2020). Il aurait même un rôle de protection de ces plantes contre *Fusarium* sp. Ainsi, le mode de vie d'une espèce fongique n'est pas figé et peut varier selon l'hôte ou selon d'autres facteurs mal définis.

1.3.2. Colonisation par les champignons endophytes

Les champignons endophytes colonisent généralement de manière biotrophe leur hôte (Lo Presti *et al.*, 2015). Contrairement aux champignons mycorhiziens (cf. partie 1.3.3), ils ne développent pas d'interface spécialisée dans l'échange de minéraux et composés organiques entre la plante et le champignon (Figure 5).

Le mode de vie du champignon peut varier au cours du cycle. Ainsi, *E. festucae* est endophyte et donc biotrophe tant qu'il colonise les feuilles de son hôte. Une fois arrivé au niveau des inflorescences et des épis, il peut devenir nécrotrophe pour effectuer son étape de reproduction sexuée (Tanaka *et al.*, 2012). De même, *P. indica* est considéré comme un endophyte, ou bien un symbionte selon les auteurs.

Tout comme les champignons phytopathogènes, les endophytes produisent également des effecteurs pour coloniser leur hôte (cf. partie 3). Lors de la colonisation biotrophe de l'orge, *P. indica* exprime de nombreux effecteurs, représentant 10% des gènes induits lors de cette phase de colonisation (Lahrmann & Zuccaro, 2012).

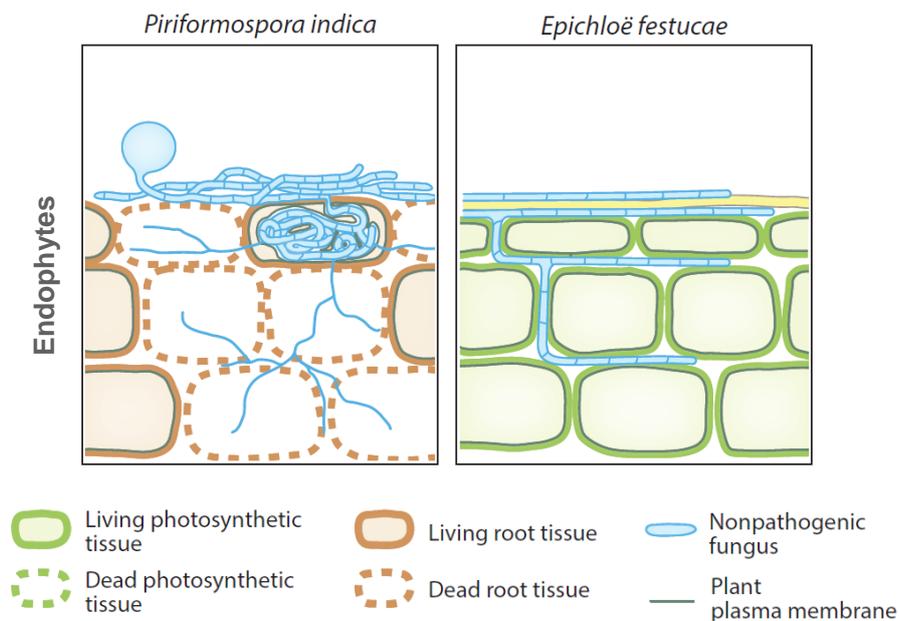


Figure 5 : Colonisation de la plante par les champignons endophytes

Les champignons endophytes peuvent coloniser les racines, tout comme les parties aériennes de la plante et peuvent se développer de façon intracellulaire ou intercellulaire (D'après Lo Presti *et al.*, 2015).

1.3.3. Colonisation par les champignons mycorhiziens

Dans le cadre d'une interaction symbiotique, les deux partenaires ont mutuellement besoin l'un de l'autre. Il est donc indispensable pour le champignon de maintenir vivant l'hôte colonisé. Comme nous l'avons vu dans la partie 1.2.3, il existe quatre types de mycorhizes. Par la suite, nous nous concentrerons sur les deux types de mycorhizes qui concernent les espèces forestières et cultivées notamment ; c'est-à-dire les mycorhizes à arbuscules et les ectomycorhizes (Brundrett & Tedersoo, 2018).

Tout comme les champignons phytopathogènes, les champignons mycorhiziens développent des structures spécialisées lors de la colonisation de l'hôte. Les endomycorhizes sont définies par la formation d'arbuscules dans les cellules du cortex racinaire, et selon les espèces par la formation de vésicules (Figure 6). Les ectomycorhizes quant à elles sont définies par la présence d'un manteau mycélien autour des racines et d'un réseau de « Hartig » entre les cellules racinaires (Brundrett & Tedersoo, 2018).

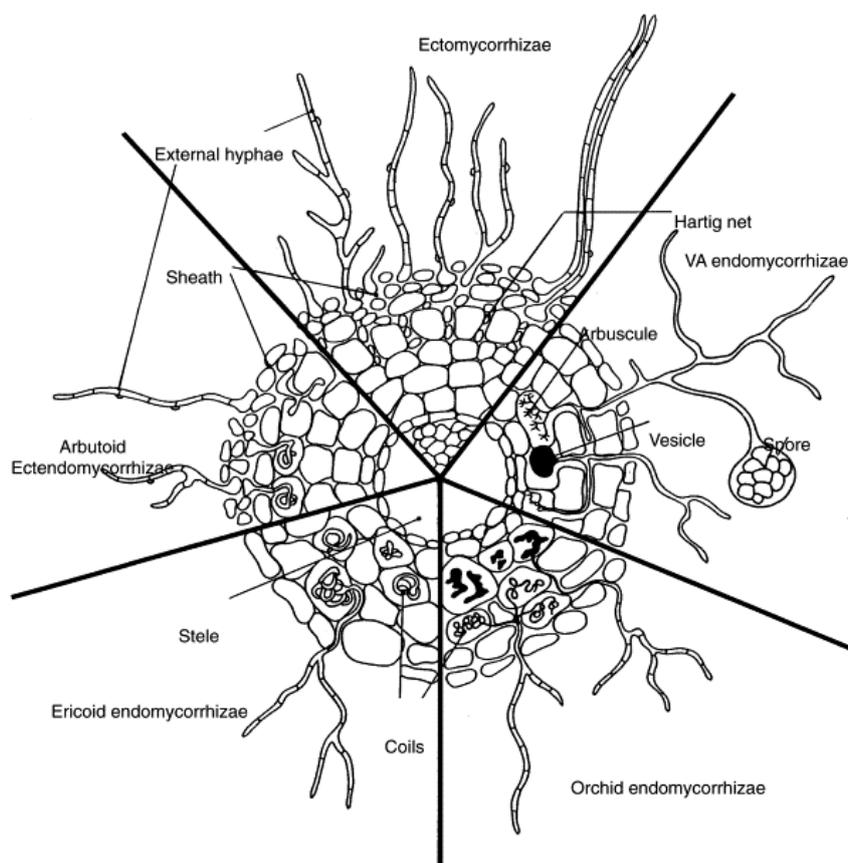


Figure 6 : La colonisation racinaire par les quatre types de champignons mycorhiziens.

Structures formées lors de la colonisation de l'hôte par les quatre types de champignons mycorhiziens, les ectendomycorhizes constituant un type intermédiaire de mycorhizes, entre ectomycorhizes et endomycorhizes (D'après Selosse et Le Tacon, 1998).

Les champignons endomycorhiziens pénètrent dans les tissus végétaux et colonisent de manière intracellulaire les racines de la plante, en formant une structure spécifique nommée hyphopodium (Martin FM. *et al.*, 2017). L'étape de pénétration de l'hôte par les champignons ectomycorhiziens est moins bien connue que celle des champignons endomycorhiziens. Une chose est sûre, elles colonisent uniquement de manière intercellulaire les racines de l'hôte (Martin FM. *et al.*, 2017). Elles ne mettent pas en place de structures différenciées, en dehors des hyphes qui colonisent les racines pour former le réseau de Hartig. A l'inverse, les endomycorhizes forment une structure à l'interface avec les cellules végétales, l'arbuscule. Les arbuscules sont entourés par la membrane périarbusculaire et servent d'interfaces d'échange entre le champignon qui envoie des nutriments à la plante, comme le phosphore et la plante qui en retour envoie du carbone, généralement sous forme d'acides gras (Luginbuehl & Oldroyd, 2017).

Lors de la colonisation de l'hôte par les champignons mycorhiziens, des petites protéines sécrétées permettant la colonisation de l'hôte (notion développée en partie 3) sont surexprimées et ont donc probablement un rôle dans l'établissement de la symbiose. Cela semble être le cas pour les ectomycorhizes, avec l'exemple de *Laccaria bicolor* (Martin F. *et al.*, 2008), mais également pour les mycorhizes à arbuscules, comme chez *Rhizophagus irregularis* (Handa *et al.*, 2015). Chez ce dernier, des changements du sécrétome, correspondant aux petites protéines sécrétées, sont observés selon l'hôte colonisé (Zeng T. *et al.*, 2018).

Ainsi, la diversité des organismes filamenteux s'explique probablement en partie par la diversité des modes de vie et des hôtes colonisés. D'une telle diversité de champignons et d'oomycètes, résulte une diversité de maladies des plantes. L'étude des pathosystèmes d'intérêt est donc indispensable pour comprendre le fonctionnement de ces interactions hôtes / pathogènes, afin de lutter de manière raisonnée et éclairée contre les maladies qui touchent les plantes cultivées.

2. Un pathosystème complexe : *Brassica napus* - *Leptosphaeria maculans*

Afin d'y faire référence par la suite, nous étudierons dans cette partie, les deux membres d'un pathosystème complexe, *Brassica napus* et *Leptosphaeria maculans*, ainsi que leur interaction au cours de la culture. Ainsi, nous verrons tout d'abord l'importance de la culture du colza, et son cycle cultural. Puis, nous nous intéresserons à l'autre membre du pathosystème ; *L. maculans*, en abordant son impact sur la culture, son cycle infectieux et enfin les moyens de lutte pour limiter son impact sur la culture du colza.

2.1. Une plante de grande culture : *Brassica napus*

Dans la famille des *Brassicaceae*, plusieurs espèces sont issues de croisements interspécifiques spontanés, comme décrit dans le triangle de U (Figure 7). *Brassica napus* est une espèce apparue il y a environ 7500 ans (Chalhoub *et al.*, 2014), à l'issue de croisements spontanés, indépendants et en plusieurs lieux, entre la navette, *Brassica rapa* ($2n=AA$) et le chou, *Brassica oleracea* ($2n=CC$). Issu de l'hybridation entre deux espèces diploïdes, le colza est donc une espèce allotétraploïde. Ainsi, plusieurs copies similaires d'un même gène peuvent être présentes dans le génome du colza.

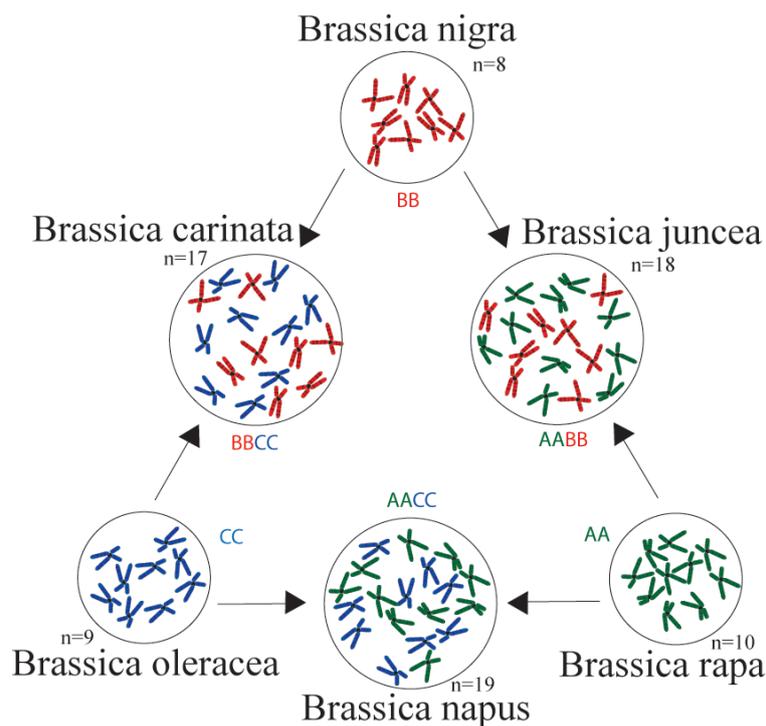


Figure 7 : Croisements interspécifiques entre espèces de *Brassicaceae*

Aux sommets du triangle, figurent les espèces parentes, avec leurs génomes A, B et C respectivement en vert, rouge et bleu. Entre les parents, figurent les espèces descendantes de ces croisements interspécifiques (Triangle de U, 1935).

2.1.1. Améliorations génétiques et importance du colza

La culture du colza en Europe remonterait au Moyen-Age (Hebinger, 2013). A cette époque, l'huile de colza servait à des fins alimentaires, mais également pour l'éclairage et la saponification. Le premier colza était probablement de type semi-hiver (Rahman *et al.*, 2021). Ensuite, les sélectionneurs européens ont développé des colzas d'hiver et des colzas de printemps, afin qu'ils soient adaptés à des conditions environnementales plus diversifiées. A partir du milieu du XX^{ème} siècle, la culture de colza a commencé à se développer en France (Bonneuil & Thomas, 2012).

Dans les années 1960, plusieurs études menées sur des rats alertent sur les risques liés à la consommation d'huile de colza, entraînant des lésions cardiaques (Beare-Rogers *et al.*, 1974). En effet, jusqu'alors l'huile extraite des graines de colza contenait de hautes teneurs en acide érucique (~45%), qui pouvait être responsable de ces lésions cardiaques (Houtsmuller *et al.*, 1970). A la suite de ces études, les programmes de sélection ont eu pour objectif de trouver des génotypes ayant naturellement peu d'acide érucique dans leurs graines. En 1971, la variété française 'Primor' a ainsi été créée, contenant moins de 0,5% d'acide érucique dans l'huile obtenue à partir de ses graines (Jacotot *et al.*, 1978). La variété 'Primor' a donc été utilisée dans la majorité des programmes de sélection suivants, réduisant de fait la diversité génétique des génotypes résultant et entraînant une perte de diversité des gènes de résistance aux maladies et des autres traits agronomiquement intéressants.

Lors de l'extraction d'huile, des sous-produits sont obtenus après trituration des graines de colza. Ce qu'il reste des graines, appelé tourteaux, est utilisé dans l'alimentation des animaux d'élevage. Une dizaine d'années après la création de 'Primor', différentes études ciblaient les glucosinolates contenus dans les graines de colza, et donc dans les tourteaux. Ils diminuent l'appétence (Mawson *et al.*, 1993), provoquent des troubles de l'activité thyroïdienne et diminuent la circulation des hormones thyroïdiennes (Mawson *et al.*, 1994). Dès lors, les efforts de sélection variétale ont été orientés vers des variétés contenant le moins possible de glucosinolates dans leurs graines. La variété 'Bronowski', contenant très peu de glucosinolates, devint la source du caractère « faible teneur en glucosinolates » (Bell, 1982) et permit l'obtention des variétés 'Tower' et 'Candle'. Ainsi, ces variétés et celles qui suivirent sont appelées « double-zéro », car contenant peu d'acide érucique et peu de glucosinolates. Ce sont ces variétés qui ont permis le développement de la culture du colza dans le monde, tout en réduisant encore la diversité originelle.

Parmi les espèces de grande culture, le colza se classe septième en termes de surfaces récoltées dans le monde en 2018 (Figure 8A). Pour cette même année, le Canada, l'Inde, la Chine, l'Australie, la France, la Russie, et l'Allemagne étaient les principaux producteurs de colza, avec 80% des surfaces récoltées dans le monde, soit environ 30 millions d'hectares (Données FAO ^[3]).

En tant que culture oléagineuse, le colza figure en seconde position, avant le tournesol, toutefois loin derrière le soja (Figure 8A). Depuis les années 1960, la culture du colza s'est largement popularisée, passant de six millions d'ha à près de 38 millions d'ha dans le monde (Figure 8B). En parallèle, l'amélioration des variétés et des pratiques culturales a permis de multiplier par 1,75 le rendement des cultures.

Depuis 1995, le biodiesel, issu des huiles de colza, de tournesol et de palme, est incorporé dans le gazole. L'utilisation généralisée de biodiesel dans les carburants fossiles a contribué à l'augmentation des surfaces cultivées en colza depuis les années 2000 (Terres Univia ^[4]).

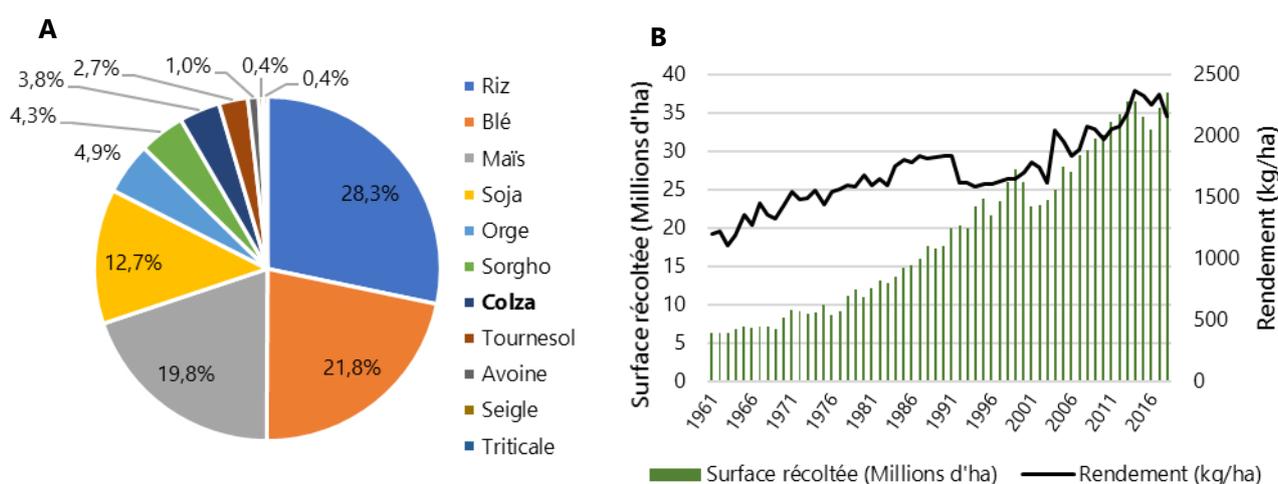


Figure 8 : Importance relative de la culture de colza dans le monde (Données FAO ^[3])

(A) Répartition des surfaces récoltées dans le monde en 2018, pour 11 espèces de grande culture.

(B) Evolution des surfaces récoltées et des rendements mondiaux en colza de 1961 à 2018.

2.1.2. Une culture sur plusieurs mois

Tel qu'il est cultivé en Europe de l'Ouest, le colza d'hiver est une plante de grande culture au cycle long, nécessitant une phase de vernalisation afin de pouvoir fleurir au printemps. Ainsi, semé au milieu de l'été, les plants se développent tout l'automne en restant dans une forme « rosette ». Lorsque les températures augmentent en février-mars, les plantes peuvent reprendre leur croissance, et l'élongation de la tige commence, menant à la formation des inflorescences durant le mois d'avril généralement. Les graines sont récoltées en juillet (Figure 9, Hebinger, 2013). Ce cycle cultural d'environ 10 mois laisse la possibilité à de nombreux bioagresseurs d'attaquer les cultures.

En revanche, toutes les régions ne se prêtent pas à la culture du colza d'hiver. Dans les régions du globe où les températures sont trop basses l'hiver, comme en Europe de l'Est ou bien en Amérique du Nord, des colzas dits de printemps sont cultivés. Ces géotypes ne nécessitent pas de phase de vernalisation et font l'objet de programmes de sélection distincts.

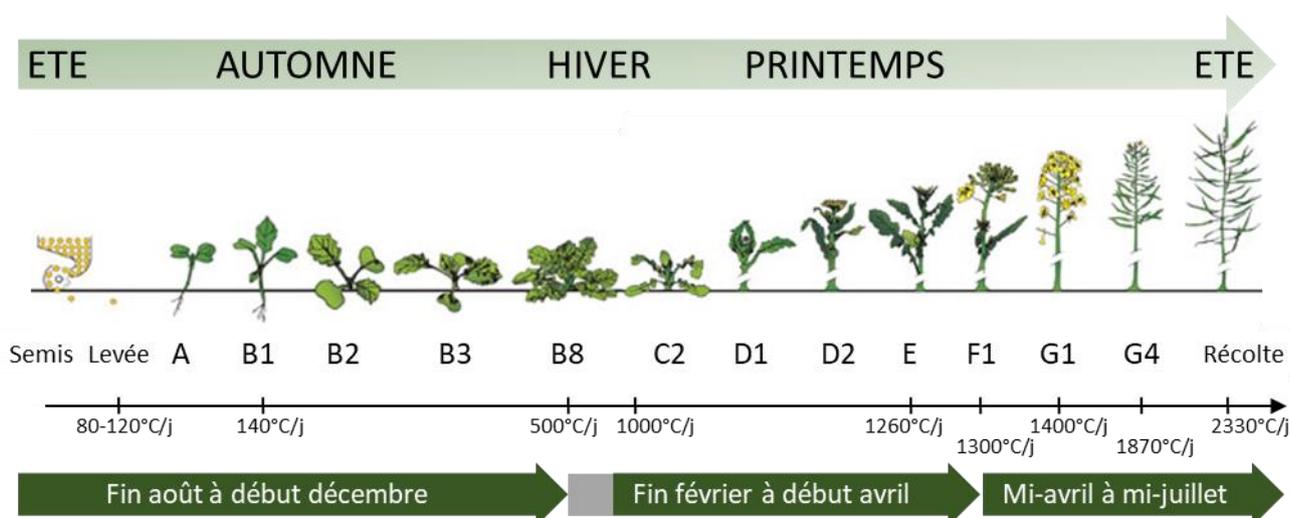


Figure 9 : Cycle de culture du colza en Europe de l'Ouest

Le colza d'hiver ne fleurit qu'après une période de vernalisation de début décembre à fin février. Les valeurs en degrés-jours indiquent la somme des températures nécessaires pour chacun des stades clés de développement des plants de colza (Adapté de Hebinger, 2013 et de l'échelle BBCH, abréviation pour « Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und CHEmische Industrie », source : Syngenta ^[5]).

2.1.3. Une plante soumise à de multiples bioagresseurs

Comme nous l'avons vu précédemment, le cycle de culture du colza d'hiver s'étend de septembre à juillet de l'année suivante. Dès la levée des semis, plusieurs ravageurs peuvent poser problèmes, parmi lesquels nous pouvons citer les limaces, les grosses altises (*Psylliodes chrysocephala*) et les altises des crucifères (*Phyllotreta sp.*).

A l'automne, le charançon du bourgeon terminal (*Ceutorhynchus picitarsis*) pond dans les pétioles du colza. Les larves vont se développer au cœur de la plante durant la phase hivernale de la culture. A la reprise de la végétation, les bourgeons terminaux sont détruits conduisant à des plantes buissonnantes, peu productives. De façon similaire, lors de la phase d'élongation des tiges au printemps, le charançon de la tige du colza (*Ceutorhynchus napi*) pond dans les tiges, ce qui peut conduire à leur éclatement.

Au début de la floraison, les méligèthes (*Meligethes aeneus*) s'attaquent aux boutons floraux avant même leur ouverture, perforant les pétales pour se nourrir du pollen (Source : Terres Inovia^[6]). Les insectes ravageurs peuvent donc causer des pertes importantes, à différentes étapes du cycle de culture du colza.

En parallèle, plusieurs agents phytopathogènes comme *Erysiphe cruciferarum* (oidium), *Cylindrosporium concentricum* (cylindrosporiose), *Mycosphaerella capsellae* et *Pseudocercospora capsellae* (responsables de la maladie des taches blanches), *Alternaria brassicae* ou encore *Plasmodiophora brassicae* (hernie des crucifères) s'attaquent aux cultures de colza. Toutefois, les deux champignons phytopathogènes les plus dommageables sont *S. sclerotiorum* et *L. maculans* (phoma du colza). Le premier est bien contrôlé par une protection fongicide appliquée au moment opportun (stade G1, chute des premiers pétales). L'impact du second en revanche n'est limité, en France tout du moins, que par l'utilisation de variétés génétiquement résistantes au phoma (Source : Terres Inovia^[6]).

2.2. Un champignon hémibiotrophe : *Leptosphaeria maculans*

2.2.1. Impacts sur la culture de colza

Après une longue phase de colonisation asymptomatique de la tige, *L. maculans* provoque une nécrose au collet (Figure 10), qui entraîne une verse parasitaire. Durant les années à forte pression de maladie, *L. maculans* peut provoquer jusqu'à 50% de pertes de rendement sur les variétés sensibles (Fitt *et al.*, 2008, Terres Inovia^[6]). *L. maculans* fait partie d'un complexe d'espèces, incluant une espèce proche, *Leptosphaeria biglobosa* (Mendes-Pereira *et al.*, 2003; Fitt *et al.*, 2006). A l'exception de la Chine, où seule *L. biglobosa* est présente, *L. maculans* et *L. biglobosa* sont retrouvées associées dans tous les organes de la plante (Fitt *et al.*, 2006; Liu Z. *et al.*, 2014a). Toutefois, l'impact de *L. biglobosa* est considéré négligeable par rapport à celui de *L. maculans*. Pour la suite, nous nous focaliserons sur *L. maculans*.

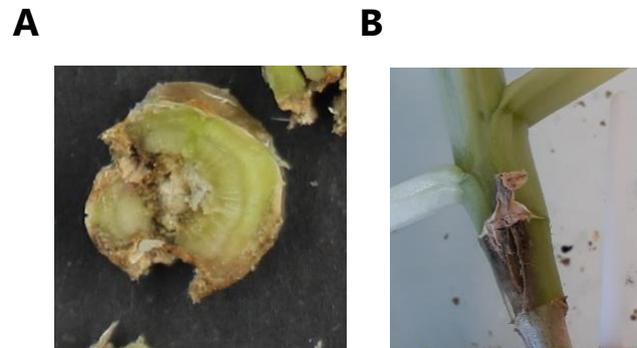


Figure 10 : Symptômes de nécroses au collet sur tiges de colza, obtenus expérimentalement

(A) Coupe transversale. (B) Nécrose externe. Photos : Audren Jiquel, INRAe Bioger, 2018.

2.2.2. Diversité chez les Dothidéomycètes

Le champignon ascomycète *L. maculans* appartient à la classe des Dothidéomycètes et à l'ordre des Pléosporales, dont la phylogénie a été obtenue par analyse des séquences de 19 protéines (Figure 11). Parmi les Dothidéomycètes, se trouvent des champignons aux modes de vie très diversifiés. En effet, on y trouve des champignons phytopathogènes comme *Corynespora cassiicola*, des champignons saprophytes comme *Stagonospora macropycnidia*, mais également des champignons lichénisés comme *Arthopyrenia salicis* (Schoch *et al.*, 2009). Parmi les 356 espèces étudiées par Schoch *et al.* (2009), 73% sont saprophytes, 22% sont associées aux plantes (phytopathogènes, endophytes et symbiontes), 4% sont des champignons lichénisés et 1% ne sont pas classés. A l'origine, l'ancêtre commun des Dothideomycètes était probablement un champignon saprotrophe terrestre (Schoch *et al.*, 2009; Haridas *et al.*, 2020). Très diversifié, l'ordre des Pléosporales correspond à un quart des espèces de Dothidéomycètes (Zhang *et al.*, 2012). Parmi les Pléosporales, se trouvent des espèces épiphytes, endophytes, phytopathogènes, lichénisées, et saprophytes, sans qu'il y ait d'espèces symbiotiques.

L'ordre des Pléosporales est riche en espèces phytopathogènes, incluant notamment plusieurs champignons pathogènes de cultures, tels que *Cochliobolus heterostrophus* (helminthosporiose du maïs), *Pyrenophora tritici-repentis* (maladie des tâches bronzées du blé), *Alternaria brassicicola* (maladie des tâches noires des Brassicaceae), *Zymoseptoria tritici* (septoriose du blé) ou encore *Mycosphaerella fijiensis*, anciennement *Pseudocercospora fijiensis* (cercosporiose noire du bananier), ainsi que *L. maculans* et *L. biglobosa*.

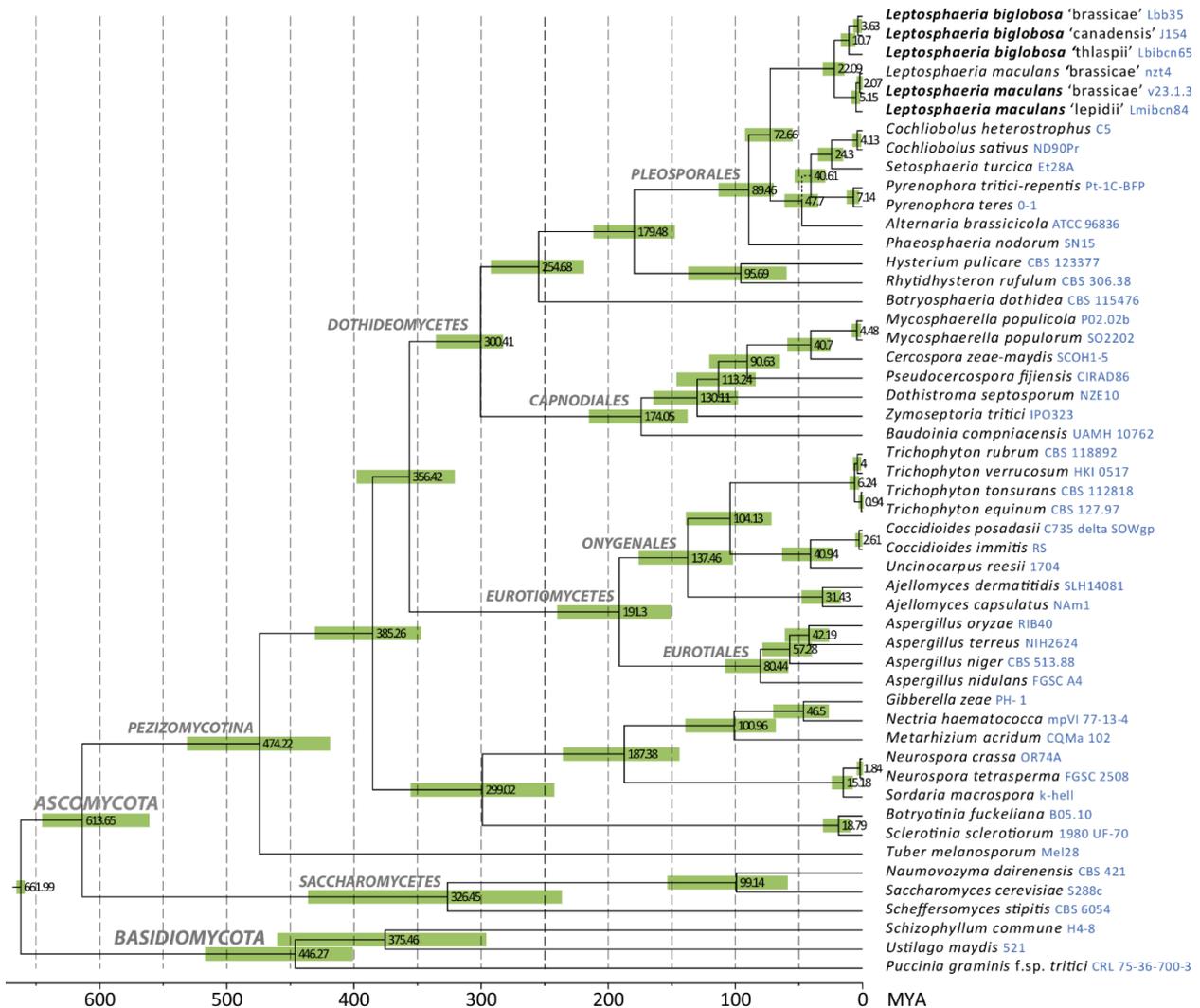


Figure 11 : Phylogénie des principales classes d'Ascomycètes, focalisé sur les Dothidéomycètes

Le chronogramme a été obtenu à partir des séquences de 19 protéines tronquées. Les nombres au niveau des embranchements indiquent l'âge du nœud en millions d'années (MYA) (D'après Grandaubert *et al.*, 2014).

2.3. Un cycle infectieux alternant modes de vie biotrophe et nécrotrophe

L. maculans est un champignon phytopathogène s'attaquant aux *Brassicaceae*. Parmi les espèces du triangle de U (Figure 7), il peut infecter plusieurs espèces comme *Brassica juncea* (moutarde brune), *Brassica nigra* (moutarde noire), *Brassica olearacea* (chou) et *Brassica rapa* (navette). *Sinapis alba* (moutarde blanche) et *Raphanus sativus* (radis) sont également des hôtes de *L. maculans* (Li *et al.*, 2005). Toutefois, c'est sur le colza qu'il est le plus dommageable.

En Europe de l'Ouest, le cycle infectieux de *L. maculans* est synchronisé avec le cycle de culture du colza d'hiver, et alterne à plusieurs reprises entre des modes de vie saprotrophe, endophyte, biotrophe et nécrotrophe (Figure 13).

A la fin de l'été, le champignon se développe en tant que saprophyte sur les résidus de culture, où il effectue sa reproduction sexuée. A l'issue de cette phase, les premières structures d'infection sont produites ; les ascospores formées dans les pseudothèces (West *et al.*, 2001; Rouxel & Balesdent, 2005). Ces spores expulsées à maturité sont ensuite véhiculées par le vent. La plupart ne parcourt pas plus d'un kilomètre (West & Fitt, 2005). Dès l'automne, les ascospores peuvent infecter les cotylédons et feuilles de colza. Après germination des ascospores sur les feuilles, les hyphes pénètrent par les stomates ou bien les blessures et colonisent l'espace intercellulaire du mésophylle foliaire, comme l'illustre la Figure 12 (Hammond *et al.*, 1985).

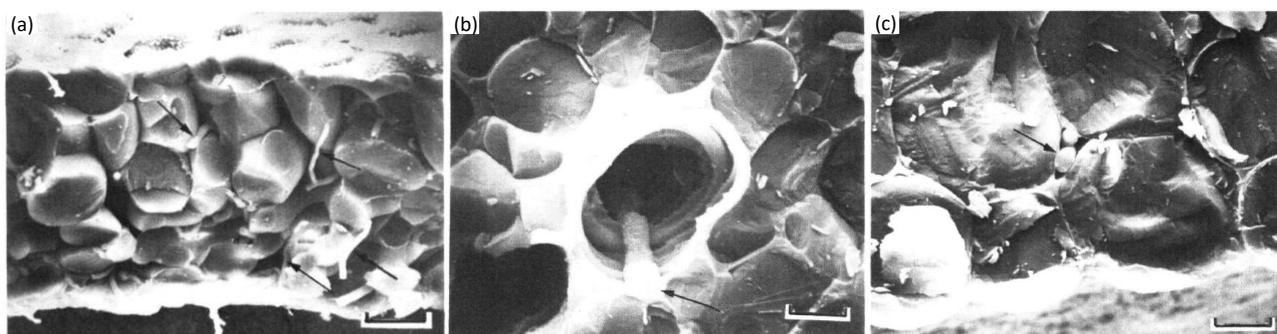


Figure 12 : Colonisation du mésophylle foliaire et du pétiole de *B. napus* par *L. maculans*

Images obtenues par microscopie électronique à balayage, mettant en évidence des hyphes fongiques, indiqués par les flèches noires. (a) Hyphes intercellulaires colonisant le mésophylle foliaire. (b) Hyphe colonisant le pétiole via un vaisseau du xylème. (c) Hyphes colonisant l'espace intercellulaire du cortex (D'après Hammond *et al.*, 1985).

A ce stade, le champignon est dans une phase biotrophe. Ensuite, il passe à une phase nécrotrophe durant laquelle il va induire la formation de macules foliaires. Sur ces macules, vont se former des pycnides, contenant des pycnidiospores, les structures de multiplication asexuée de *L. maculans*. Ces pycnides constituent l'inoculum secondaire, pouvant infecter d'autres feuilles par « splashing » à courte distance (West *et al.*, 2001).

A partir des macules, les hyphes se propagent vers le pétiole des feuilles, en passant par les vaisseaux

du xylème et entre les cellules du parenchyme et du cortex (Figure10, Hammond *et al.*, 1985). Pendant la période hivernale, la colonisation se poursuit de la même manière le long des pétioles et de la tige, vers le collet de la plante. A ce stade, le champignon, colonisant la tige de manière asymptotique, est considéré comme endophyte.

En fin de cycle cultural, entre mai et juillet, le champignon redevient nécrotrophe et provoque la formation de nécroses au niveau du collet, pouvant aller jusqu'à provoquer la verse des plantes et donc des pertes de rendement. Durant tout son cycle infectieux, *L. maculans* ne se développe que dans l'apoplasme, ne différencie aucune structure d'infection et ne pénètre pas dans les cellules végétales (Hammond *et al.*, 1985).

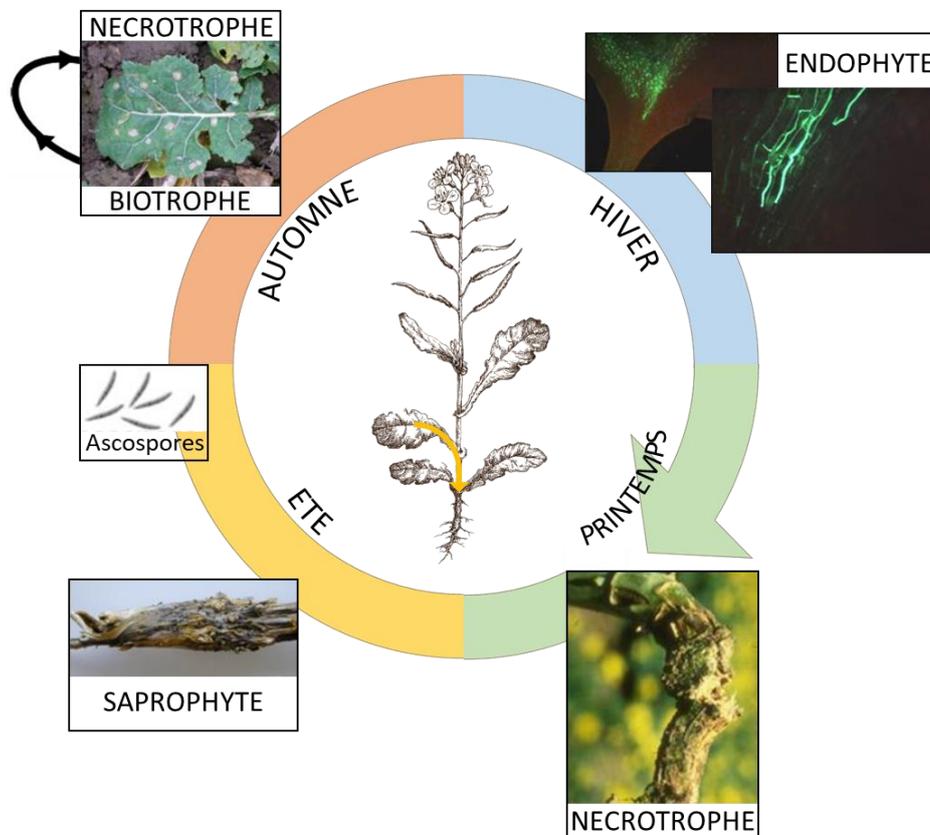


Figure 13 : Cycle infectieux de *Leptosphaeria maculans*

La phase de reproduction sexuée de *L. maculans* s'effectue sur les résidus de culture à l'automne. Les ascospores produites infectent les feuilles de colza. Des macules se forment sur les feuilles. Ensuite, le champignon colonise le pétiole et la tige en direction du collet, lors d'une phase asymptotique durant tout l'hiver. Au printemps, il provoque la formation de nécroses du collet, conduisant à la verse des plantes (Adapté de Rouxel et Balesdent, 2005).

2.4. Contrôle de la maladie

Pour limiter les impacts du phoma du colza, l'une des premières solutions pourrait être l'emploi de fongicides. Seulement, avec un cycle infectieux complexe comme celui de *L. maculans*, l'utilisation de fongicides n'est pas si aisée. En effet, nous avons vu que l'inoculum primaire provient des ascospores produites sur les résidus de culture. En Europe de l'ouest elles sont libérées régulièrement après les pluies de septembre à avril (West *et al.*, 2001). Pour une protection efficace, il faudrait donc appliquer régulièrement des fongicides et réussir à faire coïncider les applications avec les pics de libération des ascospores. De plus, lorsque le champignon a réussi à infecter les feuilles et à entrer dans la plante, les traitements antifongiques ne sont plus efficaces. Pour ces raisons, les fongicides sont très peu utilisés pour lutter contre le phoma, en tout cas en France.

Puisque l'inoculum primaire provient des résidus de culture, leur enfouissement après la récolte pourrait être un bon moyen de lutte contre le phoma. Seulement, certaines pratiques culturales bénéfiques pour un pathosystème peuvent être néfastes pour un autre. En effet, le labour conventionnel, avec retournement du sol entraîne une diminution de la survie et de l'émergence des insectes parasitoïdes des méligèthes, ravageurs des boutons floraux de colza (Nilsson, 2010; Rusch *et al.*, 2011). De plus, les labours profonds permettant d'enfouir les résidus de culture sont de moins en moins utilisés, en agroécologie notamment, du fait de leur impact environnemental (dépense énergétique, érosion des sols, perte de biodiversité). Après les cultures de colza, l'enfouissement des résidus de culture est de moins en moins pratiqué.

Finalement, la lutte génétique, en cultivant des génotypes résistants, est le moyen le plus efficace et donc le plus employé pour contrôler le phoma du colza. Il est donc indispensable de caractériser les mécanismes et molécules impliquées dans les interactions entre *B. napus* et *L. maculans*, dans l'objectif d'identifier de nouvelles sources de résistance. Nous commencerons par les molécules sécrétées par *L. maculans* lors de l'infection.

3. Facteurs de colonisation de la plante

En interaction avec les plantes, les champignons sécrètent des molécules qui permettent de moduler les réponses de l'hôte afin de promouvoir la colonisation de ce dernier. Dans cette partie, nous verrons donc les différents types de molécules qui permettent aux champignons de coloniser la plante, ainsi que les rôles et modes d'actions très diversifiés de ces molécules.

3.1. Effecteurs : trois types de molécules

Comme nous l'avons déjà vu, les plantes peuvent être colonisées par des champignons aux modes de vie diversifiés, tels que des champignons symbiotiques, endophytes, biotrophes ou bien nécrotrophes. Tous déploient un arsenal de molécules qui leur permet de coloniser ou d'infecter la plante, selon le champignon, l'hôte et parfois le stade d'infection.

Ces molécules qui permettent de promouvoir l'infection et spécifiquement exprimées dans la plante, sont appelées des effecteurs (Lo Presti *et al.*, 2015). Il peut s'agir de petits ARNs non codants, de métabolites secondaires ou bien de petites protéines sécrétées (PPS). Nous allons détailler les spécificités de chacun de ces types d'effecteurs.

3.1.1. Les petits ARN interférents

Chez les Eucaryotes, les petits ARN sont définis comme des ARN non-codants de petite taille (20 à 30 nucléotides), incluant les petits ARN interférents et les micro-ARN (Zeng J. *et al.*, 2019). Les petits ARN participent au mécanisme de régulation négative de l'expression des gènes, par « RNA interférence » ou RNAi. Dans la cellule, ils sont préparés par l'enzyme DICER, puis liés aux protéines « Argonaute » (AGO) et ensuite incorporés au complexe RISC (« RNA-induced silencing complex »). Dans la majorité des cas, ils entraînent la régulation négative des gènes ciblés (Zeng J. *et al.*, 2019).

L'importance des petits ARN chez les champignons phytopathogènes a été découvert assez récemment, avec le cas de *B. cinerea* (Weiberg *et al.*, 2013). En effet, ce champignon phytopathogène au large spectre d'hôtes (~200 espèces) sécrète des petits ARN dans les cellules de l'hôte, lesquels piratent la machinerie de « silencing » de l'hôte, tels que *Arabidopsis* ou la tomate (Weiberg *et al.*, 2013). En se fixant aux protéines Argonaute, les petits ARN de *B. cinerea* (*Bc*-sRNAs) induisent le « silencing » des gènes de défense de la plante, nommé « Cross-kingdom RNAi ». Par exemple, le petit ARN *Bc*-siR37 ciblerait au moins 15 gènes d'*Arabidopsis*, tels que des facteurs de transcription (WRKY), des récepteurs (« Receptor-like kinases ») et des enzymes de modification de la paroi (Wang M. *et al.*, 2017b).

Par la suite, d'autres cas ont été identifiés chez les champignons phytopathogènes, comme par exemple chez le biotrophe *Puccinia striiformis* infectant le blé (Mueth *et al.*, 2015). L'effecteur de type micro-ARN *Pst*-miR1 induit le silencing du gène PR2 (« Pathogenesis-Related 2 »), impliqué dans les défenses immunitaires du blé (Wang B. *et al.*, 2017a).

Chez les espèces du genre *Phytophthora*, une véritable course à l'armement semble s'être développée entre les petits ARN de l'agent pathogène et ceux sécrétés par la plante, ciblant certains gènes de l'oomycète (Hou *et al.*, 2019).

3.1.2. Les métabolites secondaires

Lors d'interactions avec d'autres organismes, notamment leur hôte végétal, les champignons nécrotrophes produisent des métabolites dits secondaires ou bien spécialisés (Stergiopoulos *et al.*, 2013). Nous ne détaillerons ici que les métabolites secondaires impliqués dans la pathogénie des organismes filamenteux. Ces métabolites secondaires, de faible poids moléculaire, sont généralement des polycétides, des peptides non-ribosomiques, des alcaloïdes ou des terpènes. Parmi les métabolites spécialisés, les phytotoxines sont classées selon leur spécificité d'hôte. Ainsi, les toxines affectant un large spectre d'espèces végétales sont nommées « Non-Host-Specific-Toxins » (NHST), tandis que celles qui affectent spécifiquement une espèce végétale, voire seulement certains génotypes de cette espèce sont nommées « Host-Specific-Toxins » (HST). La synthèse des métabolites secondaires nécessite plusieurs étapes enzymatiques, dont les gènes codant ces enzymes sont organisés en clusters (Stergiopoulos *et al.*, 2013). Ces clusters de gènes contiennent généralement une enzyme clé, telles que les polycétides synthases (PKS), les peptides synthétases non-ribosomiques (NRPS) ou les terpènes cyclases.

Les mécanismes d'action des métabolites spécialisés sont multiples, allant de la toxicité à la manipulation de l'immunité végétale, en passant par la manipulation du niveau hormonal de la plante. Comme nous l'avons vu dans la partie 1.2.1, certains métabolites secondaires s'avèrent être des mycotoxines, comme les alcaloïdes de *C. purpurea* ou bien les terpènes produits par les espèces du genre *Fusarium*, et sont impliqués dans la pathogénie.

Chez *B. cinerea*, huit familles de métabolites secondaires, et 40 clusters de gènes ont déjà été identifiés (Collado & Viaud, 2015). Parmi ces métabolites secondaires, deux phytotoxines non-spécifiques participant à la pathogénie de *B. cinerea* ont été identifiées, le botrydial et l'acide botcinique (Dalmais *et al.*, 2011). Leurs clusters de gènes présentent des similarités de régulation de leur expression (Porquier *et al.*, 2019). En effet, ces deux clusters sont chacun régulés par un facteur de transcription de type Zn₂Cys₆. Ils sont également régulés par un même facteur de transcription, BcYoh1 impliqué dans la régulation de 22 clusters de métabolites secondaires.

Le botrydial, produit lors de l'infection de l'hôte provoque des chloroses et un effondrement des cellules (Dalmais *et al.*, 2011). L'acide botcinique entraîne aussi la formation de chloroses et de nécroses. En revanche, il possède également une activité antifongique.

Une grande majorité des champignons phytopathogènes produisent des hormones végétales, comme les gibbérellines, les auxines, les cytokinines ou encore l'acide abscissique (Collemare *et al.*, 2019). Produire des hormones végétales perturbe le statut hormonal et les voies de signalisation hormonales de l'hôte, favorisant ainsi l'infection par l'agent phytopathogène. Par exemple, lors de l'infection du riz par *Fusarium fujikuroi*, le champignon produit des gibbérellines, entraînant une croissance démesurée des plantes, favorable à l'infection par *F. fujikuroi* (Cen *et al.*, 2020).

De plus, de nombreux métabolites spécialisés présentent des fonctions similaires à celles des effecteurs protéiques (Collemare *et al.*, 2019). Par exemple, les cytochalasanes inhibent la polymérisation de l'actine et le déoxinivalénol interfère avec la biosynthèse de protéines.

En tant que champignon hémibiotrophe, *L. maculans* produit également des métabolites secondaires lors des phases nécrotrophes de son cycle infectieux (Figure 14). Le cluster de gènes permettant la production de la sirodesmine PL (une epipolythiopiperazinedione ou ETP) a été identifié et caractérisé par Gardiner *et al.*, (2004). Pour la production de cette phytotoxine non spécifique de l'hôte, dix-huit gènes seraient impliqués. Le mutant *sirP*, incapable de produire de la sirodesmine colonise moins efficacement la tige du colza, en termes de biomasse mesurée par PCR quantitative, et présente une activité antibactérienne et antifongique plus faible que la souche témoin (Elliott *et al.*, 2007, 2011). La régulation de la production de la sirodesmine est liée au facteur de transcription *sirZ* et au gène *cpcA* (Fox *et al.*, 2008; Elliott *et al.*, 2011). La sirodesmine, et les ETP d'une manière plus générale seraient impliquées dans la production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS, toxiques pour les cellules végétales (Gardiner *et al.*, 2004). Parmi les ETP, la phomalirazine a été identifiée chez *L. maculans* (Pedras *et al.*, 1989). Elle serait un intermédiaire dans la biosynthèse de la sirodesmine (Welch & Williams, 2014). Lors de l'infection du colza par *L. maculans*, 16 gènes du cluster de la sirodesmine, dont un gène NRPS, sont positivement régulés et sont associés à la phase de nécrotrophie en tige (vague 6 de Gay *et al.*, 2021).

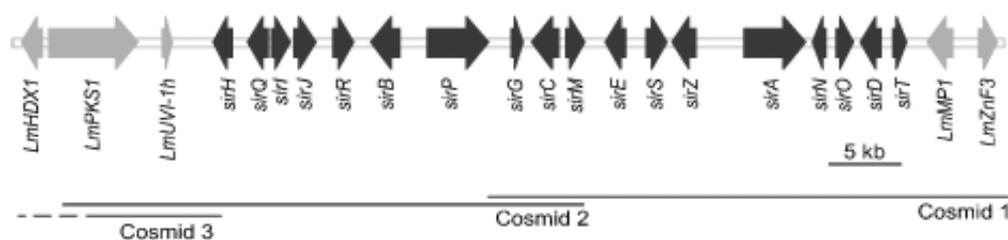


Figure 14 : Cluster de biosynthèse de la sirodesmine

En noir, figurent les gènes du cluster et en gris, les gènes voisins (D'après Gardiner *et al.*, 2004).

L'acide phoménoïque est un second métabolite secondaire étudié chez *L. maculans*. Produit lors de l'infection des tiges de colza, il n'est pas indispensable à la pathogénie. En revanche, il est toxique pour *L. biglobosa* et pourrait donc permettre à *L. maculans* de concurrencer *L. biglobosa* lors de la colonisation de la tige (Elliott *et al.*, 2013). Lors de l'infection, l'expression du gène PKS impliqué dans la production d'acide phoménoïque corrèle avec celle des gènes liés à la phase nécrotrophe de la tige (vague 6 de Gay *et al.*, 2021).

De plus, *L. maculans* produit également de l'acide abscissique lors de l'infection de la plante. La mutation de deux des sept gènes du cluster n'impacte pas la pathogénie des deux mutants, lors de l'infection des cotylédons, des pétioles et des tiges (Darma *et al.*, 2019). Par ailleurs, la PKS permettant la synthèse d'acide abscissique est exprimée lors de la phase de colonisation biotrophe des cotylédons par *L. maculans* (vague 2), ainsi que tous les gènes du cluster de synthèse de l'acide abscissique (Gay *et al.*, 2021). Sans que son rôle soit identifié, il semble que l'acide abscissique intervienne dans la phase biotrophe de *L. maculans*, sans être indispensable à la pathogénie sur cotylédons.

3.1.3. Petites protéines secrétées

Dans leur sens le plus courant, les effecteurs sont des petites protéines secrétées (PPS), souvent spécifiquement produites *in planta* lors de l'infection et formées de moins de 300 acides aminés. De plus, elles sont souvent riches en cystéines, qui stabilisent la structure de la protéine par formation de ponts disulfures. Cette structure stable est ainsi protégée, notamment dans l'apoplasme végétal aux conditions physiologiques difficiles (Lo Presti *et al.*, 2015). Ces différents critères permettent d'établir une règle générale, à laquelle il y a de nombreuses exceptions. Le critère de la taille des petites protéines secrétées est souvent considéré comme très arbitraire. Il fixe une limite, que certains effecteurs dépassent comme l'effecteur AvrSr35 de *Puccinia graminis* f. sp. tritici, faisant 578 acides aminés (Salcedo *et al.*, 2017). Concernant l'enrichissement en cystéines, il existe également des exceptions. Chez *L. maculans*, les effecteurs *AvrLm1* et *AvrLm10B* par exemple ne contiennent qu'une seule cystéine (Gout *et al.*, 2006; Petit-Houdenot *et al.*, 2019).

Les petites protéines secrétées jouent plusieurs rôles lors de l'infection de la plante, qui seront développés plus en détails dans la partie 3.2.4. Ainsi, certains effecteurs peuvent participer à la mort cellulaire de la plante. C'est le cas des effecteurs nommés « Nep1-like proteins » ou NLP, qui sont des toxines protéiques. Ils provoquent la formation rapide de nécroses chez les plantes dicotylédones. Ils sont divisés en deux types de NLP, selon le nombre de cystéines conservées dans la séquence protéique (Oome & Van Den Ackerveken, 2014). De même, ToxA est un effecteur protéique de *P. tritici-repentis*, mais agissant comme une toxine spécifique, une HST (Manning & Ciuffetti, 2005; Manning *et al.*, 2007). Localisée au niveau des chloroplastes, son interaction avec la protéine de sensibilité ToxABP1 perturbe le fonctionnement du photosystème végétal, entraînant la mort cellulaire (Lo Presti *et al.*, 2015).

Par ailleurs, ayant pour rôle d'éviter la reconnaissance par l'hôte, les effecteurs avec un domaine LysM ont été très étudiés. Leurs modes d'action seront vus plus en détails dans la partie 3.2.4. D'une manière générale, ils évitent la reconnaissance de la chitine des parois fongiques par les défenses de la plante, mais également par les autres microorganismes présents dans l'environnement (De Jonge *et al.*, 2010; Kombrink & Thomma, 2013; Takahara *et al.*, 2016).

D'autres effecteurs ont pour rôle de supprimer les défenses de la plante. Pour cela, plusieurs champignons sécrètent des effecteurs qui ciblent les voies de signalisation hormonales de la plante, comme *Ustilago maydis* (Hemetsberger *et al.*, 2012), *Phytophthora sojae* et *Verticillium dahliae* (Liu T. *et al.*, 2014b) ou encore le champignon ectomycorhizien *L. bicolor* (Plett *et al.*, 2011, 2014). Certains effecteurs permettent également d'inhiber la production de ROS (« Reactive Oxygen Species »), intervenant dans les réponses de la PTI (« PAMP-Triggered Immunity ») (Djamei *et al.*, 2011).

Concernant la présence d'homologues chez d'autres espèces de champignons, les effecteurs sont souvent considérés comme peu ou pas conservés en dehors des espèces du même genre. Toutefois, de nombreuses exceptions contredisent cette règle.

Ainsi, les effecteurs NLP, dont nous avons discuté précédemment, ont été identifiés chez de nombreux organismes, notamment des champignons, des oomycètes et des bactéries, la plupart étant des organismes phytopathogènes (Gijzen & Nürnberger, 2006). De même, Avr4 identifié chez *Cladosporium fulvum*, présente des homologies avec des effecteurs de nombreux champignons phytopathogènes (Franceschetti *et al.*, 2017).

Même si les effecteurs sont très étudiés chez les organismes phytopathogènes, les organismes endophytes et symbiotiques produisent également des effecteurs protéiques pour coloniser leur hôte / partenaire de symbiose. Un effecteur « crinkler » RiCRN1 a été identifié et caractérisé chez le champignon ectomycorhizien *R. irregularis* (Voß *et al.*, 2018), où il aurait un rôle dans le développement des arbuscules. Étonnamment, les effecteurs « crinkler » ont été initialement identifiés chez l'oomycète phytopathogène *P. infestans* (Torto *et al.*, 2003; Amaro *et al.*, 2017) et sont généralement impliqués dans les processus de mort cellulaire. Il s'agit donc d'une famille de protéines très conservée, y compris chez des champignons non-pathogènes.

De la même manière, il existe des domaines protéiques très conservés parmi les effecteurs fongiques. Ainsi, de nombreux effecteurs présentent un domaine LysM, chez des champignons phytopathogènes, saprophytes ou encore chez des champignons pathogènes de mammifères (De Jonge & Thomma, 2009). Le domaine CFEM (« Common in Fungal Extracellular Membrane »), initialement identifié chez *Candida albicans*, puis chez d'autres champignons (Kulkarni *et al.*, 2003; Nasser *et al.*, 2016) est un second exemple de domaine conservé.

Identifié également chez *Melampsora lini* et *Magnaporthea grisea*, ce domaine est considéré comme impliqué dans la pathogénie (Martin F. *et al.*, 2008). Toutefois, le champignon ectomycorrhizien *L. bicolor*, possède au moins six PPS contenant un domaine CFEM (Martin F. *et al.*, 2008).

Enfin, *L. maculans* est autre exemple de champignon phytopathogène présentant des effecteurs conservés chez d'autres espèces fongiques. Ainsi, quatre des cinq effecteurs dits « tardifs » actuellement identifiés chez *L. maculans*, et quatre des six effecteurs étudiés dans ce manuscrit de thèse, présentent des homologues chez d'autres espèces de champignons (Gervais, 2017; Jiquel *et al.*, 2021). Ces gènes codant des effecteurs « tardifs » sont spécifiquement exprimés lors de la colonisation asymptomatique de la tige de colza et/ou lors de l'infection du collet du colza. Comme nous le verrons dans les parties 3.2.2 et 3.2.3, ces gènes codant des effecteurs se distinguent des effecteurs dits « précoces » étudiés jusqu'à présent. Ils diffèrent par leur localisation génomique et par leur profil d'expression lors du cycle infectieux.

3.2. Effecteurs : leurs rôles selon le mode de vie du champignon

Les champignons ne déploient pas tous le même arsenal de molécules pour coloniser l'hôte. Chez l'espèce modèle *L. maculans*, les effecteurs protéiques sont tout particulièrement étudiés et plusieurs centaines sont produits lors de l'interaction avec *B. napus* (Gay *et al.*, 2021). Par la suite, nous nous focaliserons donc essentiellement sur les petites protéines sécrétées.

3.2.1. Des sécrétomes liés aux modes de vie

Le sécrétome est défini comme l'ensemble des protéines sécrétées par le champignon. La comparaison des sécrétomes de 49 espèces fongiques, saprophytes, pathogènes et symbiotiques, a permis de conclure que la taille du sécrétome n'est pas liée au mode de vie du champignon (Pellegrin *et al.*, 2015). En revanche, ses caractéristiques, en termes de type de protéines sécrétées, le sont (Lo Presti *et al.*, 2015). En effet, les champignons ayant le plus de protéines sécrétées dans leur génome sont sur-représentés parmi les hémibiotrophes (Lo Presti *et al.*, 2015).

Comme l'illustre la Figure 15, les génomes des champignons nécrotrophes et hémibiotrophes présentent plus d'enzymes de dégradation des parois végétales que les génomes des champignons biotrophes et symbiotiques, mais en présentent un nombre comparable à celui des génomes de champignons saprotrophes (Lo Presti *et al.*, 2015). Cela semble cohérent avec le fait que les champignons biotrophes et hémibiotrophes, à un certain stade de leur cycle, se nourrissent de tissus vivants dans la plante. Il leur est donc nécessaire d'éviter d'endommager les cellules végétales. Par ailleurs, les produits de dégradation des parois pouvant être reconnus par la plante en tant que DAMP (« Damage-Associated Molecular Pattern »), ne pas détruire les cellules contribue à passer inaperçu lors de la colonisation de la plante.

De plus, les sécrétomes des champignons ectomycorrhiziens contiennent une proportion plus importante de PPS que les sécrétomes des autres types de champignons, mais contiennent moins de PPS spécifiques de leur espèce fongique (Pellegrin *et al.*, 2015). *R. irregularis*, un champignon mycorrhizien à arbuscules, étaye également cette observation. En effet, il possède un répertoire d'effecteurs prédits d'au moins 220 effecteurs candidats, dont 95 % ont des homologues chez une autre espèce *Rhizophagus clarus* (Toro 2016).

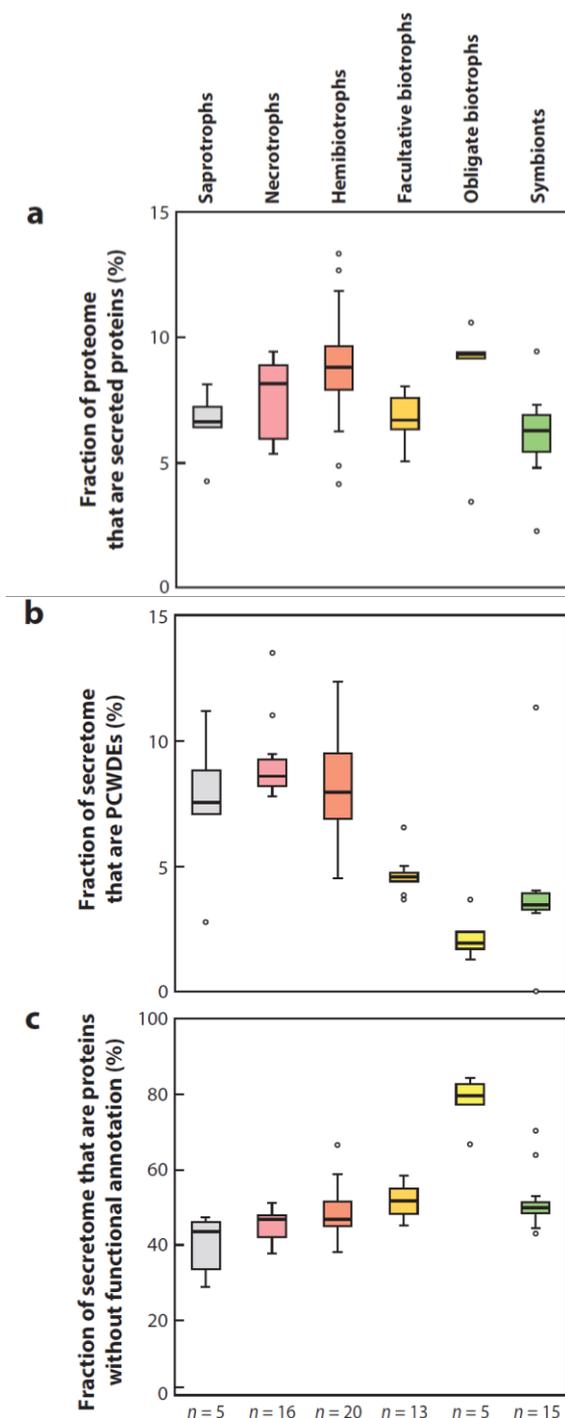


Figure 15 : Tendances liées aux modes de vie dans la composition du sécrétome des champignons

Les sécrétomes ont été classés selon le mode de vie du champignon. Les résultats sont présentés sous forme de diagrammes en boîtes, où la boîte indique les quartiles, et la ligne centrale correspond à la médiane. Les moustaches correspondent aux points de données les plus bas et les plus élevés dans l'écart interquartile de 1,5 des quartiles inférieur et supérieur, respectivement. Les valeurs aberrantes sont indiquées par des cercles. (a) Nombre de protéines sécrétées par rapport au protéome total. (b) Nombre d'enzymes sécrétées dégradant la paroi des cellules végétales (PCWDE) par rapport au nombre total de protéines sécrétées. (c) Nombre de protéines sécrétées sans annotation fonctionnelle par rapport au nombre total de protéines sécrétées (D'après Lo Presti *et al.*, 2015). Sous le graphique, le nombre *n* correspond au nombre de sécrétomes différents étudiés.

Chez *L. maculans*, la combinaison de plusieurs critères a permis la prédiction *in silico* d'un répertoire d'effecteurs. Il a été déterminé, en prédisant tout d'abord le sécrétome (Gay *et al.*, 2021). Pour cela, trois critères ont été employés ; les protéines n'ont pas plus d'un domaine transmembranaire (outil TMHMM 2.0, Möller *et al.*, 2001) et ont un peptide signal prédit (outil SignalP, Nielsen, 2017) ou une localisation extracellulaire prédite (outil TargetP, Almagro Armenteros *et al.*, 2019). Une limite maximale de taille, fixée à 300 acides aminés, a été appliquée aux protéines du sécrétome prédit. En parallèle, l'outil de prédiction EffectorP (Sperschneider *et al.*, 2016) a été utilisé sur le sécrétome sans limitation à 300 acides aminés, permettant d'identifier seulement quatre protéines supplémentaires de plus de 300 acides aminés, qui ont donc été intégrées au répertoire d'effecteurs.

3.2.2. Des génomes à plusieurs vitesses

Les génomes fongiques sont souvent structurés par des régions génomiques contrastées. Il peut s'agir de structures en isochores, avec des régions riches en gènes, peu plastiques et des régions riches en éléments transposables (ET), plus plastiques. Il peut également s'agir d'une structure distinguant le « core » génome ou génome principal, du génome « accessoire » ou génome dispensable.

La présence de chromosomes accessoires a été détectée chez plusieurs espèces de champignons. C'est notamment le cas chez *Fusarium oxysporum* et *Nectria haematococca* (Coleman *et al.*, 2009; Ma LJ. *et al.*, 2010). Facilement perdus ou gagnés, ils permettent d'acquérir de nouveaux gènes pour infecter d'autres hôtes, gagner en agressivité ou contourner une résistance. De même, le génome de *Z. tritici* peut compter jusqu'à huit chromosomes accessoires actuellement identifiés (Croll & McDonald, 2012; Croll *et al.*, 2013).

Pour les structures en isochores, chez les espèces endophytes du genre *Epichloë*, de longs blocs d'éléments répétés sont présents près des gènes impliqués dans la biosynthèse des alcaloïdes (Schardl *et al.*, 2013), indiquant une possible organisation en compartiments génomiques distincts. De même, le séquençage du génome de *L. maculans* en 2011 a permis de mettre en évidence une structure bien particulière, alternant entre des isochores équilibrés en bases GC et des isochores riches en bases AT, comme l'illustre la Figure 16 (Rouxel *et al.*, 2011).

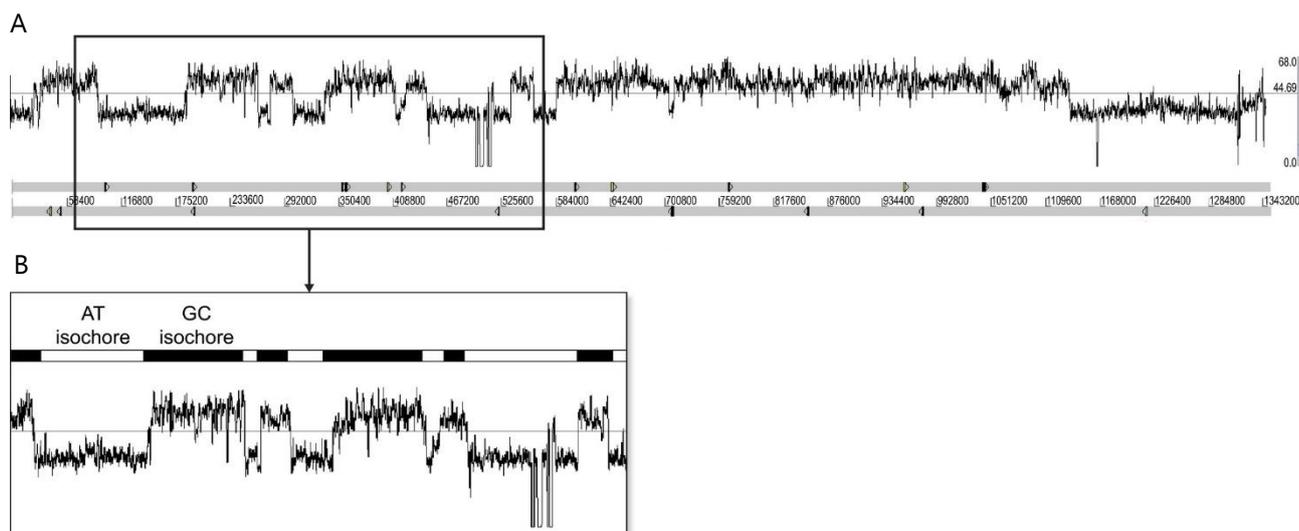


Figure 16 : Exemple de structure en isochores du génome à deux vitesses de *L. maculans*

Les isochores GC constituent le « core genome », représentant 64% du génome et contenant 95% des gènes prédits. A l’opposé, les isochores AT représentent une partie accessoire et très plastique du génome, enrichie en PPS. (A) Représentation d’un chromosome (Rouxel *et al.*, 2011). (B) 502kb de ce même chromosome (Rouxel et Balesdent, 2017).

Ces régions très plastiques, qu’il s’agisse d’isochores ou de chromosomes dispensables, hébergent généralement une partie des gènes impliqués dans la pathogénie. Ainsi, chez *F. oxysporum*, les chromosomes accessoires sont enrichis en transposons et en effecteurs putatifs (Ma LJ. *et al.*, 2010). En effet, dans le cas des formes spéciales de *F. oxysporum*, le transfert de deux chromosomes accessoires a converti une souche non-pathogène en souche pathogène sur une nouvelle espèce végétale (Ma LJ. *et al.*, 2010). A l’inverse, une seconde étude a montré que la perte d’un chromosome riche en effecteurs a entraîné la perte complète de pathogénie chez *F. oxysporum* (Vlaardingerbroek *et al.*, 2016). De même, le génome d’*U. maydis*, ainsi que ceux de champignons proches ; *Ustilago hordei*, *Sporisorium scitamineum* et *Sporisorium reilianum* présentent des regroupements en cluster d’effecteurs, associés à des éléments transposables (Dutheil *et al.*, 2016).

Chez *L. maculans*, les isochores riches en AT sont riches en éléments transposables et pauvres en gènes. Les rares gènes identifiés dans ces régions AT sont généralement impliqués dans la pathogénie, incluant des clusters de métabolites secondaires et des gènes codant des PPS, dont certains ont aussi une fonction d’avirulence. A l’inverse, les isochores GC contiennent 95% des gènes prédits chez *L. maculans* (Rouxel *et al.*, 2011) et sont pauvres en éléments transposables. Le génome de *L. maculans* présente également un chromosome dispensable, dans lequel se situe notamment le gène d’avirulence *AvrLm11* (Balesdent *et al.*, 2013).

A quelques exceptions près illustrées par la suite, il est maintenant admis que les gènes codant des effecteurs sont associés à des régions plastiques des génomes, comme les chromosomes dispensables, les isochores AT, les télomères et les grandes régions riches en ET (Croll & McDonald, 2012).

De nombreux travaux mettent en relation cette structuration du génome avec la vitesse d'évolution accélérée de ces régions plastiques. En effet, certaines régions génomiques, voire des chromosomes entiers peuvent être éliminés. Les isochores AT par exemple, étant généralement dépourvus de gènes essentiels, peuvent être facilement éliminés lors de la reproduction sexuée voire de la mitose, sans impact majeur sur la biologie du champignon. De même, la perte de chromosomes dispensables n'impacte pas la viabilité du champignon (Raffaele & Kamoun, 2012). Ces chromosomes accessoires sont maintenus dans la population, uniquement s'ils confèrent un avantage adaptatif. Ils constituent donc une partie plastique et modulable des génomes fongiques.

De plus, identifié en 1989 chez *Neurospora crassa* (Cambareri *et al.*, 1989), le mécanisme de RIP (« Repeat-Induced Point mutations »), présent uniquement chez les champignons, entraîne des mutations de G-C en A-T dans les séquences répétées. Ce mécanisme conduit à l'inactivation des séquences répétées par apparition de mutations et/ou d'un codon-stop prématuré. Le RIP peut également affecter les gènes situés à proximité de séquences répétées, pouvant mener à de nouveaux allèles ou à des mutations inactivantes (Raffaele & Kamoun, 2012). Ainsi, le RIP peut permettre d'accélérer la vitesse d'évolution des gènes situés dans des régions riches en éléments répétés.

Également identifié en 2003 chez *L. maculans*, ce mécanisme de préservation du génome inactive ainsi les éléments transposables, ce qui limite leur expansion dans le génome (Idnurm & Howlett, 2003). Chez *L. maculans*, le mécanisme de RIP a lieu dans les isochores AT, riches en éléments répétés, et peut s'étendre aux gènes proches des éléments transposables (Rouxel *et al.*, 2011). Tous les gènes d'avirulence de *L. maculans*, identifiés jusqu'à présent se trouvent dans les isochores AT. Ils peuvent donc être facilement éliminés car ils sont situés dans des régions non-essentiels. Etant à proximité d'éléments répétés, ils peuvent aussi être affectés par le RIP, engendrant de la diversité allélique. Ainsi, la perte, l'inactivation ou la mutation d'un gène peut permettre d'échapper à la reconnaissance de l'effecteur par la plante (Daverdin *et al.*, 2012).

Par ailleurs, des effecteurs spécifiques de la colonisation de la tige ont été plus récemment identifiés (Gervais *et al.*, 2017). Ces effecteurs dits « tardifs » se trouvent dans des isochores GC, plus ou moins riches en gènes, moins susceptibles d'être éliminés. La plupart se trouvent suffisamment loin des éléments transposables pour ne pas subir de mutations liées au mécanisme de RIP. Cette localisation dans les isochores GC devrait donc probablement limiter leur potentiel évolutif, comparé à celui des gènes d'avirulence, situés dans les isochores AT.

Comme nous le verrons dans la partie 1.2 de la discussion, certains effecteurs tardifs se situent tout de même en bordure d'isochores GC, ou bien dans de petits îlots GC ou encore associés à un élément transposable. Il convient donc de nuancer cette idée de localisation des effecteurs tardifs en isochores GC, et surtout de l'étudier au cas par cas.

Ainsi, les génomes fongiques sont structurés en régions plus ou moins plastiques. Cette structuration des génomes, liée au potentiel évolutif élevé des régions plastiques, a donné naissance au concept de « génome à deux vitesses », voire de « multi-speed genomes » pour certains auteurs (Rouxel *et al.*, 2011; Grandaubert *et al.*, 2014; Frantzeskakis *et al.*, 2019).

3.2.3. Des vagues d'expression lors de l'infection

Ces dernières années, les analyses transcriptomiques, basées sur des données RNAseq se sont largement démocratisées. Ces analyses permettent d'avoir une vue d'ensemble des gènes exprimés à un stade donné, lors d'une interaction hôte-pathogène par exemple. De nombreuses analyses transcriptomiques ont ainsi mis en évidence des vagues d'expression de gènes lors de l'infection de l'hôte. Chez *P. striiformis*, des vagues d'expression concertée d'effecteurs candidats interviennent à différents temps après l'inoculation (Cantu *et al.*, 2013; Dobon *et al.*, 2016).

Le changement d'une phase asymptomatique à une phase nécrotrophe se traduit également par un changement d'expression des gènes impliqués dans la pathogénie, comme chez l'hémibiotrophe *Z. tritici* (Palma-Guerrero *et al.*, 2016; Haueisen *et al.*, 2019). Différents gènes semblent spécifiquement exprimés pour chaque mode de nutrition du champignon, à savoir biotrophe, nécrotrophe et saprotrophe. Lors de la pénétration des tissus puis de la colonisation de l'hôte, *C. higginsianum* exprime quatre vagues successives d'expression de gènes codant des effecteurs et des métabolites secondaires. Lors de ces différentes phases de colonisation, des effets antagonistes ont probablement lieu entre effecteurs induisant ou supprimant la mort cellulaire (Kleemann *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012).

Des vagues d'expression de gènes peuvent également être spécifiques des tissus colonisés ou bien même de l'hôte. Selon l'organe infecté par *U. maydis*, les gènes codant des effecteurs sont différenciellement exprimés (Schilling *et al.*, 2014; Lanver *et al.*, 2018). Par ailleurs, *Melampsora larici-populina* nécessite deux espèces hôtes pour effectuer intégralement son cycle de vie et de reproduction ; le mélèze pour la reproduction sexuée et le peuplier pour la reproduction asexuée. La comparaison entre l'infection du peuplier et du mélèze révèle un enrichissement en PPS différentes parmi les gènes différenciellement exprimés entre les deux hôtes (Lorrain *et al.*, 2018). Ces gènes sont probablement des candidats contribuant à la spécificité d'hôte.

Enfin, pour une même espèce hôte, des sets distincts de gènes différentiellement exprimés au cours de l'infection peuvent être exprimés selon le niveau de résistance quantitative des variétés, comme chez *M. oryzae* (Bagnaresi *et al.*, 2012).

Des vagues d'expression de gènes semblent également nécessaires à la symbiose entre champignons mycorhiziens et plantes. En effet, différents sets de gènes sont spécifiquement exprimés lors de la mise en place de la symbiose ectomycorhizienne entre *Hebeloma cylindrosporum* et *Pinus pinaster* (Doré *et al.*, 2017). A toutes les étapes d'établissement de la symbiose, les gènes codant des MiSSPs (« Mycorrhiza-induced Small Secreted Proteins ») sont sur-représentées parmi les gènes surexprimés.

Tout comme d'autres organismes filamenteux, l'expression des gènes de *L. maculans* est régulée lors de l'infection de *B. napus*. En 2017, Julie Gervais avait identifié deux vagues d'expression de gènes, l'une spécifique de l'infection des cotylédons et l'autre spécifique de l'infection de la tige (Gervais *et al.*, 2017). Avec les données RNAseq disponibles à ce moment-là, il était difficile d'être plus précis concernant les vagues d'expression de gènes. Toutefois, ces premières analyses ont permis d'identifier des effecteurs considérés à l'époque comme « tardifs », spécifiquement exprimés lors de la colonisation de la tige. Ces effecteurs sont localisés dans les isochores GC du génome de *L. maculans*. Comme nous l'avons vu dans la partie 3.2.2, les gènes, et donc les effecteurs tardifs, situés dans ces isochores GC sont susceptibles d'évoluer moins vite que les gènes situés dans les isochores AT.

Depuis la publication de Gervais *et al.* (2017), un jeu de données plus complet a été généré lors du projet « France Génomique » Leptolife. Ainsi, en accord avec la complexité de son mode de vie, huit vagues d'expression de gènes de *L. maculans*, spécifiquement exprimés en interaction avec la plante ont été récemment définies par Gay *et al.* (2021). Trois vagues d'expression sont spécifiques de l'infection des cotylédons, avec plus particulièrement tous les gènes d'avirulence connus exprimés lors de la seconde vague (cluster 2, Figure 17). Trois autres vagues, correspondant aux clusters 4, 5 et 6 (Figure 17), quant à elles sont plus spécifiques de la colonisation de la tige mais pas toujours exclusives et incluent les effecteurs « tardifs » de *L. maculans* précédemment décrits (Gervais *et al.*, 2017; Gay *et al.*, 2021).

D'une manière générale, les vagues d'expression de gènes façonnent le paysage des interactions plantes-champignons, en termes de modes de vie du champignon, de tissus, d'hôtes, de génotypes ou même de souches. Identifier et caractériser ses vagues peut permettre d'identifier de nouveaux gènes du champignon, impliqués dans l'infection de la plante à des stades moins bien étudiés et donc d'identifier de potentiels nouveaux gènes d'avirulence.

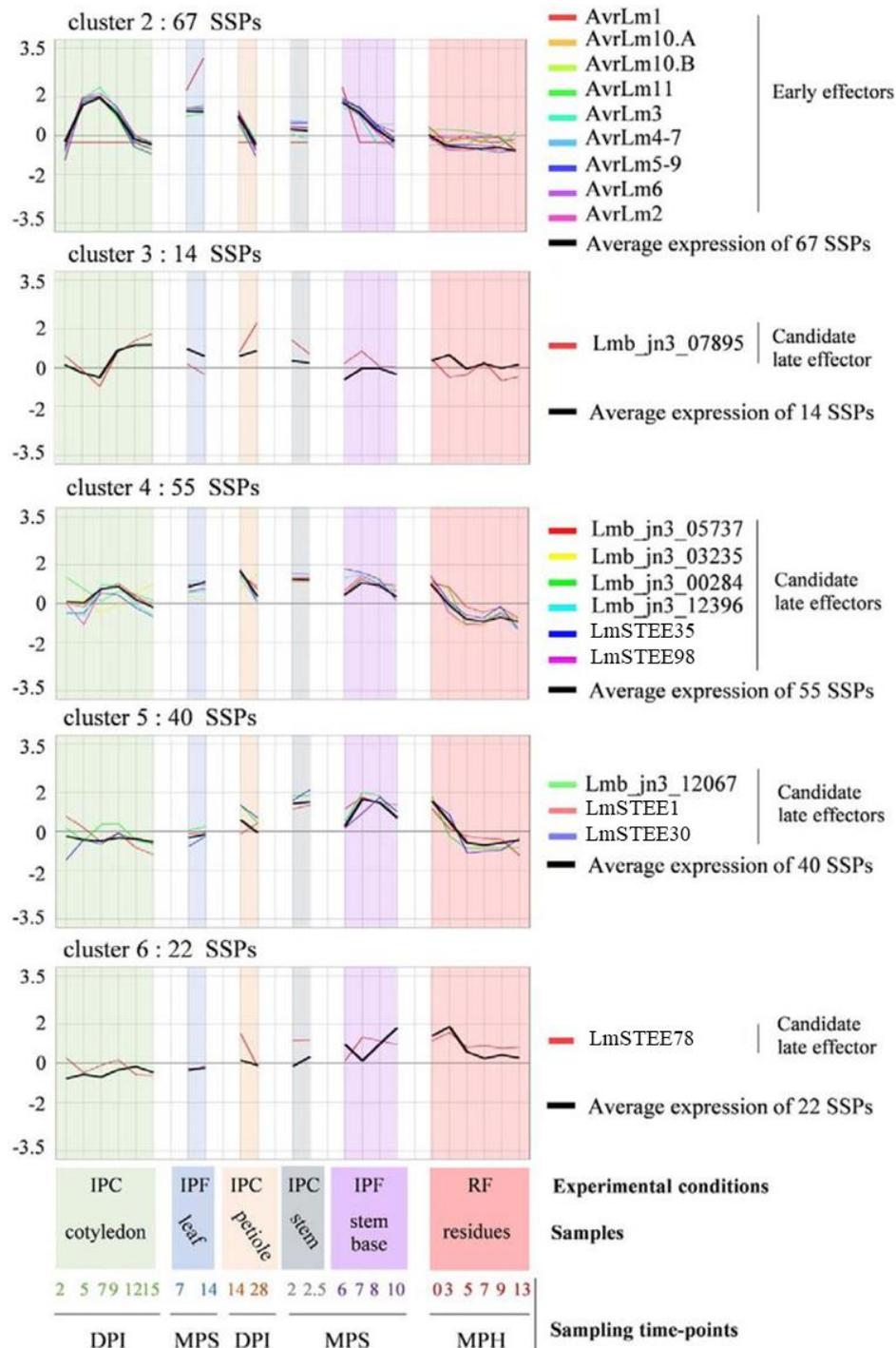


Figure 17 : Vagues d'expression d'effecteurs connus et putatifs de *L. maculans* lors de la colonisation du colza

Les valeurs d'expression en $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ des neuf gènes d'avrulence (AvrLm) clonés et de onze effecteurs tardifs candidats sont regroupés par cluster d'expression. Les valeurs moyennes en $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ de tous les gènes codant des PPS sont représentées dans chaque cluster correspondant (courbe noire). Le long de l'axe des abscisses sont indiqués : IPF (*in planta* field conditions) ; IPC (*in planta* controlled conditions) ; RF (residues in field conditions) et DPI (days post inoculation) ; MPS (months post sowing) ; MPH (months post harvest), d'après Gay *et al.* (2021).

3.2.4. Des modes d'action variés

Les effecteurs fongiques permettent de promouvoir l'infection de l'hôte par le champignon. Pour y parvenir, leurs modes d'action peuvent être très différents d'un effecteur à l'autre, comme l'illustre la Figure 18 (Lo Presti *et al.*, 2015; Franceschetti *et al.*, 2017). Dans cette partie, nous illustrerons différents modes d'actions par quelques exemples, sans que cela soit exhaustif.

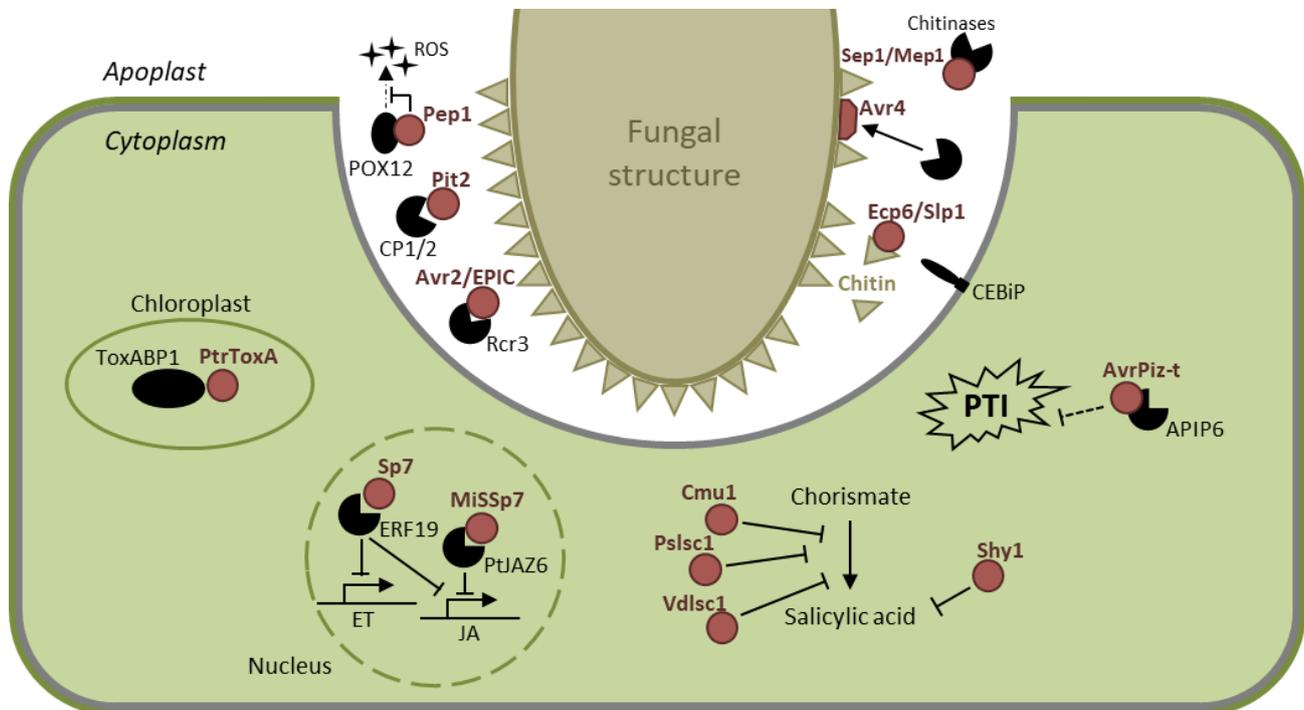


Figure 18 : Principaux modes d'action connus des effecteurs fongiques

La structure fongique pourrait être un hyphes, un haustorium ou bien un arbuscule. Les organismes filamenteux sécrètent des effecteurs (en rouge) qui dérèglent l'immunité végétale en interagissant avec des cibles de l'hôte (en noir). Figure adaptée de Lo Presti *et al.* (2015) et de Rovenich *et al.* (2014).

Certains effecteurs ciblent les protéines et protéases végétales, afin de les dégrader ou les inhiber. Ainsi, des familles de protéases sécrétées ont été identifiées dans les génomes de plusieurs champignons pathogènes ; *Z. tritici*, *Colletotrichum sp.*, *S. sclerotiorum*, et auraient un rôle d'effecteur putatif (Franceschetti *et al.*, 2017). Lors de l'infection, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersicum* sécrète une serine protéase, Sep1, et une métalloprotéase, Mep1, qui ensemble dégradent les chitinases de l'hôte, évitant la dégradation de la paroi fongique par ces dernières (Jashni *et al.*, 2015). Chez *M. oryzae*, l'effecteur AVR-Pita possède les caractéristiques typiques des métalloprotéases à zinc, mais son activité de protéase n'a pas encore été démontrée (Orbach *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'effecteur Avr2 de *C. fulvum* se lie aux protéases de la plante, comme Rcr3 chez la tomate, pour inhiber leur activité (Rooney *et al.*, 2005). Étonnamment, les effecteurs EPIC1 et EPIC2B de *P. infestans* ciblent la même protéase végétale Rcr3 (Song *et al.*, 2009). Chez *U. maydis*, l'effecteur Pit2 est également un inhibiteur de protéases végétales, ciblant CP1 et CP2 chez le maïs (Mueller *et al.*, 2013).

D'autres effecteurs interfèrent avec les mécanismes de défense de la plante. Par exemple, *U. maydis* sécrète l'effecteur Pep1, qui interagit directement avec la peroxidase POX12 et inhibe ainsi la production de ROS, l'une des premières réponses de défense de la plante lors de l'attaque par un agent pathogène (Hemetsberger *et al.*, 2012).

De plus, tous les *Fungi* possèdent une paroi constituée de chitine. Lors de l'infection, les plantes détectent les fragments de chitine des champignons grâce à des récepteurs situés à la surface des cellules, contenant des domaines extracellulaires avec un motif lysine (LysM). Pour se protéger lors de l'infection, les champignons sécrètent des effecteurs LysM qui séquestrent les fragments de chitine dans l'apoplasme, comme l'illustre la Figure 19.

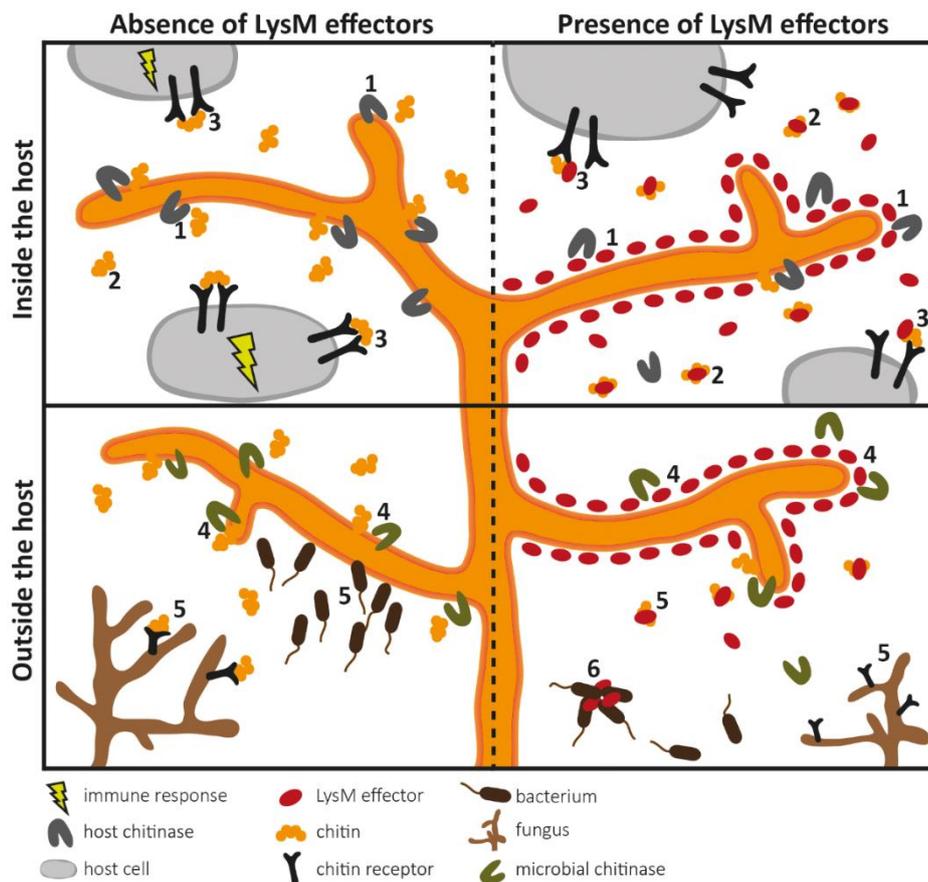


Figure 19 : Les différents rôles des effecteurs LysM

Les effecteurs LysM peuvent jouer un rôle lors de la colonisation de l'hôte (moitié haute du schéma) mais également en-dehors de l'hôte (moitié basse du schéma). Ils peuvent (1) protéger les hyphes de la dégradation par les chitinases de l'hôte, (2) se fixer aux oligomères de chitine qui induiraient sans cela une reconnaissance par les récepteurs de chitine de la plante, (3) interférer avec les récepteurs de chitine de la plante pour éviter leur activation. Chez les champignons non-pathogènes, ils auraient plutôt pour rôle de (4) protéger les hyphes de la dégradation par les chitinases de mycoparasites, (5) séquestrer les fragments de chitine pour éviter d'attirer ces mycoparasites et (6) immobiliser les bactéries compétitrices, par reconnaissance des peptidoglycanes bactériens par exemple (D'après Kombrink et Thomma, 2013).

Par exemple, l'effecteur Ecp6 de *C. fulvum* se lie aux fragments de chitine avec une plus grande affinité que les récepteurs LysM de la plante (Sánchez-Vallet *et al.*, 2013). Tout comme Ecp6, l'effecteur Slp1 de *M. oryzae* se lie aux fragments de chitine libres et entre en compétition avec le récepteur végétal CEBiP (Mentlak *et al.*, 2012). Chez *Z. tritici*, les effecteurs LysM ont plutôt un rôle de protection des hyphes fongiques contre la dégradation par les chitinases (Kombrink & Thomma, 2013). De la même manière, l'effecteur Avr4 de *C. fulvum* protège la paroi fongique de l'hydrolyse par les chitinases de la plante, en se fixant directement aux chitines sur la paroi fongique (Van Den Burg *et al.*, 2006).

Toujours en interférence avec les défenses de la plante, lorsque *M. oryzae* infecte le riz, l'effecteur sécrété AvrPiz-t cible APIP6 dans le cytoplasme. Il entraîne sa dégradation, via un mécanisme encore inconnu. Ayant un rôle dans les défenses de la plante et notamment dans la PTI, la dégradation d'APIP6 entraîne une diminution de la production de ROS et donc une augmentation de la sensibilité de la plante à l'infection par *M. oryzae* (Park *et al.*, 2012).

Nombre d'effecteurs fongiques ciblent les voies de signalisation hormonales chez l'hôte, afin de favoriser l'infection ou la colonisation de l'hôte. C'est le cas notamment de l'effecteur Cmu1 produit par *U. maydis* qui perturbe la production d'acide salicylique (Djamei *et al.*, 2011). *U. maydis* produit également une salicylate hydrolase Shy1 qui dégrade l'acide salicylique lors de l'infection (Rabe *et al.*, 2013). De même, *P. sojae* et *V. dahliae* semblent avoir développé une stratégie similaire avec la sécrétion d'effecteurs ayant une activité d'isochorismatase (respectivement Pslsc1 et Vdlscl1). Ces effecteurs hydrolysent l'isochorismate, un précurseur de l'acide salicylique (Liu T. *et al.*, 2014b). De même, l'effecteur AvrLm1 de *L. maculans* interfère indirectement avec la voie de signalisation de l'acide salicylique (Ma L. *et al.*, 2018). Il interagit avec la « Mitogen-activated protein (MAP) kinase 9 » de *B. napus* (BnMPK9), conduisant à une augmentation de l'accumulation de la protéine végétale. En stabilisant l'expression de *BnMPK9* et l'accumulation de la protéine résultante, AvrLm1 perturbe la voie de signalisation hormonale de l'acide salicylique.

D'autres voies de signalisation hormonales sont ciblées par les effecteurs fongiques comme celles de l'acide jasmonique et de l'éthylène, notamment chez les champignons mycorhiziens. Ainsi, l'effecteur SP7 du champignon mycorhizien à arbuscules, *Glomus intraradices* interagit avec le facteur de transcription ERF19 dans le noyau des cellules, impliqué dans les voies de signalisation de l'acide jasmonique et de l'éthylène (Kloppholz *et al.*, 2011). De même, le champignon ectomycorhizien *L. bicolor*, produit l'effecteur MiSSP7 (« Mycorrhiza-induced Small Secreted Protein 7 ») lors de l'interaction avec son hôte le peuplier (Plett *et al.*, 2011, 2014). MiSSP7 interagit avec la protéine végétale PtJAZ6 (JAZ pour « Jasmonate Zim-Domain »), bloquant l'expression des gènes induit par la voie de signalisation de l'acide jasmonique et permettant ainsi la colonisation symbiotique de son hôte, le peuplier.

Le fonctionnement des organelles peut également être ciblé par des effecteurs fongiques. C'est notamment le cas de l'effecteur PtrToxA, un effecteur protéique, agissant comme une toxine spécifique (HST). Chez *P. tritici-repentis*, cet effecteur est internalisé dans les cellules végétales des variétés sensibles de blé uniquement. Une fois internalisé, il cible les chloroplastes, où il interagit avec la protéine ToxABP1 et induit la mort cellulaire, conduisant à des lésions nécrotiques (Manning & Ciuffetti, 2005; Manning *et al.*, 2007).

Une certaine catégorie d'effecteurs vise à modifier le milieu dans lequel ils sont sécrétés, pour favoriser l'infection. Initialement identifiés chez la plante *Nicotiana tabacum*, les peptides nommés RALF (pour « Rapid Alkalinization Factor »), ont des rôles très variés et encore peu connus. Les champignons produisent également des peptides RALF. Par exemple, *F. oxysporum* sécrète un RALF qui entraîne une augmentation rapide du pH de l'espace extracellulaire, favorisant l'infection de la plante (Masachis *et al.*, 2016). De même, chez *L. maculans*, un gène RALF a été identifié dans le cluster d'expression 1, correspondant aux toutes premières phases d'infection des cotylédons (Gay *et al.*, 2021).

Ces nombreux exemples ne sont pas exhaustifs et il reste encore beaucoup d'incertitudes quant aux différents modes d'action des effecteurs fongiques. En effet, bon nombre d'effecteurs sont identifiés sans que l'on connaisse leur mode d'action pour le moment.

4. Facteurs de l'immunité végétale

D'une manière générale, les plantes qui nous entourent sont majoritairement saines. Les plantes ont donc des mécanismes de défense pour lutter contre les bioagresseurs. Chez les végétaux, deux types de résistances variétales peuvent être distingués ; la résistance qualitative et la résistance quantitative. La première implique un gène de résistance de la plante dont le produit reconnaît celui d'un gène d'avirulence du champignon. Cette résistance spécifique, dite « gène-pour-gène », induit une réponse hypersensible. Quant à la résistance quantitative, moins bien caractérisée, elle présente une distribution continue des symptômes et elle est généralement polygénique, c'est-à-dire résultant de l'action combinée de plusieurs loci de résistance (Niks *et al.*, 2015; Pilet-Nayel *et al.*, 2017). Dans cette partie, nous développerons la description de ces deux types de résistances et les différents gènes impliqués.

4.1. La résistance qualitative

4.1.1. Le modèle gène-pour-gène

Lors de l'infection par un agent phytopathogène la première réponse immunitaire, appelée l'immunité basale est basée sur la capacité de la plante à reconnaître des composés communs aux différents microorganismes, telles que la flagelline des bactéries ou bien la chitine des champignons (Pieterse *et al.*, 2009). Ces molécules sont appelées PAMPs (pour « Pathogen-Associated Molecular Patterns »). La reconnaissance des PAMPs par les récepteurs de la plante, nommés PRRs (« Pattern-Recognition Receptors ») entraîne des cascades de signalisation menant à la PTI (pour « PAMP-Triggered Immunity »).

Pour contourner cette immunité basale, les agents pathogènes sécrètent des effecteurs, dont nous avons parlé en détail précédemment (Figure 20). Pour contrer ces agents pathogènes, les plantes mettant en place un système de reconnaissance spécifique de ces effecteurs ont été naturellement sélectionnées, dans les populations naturelles, puis dans les programmes de sélection.

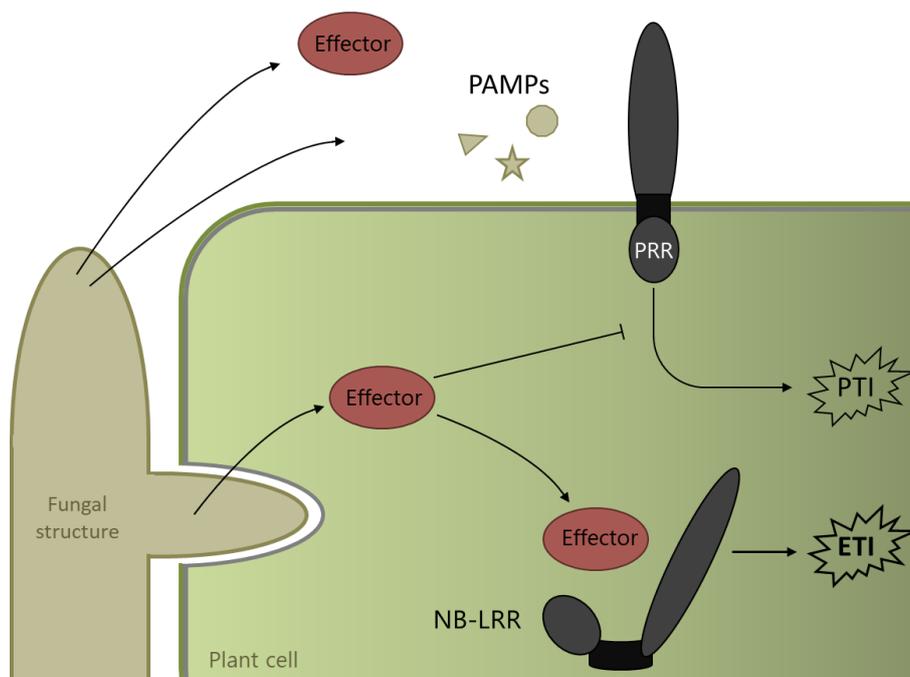


Figure 20 : Immunité végétale lors de l'infection par un champignon

Les molécules produites dans l'espace intercellulaire (PAMPs ou effecteurs) sont reconnues par les récepteurs de la plante, les PRRs (Pattern Recognition Receptors) et induisent la PTI (PAMP-Triggered Immunity). Les effecteurs sécrétés par le champignon, entre autres suppriment la PTI. Toutefois, ils peuvent être reconnus par des récepteurs intracellulaires ou extracellulaires, comme les NB-LRR (Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat) ou les RLK (Receptor-like Kinase) et les WAK (Wall-associated Kinase), induisant donc l'ETI (Effector-Triggered Immunity) (D'après Dodds et Rathjen 2010).

Ainsi, une protéine végétale codée par un gène dit de résistance, reconnaît spécifiquement un effecteur de l'agent pathogène, dans ce cas appelé protéine d'avorulence (Figure 21). Flor a mis en évidence cette relation « gène-pour-gène » en travaillant sur *M. lini* et la résistance du lin à ce champignon phytopathogène (Flor, 1971). Lorsqu'il y a reconnaissance d'une protéine d'avorulence par la protéine de résistance correspondante, l'interaction est alors incompatible et mène à une réaction d'hypersensibilité, bloquant l'infection par l'agent pathogène. La reconnaissance d'un effecteur par la protéine de résistance correspondante entraîne un mécanisme de défense de la plante que l'on appelle ETI (pour « Effector-Triggered Immunity »). En revanche, si l'une des deux protéines est absente ou s'avère être une variante protéique, l'interaction n'a plus lieu, conduisant à une interaction compatible, menant à l'infection par l'agent pathogène (Figure 21).

		<i>Brassica napus</i>	
		Rlm	rlm
<i>Leptosphaeria maculans</i>	AvrLm	Interaction incompatible  Réponse hypersensible	Interaction compatible  Symptômes
	avrLm	Interaction compatible  Symptômes	Interaction compatible  Symptômes

Figure 21 : Modèle de Flor, illustré par le cas du pathosystème *L. maculans* / *B. napus*

Une protéine d'avirulence (AvrLm) sécrétée par l'agent pathogène est reconnue par une protéine de résistance (Rlm) de la plante. La reconnaissance de l'effecteur entraîne une réaction d'hypersensibilité qui bloque l'infection par l'agent pathogène. Si la protéine de résistance (rlm) ou d'avirulence (avrLm) est absente ou mutée, la plante ne reconnaît pas l'agent pathogène et ce dernier peut coloniser la plante et produire des symptômes (Adapté de Flor, 1971).

Dans le modèle gène-pour-gène, la résistance est nommée résistance spécifique ou bien résistance qualitative. Elle est généralement monogénique, impliquant une interaction directe ou indirecte entre les produits d'un gène d'avirulence (*AvrLm* chez *L. maculans*) et d'un gène de résistance (*Rlm* ou *LepR* chez les *Brassicaceae*). Ce type de résistance est tout particulièrement intéressant pour les sélectionneurs. En effet, tant qu'elle est efficace, elle est totale, ce qui permet d'éviter les symptômes de la maladie. De plus, son caractère monogénique lui permet d'être assez facilement sélectionnée et intégrée dans les programmes de sélection, avec notamment des approches de sélection assistée par marqueurs, de plus en plus précises avec la généralisation du séquençage / reséquençage des génomes.

Ainsi, dans le pathosystème *L. maculans* / *B. napus*, certains effecteurs dits « précoces » correspondent aux gènes d'avirulence (*AvrLm*), exprimés lors de l'infection des feuilles et cotylédons. Ces gènes sont localisés dans les isochores AT (partie 3.2.2), les parties plastiques du génome de *L. maculans*. Ainsi, leur mutabilité est maximisée. Par ailleurs, le déploiement à grande échelle de variétés contenant des gènes de résistance place les gènes d'avirulence sous pression de sélection.

Par intérêt et nécessité pour la profession, les gènes d'avirulence ont donc été tout particulièrement étudiés. Ainsi, actuellement 14 gènes d'avirulence ont été identifiés, dont 12 sont maintenant clonés (Tableau 1).

Les mécanismes de la résistance spécifique peuvent s'avérer plus complexes que le modèle impliquant un gène de la plante face à un gène de l'agent pathogène. Plusieurs exemples le montrent dans le cas du pathosystème *L. maculans* / *B. napus* (Tableau 1). Ainsi, pour déclencher la résistance liée au gène *Rlm10*, les deux gènes d'avirulence, *AvrLm10A* et *AvrLm10B*, sont nécessaires (Petit-Houdenot *et al.*, 2019). A l'inverse, une protéine d'avirulence peut être reconnue par plusieurs protéines de résistance, incluant des formes alléliques du même gène *Rlm*. C'est le cas d'*AvrLm1* reconnu par *Rlm1* et *LepR3* (Larkan *et al.*, 2013), d'*AvrLm4-7* reconnu par *Rlm4* et *Rlm7* (Parlange *et al.*, 2009) et d'*AvrLm5-9* reconnu par *Rlm5* et *Rlm9* (Ghanbarnia *et al.*, 2018). Pour complexifier encore un peu plus ces interactions gène-pour-gène, il existe des phénomènes de masquages des effecteurs. En effet, l'effecteur *AvrLm4-7* empêche la reconnaissance d'*AvrLm3* par *Rlm3* (Plissonneau *et al.*, 2016) et d'*AvrLm5-9* par *Rlm9* mais il ne masque pas la reconnaissance d'*AvrLm5-9* par *Rlm5* (Larkan *et al.*, 2020).

Tableau 1 : Relations gène-pour-gène connues entre *L. maculans* et *B. napus*

Références à propos des gènes <i>AvrLm</i>	Gènes <i>AvrLm</i> de <i>L. maculans</i>	Gènes de résistance	Espèces de <i>Brassica</i>	Références à propos des gènes <i>Rlm</i> / <i>LepR</i>
Gout <i>et al.</i> (2006)	<i>AvrLm1</i>	<i>Rlm1</i> <i>LepR3</i>	<i>B. napus</i> <i>B. rapa</i> ssp. <i>sylvestris</i>	Ansan-Melayah <i>et al.</i> (1998) Yu <i>et al.</i> (2008), Larkan <i>et al.</i> (2013)
Ghanbarnia <i>et al.</i> (2015)	<i>AvrLm2</i>	<i>Rlm2</i>	<i>B. napus</i>	Ansan-Melayah <i>et al.</i> (1998) ; Larkan <i>et al.</i> (2015)
Plissonneau <i>et al.</i> (2016)	<i>AvrLm3</i>	<i>Rlm3</i>	<i>B. napus</i>	Balesdent <i>et al.</i> (2002) ; Delourme <i>et al.</i> (2004)
Parlange <i>et al.</i> (2009)	<i>AvrLm4-7</i>	<i>Rlm4</i> <i>Rlm7</i>	<i>B. napus</i> <i>B. napus</i>	Balesdent <i>et al.</i> (2001) Delourme <i>et al.</i> (2004)
Ghanbarnia <i>et al.</i> (2018)	<i>AvrLm5-9</i>	<i>Rlm5</i> <i>Rlm9</i>	<i>B. juncea</i> <i>B. napus</i>	Balesdent <i>et al.</i> (2002) Delourme <i>et al.</i> (2004) ; Larkan <i>et al.</i> (2020)
Fudal <i>et al.</i> (2007)	<i>AvrLm6</i>	<i>Rlm6</i>	<i>B. juncea</i>	Chèvre <i>et al.</i> (1996) ; Balesdent <i>et al.</i> (2002)
Balesdent <i>et al.</i> (2002)	<i>AvrLm8</i>	<i>Rlm8</i>	<i>B. rapa</i>	Balesdent <i>et al.</i> (2002)
Petit-Houdenot <i>et al.</i> (2019)	<i>AvrLm10A</i> <i>AvrLm10B</i>	<i>Rlm10</i>	<i>B. nigra</i>	Chèvre <i>et al.</i> (1996)
Balesdent <i>et al.</i> (2013)	<i>AvrLm11</i>	<i>Rlm11</i>	<i>B. rapa</i>	Balesdent <i>et al.</i> (2013)
Neik <i>et al.</i> (2020)	<i>AvrLm5-Lep2</i>	<i>Rlm5</i> <i>LepR2</i>	<i>B. napus</i> <i>B. rapa</i> ssp. <i>sylvestris</i>	Van de Wouw <i>et al.</i> (2009) Yu <i>et al.</i> (2005)
Degrave <i>et al.</i> (submitted)	<i>AvrLm13</i>	<i>Rlm13</i>	<i>B. oleracea</i>	Degrave <i>et al.</i> (soumis)

Comme nous pouvons le voir dans le Tableau 1, parmi les 15 gènes *Rlm* actuellement connus, huit gènes n'ont pas été identifiés chez *B. napus* mais chez des espèces proches comme la navette (*B. rapa*), le chou (*B. oleracea*) et deux moutardes (*B. nigra* et *B. juncea*). Le colza moderne étant une espèce dont la base génétique est étroite, le nombre de gènes *Rlm* que l'on peut encore identifier chez cette espèce est sans doute très limité. En revanche, les ressources génétiques correspondant aux diverses moutardes, voire à *B. rapa* et *B. oleracea* ou d'autres crucifères plus éloignées, restent à explorer. Toutefois, si l'introgression de ces gènes de résistance dans des variétés de colza est possible, elle est plus difficile que l'exploitation de gènes *Rlm* déjà présents dans une variété de colza.

4.1.2. Caractéristiques des gènes et protéines de résistance

Comme nous l'avons vu précédemment, les plantes ont développé des mécanismes de résistance à deux niveaux. Pour la PTI comme pour l'ETI, la reconnaissance de l'agent pathogène, via des PAMPs ou des effecteurs, nécessite un système de surveillance du non-soi appelé « gènes de résistance ». Ces derniers sont classés en plusieurs catégories et l'analyse des génomes végétaux montre l'importance quantitative des RGA (« Resistance Gene Analogs ») de chaque catégorie dans ces génomes et la plasticité évolutive de ces gènes (Tör *et al.*, 2009; Sekhwal *et al.*, 2015). Les RGA sont généralement distingués selon leur localisation cellulaire.

Ainsi, les TM-LRR (Transmembrane Leucine-Rich-Repeat) constituent une première catégorie de RGA. Ils sont ancrés dans la membrane des cellules végétales, grâce à leur domaine transmembranaire (Figure 22). Parmi les TM-LRR, il convient de distinguer les RLK (Receptor-Like Kinases), des RLP (Receptor-Like Proteins), qui tous les deux étaient considérés jusqu'à récemment surtout comme des PRR (Pattern-Recognition Receptors). Parmi les RLK, des sous-familles ont été constituées selon leurs caractéristiques structurales. On peut notamment citer les LRR (Leucine-Rich Repeat), les motifs Lysine (LysM), les WAK (Wall-Associated Kinases) et les RLCK (Receptor-Like Cytoplasmic Kinase).

Constituant une seconde catégorie, les NBS-LRR (Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich-Repeat) reconnaissent les effecteurs localisés dans le cytoplasme végétal, déclenchant l'ETI. Ce type de gène de résistance peut être divisé en deux catégories ; les (TIR)-NBS-LRR (Toil Interleukin Receptors) et les (CC)-NBS-LRR (Coiled Coil Receptors). Comme l'illustre la Figure 22, ils diffèrent par les domaines qui les constituent.

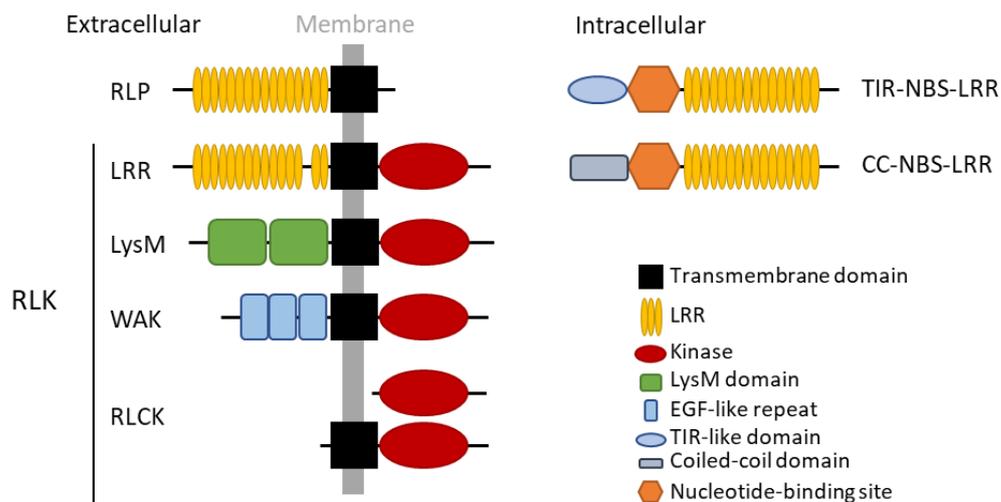


Figure 22 : Principales classes d’analogues de gènes de résistance

Les RLP et RLK, par leur localisation en partie extracellulaire reconnaissent les PAMP et les effecteurs produits dans l’apoplasme, tandis que les récepteurs intracellulaires dits NBS-LRR reconnaissent plutôt les effecteurs adressés au cytoplasme.

Abréviations : RLP, Receptor-like protein ; RLK, Receptor-like kinase ; LRR, Leucine-rich repeats ; LysM, Lysine motif ; WAK, Wall-associated kinase ; NBS, Nucleotide-binding site ; TIR, Toll and interleukin ; CC, Coiled-coil ; EGF, Epidermal growth factor (D’après Sekhwal *et al.*, 2015 et Tör *et al.*, 2009).

En termes de rôle dans l’immunité végétale, les NBS-LRR détectent les effecteurs dans le cytoplasme et déclenchent l’ETI. Les RLK et RLP quant à eux sont impliqués dans la PTI, lorsqu’ils détectent des PAMPs, permettant ainsi la reconnaissance d’un large spectre d’agents pathogènes (Sekhwal *et al.*, 2015). Toutefois, chez les champignons à la colonisation apoplasmique, comme *L. maculans* et *Z. tritici*, les effecteurs sont détectés dans l’apoplasme par des RLK et des RLP, qui déclenchent l’ETI. En effet, plusieurs effecteurs apoplasmiques sont détectés par des RLK. Chez *L. maculans*, le gène *Rlm2/LepR3* code un récepteur LRR-RLP, et *Rlm9* code un récepteur WAKL (Larkan *et al.*, 2015, 2020). De même, chez *Z. tritici*, le gène *Stb6* code également un récepteur WAKL (Saintenac *et al.*, 2018). D’une manière générale, l’ETI lors de l’infection par un champignon apoplasmique est probablement déclenchée par la reconnaissance des effecteurs apoplastiques par des RLP et des RLK. Plusieurs exemples illustrent le fait que cette dichotomie entre ETI et PTI mais également entre PRR et protéines de résistance n’est probablement pas aussi stricte qu’elle ne l’a été conceptualisée au départ. Ces aspects seront également abordés dans la partie 5.1.

Une étude récente s'est penchée sur la recherche de RGA dans 32 génomes d'espèces de *Brassicaceae* (Tirnaz *et al.*, 2020). Parmi ces espèces, les deux génomes de *Brassica napus* étudiés sont ceux qui contiennent le plus de RGA. Ainsi, les cultivars 'ZS11' et 'Darmor-bzh' contiennent respectivement 2343 (NBS-LRR, 566 ; RLK, 1,517 ; RLP, 260) et 2391 (NBS-LRR, 621 ; RLK, 1,497 ; RLP, 273) analogues de gènes de résistance. En parallèle, une étude s'est penchée sur la diversité des gènes de résistance parmi des données de reséquençage de 50 lignées de *B. napus* (Dolatabadian *et al.*, 2020). Cette étude a identifié 1749 RGA, soit environ 600 gènes de moins que l'étude de Tirnaz *et al.* (2020). Parmi les 1749 RGA, 996 gènes sont présents dans toutes les lignées étudiées. La présence des 753 autres gènes est donc variable selon les lignées, cette variabilité pouvant être liée à la qualité variable des séquençages. Ces deux études illustrent bien la difficulté d'identifier précisément le nombre de gènes de résistance, notamment chez *B. napus* qui est une espèce allotétraploïde.

Parmi les 15 gènes de résistance impliqués dans des relations gène-pour-gène connues chez le colza, seuls trois gènes ont été clonés. Il s'agit de *LepR3* (Larkan *et al.*, 2013) et *Rlm2* (Larkan *et al.*, 2015), qui s'avèrent être deux variants alléliques d'un même gène codant un LRR-RLP. Le gène *Rlm9*, qui se trouve être un gène codant un WAK, a également été cloné (Larkan *et al.*, 2020).

Pendant longtemps, les gènes de résistance des plantes étaient considérés comme constitutivement exprimés. Pourtant, leur expression, tout comme celle des effecteurs semble être régulée au cours de l'infection et durant la vie de la plante. Chez *Arabidopsis thaliana*, les NBS-LRR sont différenciellement exprimés selon les tissus, le stade de développement ou le génotype (Michelmore *et al.*, 2013). Certains gènes semblent même être spécifiques des parties aériennes ou bien des parties racinaires. Lors de l'infection de *B. napus* par *L. maculans*, l'expression du gène *Rlm9* est induite lorsque *L. maculans* est inoculé, par comparaison avec un témoin non inoculé (Larkan *et al.*, 2020). Le dogme des gènes de résistance constitutifs est ainsi remis en cause.

4.2. La résistance quantitative

A l'inverse de la résistance qualitative, considérée comme monogénique, la résistance quantitative est définie comme une résistance polygénique, conférée par plusieurs loci à effet partiel (Poland *et al.*, 2009; Niks *et al.*, 2015; Pilet-Nayel *et al.*, 2017). Elle mène généralement à une limitation des symptômes ou à une limitation du développement du bioagresseur ou de sa multiplication, et rarement à une absence totale de symptômes. La notion de résistance quantitative recoupe plusieurs termes, tels que la résistance horizontale, la résistance au champ ou bien la résistance au stade-adulte, qui toutefois ne désigne pas exactement les mêmes types de résistance (Cowger & Brown, 2019). Par la suite, nous garderons le terme de résistance quantitative.

4.2.1. Les « Quantitative Trait Loci »

Si l'on traite de résistance quantitative, alors il faut définir les « Quantitative Trait Loci » (QTL), c'est-à-dire les régions chromosomiques associées à un caractère quantitatif, ici la résistance quantitative à un agent pathogène. Ainsi, les QTL participent à la résistance quantitative, avec des effets faibles à modérés sur la résistance. Les QTL identifiés à ce jour regroupent un nombre variable de gènes (de 45 à 2745 gènes chez *B.napus*; Kumar *et al.*, 2018) et présentent des fonctions moléculaires très diverses, telles que des fonctions de lipase, de transporteur ou de kinase (Tableau 2). Hormis quelques exceptions, les gènes à effet conséquent, impliqués dans la résistance quantitative ne codent pas de NB-LRR ou de PRR (Roux *et al.*, 2014). De plus, l'effet des QTL sur la résistance aux maladies peut être variable selon les conditions environnementales (Pilet *et al.*, 2001; Fopa Fomeju *et al.*, 2015; Jestin *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2018). Dans certains cas, qui ne constituent pas la majorité des QTL identifiés à ce jour, des gènes montrant un fort effet phénotypique ont été identifiés (Tableau 2). De façon générale, l'analyse fonctionnelle et la validation des QTL restent complexes, par l'effet partiel des gènes considérés. De fait, ces derniers n'ont souvent été validés que pour des QTL à forte contribution au phénotype de résistance.

Tableau 2 : Sélection de gènes impliqués dans la résistance quantitative et montrant un fort effet phénotypique (D'après Barbacci et Raffaele, 2021)

Locus	Espèce végétale	Fonction moléculaire	Agents pathogènes	Références
<i>At1g06990</i>	<i>A. thaliana</i>	Lipase	<i>Alternaria brassicae</i>	Rajarammohan <i>et al.</i> , 2018
<i>POQR</i>	<i>A. thaliana</i> <i>S. lycopersicum</i>	Endopeptidase	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Badet <i>et al.</i> , 2017
<i>Yr36</i>	<i>Triticum turgidum</i>	Kinase-START (Liaison aux lipides)	<i>Puccinia striiformis</i>	Fu <i>et al.</i> , 2009
<i>Lr34</i>	<i>Triticum sp.</i>	Transporteur ABC	Champignons pathogènes	Krattinger <i>et al.</i> , 2009
<i>Pi21</i>	<i>Oryza sativa</i>	-	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Fukuoka <i>et al.</i> , 2009

Concernant le pathosystème *L. maculans* / *B. napus*, le nombre de macules formées par *L. maculans* à l'automne n'est pas corrélé avec la sévérité des symptômes observés au collet à la fin de la saison culturale (Huang *et al.*, 2009). Par exemple, certains génotypes connus pour montrer une forte sensibilité foliaire, tel que 'Darmor' sont aussi des références de résistance quantitative. Ainsi, l'évaluation de la résistance quantitative des cultivars de colza ne peut se faire qu'à la fin de la saison culturale, en utilisant l'échelle de notation G2 pour évaluer le pourcentage de nécrose au collet (Figure 23).

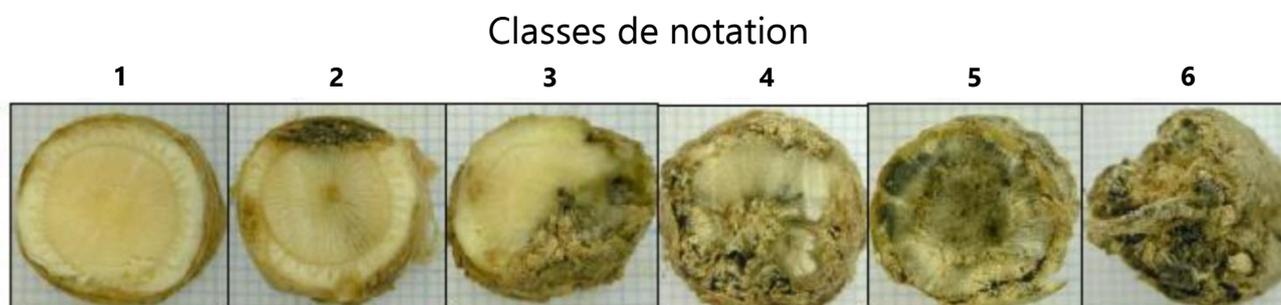


Figure 23 : Echelle de notation G2

Il s'agit de photos de sections de tiges, réalisées au niveau du collet en fin de saison culturale. Cette échelle de notation permet d'évaluer la résistance quantitative des génotypes au champ, vis-à-vis de la nécrose au collet (D'après Aubertot *et al.*, 2004).

Les premiers QTL de résistance au phoma ont été identifiés en 1998 (Pilet *et al.*, 1998), avec des différences notables selon l'année d'expérimentation. Plusieurs études suivirent et ont permis d'identifier de nouveaux QTL de résistance chez *B. napus* (Pilet *et al.*, 2001; Jestin *et al.*, 2011, 2012; Kumar *et al.*, 2018; Raman *et al.*, 2018, 2020). En combinant plusieurs approches d'identification de QTL (cartographie de populations et Genome-Wide Association Study - GWAS), Kumar *et al.* (2018) ont compilé respectivement 31 et 29 régions QTL sur les génomes A et C de *B. napus* (Figure 24). Des gènes homéologues de *B. napus* ont été identifiés dans huit paires de régions homéologues, correspondant à 657 paires de gènes homéologues.

Récemment, un QTL de résistance a été identifié comme impliqué dans la résistance lors du développement de *L. maculans* dans les feuilles de jeunes plantes cultivées en conditions contrôlées (Huang *et al.*, 2019). Ce QTL colocalise avec un QTL de résistance, détecté dans des plantes adultes cultivées au champ. Il semblerait donc que la résistance à la colonisation du pétiole et de la tige vers le collet contribue à la résistance quantitative évaluée à la fin de la saison culturale.

Chez *B. napus*, la résistance quantitative au phoma du colza permet de limiter le développement de la maladie (Delourme *et al.*, 2006). De plus, par son caractère polygénique, la résistance quantitative est considérée comme plus durable que la résistance qualitative. Elle permet également de limiter les dégâts en cas de contournement d'un gène *R/m*. Ainsi, idéalement, résistances qualitatives et quantitatives doivent être combinées pour obtenir des génotypes avec des résistances spécifiques plus durables (Brun *et al.*, 2010).

D'une manière générale, de nombreux QTL avec des effets faibles à modérés participent à la résistance quantitative. Au vu de la longueur du cycle cultural du colza, l'identification de QTL de résistance chez *B. napus* est difficile et leur efficacité est variable.

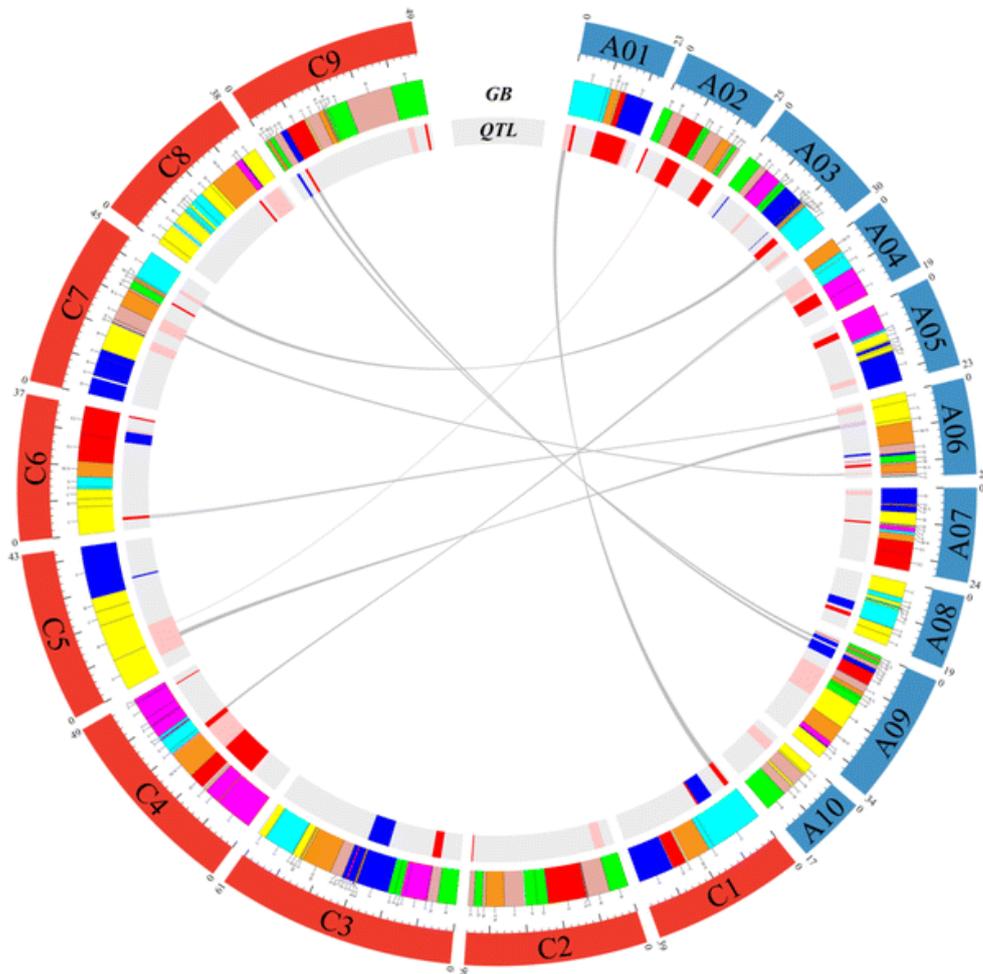


Figure 24 : Carte physique comparative montrant la relation homéologique entre les gènes sous-jacents aux QTL de résistance au phoma du colza

Relations homéologiques visualisées par Circos. L'anneau extérieur représente les chromosomes de *B. napus*. L'anneau central représente les blocs génomiques (GB) d'*Arabidopsis thaliana*. L'anneau intérieur représente la compilation des intervalles correspondant à des QTL identifiés par analyse de liaison (en rouge) et par analyse d'association (en bleu). Le rouge foncé et le bleu indiquent les QTL détectés par BLUP (« Best Linear Unbias Predictor »), d'après Kumar *et al.*, (2018).

4.2.2. Les relations QTLs-QTLs

En 1977, Parlevliet et Zadoks ont formulé une hypothèse qui consiste à penser que la résistance quantitative pourrait être au moins partiellement due à des relations de type gène-pour-gène (Parlevliet & Zadoks, 1977). Depuis, plusieurs exemples illustrent cette hypothèse (Cowger & Brown, 2019). Parmi les QTL de résistance du maïs à *Exserohilum turcicum*, l'un d'entre eux est un récepteur Wall-Associated Kinase, similaire aux récepteurs connus pour leur rôle dans l'immunité végétale, via la PTI et l'ETI (Hurni *et al.*, 2015). Des gènes candidats pour d'autres QTL incluent des récepteurs RLK, également associés aux défenses basales de la plante (Poland *et al.*, 2011).

D'après l'étude de González *et al.* (2012), sur l'orge, trois QTL de résistance à *Puccinia hordei* interagissent d'une manière gène-pour-gène avec des gènes du champignon. Il semble donc possible de parler d'interaction gène mineur – pour – gène mineur dans le cadre de la résistance quantitative, au moins pour une partie des QTL de résistance.

Cette hypothèse bouleverse la dichotomie classique résistance qualitative / résistance quantitative, qui est assez systématiquement admise. Dans les deux cas, des interactions gène-pour-gène seraient impliquées, menant soit à une réponse forte dite d'hypersensibilité, soit à une réponse quantitative due à un effet mineur de plusieurs interactions gène-pour-gène (Figure 25).

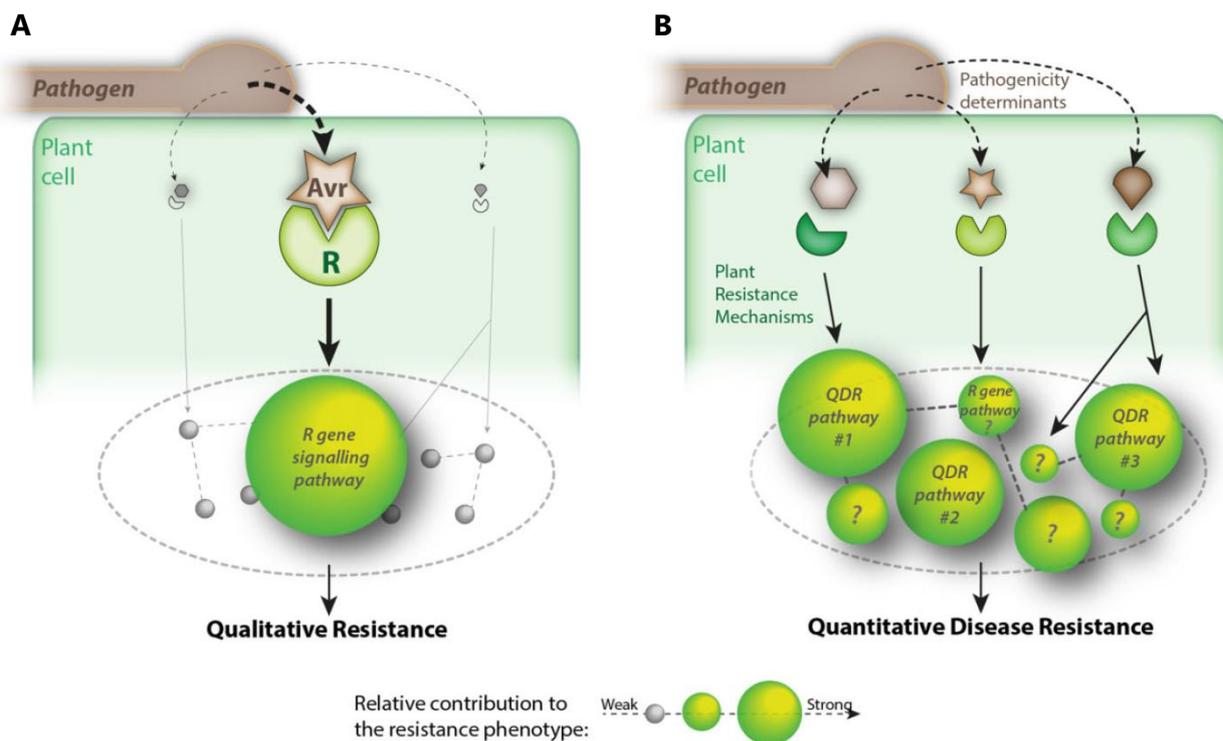


Figure 25 : Dichotomie entre résistance qualitative et quantitative, d'un point de vue moléculaire

La figure illustre la nature de la résistance qualitative (A) et de la résistance quantitative, QDR pour « Quantitative Disease resistance » (B). D'un point de vue moléculaire, la résistance qualitative résulte de la perception d'un effecteur de l'agent pathogène (Avr) par un gène de résistance de la plante (R), tandis que la résistance quantitative résulte de multiples voies de perceptions, chacune ayant une contribution partielle au phénotype de résistance quantitative (D'après Roux *et al.*, 2014).

Ainsi, dans le cadre du pathosystème *L. maculans* / *B. napus*, la résistance quantitative, observée à la fin de la saison culturale pour certains cultivars, pourrait par exemple être due à des reconnaissances gène-pour-gène, qui induisent la mise en place des défenses de la plante et qui ralentiraient le développement du champignon au cours du cycle ou qui limiteraient le développement de la nécrose au collet. Cependant, d'autres mécanismes pourraient jouer un rôle dans la résistance quantitative. On peut par exemple imaginer une lignification plus importante chez certains génotypes. De même, chez d'autres pathosystèmes, des transporteurs sont impliqués dans la résistance quantitative (cf. partie 3.2 de la discussion).

5. Un système en perpétuelle évolution

Dans la partie 3, nous avons étudié l'arsenal déployé par les organismes filamenteux pour coloniser leurs hôtes. Dans la partie 4, nous avons vu que les plantes possèdent des mécanismes immunitaires de défense et de résistance aux agents pathogènes. Dans cette partie, nous verrons que ces interactions plantes / agents pathogènes ne sont pas figées. Ainsi, les mécanismes et molécules impliqués dans ces interactions, sont en perpétuelle évolution. Nous verrons également que cette évolution des interactions pathogènes entraîne un contournement des résistances à ces agents pathogènes et qu'il est donc constamment nécessaire d'identifier de nouvelles sources de résistance végétale.

5.1. La coévolution hôte-pathogène

Au cours de l'évolution, plantes et agents pathogènes ont évolué ensemble dans l'objectif de survivre à l'infection par les uns ou bien de réussir à infecter les autres. Cette évolution a nécessité plusieurs mécanismes, conceptualisés dans le modèle zig-zag (Jones & Dangl, 2006). Dans ce modèle, la coévolution plante/agent phytopathogène est divisée en quatre phases (Figure 26).

Dans une première phase, les PAMP sont reconnus par les récepteurs PRR de la plante, induisant la PTI, qui avec un niveau de défense modéré limite l'infection. Dans une seconde phase, les agents pathogènes ayant passé la première phase peuvent sécréter des effecteurs, qui vont interférer avec la PTI. C'est ce que l'on nomme l'ETS (Effector-Triggered Susceptibility). Dans une troisième phase, les plantes ont développé des mécanismes leur permettant de surmonter l'ETS. Un effecteur est spécifiquement reconnu par une protéine de résistance, induisant l'ETI. Cette reconnaissance peut être indirecte ou directe par interaction avec la protéine de résistance en question. Les réponses de la plante qui en découlent sont plus rapides et plus importantes que celles de la PTI, menant généralement à une réponse hypersensible qui bloque l'agent pathogène au niveau du site d'infection. Dans une quatrième phase, la sélection naturelle entraîne une diversification, une perte ou une acquisition d'effecteurs chez l'agent pathogène, lui permettant d'éviter l'ETI. En parallèle chez la plante, la sélection naturelle ou artificielle d'origine anthropique permet de sélectionner de nouvelles résistances, pour pouvoir de nouveau mettre en place l'ETI.

Cette course à l'armement entre plantes et agents phytopathogènes évolue en permanence. Il faut donc voir le modèle zig-zag comme un modèle en perpétuel mouvement.

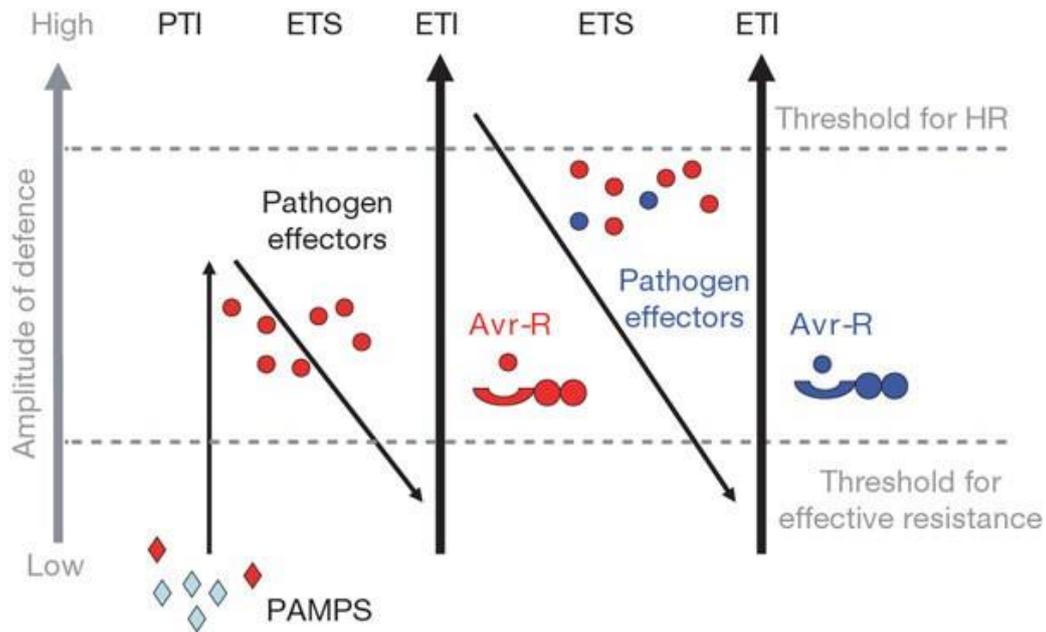


Figure 26 : Le modèle zig-zag

Les PAMP (Pathogen – Associated Molecular Patterns) reconnus par les PRR (Pattern-Recognition Receptors) de la plante entraînent le déclenchement de la PTI (PAMP Triggered Immunity). Les agents pathogènes ayant les effecteurs nécessaires peuvent contourner la PTI et infecter l'hôte, ce qui correspond à l'ETS (Effector Triggered Susceptibility). Certains individus parmi les espèces végétales peuvent évoluer et produire des récepteurs capables de reconnaître spécifiquement ces effecteurs, menant à l'ETI (Effector Triggered Immunity). Avec l'évolution naturelle des organismes, les effecteurs peuvent être modifiés ou perdus pour éviter l'ETI. En parallèle, de nouveaux récepteurs peuvent reconnaître les nouveaux effecteurs et induire de nouveau l'ETI (D'après Jones et Dangl, 2006).

Depuis le modèle zig-zag, d'autres modèles ont été conceptualisés remettant notamment en cause la dichotomie trop stricte entre PTI et ETI (Cook *et al.*, 2015). L'immunité végétale serait plutôt un continuum, qui évolue pour détecter les agents pathogènes. La séparation stricte entre PTI et ETI n'est probablement pas aussi claire qu'initialement conceptualisée (Figure 27).

Il existe des exceptions au schéma binaire, qui associe PAMP et PTI d'une part et effecteurs et ETI d'autre part. Par exemple, certains effecteurs comme les NLP sont très conservés, chez des bactéries, des oomycètes et des champignons. Une étude récente a identifié une région de 20-24 acides aminés chez des NLP (nommées respectivement nlp20 et nlp24) qui induirait la PTI. Ces effecteurs pourraient donc être considérés comme des PAMP (Böhm *et al.*, 2014; Oome & Van Den Ackerveken, 2014). A l'inverse, la flagelline, très conservée chez les bactéries est considérée comme un PAMP, induisant la PTI. Toutefois, une région différente dans la flagelline de certains pathovars de *Pseudomonas syringae* a été identifiée et nommée flgII-28. Cette variante de la flagelline n'est pas reconnue par toutes les *Solanaceae*, qui habituellement reconnaissent la flagelline flg22 (Cai *et al.*, 2011; Clarke *et al.*, 2013).

Ainsi, la PTI est généralement considérée comme peu dynamique, impliquant d'une part des PAMP stables et conservés et d'autre part des PRR évoluant peu. Pourtant comme l'illustrent les deux exemples précédents, il semblerait que les PRR évoluent pour détecter l'invasion par les agents pathogènes et qu'en parallèle les PAMP soient sous pression de sélection pour éviter la reconnaissance par les PRR (Michelmore *et al.*, 2013; Vinatzer *et al.*, 2014). L'évolution des PRR serait donc similaire à celle des gènes majeurs de résistance répondant à des agents pathogènes spécifiques à l'hôte.

D'une manière générale, la reconnaissance par l'hôte et l'évitement par l'agent pathogène de cette reconnaissance sont deux moteurs de coévolution. Ainsi, un second modèle a été proposé par Cook *et al.* (2015), appelé le modèle d'invasion (IM ; Invasion Model). Illustré par la Figure 27, ce modèle implique des récepteurs de motifs d'invasion (IPR ; Invasion Pattern Receptors) qui reconnaissent des motifs d'invasion (IP ; Invasion Patterns).

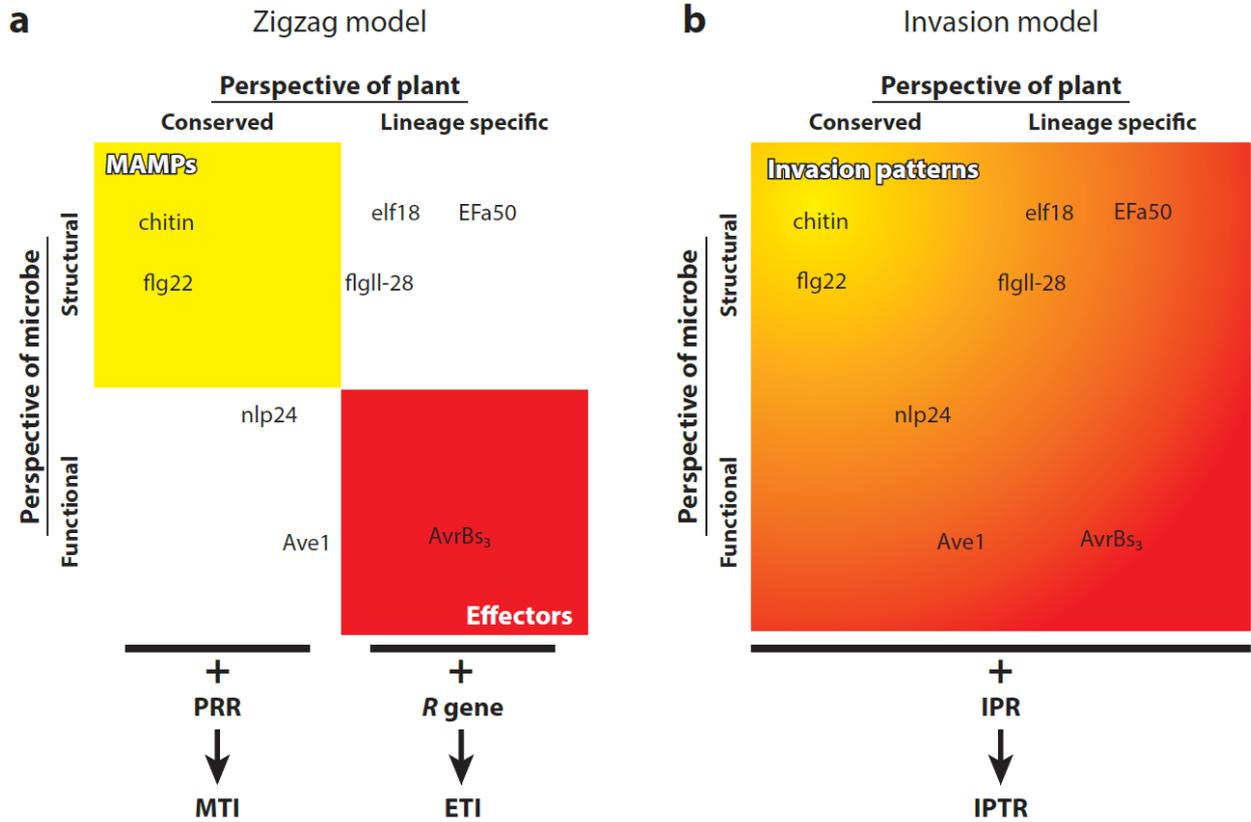


Figure 27 : Comparaison du modèle zig-zag et du modèle d'invasion

(a) Le modèle zig-zag sépare la MTI (MAMP-triggered immunity, en jaune) impliquant la reconnaissance des MAMP/PAMs par les PRR et l'ETI (effector-triggered immunity, en rouge) impliquant la reconnaissance d'effecteurs par des gènes R. Certaines molécules ne se trouvent ni complètement dans l'ETI ni dans la MTI. (b) Le modèle d'invasion est représenté comme un continuum, où les motifs d'invasion (IP ; Invasion Patterns) sont reconnus les récepteurs d'IP (IPR ; Invasion Patterns Receptors), induisant une réponse dite IP-triggered response (IPTR) (D'après Cook *et al.*, 2015).

5.2. Le contournement rapide des résistances

Comme nous l'avons vu auparavant, les pathosystèmes sont en perpétuelle évolution, menant à une coévolution étroite entre l'agent phytopathogène et son hôte végétal. Cette course à l'armement entraîne la sélection de nouvelles résistances puis le contournement de ces résistances par l'agent pathogène. Le premier contournement de résistance connu a eu lieu en 1916 (Kommedahl *et al.*, 1970). Trois variétés de lin, déployées en 1913 et hautement résistantes à *F. oxysporum* f. sp. *lini* y ont été sensibles dès 1916.

D'autres exemples comme celui-ci suivirent. Ce phénomène appelé « Boom-and-bust » est bien documenté pour les cultures céréalières, notamment le blé et l'orge (McDonald & Linde, 2002). Ces cycles alternent entre un large déploiement d'une variété comportant un gène majeur de résistance à l'agent pathogène (« Boom ») puis rapidement les individus contournant cette résistance sont sélectionnés dans la population pathogène, menant à la perte d'efficacité de la résistance (« Bust »). Le contournement des gènes de résistance est plus ou moins rapide selon le pathosystème.

La durabilité d'un gène de résistance semble également dépendante du gène de résistance en question. Pour le pathosystème *L. maculans* / *B. napus*, plusieurs gènes de résistance *Rlm* ont déjà été contournés, plus ou moins rapidement (Rouxel & Balesdent, 2017). Par exemple, le cultivar 'Capitol' portait le gène *Rlm1*. Un rapide changement de la population de *L. maculans* s'est opéré en quelques années, portant la population de 15% d'isolats virulents en 1997 à plus de 93% d'isolats virulents en 1999 (Rouxel *et al.*, 2003a). En revanche, le gène *Rlm7* s'avère être plus durable que *Rlm1*, puisqu'après plus de dix ans de déploiement au champ, seulement 19% d'isolats virulents ont été observés en 2013 en France (Balesdent *et al.*, 2015). Cependant une progression plus rapide a été observée ultérieurement, avec 50% de souches virulentes en 2017 (Balesdent *et al.*, 2019) et près de 80% en 2019 (M.H. Balesdent, communication personnelle).

Concernant la résistance quantitative, réputée plus durable que la résistance qualitative, des cas de contournement ou d'adaptation à la résistance quantitative ont déjà été rapportés. C'est notamment le cas de *P. infestans* sur la pomme de terre (Andrивon *et al.*, 2007). Cette étude a montré que *P. infestans* est capable de s'adapter aux cultivars de pomme de terre majoritairement cultivés. En effet, en France, où le cultivar sensible 'Bintje' dominait la production, les populations de *P. infestans* étaient plus agressives sur ce cultivar que sur 'Desirée', un cultivar avec de la résistance quantitative. Au Maroc à l'inverse, où 'Desirée' était largement cultivé, les isolats étaient aussi voire plus agressifs sur ce cultivar que sur 'Bintje'. Ces résultats d'inoculations croisées indiquent que les populations de *P. infestans* se sont adaptées aux variétés majoritairement cultivées dans chaque région, que la variété soit sensible ou avec un bon niveau de résistance quantitative (Andrивon *et al.*, 2007; Cowger & Brown, 2019).

De même, l'augmentation de l'agressivité des isolats de *Z. tritici* a été observée au cours d'une saison culturale (Cowger & Mundt, 2002). Après deux années successives d'essais en conditions naturelles d'infection, les cultivars de blé ayant un bon niveau de résistance quantitative ont sélectionné des isolats de *Z. tritici* plus agressifs que les cultivars sensibles (Cowger & Mundt, 2002; Cowger & Brown, 2019). Chez le pommier, le QTL *T1*, permet une résistance quantitative à *V. inaequalis*, responsable de la tavelure du pommier. Etant un QTL « isolat-spécifique », il était attendu qu'il ne soit pas très durable. Toutefois, il s'avère que la résistance quantitative de ce QTL est restée efficace dans les vergers de pommier durant au moins huit ans, avec tout de même une légère érosion de son efficacité (Caffier *et al.*, 2016). Sur ce même pathosystème, l'étude de Caffier *et al.* (2014) illustre le processus d'érosion de la résistance quantitative, au cours du temps. En effet, selon les vergers étudiés, la résistance quantitative des génotypes de pommier combinant deux QTL de résistance à la tavelure, F11 et F17 s'est érodée, voire s'est avérée inefficace.

Malgré ces exemples d'adaptation des agents pathogènes à la résistance quantitative ou l'érosion de certains QTL, la résistance quantitative reste généralement plus durable que la résistance qualitative (Niks *et al.*, 2015; Cowger & Brown, 2019). Pour prolonger la longévité d'un cultivar résistant, plusieurs exemples tendent à prouver que la durabilité d'un gène majeur de résistance peut être augmentée en le combinant à un bon niveau de résistance quantitative. Cette stratégie a été validée pour au moins trois pathosystèmes très divers : le virus Y de la pomme-de-terre (PVY) sur le poivron (Palloix *et al.*, 2009) ; le nématode *Globodera pallida* sur la pomme-de-terre (Fournet *et al.*, 2013) et le champignon *L. maculans* sur le colza (Brun *et al.*, 2010). Ainsi, chez *B. napus*, le gène *Rlm6* a été introduit dans deux cultivars, l'un sensible, l'autre avec un bon niveau de résistance quantitative. Après cinq ans d'expérimentations au champ, le gène de résistance *Rlm6* était contourné au bout de trois ans chez le cultivar sensible, tandis qu'il était toujours efficace chez le cultivar avec résistance quantitative (Brun *et al.*, 2010). De façon plus empirique, le cultivar de *B. napus* 'Jet Neuf' combine un haut niveau de résistance quantitative, avec le gène *Rlm4*. Déployé au champ en 1977, aucun contournement du gène *Rlm4* n'avait été observé après plus de dix ans de culture (Rouxel *et al.*, 2003b). Seulement, quelques années plus tard, le gène *Rlm4*, également introduit dans d'autres fonds génétiques, fut contourné avec seulement 2,3% des isolats avirulents pour *Rlm4*, à l'échelle européenne en 2006 (Stachowiak *et al.*, 2006). La résistance quantitative de 'Jet Neuf' a donc permis de conserver la résistance du gène *Rlm4* pendant plus de dix ans, sans toutefois éviter son contournement à terme. Actuellement, parmi les gènes de résistance largement déployés au champ, seuls les gènes *Rlm3* et *Rlm7* sont encore efficaces, bien que le gène *Rlm7* soit en cours de contournement. Le gène *Rlm5* commence maintenant à être déployé dans les variétés commerciales, depuis quelques années (Rouxel & Balesdent, 2017, Tableau 3).

Pour finir, comme nous l'avons vu précédemment, la résistance quantitative pourrait impliquer des interactions entre gènes mineurs de l'agent pathogène et de la plante. Nous savons également que les effecteurs tardifs sont des gènes conservés dans les populations de *L. maculans* et de par leur environnement génomique sont susceptibles d'évoluer moins vite que les gènes *AvrLm* (Gervais *et al.*, 2017). S'ils sont impliqués dans des relations gène-pour-gène, menant à la résistance quantitative, alors cette résistance aux effecteurs tardifs a de bonnes chances d'être plus durable que les gènes de résistance spécifiques aux gènes *AvrLm* identifiés jusqu'à présent.

Tableau 3 : Contournement des gènes *Rlm* de *B. napus*

Adapté de Rouxel et Balesdent (2017). NA : Données manquantes

Gène <i>Rlm</i>	Date de première utilisation	Cultivar	Date estimée de contournement (France)
<i>Rlm1</i>	1992	Vivol	1999
	1995	Capitol	
<i>Rlm2</i>	1970	Ramsès	1972
<i>Rlm3</i>	1992?	NA	NA
<i>Rlm4</i>	1971	Major	1999?
	1977	Jet Neuf	
<i>Rlm5</i>	NA	NA	NA
<i>Rlm6</i>	NA	NA	NA
<i>Rlm7</i>	2002	Roxet	En cours
	2005	Exagone	
		Exocet	
<i>Rlm8</i>	NA	NA	NA
<i>Rlm9</i>	NA	NA	NA
<i>Rlm10</i>	NA	NA	NA
<i>Rlm11</i>	NA	NA	NA
<i>RlmS</i>	NA	NA	NA

5.3. La recherche de nouvelles sources de résistances

Avec le contournement rapide des résistances, identifier régulièrement de nouvelles sources de résistance, si possible plus durables, est une priorité. Ainsi, les analyses *in silico* permettent d'identifier des RGA putatifs, comme nous l'avons vu dans la partie 4.1.2 (Dolatabadian *et al.*, 2020). Ce type d'approche permet d'identifier des gènes candidats impliqués dans la résistance qualitative. Toutefois, cette approche ne peut être appliquée à la recherche de gènes impliqués dans la résistance quantitative, du fait de la diversité de leurs fonctions (cf. partie 4.2.1). De plus, identifier *in silico* des RGA candidats ne donne aucune idée sur leur pertinence ou leur efficacité, s'il s'avère qu'ils sont effectivement impliqués dans la résistance. Il est donc nécessaire de passer par des tests biologiques.

Pour identifier de nouveaux gènes de résistance qualitative, le criblage de nombreuses accessions est une méthode souvent employée (Rouxel *et al.*, 2003b; Dilmaghani *et al.*, 2013; Vasudevan *et al.*, 2014). Elle permet d'identifier des génotypes avec un phénotype de résistance à l'agent pathogène étudié, en utilisant des tests pathologiques miniaturisés (plantules, organes isolés, etc...). Toutefois, ce type d'expérience est souvent limité par la reproductibilité des tests, la fixité du matériel puisque les collections de génotypes (surtout anciens) correspondent souvent à des populations plutôt qu'à des lignées pures, parfois également par l'hétérozygotie des variétés (Rouxel *et al.*, 2003b). Lorsque des génotypes avec un phénotype de résistance qualitative sont identifiés, réaliser des croisements entre un génotype sensible et le génotype résistant, associés à de la cartographie génétique permettent de caractériser le déterminisme génétique de la résistance et de cartographier les loci impliqués, pour en final générer des marqueurs pour de la sélection assistée par marqueurs, voire cloner le gène d'intérêt. Dans notre modèle, cette approche a permis par exemple de cartographier les gènes *Rlm3* et *Rlm7*, chez *B. napus* (Delourme *et al.*, 2004).

En ce qui concerne la résistance quantitative, compte-tenu de la diversité des fonctions des gènes localisés sous les QTL, le criblage de ressources génétiques est beaucoup plus complexe et ne peut impliquer des tests miniaturisés que s'ils sont accompagnés de phénotypage de précision (mesures de temps de latence, d'intensité de sporulation, quantification de biomasse fongique dans les tissus, etc.). Bien souvent, les approches QTL permettent de cartographier des sources de résistance quantitative, mais ne sont pas pertinentes pour le criblage de ressources génétiques, puisque basées sur un croisement entre deux génotypes montrant un différentiel de résistance quantitative à une maladie. De telles approches ont par exemple permis d'identifier un QTL de résistance à *P. striiformis* dans le blé (Yuan *et al.*, 2018), mais également huit QTL de résistance à *L. maculans* chez *B. napus* (Raman *et al.*, 2018).

De façon plus pertinente pour la découverte de nouvelles résistances quantitatives, les analyses GWAS (« Genome-Wide Association Study ») permettent d'associer des polymorphismes de séquence à un phénotype de résistance. Toutefois, ces analyses sont réalisées avec des populations naturelles présentant des niveaux de résistance contrastés, et la qualité de phénotypage est plus que jamais critique pour identifier *a priori* les différences de résistance quantitative. De nouveau chez le blé, une analyse GWAS a permis d'identifier sept QTL d'intérêt, liés à la résistance du blé à *P. striiformis* (Ledesma-Ramírez *et al.*, 2019). De même, 59 SNP significativement liés à la variation de résistance quantitative ont été identifiés chez *B. napus* (Raman *et al.*, 2020). Ainsi, ces deux méthodes nécessitent toutes deux une étape de génotypage pour identifier des marqueurs et une étape de phénotypage de grande qualité pour déterminer le niveau de résistance de chaque individu étudié. Dans notre modèle, où la résistance quantitative est évaluée au terme de l'année de culture au champ, la précision et la variabilité du phénotypage rendent difficile d'envisager les approches GWAS pour le criblage des ressources génétiques, sauf à accepter une part d'erreur importante.

L'essor des nouvelles générations de séquençage a enfin ouvert les portes des analyses transcriptomiques. Ainsi, analyser les différences d'expression des gènes entre plantes saines et inoculées (Schweiger *et al.*, 2013) ou bien entre un cultivar sensible et un résistant (Hubbard *et al.*, 2020) peut permettre d'identifier des gènes impliqués dans la résistance de la plante. Là encore, à ce stade, il s'agit d'une perspective pour différencier différents niveaux de résistance quantitative, mais très loin d'être utilisable pour la découverte de nouvelles sources de résistance dans les collections de génotypes.

Ces différentes approches sont théoriquement complémentaires pour identifier de nouvelles sources de résistance, mais quels que soient les développements méthodologiques et technologiques du futur, le phénotypage précis restera incontournable. Toutefois, développer de nouvelles approches innovantes reste nécessaire, notamment pour simplifier la caractérisation de la résistance quantitative, qui est souvent évaluée au champ. Dans le cas de la culture de colza, par exemple, comme nous l'avons vu dans la partie 4.2.2, l'évaluation de la résistance quantitative se fait au champ, à la fin de la saison culturale, qui dure plusieurs mois, est donc fastidieuse et est aléatoire selon le niveau de l'épidémie. Identifier et caractériser la résistance quantitative sans passer par la note G2 serait donc tout particulièrement intéressant (cf. Chapitre III).

6. Objectifs de ce projet

Pour le pathosystème *B. napus* / *L. maculans*, l'identification de nouvelles sources de résistance au phoma est indispensable, puisqu'il s'agit du principal moyen de lutte contre la nécrose du collet. Avec un cycle de vie complexe alternant entre mode de vie saprophyte, biotrophe et nécrotrophe, *L. maculans* produit par vagues des effecteurs, spécifiques des différentes étapes de colonisation de la plante. Les effecteurs clés produits lors de l'infection des cotylédons (vague 2, Gay *et al.*, 2021) sont bien étudiés, mais les résistances correspondantes sont généralement assez vite contournées.

En revanche, les effecteurs spécifiques de la colonisation du pétiole et de la tige, ainsi que ceux impliqués dans la formation de la nécrose au collet sont moins étudiés et donc moins bien caractérisés. Les travaux menés par Julie Gervais au cours de sa thèse (co-financée par Terres Inovia et le département SPE) ont permis de mettre en place une nouvelle stratégie permettant d'utiliser les effecteurs tardifs pour le criblage de ressources génétiques de colza (Gervais, 2017). Ses travaux lui ont permis d'identifier un locus de résistance, *RlmSTEE98* reconnaissant un effecteur tardif, *LmSTEE98* (Chapitre I). La machinerie cellulaire de la plante est donc capable de reconnaître les effecteurs tardifs, tous peu polymorphes et de nouvelles informations pour un choix éclairé des effecteurs les plus pertinents ont été générées dans l'équipe au cours de ma thèse et grâce à ma thèse (Chapitre II).

En parallèle de mes travaux, la thèse d'Elise Gay avait pour objectif d'utiliser les données de transcriptomique issues du projet Leptolife (Gay *et al.*, 2021). Son travail a permis de définir plus précisément des vagues d'expression de gènes au cours de l'infection de *B. napus* par *L. maculans*, et en particulier de mieux définir les effecteurs qui seraient spécifiques de la colonisation systémique des tiges. De plus, les déterminants de la résistance quantitative sont encore peu connus. La nécessité d'identifier de nouvelles sources de résistance au phoma du colza, cruciale pour la profession, nous a donc orientés vers l'identification de nouveaux effecteurs tardifs et la caractérisation de la résistance quantitative (Chapitres II et III). De ce besoin, découle la mise en place du projet FRSO EPHICAS, qui regroupe trois entreprises semencières (Lidea (anciennement Euralis Semences), Limagrain et RAGT), Terres Inovia et l'INRAE UMR Bioger, et dont Innolea a assuré le pilotage. Ma thèse CIFRE constitue un volet du projet EPHICAS, et a été réalisée en collaboration entre le laboratoire INRAE UMR Bioger, Lidea et Innolea.

Ainsi, l'objectif de mon projet de thèse était de valider l'hypothèse selon laquelle des effecteurs spécifiques de la colonisation des tiges peuvent être reconnus par de nouveaux gènes *R/m* et être impliqués dans la résistance quantitative du colza au phoma. Il s'agissait ensuite de contribuer à la découverte de nouveaux gènes de résistance utilisables en sélection, car présents dans des génotypes de colza, en particulier pour l'augmentation de la résistance quantitative par stratégie SAM (Sélection Assistée par Marqueurs).

Pour cet objectif, mon travail a été divisé en trois approches qui constituent les trois chapitres de ce manuscrit : (I) Poursuivre la caractérisation de l'interaction LmSTEE98 / RImSTEE98, notamment par inactivation du gène codant l'effecteur LmSTEE98, (II) Rechercher de nouvelles sources de résistance, en utilisant la même stratégie de criblage variétal, avec de nouveaux effecteurs tardifs candidats, mieux ciblés, grâce aux données transcriptomiques plus récentes (Gay *et al.*, 2021), (III) Etudier une possible corrélation entre l'expression des effecteurs de *L. maculans* et des gènes de *B. napus* lors de la colonisation de la plante au champ et la résistance quantitative des génotypes, pour générer des marqueurs de celle-ci. Mon manuscrit s'organise donc en trois chapitres, dont les deux premiers sont sous forme d'articles.

Chapitre I : Caractérisation d'une interaction gène-pour-gène avec l'effecteur tardif LmSTEE98

Dans le cadre de sa thèse, Julie Gervais a identifié et caractérisé cinq effecteurs « tardifs ». Dans l'objectif d'identifier des sources de résistance à ces effecteurs tardifs, elle a mis au point une approche de criblage variétal originale, utilisant le promoteur du gène d'avirulence *AvrLm4-7* pour exprimer ces effecteurs tardifs au stade cotylédonaire. Cette méthode a permis d'identifier un gène de résistance dans le cultivar 'Yudal', *RImSTEE98*, reconnaissant *LmSTEE98* exprimé lors de l'infection des cotylédons (Gervais, 2017).

Pour valider l'interaction entre LmSTEE98 et RImSTEE98, la technologie CRISPR-Cas9 m'a permis d'étudier l'effet de l'inactivation de *LmSTEE98* sur la reconnaissance par RImSTEE98 au stade cotylédonaire, et au stade plante entière et de démontrer l'existence d'une interaction gène-pour-gène à effet quantitatif.

Cette partie correspond à un article publié dans *New Phytologist*. Des résultats complémentaires, portant sur la localisation cellulaire et la suppression de la mort cellulaire par LmSTEE98 viennent compléter ce chapitre.

Chapitre II : Recherche de nouvelles sources de résistance aux effecteurs tardifs

Les résultats très encourageants du premier chapitre nous ont conduits à poursuivre cette stratégie en ciblant des effecteurs tardifs plus pertinents et de diversifier le panel de génotypes criblés, afin d'augmenter les chances d'identifier de nouvelles sources de résistance. Pour identifier de nouveaux effecteurs tardifs candidats, j'ai utilisé une partie des données transcriptomiques générées en 2014 lors du projet LEPTOLIFE (conditions contrôlées, conditions *in vitro*, conditions naturelles d'infection...). J'ai ensuite pu utiliser la stratégie d'expression précoce d'effecteurs tardifs pour rechercher de nouvelles sources de résistances, par criblage au stade cotylédonaire d'un panel de génotypes de colza plus représentatif de la diversité de l'espèce *B. napus*, en partenariat avec Innolea. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article, que nous prévoyons de soumettre dans la revue « Journal of Experimental Botany ».

Chapitre III : Caractérisation de la résistance quantitative au champ

Enfin, la résistance quantitative, source de résistance indispensable pour lutter durablement contre le phoma du colza, est encore difficile à évaluer au champ. Pour caractériser ce type de résistance, j'ai généré et analysé des données RNAseq à partir d'échantillons prélevés en conditions naturelles de culture. Ces données m'ont permis d'une part d'affiner la cinétique d'infection de *B. napus* par *L. maculans* et d'autre part d'identifier des gènes marqueurs candidats, qui permettraient de distinguer un génotype sensible d'un génotype ayant un bon niveau de résistance quantitative. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un chapitre en français.

Chapitre I : Caractérisation d'une interaction gène-pour-gène avec l'effecteur tardif LmSTEE98

1. Introduction

Comme nous l'avons vu en introduction, les effecteurs fongiques sont souvent exprimés par vague lors de l'infection de la plante. Afin d'identifier de telles vagues lors de l'infection de *B. napus* par *L. maculans*, un premier projet pilote avait été amorcé. Ainsi, en analysant les données RNAseq issues de ce projet pilote, Julie Gervais a pu distinguer deux vagues d'expression de gènes, l'une spécifique de l'infection des cotylédons, l'autre spécifique de la colonisation des tiges du colza (Gervais *et al.*, 2017). Après identification de ces vagues d'effecteurs, dits respectivement 'précoces' et 'tardifs', elle a sélectionné cinq effecteurs tardifs candidats pour les caractériser fonctionnellement.

Son travail a permis de démontrer leur conservation dans les populations de *L. maculans*, et chez d'autres espèces fongiques. Elle a également développé une approche de criblage variétal innovante. En plaçant les gènes codant des effecteurs tardifs candidats sous contrôle du promoteur d'un gène d'avorulence, *AvrLm4-7*, elle a obtenu des transformants exprimant des effecteurs tardifs au stade d'infection des cotylédons. Cette approche permet de simplifier le criblage de variétés, dans l'objectif d'identifier des résistances à ces effecteurs tardifs. Elle rend possible un criblage moyen débit au stade cotylédonaire, qui sans cela serait chronophage, difficile et peu reproductible au stade tige.

En ayant identifié un phénotype de résistance à l'effecteur LmSTEE98 chez 'Yudal', elle a apporté la preuve de principe que cette méthode peut fonctionner pour identifier de nouvelles sources de résistance, difficiles d'accès autrement. Par cartographie génétique et caractérisation de la descendance 'Darmor-bzh' x 'Yudal', menée en partenariat avec l'INRA de Rennes, il s'avère que le contrôle de ce phénotype est monogénique. Le locus de résistance correspondant, situé dans un intervalle de 0,6cM, a ainsi été nommé *RlmSTEE98*.

Mon projet de thèse s'est inscrit dans la continuité de ces premiers travaux. Avec l'aide d'Aude Geistodt-Kiener, dont j'ai encadré le stage de M2, j'ai poursuivi la caractérisation de cette interaction entre l'effecteur tardif LmSTEE98 et le gène de résistance *RlmSTEE98*. Afin, de confirmer notre hypothèse d'une interaction entre LmSTEE98 et RlmSTEE98, j'ai inactivé à l'aide de la méthode CRISPR-Cas9 le gène *LmSTEE98*, et j'ai pu obtenir quatre mutants différents. Trois des quatre mutants possèdent des versions très impactées du gène, tandis que le quatrième possède une version peu modifiée de *LmSTEE98*, à savoir une délétion de 9pb décalant simplement le cadre de lecture.

Cette interaction a ensuite été validée au stade tige, sur le cultivar 'Yudal' et sur le cultivar témoin 'Darmor'. Les trois mutants dont la séquence protéique de *LmSTEE98* est fortement impactée induisent plus de symptômes lors de la colonisation de la tige chez 'Yudal'. Il semble donc que *LmSTEE98* soit reconnu lors de l'infection de la tige, jouant ainsi un rôle de gène d'avirulence lors de celle-ci et soit impliqué dans la formation de la nécrose au collet.

Pour également valider cette interaction au stade cotylédonaire, les quatre versions mutées de *LmSTEE98*, ont été placées sous le contrôle du promoteur d'expression précoce d'AvrLm4-7. Les transformants ont ensuite été testés sur 'Yudal' et sur 'Darmor' comme génotype témoin. Les trois mutants dont la séquence protéique de *LmSTEE98* est fortement impactée ne sont plus reconnus par *RlmSTEE98* chez 'Yudal', tandis que la version peu impactée de la protéine provoque toujours une réaction d'hypersensibilité sur ce même cultivar. Il y a donc bien une interaction entre *LmSTEE98* et *RlmSTEE98*, lors de l'infection de la tige, mais également au stade cotylédonaire lorsque *LmSTEE98* y est exprimé.

Les résultats de Julie Gervais, complétés de ceux que j'ai obtenus par la suite concernant l'interaction *LmSTEE98* / *RlmSTEE98* sont présentés ici sous la forme d'un article intitulé « A gene-for-gene interaction involving a 'late' effector contributes to quantitative resistance to the stem canker disease in *Brassica napus* », publié dans *New Phytologist* en 2021.

Afin de déterminer le rôle de *LmSTEE98* dans la suppression de la mort cellulaire induite, des expériences complémentaires ont été menées. J'ai réalisé des tests de suppression de la mort cellulaire en tabac, en complément des tests de localisation subcellulaire, réalisés auparavant par Julie Gervais. Ces résultats complémentaires figurent à la fin de ce premier chapitre.

2. Article



New Phytologist

Full Papers |  Open Access |    

A gene-for-gene interaction involving a 'late' effector contributes to quantitative resistance to the stem canker disease in *Brassica napus*

Audren Jiquel, Julie Gervais, Aude Geistodt-Kiener, Régine Delourme, Elise J. Gay, Bénédicte Ollivier, Isabelle Fudal, Sébastien Faure, Marie-Hélène Balesdent, Thierry Rouxel 

First published: 23 February 2021 | <https://doi.org/10.1111/nph.17292>

A gene-for-gene interaction involving a 'late' effector contributes to quantitative resistance to the stem canker disease in *Brassica napus*

Authors

Audren Jiquel^{1,2#}, Julie Gervais^{1#}, Aude Geistodt-Kiener^{1,3}, Régine Delourme⁴, Elise J. Gay^{1,3}, Bénédicte Ollivier¹, Isabelle Fudal¹, Sébastien Faure⁵, Marie-Hélène Balesdent¹ and Thierry Rouxel¹ *

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

² Euralis Semences, 6 Chemin des Panedautes, 31700 Mondonville, France

³ Université Paris-Saclay, Route de l'Orme aux Merisiers, 91190 Saint-Aubin, France

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

⁵ Innolea, 6 Chemin des Panedautes, 31700 Mondonville, France

*Corresponding author: Tel: + 33(0)1 30 81 45 73, Fax: +33(0)1 30 81 53 06, thierry.rouxel@inrae.fr

These authors contributed equally to the work

Orcid IDs:

Régine Delourme : <https://orcid.org/0000-0003-2354-3764>

Isabelle Fudal : <https://orcid.org/0000-0002-9105-9432>

Marie-Hélène Balesdent : <https://orcid.org/0000-0001-5523-9180>

Thierry Rouxel : <https://orcid.org/0000-0001-9563-1793>

Brief heading:

Plant quantitative disease resistance involving a gene-for-gene interaction; media : Bioger, @INRAE_Bioger; SPE division, @INRAE_DPT_SPE; SPS labex, @SPS_Plant_Sci; MH Balesdent, @MBalesdent

Word count: 6293

Introduction: 1357

Materials and methods: 1362

Results: 1558

Discussion: 2016

No. of Figures: 5; No. of color Figures: 5

No. of Tables: 2

Supporting information: 5 Figures and 6 supplementary Tables

SUMMARY

- The control of stem canker disease of *Brassica napus* (rapeseed), caused by the fungus *Leptosphaeria maculans* is largely based on plant genetic resistance: single-gene specific resistance (*Rlm* genes) or quantitative, polygenic, adult-stage resistance. Our working hypothesis was that quantitative resistance partly obeys the gene-for-gene model, with resistance genes “recognizing” fungal effectors expressed during late systemic colonization.
- Five *LmSTEE* (stem-expressed effector) genes were selected and placed under the control of the *AvrLm4-7* promoter, an effector gene highly expressed at the cotyledon stage of infection, for miniaturized cotyledon inoculation test screening of a gene pool of 204 rapeseed genotypes.
- We identified a rapeseed genotype, ‘Yudal’, expressing hypersensitive response to LmSTEE98. The LmSTEE98-RlmSTEE98 interaction was further validated by inactivation of the *LmSTEE98* gene with a CRISPR-Cas9 approach. Isolates with mutated versions of *LmSTEE98* induced more severe stem symptoms than the wild-type isolate in ‘Yudal’. This single-gene resistance was mapped in a 0.6 cM interval of the ‘Darmor_bzh’ x ‘Yudal’ genetic map.
- One typical gene-for-gene interaction contributes partly to quantitative resistance when *L. maculans* colonizes the stems of rapeseed. With numerous other effectors specific to stem colonization, our study provides a new route for resistance gene discovery, elucidation of quantitative resistance mechanisms, and selection for durable resistance.

KEY WORDS: *Brassica napus*, effector, gene-for-gene interaction, *Leptosphaeria maculans*, quantitative disease resistance

INTRODUCTION

Genetic resistance to plant diseases is a highly desirable trait for plant breeding, to ensure global food security and avoid the adverse effects of pesticides. Furthermore, genetic resistance is the only means of disease control available in some crop species lacking other efficient or sustainable control methods. Two types of resistance are deployed in the field for efficient plant disease control: qualitative and quantitative resistance. Qualitative resistance is usually controlled by a single resistance gene and confers complete resistance to pathogen populations harboring the corresponding avirulence gene. It is often associated with a hypersensitive response (HR) and localized cell death, preventing the pathogen from colonizing its host (Greenberg & Yao, 2004). By contrast, quantitative resistance does not prevent the pathogen from infecting the plant but limits symptom severity, thereby reducing the impact on yield. It is based on the combined effects of several genes, associated with genomic regions or QTL (quantitative trait loci), each making a quantitative contribution to plant defense (Delourme *et al.*, 2006; St.Clair, 2010; Niks *et al.*, 2015). Many disease resistance QTLs have been identified in plants over the last two decades. For example, Wilfert and Schmid-Hempel (2008) analyzed 194 publications describing 445 QTL involved in resistance to various bioaggressors in diverse plants, such as wheat, barley, maize and melon. Despite the importance of quantitative resistance to the control of plant diseases, the mechanisms underlying such resistance remain largely unknown (Poland *et al.*, 2009) and are probably highly diverse (Kushalappa *et al.*, 2016; Corwin & Kliebenstein, 2017). Several studies have suggested that some quantitative resistance may be isolate-specific (Arru *et al.*, 2003; Calenge *et al.*, 2004; Rocherieux *et al.*, 2004; Zenbayashi-Sawata *et al.*, 2005; Niks *et al.*, 2015), and that partial resistance may be at least partly due to gene-for-gene interactions, as hypothesized by Parlevliet and Zadoks (1977).

The Dothideomycete *Leptosphaeria maculans* is responsible for one of the most damaging diseases of rapeseed (*Brassica napus*), phoma stem canker disease, also known as blackleg. This disease, which has been known to cause losses exceeding US\$900 million per year, is controlled principally by genetic resistance in most parts of the world (Fitt *et al.*, 2008). The ascospores of *L. maculans* produced on stem residues land on aerial organs of the plant, where they germinate, and the hyphae penetrate the leaves and cotyledons through stomata. After entering the plant, the fungus goes through a short biotrophic stage (5–15 days), during which it colonizes the apoplast, subsequently switching to a necrotrophic lifestyle, in which it causes leaf spots (Rouxel & Balesdent, 2005; Fitt *et al.*, 2006). After this first stage of colonization, the fungus migrates toward the stem tissues, from the leaves to the crown, during an asymptomatic phase that may last several months, before switching to a necrotrophic lifestyle in which necrosis is induced at the stem base (Hammond *et al.*, 1985; West *et al.*, 2001; Rouxel & Balesdent, 2005; Huang *et al.*, 2014).

Qualitative and quantitative resistances to *L. maculans* have been described in *B. napus* (Delourme *et al.*, 2006). Qualitative resistance is typically conferred by race-specific resistance genes, the *RlmX* or *LepRx* genes, conferring complete resistance to avirulent isolates and preventing such isolates from colonizing cotyledons or leaves (Balesdent *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2006; Larkan *et al.*, 2013). Qualitative resistance can be easily assessed in controlled conditions, in cotyledon inoculation assays, which are reproducible and widely used, providing a reliable method for the high-throughput screening of large collections of *B. napus* or populations of *L. maculans* (Rouxel *et al.*, 2003; Balesdent *et al.*, 2006; Ghanbarnia *et al.*, 2012). Quantitative resistance, which operates during colonization of the petiole and stem, is a partial resistance under polygenic control mediated by a large number of QTLs; its efficacy for limiting necrosis can be highly dependent on environmental conditions (Pilet *et al.*, 2001; Fopa Fomeju *et al.*, 2015; Jestin *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016; Raman *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018). Quantitative resistance limits the onset and severity of stem necrosis, but its mechanistic determinants are unknown. However, effects on the growth rate of the pathogen in tissues, the ability of the pathogen to move from the petiole to the stem and stem necrosis development have been described (Huang *et al.*, 2009, 2014). By contrast to qualitative resistance, reproducible methods for assessing quantitative resistance in controlled conditions have yet to be developed. This type of resistance is currently evaluated in field assays, by scoring disease severity on mature plants at the end of the growing season, which can last from six to ten months, depending on geographic location. Furthermore, due to the influence of the environment on quantitative resistance, the identification of stable resistance QTLs requires replicated field-plot experiments at different sites and in different years (Jestin *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018).

As already reported for other pathogens, the infection and colonization of rapeseed by *L. maculans* is dependent on a cocktail of effectors, molecules mainly corresponding to small secreted proteins which modulate plant immunity and facilitate infection (Sánchez-Vallet *et al.*, 2018). Two waves of *L. maculans* effector gene expression were initially identified, the molecules involved in the first wave being described by Gervais *et al.* (2017) as "early effectors" and those of the second wave, "late effectors" (aka "LmSTEE genes" for "*L. maculans* stem expressed effector"). More extensive studies have since discriminated eight waves of genes specifically expressed during the interaction with the plant, all being enriched in genes encoding effectors (Gay *et al.*, 2021). "Early effector" genes, including all known avirulence genes (*AvrLm*) "recognized" by the plant and leading to qualitative resistance, are up-regulated during cotyledon/leaf colonization. Genetic manipulations or crosses of the fungus to generate isolates harboring the smallest possible number of *AvrLm* genes and isogenic isolates differing by only a single *AvrLm* gene, are now routinely used as tools for identifying the corresponding *Rlm/LepR* genes in *Brassica* genotypes, for screening genetic resources, or for use in plant breeding (Balesdent *et al.*, 2002; Rouxel *et al.*, 2003; Van de Wouw *et al.*, 2014; Larkan *et al.*, 2015). An easy-to-use, medium- to high-throughput cotyledon inoculation test is widely used worldwide for such purposes (Larkan *et al.*, 2016a).

Quantitative resistance operates during the systemic colonization of rapeseed, and, during this phase, *L. maculans* expresses several genes encoding effectors thought to interfere with plant defenses (Gervais *et al.*, 2017). These *LmSTEE* genes are expressed only very weakly, if at all, during axenic growth and cotyledon/leaf colonization, but are strongly expressed during stem colonization, many months after the initial leaf infection. Our working hypothesis is that at least some *LmSTEE* genes encode products recognized by specific plant resistance gene products during systemic colonization, in a manner similar to that described for *AvrLm-Rlm* interactions, accounting for at least part of the quantitative resistance. However, it is not possible to detect gene-for-gene interactions between *LmSTEE* genes and the resistance genes of *B. napus* in the usual cotyledon inoculation assay, because the corresponding avirulence proteins are not produced at this stage. In addition, stem inoculation assays (Gervais *et al.*, 2017; Gay *et al.*, 2021) for the identification of such resistance are not amenable to medium/high-throughput screening, due to length of the process, low reproducibility and the time and space required to screen a large number of genotypes of fully grown plants. We therefore designed a new strategy, allowing the expression of "late" effectors during cotyledon infection, for the identification of putative new resistance genes in rapeseed interacting with the late effectors from *L. maculans* in the cotyledon inoculation test.

With this approach we identified a *B. napus* genotype expressing hypersensitive resistance to one late effector: LmSTEE98. The LmSTEE98-RlmSTEE98 interaction was further validated by inactivation of the *LmSTEE98* gene with a CRISPR-Cas9 approach. The genetic control of this response was investigated, and a double-haploid (DH) population was used to map the associated region on the *B. napus* genome. These results provide proof-of-principle for this approach to the identification of new, but difficult-to-detect, sources of resistance for the effective control of *L. maculans* and show for the first time in this model that gene-for-gene interaction contribute to quantitative resistance in grown-up plants.

MATERIALS AND METHODS

Fungal and plant materials

The sequenced isolate JN3 (v23.1.3) (Rouxel *et al.*, 2011) and the closely related isolate JN2 (v23.1.2) correspond to two sister progenies from an *in vitro* cross between European field isolates (Balesdent *et al.*, 2001). They were used as controls in inoculation tests. A representative selection of isolates from worldwide collections and reference isolates from Australia, Canada, the USA, Chile, France, Mexico, and New Zealand, was also analyzed (Table SI.1) (Mendes-Pereira *et al.*, 2003; Dilmaghani *et al.*, 2009, 2012; this study). INV13.269 is a single pycnidiospore isolate recovered from a French field in 2013. Fungal cultures were maintained on V8 juice agar medium, and sporulating cultures were obtained on V8 medium, as previously described (Ansan-Melayah *et al.*, 1995).

A collection of 204 genotypes of *Brassica napus* (Table SI.2) was screened for gene-for-gene interactions with *LmSTEE* genes. This panel mostly comprised varieties previously used for association studies of quantitative resistance to *L. maculans* (Fopa Fomeju *et al.*, 2015). The segregating doubled-haploid population BnaDYDH was derived from a 'Darmor-*bzh*' x 'Yudal' cross (Foisset *et al.*, 1996). The 'Darmor-*bzh*' parent is a French winter rapeseed cultivar and the 'Yudal' parent is a Korean spring rapeseed cultivar.

Plant inoculations

The cotyledons of 10-day-old seedlings were inoculated, by puncture, with 10 μ l of inoculum (10^7 pycnidiospores ml^{-1}), as described by Balesdent *et al.* (2001). Four different isolates, one per half-cotyledon, were used to inoculate each plant. At least six plants were inoculated with each isolate. Plants were incubated for two days at room temperature in the dark, and then in a growth chamber at 19°C (night) and 24°C (day) with a 16 h photoperiod and a relative humidity of 90%. Symptoms were scored 10, 14 and 18 dpi, with the IMAScore rating scale (Balesdent *et al.*, 2001). Mean scores for symptoms and the percentage of virulent and avirulent phenotypes induced by the *LmSTEE* "over-expressed in cotyledons" (OEC) transformants were determined for each cultivar and compared with the symptoms induced by the wild-type isolate on the same cultivar, on the same date (Kruskal-Wallis test).

Adult plants were inoculated as described by Gervais *et al.*, 2017. For the analysis of stem colonization by *L. maculans*, we cut the petiole of the second leaf horizontally, 1 cm from the insertion point of the leaf. Inoculum (10 μ l, containing 10^7 pycnidiospores ml^{-1}) was applied to the wounds. Inoculated plants were incubated as previously described. The necrosis of infected stems was assessed by cutting the whole stem section between the insertion point of the inoculated petiole on the stem and the ground into successive 3 mm slices. The sections were scanned and the percentage of the stem section showing internal necrosis was measured with ImageJ.

Vector construction and fungal transformation

The promoter of the *AvrLm4-7* gene was amplified with the primers indicated in Table SI.3. It was then digested with *NheI* and *BamHI* and ligated into a *SpeI*-*BamHI*-digested pPZPNat1 vector. The *LmSTEE* genes (*LmSTEE1*, *LmSTEE30*, *LmSTEE35*, *LmSTEE98*, and *LmSTEE78*) were amplified from their Start codon to their terminator regions and the amplicons were digested with *EcoRI* and *XhoI* or *SaI* and *XhoI* (Table SI.3). The resulting fragments were ligated into the pPZPNat1 vector containing the *AvrLm4-7* promoter, digested with the same enzymes.

For CRISPR-Cas9 gene inactivation, the pLAU2 (hygromycin resistance), containing the *Cas9* gene, and pLAU53 (geneticin resistance), in which the guide RNA was inserted, were used, as described by Idnurm *et al.* (2017). The CRISPOR prediction tool was used, with *L. maculans* as the reference genome (Dutreux *et al.*, 2018), to design the guide RNA (gRNA) targeting the gene for inactivation (<http://crispor.tefor.net/>; Table SI.3). The guide RNA was selected as the sequence with the fewest off-target predictions. The corresponding DNA fragment was then amplified with the universal primers MAI0309 and MAI0310 (Table SI.3). Gibson assembly (Silayeva & Barnes, 2018) was used to insert the guide RNA into the *XhoI* site of pLAU53, generating pLAU53-gRNA plasmids.

The four mutated versions of *LmSTEE98* (see below) were amplified from the Start codon to the terminator region, as for the wild-type version of *LmSTEE98* (Table SI.3). The Δ *LmSTEE98_06* and Δ *LmSTEE98_10* variants were cloned by Gibson assembly (Silayeva and Barnes, 2018), with the primers Gib_pA4-7:Lm98_F and Gib_pA4-7:Lm98_R. The Δ *LmSTEE98_20* and Δ *LmSTEE98_30* variants were amplified with the *LmSTEE98_SaI_Up* and *LmSTEE98_XhoI_Low* primers and the resulting amplicons were digested with *SaI* and *XhoI* (Table SI.3). For both cloning techniques, the pPZPNat1 vector containing the *AvrLm4-7* promoter was digested with the same enzymes and the fragments were inserted, by Gibson assembly or enzyme-mediated ligation. Both cloning methods produced constructs identical to those used for genotype screening (pA4-7::LmSTEE98), except for the mutated sites.

The various plasmids were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* C58 by electroporation at 2.5 kV, 200 Ω and 25 μ F. *L. maculans* was transformed with the resulting *A. tumefaciens* strains as described in a previous study (Gout *et al.*, 2006). For CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation, pLAU2-Cas9 was introduced into the JN2 isolate. Transformants were then transformed with pLAU53-gRNA plasmids. Fungal transformants were selected on nourseothricin (50 μ g.ml⁻¹) for pPZPNat1, hygromycin (50 μ g.ml⁻¹) for pLAU2-Cas9 and geneticin (50 μ g.ml⁻¹) for pLAU53-gRNA.

We checked that the fungal transformants with *LmSTEE98* inactivation displayed no growth defects *in vitro*. A plug of mycelium was deposited in the center of a Petri dish containing V8 agar media, and mycelial growth was measured every two days for six days (nine replicates).

DNA manipulation and HRM experiments

Genomic DNA was extracted from suspensions of conidia with the DNeasy 96 or DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), in accordance with the manufacturer's recommendations. *LmSTEE* genes were amplified by PCR with the primers in Table SI.3. High-resolution melting (HRM) was performed as described by Plissonneau *et al.* (2016), to analyze SNPs in the natural population of *L. maculans* for the various *LmSTEE* genes considered, with the primers described in Table SI.3. If variant HRM profiles were detected, the *LmSTEE* genes were sequenced by Eurofins Genomics (Eurofins, Ebersberg, Germany).

RNA manipulation and RT-qPCR

Total RNA was extracted from the inoculated cotyledons 7 dpi, the time point corresponding to the peak of *AvrLm4-7* expression (Parlange *et al.*, 2009), or from inoculated stems 30 dpi. The content of all RNA samples was adjusted to 1 µg of RNA and single-strand cDNA was generated by oligo-dT-primed reverse transcription with the PowerScript reverse transcriptase (Clontech, Palo Alto, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. Plants inoculated with water were used as negative controls. For each condition, two to three technical replicates were performed on one (stem samples) or two (cotyledon samples) biological replicates. The RT-qPCR experiments were performed as described by Fudal *et al.* (2007), with the primers indicated in Table SI.3. Ct values were analysed as described elsewhere (Muller *et al.*, 2002). Actin was used as a constitutively expressed reference gene and levels of tubulin expression relative to actin expression were used as a control.

Genetic mapping

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

Bioinformatics and statistical analyses

BLAST analyses were performed by aligning the five *LmSTEE* protein sequences against the non-redundant protein sequences from the GenPept, Swissprot, PIR, PDF, PDB, and NCBI RefSeq databases with default parameters. Hits with an e-value lower than 1.10^{-5} were selected. The Psi-BLAST method with default parameters was used to align the *LmSTEE* protein sequences against all proteins of *Leptosphaeria biglobosa* (Dutreux *et al.*, 2018). Hits with an e-value lower than 5.10^{-2} were selected. Statistical analyses were performed with R (R Core Team, 2015). The effect of the mutants used for inoculation on the area affected by stem necrosis was assessed by applying a generalized linear model (GLM), assuming a quasipoisson distribution of the data.

RESULTS

Selection of five late effector candidates

We selected five *LmSTEE* genes from the 307 effector candidates up-regulated in the stem (Gervais *et al.*, 2017). These genes were selected to cover the range of characteristics of the effector gene repertoire (Table I.1) and were thus representative of the diversity present in this gene pool. The five *LmSTEE* genes encoded for small predicted secreted proteins with size ranging from 55 to 291 amino acids (Table I.1). Some of them were particularly enriched in cysteins, such as *LmSTEE1* with 10 cysteins for 80 amino acids (12.5%) compared to only 2 for *LmSTEE78* (0.7%). The five genes belonged to three of the eight clusters of gene expression identified by Gay *et al.* (2021); *LmSTEE35* and *LmSTEE98* belonged to cluster 4 ('biotrophy to necrotrophy transition'), *LmSTEE1* and *LmSTEE30* to cluster 5 ('stem biotrophy') and *LmSTEE78* to cluster 6 ('stem necrotrophy') (Table I.1). All genes were much less expressed in cotyledons than 'early' effector genes and were all highly expressed in stems after inoculation in controlled conditions (Figure SI.1). *LmSTEE1* and *LmSTEE30* were particularly highly expressed during stem colonization. Under field conditions, each gene had a specific expression pattern, with distinct time of peak expression (March for *LmSTEE35*, April for *LmSTEE1*, *LmSTEE78* and *LmSTEE98* and May for *LmSTEE30*; Figure SI.1). Following its peak of expression in April, *LmSTEE98* expression level remained intermediate at all stages except at the last time point, corresponding to stem necrosis (Figure SI.1; Gay *et al.*, 2021).

With the exception of *LmSTEE98*, we were able to find homologs for all the *LmSTEE* proteins in databases, but all the closest hits corresponded to hypothetical proteins (Table I.1). Three proteins paralogous to *LmSTEE35* were also found in *L. maculans* (54% identity for the best hit, Table SI.4), but not in the related species from the same species complex, *Leptosphaeria biglobosa*, another pathogen of oilseed rape (Dilmaghani *et al.*, 2009). For each of the other *LmSTEE* proteins, we identified one to four homologs in *L. biglobosa* (Table SI.5).

Table I.1 : Characteristics of the "late" effector candidates of *Leptosphaeria maculans* studied here

Name	Accession Nb	Size (aa)	Cysteines	Expression rank ^a	Expression wave ^b	Number of BLAST hits ^c	Closest BLAST hit	E-value (% identities)	BLAST hit coverage	Pfam domain (E-value)	CAZymes hit (E-value)	Number of hits on <i>L. biglobosa</i> 'brassicae' proteins ^d
LmSTEE1	<i>Lmb_jn3_03177</i>	80	10 (12.5%)	2	Stem biotrophy (cluster 5)	24	<i>Aspergillus bombycis</i> hypothetical protein	3.00E-19 (56%)	99%	none	none	1
LmSTEE30	<i>Lmb_jn3_04778</i>	107	10 (9.3%)	12	Stem biotrophy (cluster 5)	230	<i>Epicoccum nigrum</i> hypothetical protein	8E-35 (68%)	98%	CFEM (2.7E-10)	none	4
LmSTEE35	<i>Lmb_jn3_08094</i>	123	7 (5.7%)	93	Biotrophy-to-necrotrophy transition (cluster 4)	26	<i>Colletotrichum salicis</i> hypothetical protein	3E-17 (39%)	94%	none	none	0
LmSTEE78	<i>Lmb_jn3_00617</i>	291	2 (0.7%)	114	Stem necrotrophy (cluster 6)	458	<i>Stagonospora sp. SRC1ISM3a</i> hypothetical protein	4.00E-156 (74%)	99%	none	GH131 (7.8E-64)	3
LmSTEE98	<i>Lmb_jn3_11364</i>	55	6 (10.9%)	101	Biotrophy-to-necrotrophy transition (cluster 4)	0	none	none	none	none	none	2

^a Fold-change in rank between stems and cotyledons of *L. maculans* effectors from RNAseq data (Gervais *et al.*, 2017).

^b Names of expression waves and corresponding genes cluster, as defined by Gay *et al.*, 2021

^c Number of hits with an E-value < 1E-5

^d Results from PSI-BLAST against all *L. biglobosa* proteins with E-values < 5E-2 (Table SI.2)

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

We used a collection of 186 isolates from around the world (Dilmaghani *et al.*, 2009, 2012), to study the conservation of the *LmSTEE* genes in populations of *L. maculans* (Table SI.1). All isolates were obtained from *B. napus*, with the exception of the Mexican isolates, which were obtained from broccoli (*Brassica oleracea*). The five *LmSTEE* genes were amplified by PCR in almost all isolates (Table I.2). Only two French isolates, from two different regions, lacked *LmSTEE35*, and another two unrelated French isolates yielded no amplicon for *LmSTEE98*. Sequence polymorphism was also rare, and the sequences of *LmSTEE1*, *LmSTEE35* and *LmSTEE78* obtained were invariant. One silent mutation was detected in *LmSTEE30*, in 18% of the isolates tested, mostly from Western or Central Canada. Only *LmSTEE98* displayed sequence polymorphism at the protein level, with one allele containing two non-synonymous mutations leading to two substitutions in the protein sequence. This allele was found at only one site in Mexico, where it was present in 70% of the local population (17% of the Mexican isolates analysed here) (Table I.2, Table SI.1).

Table I.2: PCR amplification and high-resolution melting (HRM) analysis of *LmSTEE* genes in *Leptosphaeria maculans* isolates

Origin of isolates ^a	<i>LmSTEE1</i>			<i>LmSTEE30</i>			<i>LmSTEE35</i>			<i>LmSTEE78</i>			<i>LmSTEE98</i>		
	Presence	Absence ^b	Mutation ^c (Nb isolates)	Presence	Absence ^b	Mutation ^c (Nb isolates)	Presence	Absence ^b	Mutation ^c (Nb isolates)	Presence	Absence ^b	Mutation ^c (Nb isolates)	Presence	Absence ^b	Mutation ^c (Nb isolates)
France	93	0	nd	93	0	nd	91	2	nd	93	0	nd	91	2	nd
Oceania	20	0	0/18	20	0	1/20 ^d	20	0	0/20	20	0	0/20	20	0	0/18
Canada	17	0	0/14	17	0	11/17 ^d	17	0	0/17	17	0	0/16	17	0	0/17
USA	10	0	0/9	10	0	1/10 ^d	10	0	0/9	10	0	0/10	10	0	0/10
Mexico	41	0	0/37	41	0	0/41	41	0	0/40	41	0	0/41	41	0	7/41 ^e
Chile	5	0	0/5	5	0	3/5 ^d	5	0	0/5	5	0	0/5	5	0	0/5
Total	186	0	0/83	186	0	16/88 ^d	184	2	0/91	186	0	0/88	184	2	7/90 ^e

^a Isolates are described in Table SI.3.

^b Lack of PCR amplification.

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

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

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

nd: not done

The use of an avirulence gene promoter makes it possible to overexpress *LmSTEE* genes during cotyledon colonization

We induced the expression of *LmSTEE* genes during cotyledon colonization, by creating mutant strains expressing the genes under the control of the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* (pA4-7), which is known to be up-regulated seven days post inoculation (dpi) in cotyledons (Parlange *et al.*, 2009) (Figure SI.1). Constructs were introduced into the INV13.269 isolate, which is virulent against all *Rlm* genes potentially present in current *B. napus* resources (*Rlm1*, *Rlm2*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7* and *Rlm9*), for the subsequent screening of a large panel of genotypes without interference with known *AvrLm-Rlm* interactions. The resulting OEC transformants (*pA4-7::LmSTEE*) strongly expressed *LmSTEE* genes during cotyledon infection (Figure I.1). We obtained such transformants for four genes, but not for *LmSTEE30*, which we were unable to overexpress with this strategy. Expression in the cotyledons varied between transformants and genes, but was similar to that of the native *AvrLm4-7* gene. The gene most highly expressed in OEC transformants was *LmSTEE1*, for which the level of expression was upregulated by a factor of 1000 in the transformants at 7 dpi; by contrast, transformants obtained with a construct containing the native promoter had expression levels similar to that of the wild-type isolate (Figure I.1). These findings demonstrate the usefulness of the *AvrLm4-7* promoter for modifying the expression profile of "late" effector genes. The two transformants per construct displaying the strongest overexpression (Figure I.1) were selected for the screening of rapeseed genotypes in the cotyledon inoculation assay.

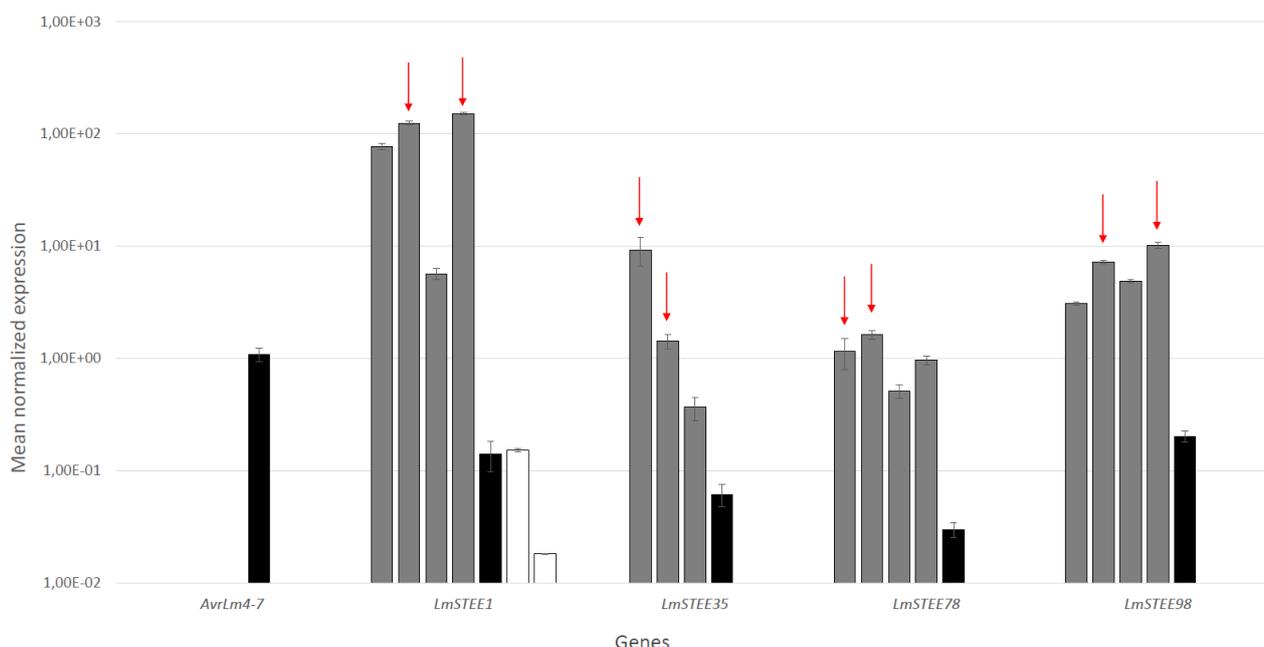


Figure I.1: Expression of *LmSTEE* genes in “over-expressed in cotyledons” (OEC) transformants during early stages of cotyledon colonization

We constructed OEC transformants specifically overexpressing the *LmSTEE1*, *LmSTEE35*, *LmSTEE78* and *LmSTEE98* genes under the control of the promoter of the *AvrLm4-7* gene during the early colonization of cotyledons. The expression of *LmSTEE* genes in the various OEC transformants was assessed by RT-qPCR in infected cotyledons of the cultivar ‘EuroI’, 7 days post-inoculation. Gray bars correspond to expression data from three to four different transformants; black bars represent expression in the wild-type isolate (INV13.269) and white bars indicate the expression in control transformants with the endogenous promoter (*LmSTEE1* only). Red arrows indicate the OEC transformant selected for the screening of plant genotypes. Mean expression is normalized against actin, with tubulin used as a control (Fudal *et al.*, 2007). Error bars represent the standard error for two biological and three technical replicates.

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

The OEC transformants were used to inoculate a panel of 204 *B. napus* genotypes (Table SI.2). This panel comprised mostly European winter-type rapeseed genotypes, and included only one spring genotype of Asian origin. With this approach, we identified two cultivars displaying specific resistance to two late effectors: 'Dariot', which was resistant to LmSTEE1 and 'Yudal', which was resistant to LmSTEE98 (Figure I.2, Figure SI.2). These genotypes displayed resistance responses with the two independent OEC transformants of each construct, but not with the other OEC transformants or the wild-type isolate. Heterogeneous resistance to other effectors was observed in 'Dariot' (Figure I.2), justifying the focusing of our analysis on the specific HR-type resistance to LmSTEE98 observed in 'Yudal'. We hypothesized that there must be a resistance gene, *RlmSTEE98*, interacting with LmSTEE98, at least at the cotyledon stage.

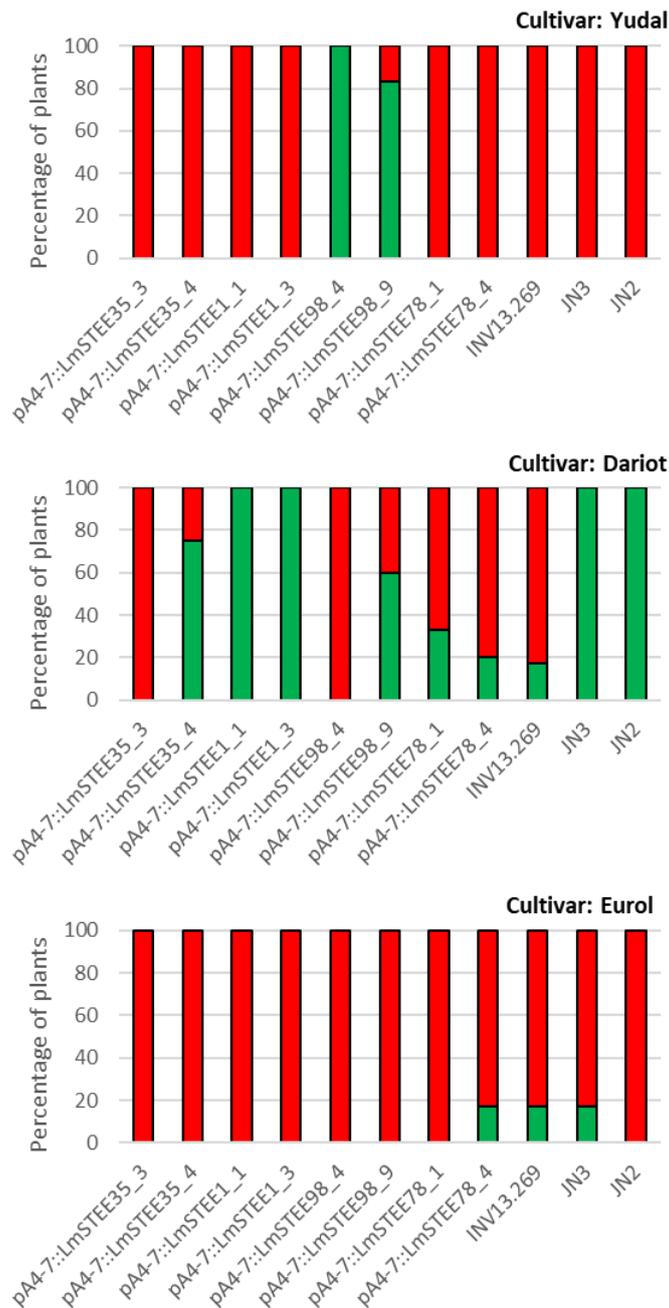


Figure I.2: Resistance response of the rapeseed cultivars ‘Yudal’ and ‘Dariot’ to two “late” effector genes *Leptosphaeria maculans* transformants expressing *LmSTEE35*, *LmSTEE1*, *LmSTEE98* or *LmSTEE78* under the control of the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were used to inoculate the ‘Yudal’, ‘Dariot’ and susceptible ‘Eurol’ cultivars. Two independent transformants were used per construct. The bars represent the percentage of plants displaying susceptible (in red) or resistant (in green) phenotypes, based on the IMAScore rating scale (Balesdent *et al.*, 2001), 14 days after inoculation. INV13.269 is the wild-type isolate and the JN2 and JN3 isolates were used as additional controls. The resistance of ‘Dariot’ to JN3 and JN2 is linked to the presence of *Rlm7*, which recognizes *AvrLm7* in these isolates.

***LmSTEE98* inactivation suppresses its recognition in 'Yudal' at the cotyledon stage**

For validation of the interaction between *LmSTEE98* and *RlmSTEE98*, we used the CRISPR-Cas9 technology (Idnurm *et al.*, 2017) to inactivate *LmSTEE98* in *L. maculans*. Using the transformant strain JN2 expressing the Cas9 protein (JN2_Cas9), we generated *L. maculans LmSTEE98* mutants. Four independent mutants with four different mutations resulting in different truncations or modifications to the protein were selected: $\Delta LmSTEE98_{06}$ (+1 bp), $\Delta LmSTEE98_{10}$ (-2 bp), $\Delta LmSTEE98_{20}$ (-9 bp) and $\Delta LmSTEE98_{30}$ (-17 bp) (Figure I.3A).

To test whether these altered versions of the protein were still able to elicit the *RlmStee98*-mediated resistance, these four mutated versions of *LmSTEE98* were placed under the control of the *AvrLm4-7* promoter and introduced into INV13.269, to generate OEC mutants. All transformants displayed high levels of expression of the mutated versions of *LmSTEE98* on cotyledons at 7 dpi (Figure SI.3). All of the OEC mutants were virulent on the susceptible genotype 'Darmor', as were the control isolates with the wild-type version of *LmSTEE98* (Figure I.3B). Three OEC mutants with major defects of *LmSTEE98* — $\Delta LmSTEE98_{06}$, $\Delta LmSTEE98_{10}$ and $\Delta LmSTEE98_{30}$ — were virulent on 'Yudal', suggesting that the corresponding altered versions of the protein were not recognized by the plant (Figure I.3C). By contrast, the *pA4-7::ΔLmSTEE98₂₀* OEC mutant, lacking only three amino acids, was avirulent (Figure I.3C), as were the control isolates *pA4-7::LmSTEE98₄* and *pA4-7::LmSTEE98₉* (Figure I.2), suggesting that this mutant version of the protein was still recognized by the plant. These results indicate that the recognition of *LmSTEE98* at the cotyledon stage is impaired by major mutations or truncations of *LmSTEE98*.

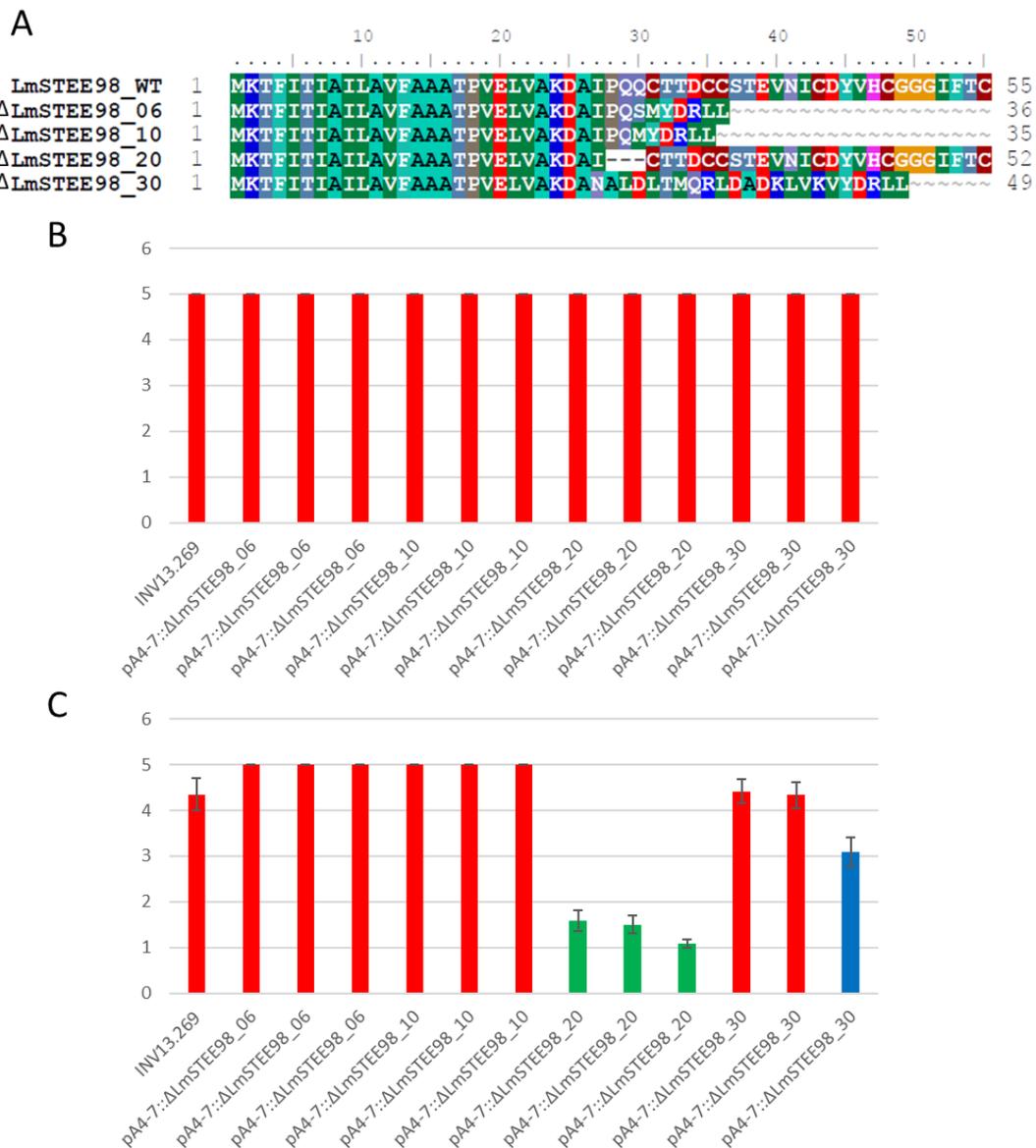


Figure I.3: Generation of CRISPR-Cas9-mutated versions of *LmSTEE98* and effect of the mutations on their recognition by *RlmSTEE98* in cultivar 'Yudal'

Four CRISPR-Cas9-mutated versions of *LmSTEE98* were generated and their deduced protein sequences were aligned with that of the WT protein in (A). The mutated alleles were placed under the control of the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7*, and transformants of *Leptosphaeria maculans* were used to inoculate the susceptible cultivar 'Darmor' (B) and the resistant cultivar 'Yudal', containing the *RlmSTEE98* gene (C). Three independent transformants were used per construct. Scoring was based on the IMAScore rating scale, in which scores of 1-3 indicate resistance and scores of 4-6 indicate susceptibility (Balesdent *et al.*, 2001), 14 days after inoculation. INV13.269 is the wild-type isolate. Error bars represent the standard error for at least ten biological replicates.

***LmSTEE98* inactivation leads to stronger symptoms during stem colonization**

We investigated the role of *LmSTEE98* in stem colonization, using the four mutants inactivated with CRISPR-Cas9 (Figure I.3A). These mutants displayed no *in vitro* growth or sporulation defects and were as virulent as the control isolate JN2_Cas9 when used to inoculate the cotyledons of a susceptible cultivar (Figure SI.4). Moreover, they displayed no defect of *LmSTEE98* gene expression during stem colonization (Figure SI.5). We then tested the ability of these four mutants to cause stem necrosis on ‘Yudal’, and on ‘Darmor’ as a control. The three mutants with *LmSTEE98* gene impairments — $\Delta LmSTEE98_{06}$, $\Delta LmSTEE98_{10}$ and $\Delta LmSTEE98_{30}$ — generated significantly higher percentage areas of stem necrosis on ‘Yudal’ than the control isolate JN2_Cas9 (Figure I.4A). By contrast, the effects of the $\Delta LmSTEE98_{20}$ mutant, which lacked only three amino acids, did not differ significantly from those of JN2_Cas9. On ‘Darmor’; no significant effect of *LmSTEE98* gene inactivation was observed (Figure I.4B).

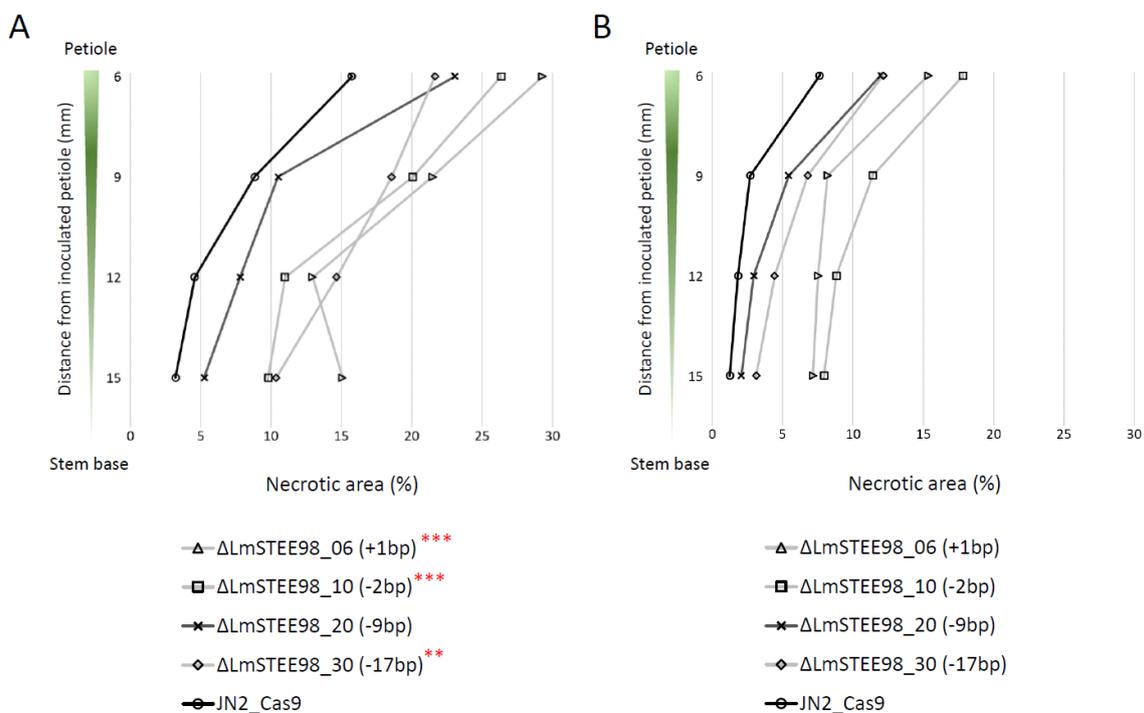


Figure I.4: The inactivation of *LmSTEE98* by CRISPR-Cas9 method increases stem necrosis in ‘Yudal’ rapeseed stems

LmSTEE98 mutants of *Leptosphaeria maculans* (Figure I.3A) were used to inoculate the petiole of the second true leaf of *B. napus* ‘Darmor’ and ‘Yudal’, cut 1 cm from the point of insertion into the stem. Symptoms were evaluated on stem sections, 30 days after inoculation. (A) Percentage of the stem section displaying necrosis for cultivar ‘Yudal’ (n ≥ 18). (B) Percentage of the stem section displaying necrosis for cultivar ‘Darmor’ (n ≥ 18). The asterisks indicate a significant difference in the area under the curve between the control isolate JN2_Cas9 and the *LmSTEE98* mutants, for the two biological replicates of the experiment (GLM: **: p-value < 0.05 and ***: p-value < 0.01).

Genetic control and mapping of resistance to *LmSTEE98*

A doubled-haploid population derived from the 'Darmor-*bzh*' x 'Yudal' cross (BnDYDH; Foisset *et al.*, 1996) was used to investigate the segregation of the phenotype of resistance to *LmSTEE98* in 'Yudal'. We found that 87 of the 258 offspring tested were resistant to the *LmSTEE98* OEC transformants, whereas 171 were susceptible (Table SI.6). This segregation does not correspond to the expected 50:50 (resistant:susceptible) ratio for monogenic resistance in a DH population. However, genetic mapping of the resistant phenotype indicated that the resistance was controlled by a single locus mapping to a 0.6 cM interval on oilseed rape chromosome A09, flanked on one side by the marker Bn-A09-p33777987 and on the other side by Bn-A09-p33971771 (Table SI.6, Figure I.5). This genetic interval corresponded to a 266.33 kb sequence of chromosome A09 and an unanchored 84 kb sequence (potentially located on chromosome A09). In the reference genome of 'Darmor-*bzh*', this interval was predicted to contain 70 genes (Chalhoub *et al.*, 2014), but a comparison with this genetic interval in 'Yudal' was not possible, due to a lack of sequence data for 'Yudal'. The control of the interaction by single genes in both the plant and the fungus is consistent with a typical gene-for-gene interaction, and *LmSTEE98* was therefore renamed *AvrLmSTEE98*.

A09 (Darmor-*bzh* x Yudal)

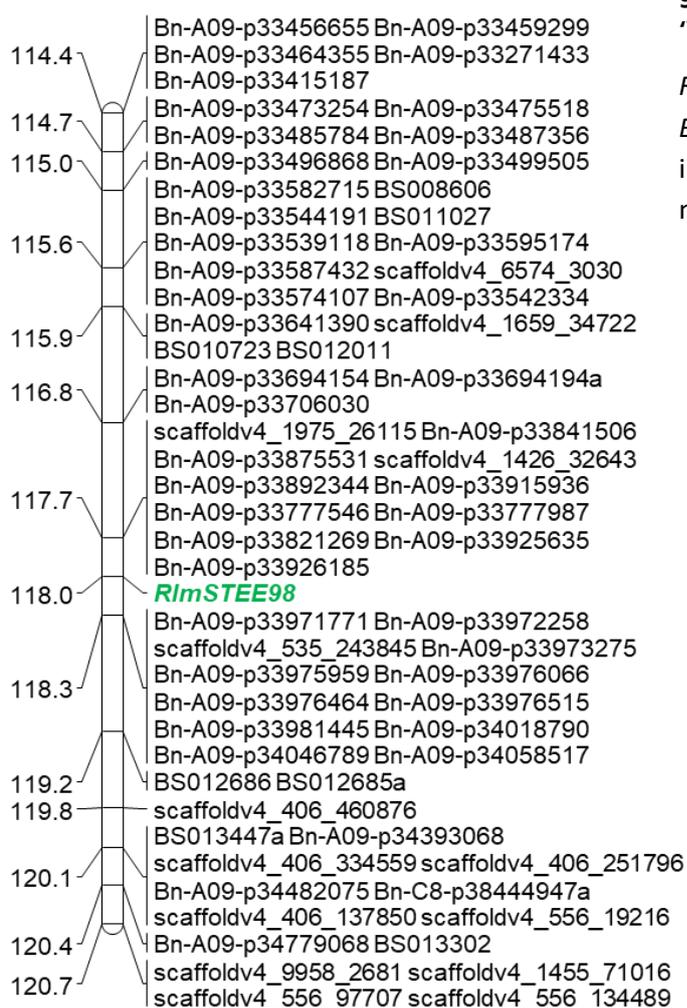


Figure I.5: Genetic mapping of the resistance gene *RlmSTEE98* in the 'Darmor-*bzh*' x 'Yudal' cross

RlmSTEE98 was mapped to chromosome A09 of *Brassica napus*. The genetic distances, indicated in centiMorgans, are shown on the left, with marker order shown on the right.

DISCUSSION

The use of resistance genes is the most efficient strategy for controlling stem canker disease in rapeseed crops. However, the resistance to avirulent populations of *L. maculans* conferred by *Rlm/LepR* genes is rapidly broken down in the field after the release of resistant varieties (Rouxel & Balesdent, 2017). New sources of resistance to the pathogen are, therefore, urgently required. High-throughput screening for resistance at the cotyledon stage, with genetically improved isolates, is now well developed. However, screening for adult-stage resistance is much more difficult, time-consuming, and less reproducible, with high levels of variation between experiments and between plants. We hypothesized that adult-stage resistance was at least partly dependent on gene-for-gene interactions involving fungal effectors expressed only during stem colonization. We tested this hypothesis by selecting a small number of effectors belonging to stem-specific waves of expression, and designing an innovative strategy in which the genes were placed under the control of an early effector gene promoter, making it possible to screen a collection of *B. napus* genotypes for resistance genes operating in the stem in a miniaturized cotyledon test. Not only did this efficient strategy identify and map a new resistance source, but, following CRISPR-Cas9 inactivation of the late effector gene identified, we were able to demonstrate its involvement in stem canker severity and recognition by the cognate resistance gene.

We selected five late effector candidates from three different waves of expression that had previously been shown to be specifically up-regulated in rapeseed stems during systemic colonization (Gay *et al.*, 2021). We recently showed that all “early” effectors (including all known avirulence effectors) are actually specifically up-regulated during all the biotrophic stages of plant colonization (leaf/cotyledon, petiole and stems) (Gay *et al.*, 2021). The decrease in expression of early effectors is relayed, at least during stem colonization, by a stem-specific biotrophic wave of gene expression including *LmSTEE1* and *LmSTEE30*, followed by another wave involved in the biotrophy-to-necrotrophy transition, which includes *LmSTEE78*. *LmSTEE35* and *LmSTEE98* belong to a less well-defined wave, illustrating a series of biotrophy-to-necrotrophy transitions. In field samples, the expression of *LmSTEE* genes other than *LmSTEE98* and *LmSTEE78*, decreases with the development of stem necrosis (Gay *et al.*, 2021). Some AvrLm effectors, produced during the initial stages of cotyledon colonization, may decrease the magnitude of symptom expression on *B. napus* cotyledons (Petit-Houdenot *et al.*, 2019). Similarly, the *LmSTEE* genes associated with the long systemic colonization of the tissues and involved in biotrophic stem colonization have been suggested to manipulate plant innate immunity, to enable the fungus to colonize its host efficiently, ultimately leading to the development of stem necrosis (Gay *et al.*, 2021).

Both "early" and "late" candidate effectors are structurally similar, as they are small secreted proteins (SSPs) generally enriched in cysteine residues, and most have no predicted function or recognizable domain. However, they differ by their location within the genome. "Early" effector genes are located in dispensable regions of the genome enriched in transposable elements acting as drivers of evolution by favoring deletions, translocations and diversifying or inactivating point mutations (Rouxel & Balesdent, 2017; Gay *et al.*, 2021; Soyer *et al.*, 2020). By contrast, "late" effector genes are located in GC-equilibrated regions of the genome, an unusual feature for most effector genes in *Fungi*, and a genome environment much less conducive in generating deletions or inactivation by Repeat-Induced Point mutation, as frequently found for *AvrLm* genes (Rouxel *et al.*, 2011; Rouxel & Balesdent, 2017). As a consequence, *LmSTEE* genes also differ from "early" effector genes by their lack of polymorphism or presence/absence variation in field populations of *L. maculans*, with only one non-synonymous mutation identified in *LmSTEE98*. This suggests that, unlike effector genes expressed at the onset of plant colonization, *LmSTEE* genes, which are not expressed in early stages of infection, are not readily subjected to selection pressures exerted by the plant, such as those generated by *Rlm* genes. As the corresponding *RlmSTEE* genes may also have only a partial effect, contributing to adult-stage resistance, they may contribute to more stable and durable resistance in *B. napus*.

We designed a new approach based on the widely used cotyledon inoculation test, for identifying new sources of resistance to *L. maculans* in *B. napus* that could contribute to quantitative resistance. This type of resistance has not, to date, been amenable to miniaturized, medium-throughput screening in growth chambers. We modified the expression of the *LmSTEE* genes such that they are expressed, under the control of the *AvrLm4-7* promoter, during cotyledon infection. This approach was particularly efficient, with all strains transformed with the constructs expressing the target genes to at least the same level as avirulence genes on cotyledons at 7 dpi. We screened a large collection of rapeseed genotypes to identify easy-to-record plant resistance responses to late effectors. We identified at least one such interaction, between *LmSTEE98* and a resistance gene in the 'Yudal' cultivar. This interaction would not have been identified with the usual screening approaches.

Following inoculation with *LmSTEE98* OEC transformants, we observed a clear HR phenotype, which segregated in the BnDYDH population. The segregation pattern in this population was not consistent with the 1:1 ratio expected for monogenic control of the resistance. However, markers closely linked to *RlmSTEE98* on A09 also displayed distorted segregation patterns. Such distortions have often been observed in segregating DH populations in *B. napus*, even in other regions of the genome, and are thought to be due to *in vitro* androgenesis (Foisset *et al.*, 1996; Delourme *et al.*, 2013). To confirm that our approach revealed a genuine gene-for-gene interaction contributing to quantitative resistance, we used CRISPR-Cas9 method to introduce a range of mutations into *AvrLmSTEE98*.

Heavily altered versions of the protein did not induce a HR on cotyledons, suggesting a lack of recognition by RlmSTEE98. In addition, the mutant isolates induced larger areas of stem necrosis in 'Yudal', also suggesting that the RlmSTEE98-AvrLmSTEE98 interaction contributes to stem resistance to wild-type isolates.

Our results thus highlighted a role for a single genomic region in 'Yudal', and functional analyses strongly suggest that the interaction was controlled by a single resistance gene. The participation of single major genes in adult-stage resistance through gene-for-gene interactions has already been reported in other models, such as the *Brassica oleracea* / *Plasmodiophora brassicae* (Rocherieux *et al.*, 2004), apple tree/*Venturia inaequalis* (Calenge *et al.*, 2004) and barley/*Pyrenophora graminea* (Arru *et al.*, 2003) pathosystems, but has never before been reported for the *B. napus*-*L. maculans* interaction. Gene-for-gene interactions underlying partial resistance have also been identified in a few models, such as the wheat/*Zymoseptoria tritici* system (Meile *et al.*, 2019), or the rice/*Magnaporthe oryzae* pathosystem, in which an avirulence gene (*AvrPi34*) corresponding to the single dominant resistance gene *Pi34* was shown to be responsible for the partial resistance phenotype (Zenbayashi-Sawata *et al.*, 2005).

The BnDYDH population has been extensively used to search for QTL for resistance to *L. maculans* following the scoring of stem necrosis severity in the field (Pilet *et al.*, 1998, 2001; Jestin *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2016). Using the same BnDYDH population we mapped *RlmSTEE98* to chromosome A09, but, surprisingly, this locus originated from 'Yudal', the parent of the cross considered susceptible under field conditions. QTL for resistance may originate from the susceptible parent, and resistance QTL have been identified in the vicinity of the genomic region containing *RlmSTEE98*, but no such QTL for resistance was identified in 'Yudal' in previous studies, the closest QTL associated with stem canker resistance located on A09 originating instead from 'Darmor-*bzh*' (Jestin *et al.*, 2011). Stem canker resistance QTL or associated markers on A09 from other cultivars were also detected by Jestin *et al.* (2015), Larkan *et al.* (2016b) and Raman *et al.* (2016). However, all these regions mapped to areas upstream from the physical position of *RlmSTEE98*.

There are four possible reasons for the identification of a resistance QTL originating from the susceptible genotype and not previously identified at this genomic location: (i) *RlmSTEE98* is differentially expressed at different stages of plant growth, being expressed in the cotyledons and leaves, for example, but not in stems, preventing the recognition of AvrLmSTEE98 during stem colonization, when this gene is expressed. Stage-specific expression patterns have been observed for other resistance genes, such as the wheat *Lr34* gene, which is weakly expressed at the cotyledon stage but strongly induced in adult plants, conferring quantitative resistance to several pathogens (Krattinger *et al.*, 2009). This hypothesis is also supported by the identification of differential expression profiles between cotyledons and stems for the genes present in the *RlmSTEE98* region in 'Darmor-*bzh*' (data not shown).

However, our results showing that *AvrLmSTEE98* inactivation increases the size of stem lesions in 'Yudal', but not in 'Darmor-*bzh*' in controlled conditions strongly suggests that recognition takes place in the stem, rendering this hypothesis highly unlikely. Genomic and transcriptomic data for different developmental stages are now required for 'Yudal', to resolve this issue. (ii) Alternatively, *AvrLmSTEE98* may be expressed too late or at a too low level during systemic colonization, leading to late or insufficient recognition by the plant, and an inability to prevent the development of stem canker at this stage. Indeed, transcriptomic analyses in 'Darmor-*bzh*' have shown that *AvrLmSTEE98* is not expressed in field conditions from November to March, and that its expression peaks in April, but at a lower level than for two of the other *LmSTEE* genes analysed here, *LmSTEE1* and *LmSTEE30* (Gay *et al.*, 2021; Figure SI.1). According to this hypothesis, the choice of *LmSTEE* genes for resistance screening in the approach developed here, should be based on a precise characterization of their expression profiles under field conditions, with particular attention paid to effectors expressed at the earliest stages of stem colonization. (iii) Another possible explanation for the absence of resistance QTL associated with this region is that the *RlmSTEE98* region is effectively associated with a resistance QTL conferring partial resistance to the fungus but not identified as such under field conditions. Several studies have shown that the detection of resistance QTL can be strongly influenced by environmental conditions, particularly for the *B. napus*-*L. maculans* system under European cropping conditions (Kaur *et al.*, 2009; Raman *et al.*, 2012). The effect of the *RlmSTEE98* gene may be subject to such influences, preventing its detection. (iv) Finally, the partial resistance conferred by *RlmSTEE98* may have remained undetected due to a combination of insufficient sensitivity and accuracy of the disease severity scoring in the field and a relatively low contribution to quantitative resistance relative to other QTL in this cross.

This study provides a new approach and tools for enriching the *Rlm* gene pool for a system in which the scarcity of *Rlm* genes has proved a critical limitation to crop sustainability. Our study also highlights the importance of the diversity of the plant material screened. Our screening was of limited diversity, with only European winter rapeseed varieties plus 'Yudal'. More distantly related genotypes might also display new specific resistances to *LmSTEE* effectors. Also, choice of *LmSTEE* genes expressed early during stem infection could allow to identify new *RlmSTEE* resistance in winter-type European cultivars known to display a high level of adult-stage resistance. Many other late effector candidates have been described, with 40 effector candidates belonging to the stem biotrophy wave of expression (Gay *et al.*, 2021). These genes will be targets of choice for this strategy, now that proof-of-principle has been obtained for its validity.

With time, the *B. napus*-*L. maculans* system has become a model of choice to conceptualize mechanisms of plant-fungal pathogen co-evolution, with a range of adaptive mechanisms set-up by the fungus to break-down qualitative resistance while maintaining effector function (Rouxel & Balesdent, 2017). The finding that *LmSTEE* genes may behave as avirulence effectors operating very late in the disease cycle and not prone to accelerated mutation rate complexify the picture and suggests the plant surveillance machinery has been able to adapt to all tissue-specific waves of effector gene expression to recognize the fungal presence. The data obtained thus provide new tools and strategies for knowledge-driven breeding for quantitative resistance in *B. napus*. They also cast new light on the mechanisms of quantitative resistance and question on the durable quantitative resistance paradigm in this model.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Bertrand Auclair and Yanick Monet (INRAE BIOGER) for plant management. We thank Alexander Idnurm (Melbourne University, Australia) for providing us with the vector and protocols for the CRISPR-Cas9 approach. We thank Pascal Glory and the CRB BrACySol, INRAE-IGEPP, France, for providing the BnDydh population. J.G. was funded by a joint grant from the *Santé des Plantes et Environnement* (SPE) department of INRAE and Terres Inovia. A. J. was funded by ANRT and Euralis semences (Cifre project no. 2017/1374). The authors acknowledge financial support from SOFIPROTEOL as part of the FASO EPHICAS Project. The UMR Bioger benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007).

AUTHOR CONTRIBUTION: Design of the research, MHB, TR, RD; Performance of the research, AJ, JG, AGK, BO, IF, MHB, TR; Data analysis, collection and interpretation; EJG, RD, MHB; Supervision, MHB, TR, SF; Writing manuscript, AJ, JG, TR, MHB, RD, SF.

DATA AVAILABILITY: Data are available in the main document or supplementary files. Other data ('Darmor' x 'Yudal' map, RNASeq, accession no. for *LmSTEE* effectors, etc.) are available in the literature.

REFERENCES

- Ansan-Melayah D, Balesdent MH, Buée M, Rouxel T. 1995.** Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **85**: 1525–1529.
- Arru L, Francia E, Pecchioni N 2003.** Isolate-specific QTLs of resistance to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in the “Stephoe” x “Morex” spring barley cross. *Theoretical and Applied Genetics* **106**: 668–675.
- Balesdent MH, Louvard K, Pinochet X, Rouxel T 2006.** A large-scale survey of races of *Leptosphaeria maculans* occurring on oilseed rape in France. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 53–65.
- Balesdent MH, 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 MH, Attard A, Kühn ML, Rouxel T 2002.** New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **92**: 1122–1133.
- Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA 2003.** R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* **19**: 889–890.
- Calenge F, Faure A, Goerre M, Gebhardt C, Van De Weg WE, Parisi L, Durel CE 2004.** Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **94**: 370–379.
- Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, Parkin IAP, Tang H, Wang X, Chiquet J, Belcram H, Tong C, Samans B *et al.* 2014.** Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* **345**, 950–953.
- Clarke WE, Higgins EE, Plieske J, Wieseke R, Sidebottom C, Khedikar Y, Batley J, Edwards D, Meng J, Li R *et al.* 2016.** A high-density SNP genotyping array for *Brassica napus* and its ancestral diploid species based on optimised selection of single-locus markers in the allotetraploid genome. *Theoretical and Applied Genetics* **129**: 1887–1899.
- Corwin JA & Kliebenstein DJ 2017.** Quantitative resistance: more than just perception of a pathogen. *Plant Cell* **29**: 655–665.
- Delourme R, Chèvre AM, Brun H, Rouxel T, Balesdent MH, Dias JS, Salisbury P, Renard M, Rimmer SR 2006.** Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 41–52.
- Delourme R, Falentin C, Fopa Fomeju B, Boillot M, Lassalle G, André I, Duarte J, Gauthier V, Lucante N, Marty A *et al.* 2013.** High-density SNP-based genetic map development and linkage disequilibrium assessment in *Brassica napus* L. *BMC Genomics* **14**: 1–18.
- Dilmaghani A, Balesdent MH, Didier JP, Wu C, Davey J, Barbetti MJ, Li H, Moreno-Rico O, Phillips D, Despeghel JP *et al.* 2009.** The *Leptosphaeria maculans* - *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathology* **58**: 1044–1058.

- Dilmaghani A, Gladioux P, Gout L, Giraud T, Brunner PC, Stachowiak A, Balesdent MH, Rouxel T 2012.** Migration patterns and changes in population biology associated with the worldwide spread of the oilseed rape pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Ecology* **21**: 2519–2533.
- Dutreux F, Da Silva C, Agata L, Couloux A, Gay EJ, 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. *Scientific data* **5**: 1–11.
- Fitt, BDL, Brun H, Barbeti MJ, Rimmer SR 2006.** World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 3–15.
- Fitt BDL, Hu BC, Li ZQ, Liu SY, Lange RM, Kharbanda PD, Butterworth MH, White RP 2008.** Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China; costs and benefits. *Plant Pathology* **57**: 652–664.
- Foisset N, Delourme R, Barret P, Hubert N, Landry BS, Renard M. 1996.** Molecular-mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLF markers on a doubled-haploid progeny. *Theoretical and Applied Genetics* **93**, 1017–1025.
- Fopa Fomeju B, Falentin C, Lassalle G, Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R 2015.** Comparative genomic analysis of duplicated homoeologous regions involved in the resistance of *Brassica napus* to stem canker. *Frontiers in Plant Sciences* **6**: 1–14.
- Fudal I, Ross S, Gout L, Blaise F, Kuhn ML, Eckert MR, Cattolico L, Bernard-Samain S, Balesdent MH, Rouxel T 2007.** Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of *AvrLm6*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 459–470.
- Gay EJ, Soyer JL, Lapalu N, Linglin J, Fudal I, Da Silva C, Wincker P, Aury JM, Cruaud C, Levrel A et al. 2021.** Large-scale transcriptomics to dissect two years of life of a fungal phytopathogen interacting with its host plant. *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.13.331520>
- Gervais J, Plissonneau C, Linglin J, Meyer M, Labadie K, Cruaud C, Fudal I, Rouxel T, Balesdent MH 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.
- Ghanbarnia K, Lydiate DJ, Rimmer SR, Li G, Kutcher HR, Larkan NJ, McVetty PBE, Fernando WGD 2012.** Genetic mapping of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene corresponding to the *LepR1* resistance gene of *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* **124**: 505–513.
- Gout L, Fudal I, Kuhn ML, Blaise F, Eckert M, Cattolico L, Balesdent MH, Rouxel T 2006.** Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Microbiology* **60**: 67–80.

- Greenberg JT & Yao N 2004.** The role of regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiology* **6**: 201–211.
- Hammond KE, Lewis BG, Musa TM 1985.** A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **34**: 557–565.
- Huang YJ, Evans N, Li ZQ, Eckert M, Chèvre AM, Renard M, Fitt BDL 2006.** Temperature and leaf wetness duration affect phenotypic expression of *Rlm6*-mediated resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* **170**: 129–141.
- Huang YJ, Jestin C, Welham SJ, King GJ, Manzanares-Dauleux MJ, Fitt BDL, Delourme R 2016.** Identification of environmentally stable QTL for resistance against *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Theoretical and Applied Genetics* **129**: 169–180.
- Huang YJ, Pirie EJ, Evans N, Delourme R, King GJ, Fitt BDL 2009.** Quantitative resistance to symptomless growth of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape). *Plant Pathology* **58**: 314–323.
- Huang YJ, Qi A, King GJ, Fitt BDL 2014.** Assessing quantitative resistance against *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) in young plants. *PLoS One* **9**: eB4924.
- Idnurm A, Urquhart AS, Vummadi DR, Chang S, Van de Wouw AP, López-Ruiz FJ 2017.** Spontaneous and CRISPR/Cas9-induced mutation of the osmosensor histidine kinase of the canola pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Biology and Biotechnology* **4**: 12.
- Jestin C, Bardol N, Lodé M, Duffé P, Domin C, Vallée P, Mangin B, Manzanares-Dauleux M, Delourme R 2015.** Connected populations for detecting quantitative resistance factors to phoma stem canker in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Molecular Breeding* **35**: 1–16.
- Jestin C, Lodé M, Vallée P, Domin C, Falentin C, Horvais R, Coedel S, Manzanares-Dauleux M, Delourme R 2011.** Association mapping of quantitative resistance for *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Molecular Breeding* **27**: 271–287.
- Kaur S, Cogan NOI, Ye G, Baillie RC, Hand ML, Ling AE, McGeary AK, Kaur J, Hopkins CJ, Todorovic M *et al.* 2009.** Genetic map construction and QTL mapping of resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in Australian canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* **120**: 71–83.
- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B 2009.** A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* **323**: 1360–1363.
- Kumar V, Paillard S, Fopa-Fomeju, B, Falentin C, Deniot G, Baron C, Vallée P, Manzanares-Dauleux M, Delourme R 2018.** Multi-year linkage and association mapping confirm the high number of genomic regions involved in oilseed rape quantitative resistance to blackleg. *Theoretical and Applied Genetics* **131**: 1627–1643.

- Kushalappa AC, Yogendra KN, Karre S 2016.** Plant innate immune response: qualitative and quantitative resistance. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* **35**: 38–55.
- Laperche A, Aigu Y, Jubault M, Ollier M, Guichard S, Glory P, Strelkov SE, Gravot A, Manzanares-Dauleux M 2017.** Clubroot resistance QTL are modulated by nitrogen input in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* **130**: 669–684.
- Larkan NJ, Lydiate DJ, Parkin IAP, Nelson MN, Epp DJ, Cowling WA, Rimmer SR, Borhan MH 2013.** The *Brassica napus* blackleg resistance gene *LepR3* encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm1. *New Phytologist* **197**: 595–605.
- Larkan NJ, Ma L, & Borhan MH 2015.** The *Brassica napus* receptor-like protein RLM2 is encoded by a second allele of the *LepR3/Rlm2* blackleg resistance locus. *Plant Biotechnology Journal* **13**: 983–992.
- Larkan NJ, Yu F, Lydiate DJ, Rimmer SR, Borhan MH 2016a.** Single R gene introgression lines for accurate dissection of the *Brassica - Leptosphaeria* pathosystem. *Frontiers in Plant Sciences* **7**: 1771.
- Larkan NJ, Raman H, Lydiate DJ, Robinson SJ, Yu F, Barbulescu DM, Raman R, Luckett DJ, Burton W, Wratten N et al. 2016b.** Multi-environment QTL studies suggest a role for cysteine-rich protein kinase genes in quantitative resistance to blackleg disease in *Brassica napus*. *BMC Plant Biology* **16**: 183.
- Meile L, Croll D, Brunner PC, Plissonneau C, Hartmann FE, McDonald BA, Sánchez-Vallet A 2018.** A fungal avirulence factor encoded in a highly plastic genomic region triggers partial resistance to septoria tritici blotch. *New Phytologist* **2019**: 1048–1061.
- Mendes-Pereira E, Balesdent MH, Brun H, Rouxel T 2003.** Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans-L. biglobosa* species complex. *Mycological Research* **107**: 1287–1304.
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z 2002.** Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* **32**: 1372-1379.
- Niks RE, Qi X, Marcel TC 2015.** Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: concepts, misconceptions, and mechanisms. *Annual Review of Phytopathology* **53** 445–470.
- Parlange F, Daverdin G, Fudal I, Kuhn ML, Balesdent MH, Blaise F, Grezes-Besset B, Rouxel T 2009.** *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents *Rlm4*-mediated recognition through a single amino acid change. *Molecular Microbiology* **71**: 851–863.
- Parlevliet JE & Zadoks JC 1977.** The integrated concept of disease resistance: A new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica*, **26**, 5–21.
- Petit-Houdenot Y, Degrave A, Meyer M, Blaise F, Ollivier B, Marais CL, 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 Phytologist* **223**: 397–411.

- Pilet ML, Delourme R, Foisset N, Renard M 1998.** Identification of loci contributing to quantitative field resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not., in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **96**: 23–30.
- Pilet ML, Duplan G, Archipiano M, Barret P, Baron C, Horvais R, Tanguy X, Lucas MO, Renard R, Delourme R 2001.** Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oilseed rape. *Crop Science* **41**: 197–205.
- Plissonneau C, Daverdin G, Ollivier B, Blaise F, Degrave A, Fudal I, Rouxel T, Balesdent MH 2016.** A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist* **209**: 1613–1624.
- Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ 2009.** Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Sciences* **14**: 21–29.
- Raman H, Raman R, Coombes N, Song J, Diffey S, Kilian A, Lindbeck K, Barbulescu DM, Batley J, Edwards D et al. 2016.** Genome-wide association study identifies new loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* in canola. *Frontiers in Plant Sciences* **7**: 1513.
- Raman R, Taylor B, Marcroft S, Stiller J, Eckermann P, Coombes N, Rehman A, Lindbeck K, Luckett D, Wratten N et al. 2012.** Molecular mapping of qualitative and quantitative loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* causing blackleg disease in canola (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **125**: 405–418.
- Rocherieux J, Glory P, Giboulot A, Boury S, Barbeyron G, Thomas G, and Manzanares-Dauleux M 2004.** Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics* **108**: 1555–1563.
- Rouxel T & Balesdent MH 2017.** Life, death and rebirth of avirulence effectors in a fungal pathogen of *Brassica* crops, *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist* **214**, 526–532.
- Rouxel T & Balesdent MH 2005.** The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Molecular Plant Pathology* **6**: 225–241.
- Rouxel T, Grandaubert J, Hane JK, Hoede C, Van De Wouw AP, Couloux A, Dominguez V, Anthouard V, Bally P, Bourras S 2011.** Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by repeat-induced point mutations. *Nature Communications* **2**: 202.
- Rouxel T, Willner E, Coudard L, Balesdent MH 2003.** Screening and identification of resistance to *Leptosphaeria maculans* (stem canker) in *Brassica napus* accessions. *Euphytica* **133**: 219–231.
- Sánchez-Vallet A, Fouché S, Fudal I, Hartmann FE, Soyer JL, Tellier A Croll D. 2018.** The genome biology of effector gene evolution in filamentous plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **56**: 21–40.
- Silayeva O & Barnes AC 2018.** Gibson Assembly facilitates bacterial allelic exchange mutagenesis. *Journal of Microbiology Methods* **144**: 157–163.

- Soyer JL, Clairet C, Gay EJ, Lapalu N, Rouxel T, Stukenbrock EH, Fudal I 2020.** Genome-wide mapping of histone modifications in two species of *Leptosphaeria maculans* showing contrasting genomic organization and host specialization. *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.08.084566>.
- St.Clair DA 2010.** Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 247–268.
- West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ Fitt BDL 2001.** Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology* **50**: 10–27.
- Wilfert L & Schmid-Hempel P 2008.** The genetic architecture of susceptibility to parasites. *BMC Evolutionary Biology* **8**: 187.
- Van de Wouw AP, Lowe RGT, Elliott CE, Dubois DJ, Howlett BJ 2014.** An avirulence gene, *AvrLmJ1*, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Molecular Plant Pathology* **15**: 523–530.
- Zenbayashi-Sawata K, Ashizawa T, Koizumi S 2005.** *Pi34-AVRPi34*: A new gene-for-gene interaction for partial resistance in rice to blast caused by *Magnaporthe grisea*. *Journal of General Plant Pathology* **71**: 395–401.

Supporting information

Figure SI.1 Expression profiles of *LmSTEE* genes during rapeseed colonization

Figure SI.2 Mean disease ratings of three rapeseed cultivars following inoculation with *L. maculans* transformants expressing "late" effector genes in cotyledons

Figure SI.3 Expression of the mutated *LmSTEE98* gene in "over-expressed in cotyledons" (OEC) transformants during early stages of cotyledon colonization

Figure SI.4 *In vitro* growth and pathogenicity phenotypes of *L. maculans* *LmSTEE98* mutants

Figure SI.5 Expression of *LmSTEE98* in mutants during stem infection

Table SI.1 Isolates used for polymorphism studies in *Leptosphaeria maculans* populations

Table SI.2 List of *Brassica napus* genotypes screened for resistance

Table SI.3 List of primers used in this study

Table SI.4 The top 20 BLAST results for each "late" effector

Table SI.5 PSI-BLAST results for each late effector against *Leptosphaeria biglobosa* proteins

Table SI.6 Cosegregation of resistance to *LmSTEE98* and two molecular markers in the 'Darmor-*bzh*' x 'Yudal' doubled haploid population

Figure I.1: Expression of *LmSTEE* genes in “over-expressed in cotyledons” (OEC) transformants of *Leptosphaeria maculans* during early stages of cotyledon colonization

We constructed OEC transformants specifically overexpressing the *LmSTEE1*, *LmSTEE35*, *LmSTEE78* and *LmSTEE98* genes under the control of the promoter of the *AvrLm4-7* gene during the early colonization of cotyledons. The expression of *LmSTEE* genes in the various OEC transformants was assessed by RT-qPCR in infected cotyledons of the cultivar ‘Eurol’, 7 days post-inoculation. Gray bars correspond to expression data from three to four different transformants; black bars represent expression in the wild-type isolate (INV13.269) and white bars indicate the expression in control transformants with the endogenous promoter (*LmSTEE1* only). Red arrows indicate the OEC transformants selected for the screening of plant genotypes. Mean expression is normalized against actin, with tubulin used as a control (Fudal *et al.*, 2007). Error bars represent the standard error for two biological and three technical replicates.

Figure I.2: Resistance response of the rapeseed cultivars ‘Yudal’ and ‘Dariot’ to two “late” effector genes

Leptosphaeria maculans transformants expressing *LmSTEE35*, *LmSTEE1*, *LmSTEE98* or *LmSTEE78* under the control of the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were used to inoculate the ‘Yudal’, ‘Dariot’ and susceptible ‘Eurol’ cultivars. Two independent transformants were used per construct. The bars represent the percentage of plants displaying susceptible (in red) or resistant (in green) phenotypes, based on the IMAScore rating scale (Balesdent *et al.*, 2001), 14 days after inoculation. INV13.269 is the wild-type isolate and the JN2 and JN3 isolates were used as additional controls. The resistance of ‘Dariot’ to JN3 and JN2 is linked to the presence of *Rlm7*, which recognizes *AvrLm7* in these isolates.

Figure I.3: Generation of CRISPR-Cas9-mutated versions of *LmSTEE98* and effect of the mutations on their recognition by *RlmSTEE98* in cultivar ‘Yudal’

Four CRISPR-Cas9-mutated versions of *LmSTEE98* were generated and their deduced protein sequences were aligned with that of the WT protein in (A). The mutated alleles were placed under the control of the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7*, and transformants of *Leptosphaeria maculans* were used to inoculate the susceptible cultivar ‘Darmor’ (B) and the resistant cultivar ‘Yudal’, containing the *RlmSTEE98* gene (C). Three independent transformants were used per construct. Scoring was based on the IMAScore rating scale, in which scores of 1-3 indicate resistance and scores of 4-6 indicate susceptibility (Balesdent *et al.*, 2001), 14 days after inoculation. INV13.269 is the wild-type isolate. Error bars represent the standard error for at least ten biological replicates.

Figure I.4: The inactivation of *LmSTEE98* by CRISPR-Cas9 method increases stem necrosis in 'Yudal' rapeseed stems

LmSTEE98 mutants of *Leptosphaeria maculans* (Figure I.3A) were used to inoculate the petiole of the second true leaf of *B. napus* 'Darmor' and 'Yudal', cut 1 cm from the point of insertion into the stem. Symptoms were evaluated on stem sections, 30 days after inoculation. (A) Percentage of the stem section displaying necrosis for cultivar 'Yudal' ($n \geq 18$). (B) Percentage of the stem section displaying necrosis for cultivar 'Darmor' ($n \geq 18$). The asterisks indicate a significant difference in the area under the curve between the control isolate JN2_Cas9 and the *LmSTEE98* mutants, for the two biological replicates of the experiment (GLM: **: p -value < 0.05 and ***: p -value < 0.01).

Figure I.5: Genetic mapping of the resistance gene *RlmSTEE98* in the 'Darmor-bzh' x 'Yudal' cross

RlmSTEE98 was mapped to chromosome A09 of *Brassica napus*. The genetic distances, indicated in centiMorgans, are shown on the left, with marker order shown on the right.

Table I.1: Characteristics of the "late" effector candidates of *Leptosphaeria maculans* studied here

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

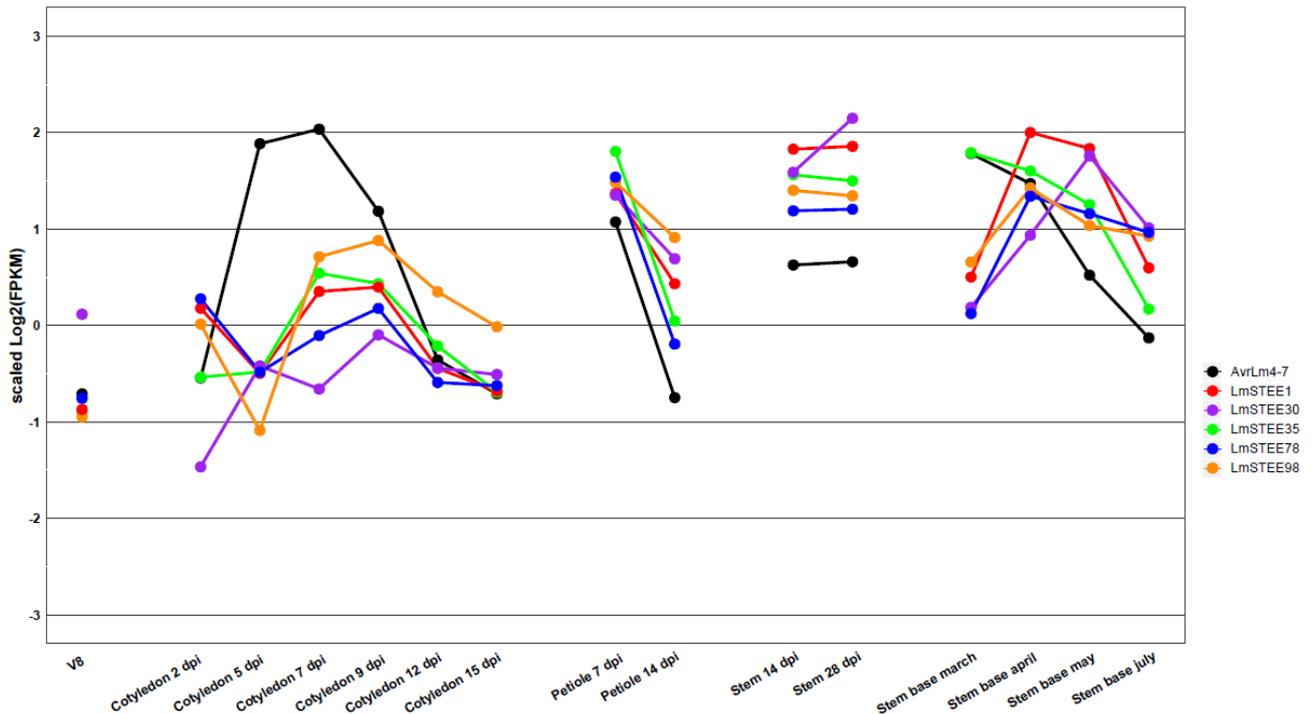


Figure SI.1: Expression profiles of *LmSTEE* genes during rapeseed colonization

Expression profiles of *LmSTEE* genes are based on RNAsequencing of samples obtained (i) *in vitro* on V8-agar medium (V8, JN2 (v23.1.2) isolate), (ii) from 'Darmor-*bzh*' cotyledons, petioles and stems inoculated with isolate JN2 under controlled conditions and sampled at 2, 5, 7, 9, 12 and 15 days post inoculation (dpi) for cotyledons, 7 and 14 dpi for petioles and 14 and 28 dpi for stems, and (iii) from stem base tissues sampled at four time points (March, April, May and July) during the 2013-2014 growing season in the field following natural infection. FPKM expression values were log₂-transformed and then mean-centered. Two or three independent biological replicates were used per sampling time-point. Raw counts, library size and expression analyses are from Gay *et al.* (2021).

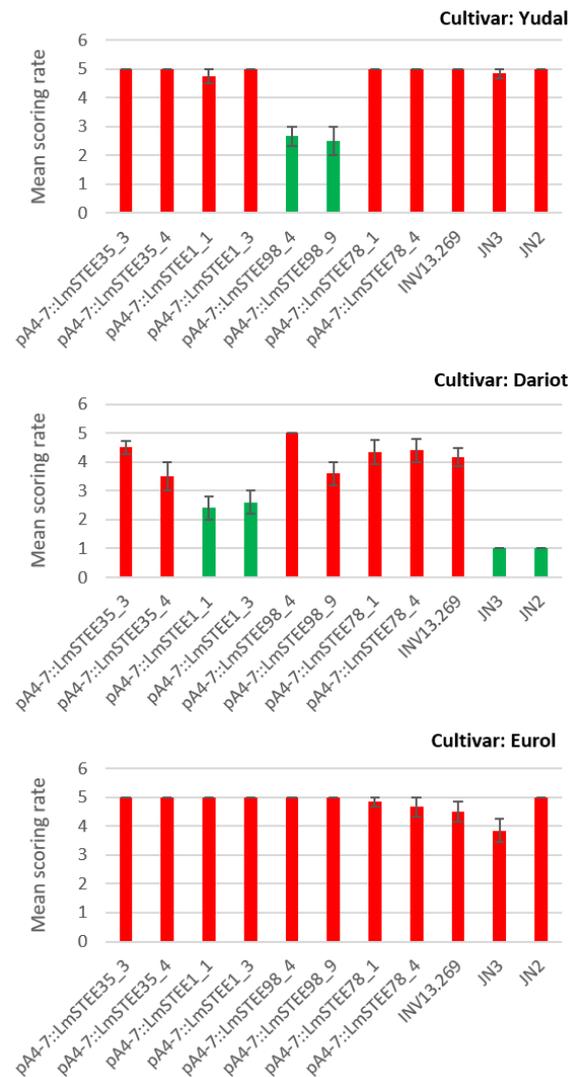


Figure SI.2: Mean disease ratings of three rapeseed cultivars following inoculation with *L. maculans* transformants expressing “late” effector genes in cotyledons

L. maculans transformants expressing *LmSTEE35*, *LmSTEE1*, *LmSTEE98* or *LmSTEE78* under the control of the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were used to inoculate the ‘Yudal’, ‘Dariot’ and susceptible ‘Eurol’ cultivars. Two independent transformants were used per construct. Scoring was based on the IMAScore rating scale (Balesdent *et al.*, 2001), 14 days after inoculation. INV13.269 is the wild-type isolate and JN2 and JN3 isolates were used as additional controls. Error bars represent the standard error. The resistance of ‘Dariot’ to JN3 and JN2 is linked to the presence of *Rlm7*, which recognizes *AvrLm7* in these isolates.

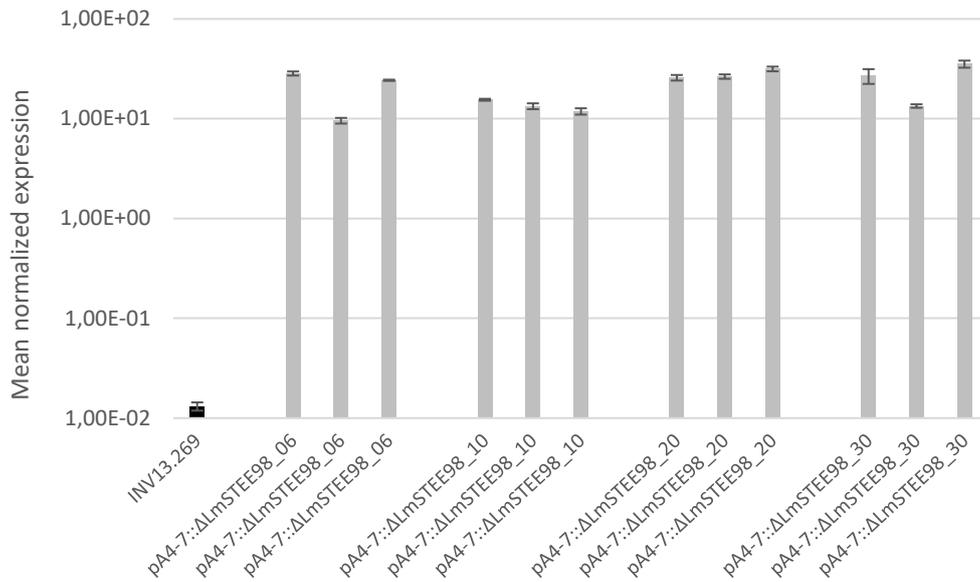


Figure SI.3: Expression of the mutated *LmSTEE98* gene in “overexpressed in cotyledons” (OEC) mutants during early stages of cotyledon colonization

We constructed OEC mutants expressing mutated versions of *LmSTEE98* under the control of the promoter of the *AvrLm4-7* gene specifically overexpressed during the early colonization stage. The expression of *LmSTEE98* in the various mutants was assessed by RT-qPCR in infected cotyledons, seven days post inoculation. The black bar represents the expression of *LmSTEE98* in the wild-type isolate INV13.269. Mean expression is normalized against actin, with tubulin used as a control. Error bars represent the standard error for two biological and two technical replicates.

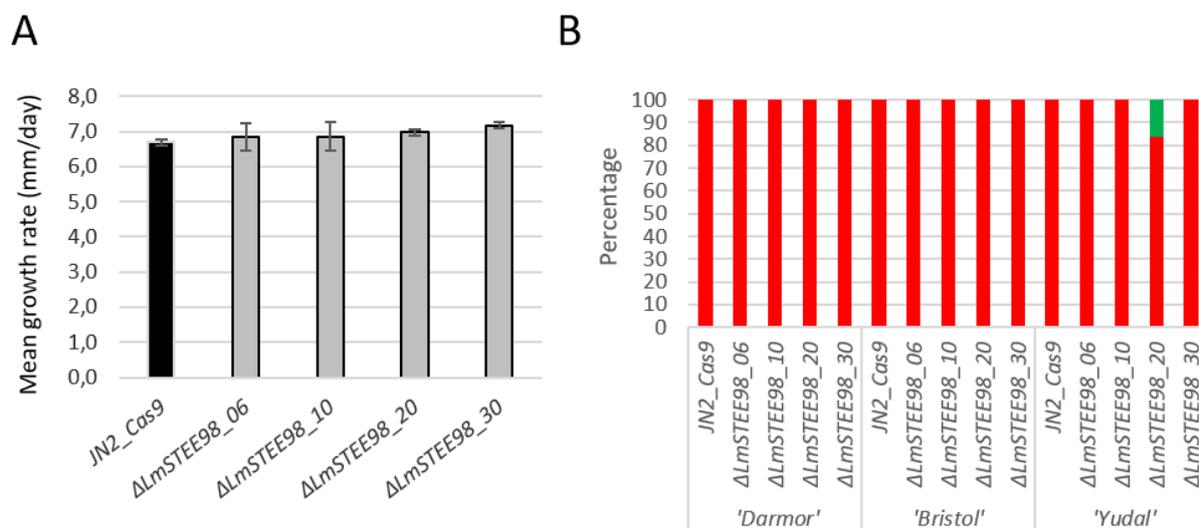


Figure SI.4: *In vitro* growth and pathogenicity phenotypes of *L. maculans* LmSTEE98 mutants

Four different mutant forms of the LmSTEE98 protein were generated following CRISPR-Cas9 mutagenesis. (A) The mean growth rate (mm/day) of the LmSTEE98 mutants was assessed at 6 days, on mycelium grown on V8 agar at 25°C. JN2_Cas9 is the control isolate, represented by a black bar. Error bars indicate the standard error of 9 replicates. (B) The percentages of inoculated plants displaying a resistant (green) or susceptible phenotype (red) are shown. Pathogenicity assays were performed on the cotyledons of the susceptible cultivars 'Darmor', 'Bristol' and 'Yudal'. Phenotypes were scored with the IMAScore rating scale (Balesdent *et al.*, 2006), 14 days after inoculation. Approximately 10 plants of each genotype were inoculated per construct.

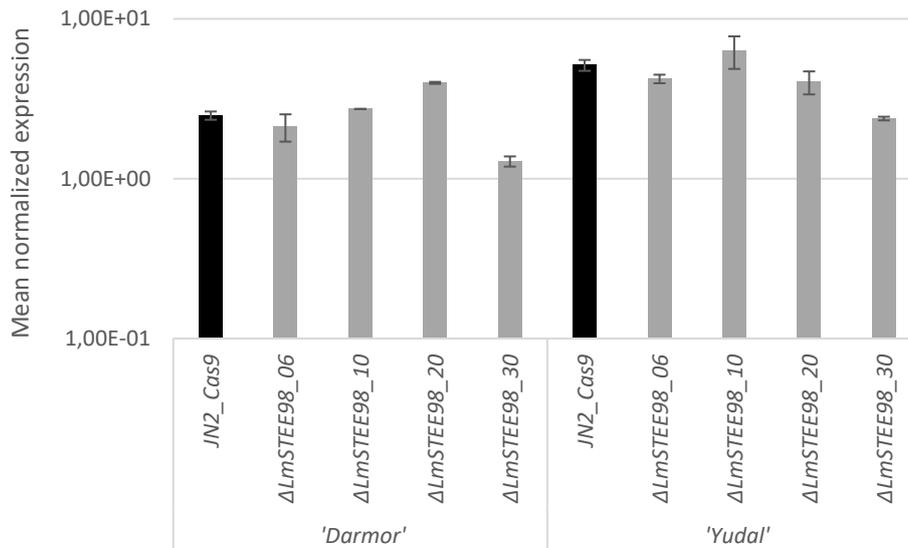


Figure SI.5: Expression of *LmSTEE98* in mutants during stem infection

Mutants carrying four mutated versions of the *LmSTEE98* gene were created. The expression of *LmSTEE98* in the mutants was assessed by RT-qPCR on infected stems of 'Darmor' and 'Yudal', 30 days post inoculation. Gray bars correspond to expression data for the various mutants; black bars represent expression in the wild-type isolate (JN2_Cas9). Mean expression levels are normalized against actin, with tubulin used as a control. Error bars represent the standard error for one biological and two technical replicates.

Table SI.1: Isolates used for polymorphism studies in *Leptosphaeria maculans* populations

^a Presence determined by PCR amplification.

^b HRM results coupled with sequencing: na (not-analyzed by HRM analysis), 0 (no sequence difference by HRM analysis) and SNPs obtained by sequencing.

Name	Country	Region	Sampling date	Reference	Isolated from	LmSTEE1 (HRM) ^a	LmSTEE2 (PCR) ^a	LmSTEE3 (HRM) ^b	LmSTEE4 (HRM) ^b	LmSTEE5 (PCR) ^a	LmSTEE6 (HRM) ^b	LmSTEE7 (PCR) ^a	LmSTEE8 (HRM) ^b	LmSTEE9 (PCR) ^a	LmSTEE10 (HRM) ^b
IBCv14	Australia	na	1988	Mendes-Pereira et al., 2003	<i>B. napus</i>	0	presence								
WT47	Australia	Western Australia	2005	Mendes-Pereira et al., 2003	<i>B. napus</i>	0	presence								
WT 6.7.3	Australia	Western Australia	2005		<i>B. napus</i>	0	presence								
WT86	Australia	Western Australia	2005		Westar	0	presence								
WT101	Australia	Western Australia	2005		Westar	0	presence								
WT15	Australia	Western Australia	2005		Westar	0	presence								
WT3	Australia	Western Australia	2005		Westar	0	presence								
WT30	Australia	Western Australia	2005		Westar	0	presence								
WT31	Australia	Western Australia	2005		Westar	0	presence								
WT32	Australia	Western Australia	2005		Westar	na	presence	0	presence	0	presence	0	presence	0	presence
WT48	Australia	Western Australia	2005		Westar	0	presence								
WT5	Australia	Western Australia	2005		Westar	na	presence	0	presence	0	presence	0	presence	0	presence
WT50	Australia	Western Australia	2005		Westar	0	presence								
WT51	Australia	Western Australia	2005		Westar	0	presence								
WT57	Australia	Western Australia	2005		Westar	0	presence								
WT75	Australia	Western Australia	2005		Westar	0	presence								
WT78	Australia	Western Australia	2005		Westar	0	presence								
AD 1198	Canada	Lanigan (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD 1294	Canada	Fort Saskatchewan (Alberta)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD 1366	Canada	Wetaskiwin (Alberta)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD 323	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD 336	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD 372	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	na	presence	0	presence	0	presence	0	presence	0	presence
AD 378	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD 420	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD 476	Canada	Rosheim (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD 539	Canada	Saskatoon (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD 717	Canada	Roland (Manitoba)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD 752	Canada	Camrose (Alberta)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD 847	Canada	Birch hills (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	na	presence	0	presence	0	presence	0	presence	0	presence
AD 879	Canada	Elm Creek (Manitoba)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD 917	Canada	Brandon (Manitoba)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	na	presence	0	presence	0	presence	0	presence	0	presence
AD 987	Canada	Levellier (Manitoba)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD1018	Canada	Moris (Manitoba)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD190	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Surpass 400	0	presence								
AD194	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Surpass 400	0	presence								
AD217	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Westar	0	presence								
AD258	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dimaghani et al., 2009	Surpass 400	0	presence								
G.13.100	France	Grignon (Vielaines)	2013	unpublished	Alpaga	na	presence								
G.13.119	France	Grignon (Vielaines)	2013	unpublished	Alpaga	na	presence								
G.13.139	France	Grignon (Vielaines)	2013	unpublished	Alpaga	na	presence								
G.13.141	France	Grignon (Vielaines)	2013	unpublished	Alpaga	na	presence								
G.13.20	France	Grignon (Vielaines)	2013	unpublished	Drakkar	na	presence								
G.13.322	France	Grignon (Vielaines)	2013	unpublished	DK Explicit	na	presence								
G.13.380	France	Grignon (Vielaines)	2013	unpublished	DK Excellium	na	presence								
G.13.501	France	Grignon (Vielaines)	2013	unpublished	DK Excellium	na	presence								
G.13.506	France	Grignon (Vielaines)	2013	unpublished	DK Excellium	na	presence								
G.13.515	France	Grignon (Vielaines)	2013	unpublished	DK Excellium	na	presence								
G.13.89	France	Grignon (Vielaines)	2013	unpublished	Drakkar	na	presence								
INV.13.100	France	Saint-Aignan (Loir-et-Cher)	2013	unpublished (inVivo project)	Falcon	na	presence								
INV.13.101	France	Saint-Aignan (Loir-et-Cher)	2013	unpublished (inVivo project)	Falcon	na	presence								
INV.13.102	France	Saint-Aignan (Loir-et-Cher)	2013	unpublished (inVivo project)	Falcon	na	presence								
INV.13.197	France	La Roche sur Von (Vendée)	2013	unpublished (inVivo project)	Falcon	na	presence								
INV.13.200	France	La Roche sur Von (Vendée)	2013	unpublished (inVivo project)	Falcon	na	presence								
INV.13.203	France	La Roche sur Von (Vendée)	2013	unpublished (inVivo project)	Falcon	na	presence								
INV.13.207	France	La Roche sur Von (Vendée)	2013	unpublished (inVivo project)	Falcon	na	presence								
INV.13.217	France	La Roche sur Von (Vendée)	2013	unpublished (inVivo project)	Falcon	na	presence								

Table SI.2: List of *Brassica napus* genotypes screened for resistance

Varieties	Maintainer	Year released	Accession type ^a	Type	Origin
12/239 Advanta	Limagrain	2014	00	Winter	France
15.23.4.1	na	na	00	Winter	
Action	NPZ	-	00	Winter	
Adder	SDME	1997	00	Winter	
Adriana	Advanta	2006	00	Winter	
Akamar	KWS	1995	00	Winter	Germany
Alesi	KWS	2002	00	Winter	
Alicante	Advanta	2015	00	Winter	France
Aligator	KWS	1994	00	Winter	Germany
Alsace 1360	INRA	<1960	++	Winter	France
Amber			00	Winter	Germany
Amor	RAPS GbR	1996	00	Winter	
Angus	NPZ	2015	00	Winter	France
Aragon	NPZ	2004	00	Winter	
Ariana			00	Winter	
Askari			++	Winter	
Atlantic	Nickerson	2005	00	Winter	
Aurum	NPZ	2004	00	Winter	
Aviso	Nickerson	2000	00	Winter	Denmark
Aztec			0+	Winter	United Kingdom
Belinda			0+	Winter	
Bellini	Danisco Seed	2000	00	Winter	Denmark
Beryl			0+	Winter	Poland
Bienvenu	INRA	1983	0+	Winter	France
Bolko			00	Winter	Poland
Boston	Nickerson	1997	00	Winter	France
Brink			0+	Winter	Sweden
Bristol	Monsanto SAS	1993	00	Winter	France
Caddy			00	Winter	Germany
Campala	Monsanto SAS	2001	00	Winter	
Canberra	Monsanto SAS	1999	00	Winter	
Cancan	PBI	2004	00	Winter	
Capitol	Monsanto SAS	1995	00	Winter	
Captain	Monsanto SAS	1999	00	Winter	
Capvert	Monsanto SAS	2002	00	Winter	
Castille	Monsanto SAS	2004	00	Winter	
Ceres			00	Winter	Germany
Chelsi	Caussade	2002	00	Winter	
Cheops	Dalgety Agriculture	2001	00	Winter	
Cheyenne	Euralis	1996	00	Winter	
Columbus	Monsanto SAS	1996	00	Winter	
Colvert	Nickerson	1996	00	Winter	France
Constable			0+	Winter	United Kingdom
Courage	KWS	2000	00	Winter	
Cristal	Semences de France	2015	00	Winter	France
Cuzzco	RAGT Semences	2015	00	Winter	France
CWH291	Dekalb	2015	00	Winter	na
Dariot	DSV	2015	00	Winter	France
Darmor	Serasem	1984	00	Winter	France
DK Exmore	Dekalb	2015	00	Winter	Austria
DK expansion	Dekalb	2015	00	Winter	France
DK Extract	Dekalb	2015	00	Winter	Poland
DK imperial	Dekalb	2014	00	Winter	Slovakia
DK impressario	Dekalb	2015	00	Winter	Hungria
Doral			00	Winter	France
Doublol	INRA	1989	00	Winter	France
Dozzen	Semences de France	2013	00	Winter	United Kingdom
Dualis	DSV	2016		Winter	
Dublianski			++	Winter	Russia
Ecrin	Serasem	2004	00	Winter	
Eleonore	Euralis	2002	00	Winter	
Elvira	na	na	na	Winter	na
Envol			00	Winter	France
ES angel	Euralis	2013	00	Winter	Italy
ES Astrid	Euralis	2003	00	Winter	France
ES Cesario	Euralis	2015	00	Winter	
ES imperio	Euralis	2015	00	Winter	France
ES Mambo	Euralis	2014	00	Winter	France
ES Pinson	Euralis	2004	00	Winter	
Escort	Euralis	-	00	Winter	
Eurol	Monsanto SAS	1991	00	Winter	France
Evri	Caussade	2003	00	Winter	
Expander			0+	Winter	
Express	NPZ	1992	00	Winter	Germany
Falcon	NPZ	1991	00	Winter	Germany
Fencer	Bayer	2014	00	Winter	
Fernando	KWS	2014	00	Winter	France
Fertodi Elit			++	Winter	Hungary
Fortis	Maisadour	2000	00	Winter	
Forto			++	Winter	Germany
Forza	Momont	2005	00	Winter	
Frederic	RAPS GbR	2003	00	Winter	

Varieties	Maintainer	Year released	Accession type ^a	Type	Origin
Gaspard	INRA	1985	++	Winter	France
Goeland	Momont	1992	00	Winter	Germany
Goldberger Zarter Butter			++	Winter	
Gorczański			++	Winter	
Grizzly	R2N	2003	00	Winter	
Groß Luzewitter			++	Winter	Germany
H9109901	KWS	2014	00	Winter	France
H9110523	KWS	2014	00	Winter	France
Hektor	JD	2003	00	Winter	Sweden
Hercules			0+	Winter	Sweden
Hourra	Momont	2014	00	Winter	France
HR 175160	RAGT 2n	2014	00	Winter	France
Ibex	R2N	2001	00	Winter	
Idol			00	Winter	
INV1025	Bayer	2015	00	Winter	France
INV1030	Bayer			Winter	
Jantar	IHAR	1985	00	Winter	France
Jet Neuf	Serasem	1977	0+	Winter	France
Jetton	NPZ	-	00	Winter	France
Jupiter			0+	Winter	Sweden
Kadore	Momont	2004	00	Winter	
Kid				Winter	
Kosto	Momont	2001	00	Winter	France
Kurander			0+	Winter	Germany
Labrador	Momont	2003	00	Winter	
Lembkes			++	Winter	Germany
Lesira			0+	Winter	Germany
Lewis	Serasem	2003	00	Winter	
Liberator			00	Winter	
Ligora			0+	Winter	
Lingot			0+	Winter	
Link			00	Winter	Germany
Lioness	DSV	2004	00	Winter	France
Liporta			00	Winter	Germany
Liprima	DSV	2001	00	Winter	
Lirabon			00	Winter	
Lirajet	DSV	1989	00	Winter	
Local d'Ukraine			++	Winter	Ukraine
Madrigal	NK	1999	00	Winter	France
Major	INRA	1971	++	Winter	France
Makila	Maisadour	2001	00	Winter	
Mar	IHAR	1991	00	Winter	Poland
Markus			++	Winter	
Matador			++	Winter	Sweden
Maxol			00	Winter	
Mikado			0+	Winter	United Kingdom
Milena	KWS	2000	00	Winter	Germany
Mirander				Winter	
Mohican	Euralis	1995	00	Winter	United Kingdom
Moldavia			++	Winter	Russia
Montego	Nickerson	2001	00	Winter	United Kingdom
Nain de Hambourg	INRA	<1960	++	Winter	Germany
Najavo	Euralis	1992	00	Winter	United Kingdom
Napoli	RAGT Semences	2015	00	Winter	France
Norde			++	Winter	
Oase	DSV	2004	00	Winter	France
Oleski			++	Winter	Russia
Olphi	Euralis	2002	00	Winter	
Olqueil Gulzover			++	Winter	
Olymp	INRA	1990	00	Winter	Germany
Orléans			++	Winter	France
Pacha			++	Winter	
Pacific	Nickerson	2003	00	Winter	France
Pixel			++	Winter	
Pollen	Momont	1998	00	Winter	France
Pollux				Winter	
Popular	DSV	2013	00	Winter	
Potomac	Nickerson	2003	00	Winter	France
Prerouska			++	Winter	
President	Saatbau France	2015	00	Winter	Denmark
Primor	INRA	1973	0+	Winter	France
Prince	NPZ	-		Winter	
PT246	Pioneer Semences	2014	00	Winter	France
PT255	Pioneer Semences		00	Winter	
PT256	Pioneer Semences	2015	00	Winter	France
Quedlinburger Platzfester			++	Winter	
Quinta	INRA	1976	0+	Winter	France
Rafale	Semences de France	2013	0+	Winter	
Raffiness				Winter	
Ramses	INRA	1970	++	Winter	France
Rapol			++	Winter	Germany
Rapora				Winter	

Varieties	Maintainer	Year released	Accession type ^a	Type	Origin
Recital	NK	2000	00	Winter	
Remy	KWS	2004	00	Winter	
Ridana			0+	Winter	Germany
Rocket			00	Winter	
Rodeo	KWS	2004	00	Winter	
Roxet			00	Winter	
Sahara	JD	2001	00	Winter	
Salomont	Serasem	2003	00	Winter	France
Sarepta	INRA	1962	++	Winter	France
Savannah			00	Winter	
Severino KWS	KWS	2014	00	Winter	France
Shogun			00	Winter	
Sinera				Winter	
Sinus			++	Winter	
Skrzesowicka-Fero			++	Winter	Poland
SW Gospel	SW	2003	00	Winter	
SY Alister	Syngenta	2012	00	Winter	United Kingdom
Tapidor			00	Winter	France
Tennessee	Nickerson	2000	00	Winter	
Tenor	Momont	1999	00	Winter	France
Titus			++	Winter	
Tonus			++	Winter	
Tosca	SW	1999	00	Winter	Sweden
Tradition	INRA	1999	00	Winter	France
Trezzor	RAGT 2n	2014	00	Winter	France
Twister	NK	2000	00	Winter	na
V275OL	Dekalb	2011	00	Winter	
V316OL	Dekalb	2014	00	Winter	Denmark
Valdor			0+	Winter	France
Verona	SW	2004	00	Winter	
Victor			++	Winter	
Viking	NPZ	2002	00	Winter	
Vivol	Monsanto SAS	1992	00	Winter	France
Warzanowski			++	Winter	Poland
Wembley	Semences de France	2015	00	Winter	United Kingdom
Whisky	Semences de France	2015	00	Winter	France
Wotan	NPZ	1991	00	Winter	
Yudal	INRA	-	++	Spring	Korea
Zeruca	Serasem	1998	+0	Winter	France
Zorro			00	Winter	Germany

^a The accession type (++, +0, 0+ or 00) is indicated, with:

" ++ ", varieties rich in erucic acid (C22:1) and glucosinolates (GSL)

" +0 ", varieties rich in C22:1 and poor in GSL

" 0+ ", varieties poor in C22:1 and rich in GSL

" 00 ", varieties poor in both C22:1 and GSL

Table SI.3: List of primers used in this study

Name	Sequence (5'-3')	Experiment	Tm (°C)	gDNA (bp)	cDNA (bp)
LmSTEE1_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGGGCTACTGTAAACCGTTTTGTAC	Cloning	64	761	-
LmSTEE1_EcoRI_Up	GAGAGAGAATTCATGCAATTCCTCAACCATCTTTAACGC	Cloning			
LmSTEE1_qUp	AGCTGCTCTTCTTACCC	<i>In planta</i> expression	60	167	119
LmSTEE1_qLow	ATTTTCACACACGTCCCA	<i>In planta</i> expression			
LmSTEE1_Up_out	TCCCTTTGCCCTCATCAACA	Genotyping	64	397	302
LmSTEE1_Low_out	CTGATAGCAACGTCCGCAA	Genotyping			
LmSTEE30_SalI_Up	GAGAGAGTCGACATGAAGTTCACAAACACC	Cloning	60	785	-
LmSTEE30_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGTCATGTCACCTGTGCTACCGA	Cloning			
LmSTEE30_qUp	GAACCGCATAACCTTTGCA	<i>In planta</i> expression	60	130	130
LmSTEE30_qLow	GCCATCCAGTCTTCAGCCAT	<i>In planta</i> expression			
LmSTEE30_Up_out	TCGCCTACCTAACTCTGCAC	Genotyping	62	583	430
LmSTEE30_Low_out	AGCGAATGAGTCCACGATCT	Genotyping			
LmSTEE35_EcoRI_Up	GAGAGAGAATTCATGTATCTCTGCAAAACTG	Cloning	60	1449	-
LmSTEE35_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGCTCGAGTTAGGCTGTGT	Cloning			
LmSTEE35_qUp	TGCAAAACTGTTATCGCCCTTT	<i>In planta</i> expression	60	171	109
LmSTEE35_qLow	TGCAGGTACGTTAATAGGTCC	<i>In planta</i> expression			
LmSTEE35_Up_out	GAGAGAGAATTCATGTATCTCTGCAAAACTG	Genotyping	64	629	458
LmSTEE35_Low_out	GAGAGACCATGGTTCGTTGATCCATTGAAAGCA	Genotyping			
LmSTEE78_EcoRI_Up	GAGAGAGAATTCATGTTTACCAGCACATTCATTTTC	Cloning	61	1399	-
LmSTEE78_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGTGTGACGAGGCTACATGGTT	Cloning			
LmSTEE78_qUp	GGTGGCAAGGGCGTTAAGA	<i>In planta</i> expression	58	135	135
LmSTEE78_qLow	AGTCTGGAATGGATCTGGT	<i>In planta</i> expression			
LmSTEE78_Up_out	ACGATTCGAGATAGAGCTTCAA	Genotyping	60	994	923
LmSTEE78_Low_out	TCTTTCACAACCACGTCCACT	Genotyping			
LmSTEE98_SalI_Up	GAGAGAGTCGACATGAAGACCTTATCACCATTGC	Cloning	62	694	-
LmSTEE98_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGTGTGGCATTGGGTTTAGGC	Cloning			
Gib_pA4-7:Lm98_F	CGAATTCGTTAAACAGCTGTGCGACATGAAGACCTTATCACCATTG	Gibson cloning	63	694	-
Gib_pA4-7:Lm98_R	CTTCTGTGCAATCGGTACCCTCGAGTGTGGCATTGGGTTTAG	Gibson cloning			
LmSTEE98_qUp	ATGAAGACCTTATCACCATTGC	<i>In planta</i> expression	60	279	149
LmSTEE98_qLow	CCGCCACAGTGAACATAAT	<i>In planta</i> expression			
LmSTEE98_Up_out	CTCGATCAAGCACAAATACAACCTG	Genotyping	58	352	222
LmSTEE98_Low_out	GTTTTAAATACACACAGCCTCG	Genotyping			
Tubulin_qUp	AAGAACTCATCTACTTCGT	<i>In planta</i> expression	60	130	130
Tubulin_qLow	TGAATAGCTCCTGAATGG	<i>In planta</i> expression			
Actin_qUp	AGTGCATGTCGATGTCAG	<i>In planta</i> expression	60	160	110
Actin_qLow	AAGAGCGGTGATTTCTTCT	<i>In planta</i> expression			
promAvrLm4-7_Up	GTTTTGGTTAGGTTTAGGGTCT	Cloning	59	1402	-
promAvrLm4-7_Down BamHI	GAGAGAGGATCCGTTGTTAACTGTCAAAGGGTT	Cloning			
gRNA against LmSTEE98	GAAACCTAATCAATCAACGCCCTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAAC GAGTAAGCTCGTGAGGGCATACTTACTTGTGTTTATAGAGCTAGAAA TAGC	gRNA (CRISPR-Cas9)	-	-	-
MAI0309	ACCTTAATCGAAACCTAATCAATCAAC	Amplification of gRNA (CRISPR-Cas9)	64	121	-
MAI0310	ATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC		61	-	-
MAI0198	TGGGGAGTTTGCTTATGG		Plasmid sequencing (CRISPR-Cas9)	61	-
SeqLmSTEE98_F	GACCTTTATCACCATTGC	LmSTEE98 mutation detection (CRISPR-Cas9)	55	292	-
SeqLmSTEE98_R	TAACAAGTGAAATACCGC				

Table SI.4: The top 20 BLAST results for each "late" effector

^a E-value threshold: 1E-5

LmSTEE genes	Blast Hits GenInfo Identifiers	Identity (%)	Coverage (%)	Species	Predicted Function	E-value	Bitscore
LmSTEE 1	396495820	100	99	<i>Leptosphaeria maculans</i> (JN3)	predicted protein	5.00E-51	167
LmSTEE 1	1245868328	56.47	99	<i>Aspergillus bombycis</i>	hypothetical protein ABOM_005030	3.00E-19	86.3
LmSTEE 1	1445208731	52.44	99	<i>Coleophoma cylindrospora</i>	hypothetical protein BP6252_06805	8.00E-16	77
LmSTEE 1	1385089610	51.19	99	<i>Cadophora</i> sp. (DSE1049)	hypothetical protein DL98DRAFT_590336	4.00E-18	83.2
LmSTEE 1	1092140066	50.79	68	<i>Rhynchosporium secalis</i>	uncharacterized protein RSE6_14964	9.00E-06	50.4
LmSTEE 1	1245875238	50	99	<i>Aspergillus bombycis</i>	hypothetical protein ABOM_006663	3.00E-17	81.3
LmSTEE 1	1445223734	48.86	99	<i>Coleophoma crateriformis</i>	hypothetical protein BP5796_03573	6.00E-13	69.7
LmSTEE 1	1245868190	47.06	99	<i>Aspergillus bombycis</i>	hypothetical protein ABOM_005029	7.00E-11	64.3
LmSTEE 1	1092154329	46.59	99	<i>Rhynchosporium agropyri</i>	uncharacterized protein RAGO_17269	6.00E-10	61.6
LmSTEE 1	1385082018	42.7	99	<i>Cadophora</i> sp. (DSE1049)	hypothetical protein DL98DRAFT_597353	7.00E-07	53.5
LmSTEE 1	1092151066	42.39	99	<i>Rhynchosporium secalis</i>	uncharacterized protein RSE6_03070	4.00E-06	51.6
LmSTEE 1	1092140067	41.94	99	<i>Rhynchosporium secalis</i>	uncharacterized protein RSE6_14965	4.00E-08	57
LmSTEE 1	1445202185	41.3	99	<i>Coleophoma cylindrospora</i>	hypothetical protein BP6252_09999	4.00E-08	57
LmSTEE 1	1092157460	41.3	99	<i>Rhynchosporium agropyri</i>	uncharacterized protein RAGO_13215	8.00E-06	50.8
LmSTEE 1	996641768	41.05	99	<i>Colletotrichum salicis</i>	hypothetical protein CSAL01_09958	2.00E-09	60.8
LmSTEE 1	429860962	39.56	99	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Nara gc5)	hypothetical protein CGGCS_45	4.00E-06	51.6
LmSTEE 1	1436207426	39.39	99	<i>Venturia inaequalis</i>	hypothetical protein Vi05172_g11786	8.00E-11	64.3
LmSTEE 1	530466672	38.95	99	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Cg-14)	hypothetical protein CGLO_12340	1.00E-07	55.8
LmSTEE 1	1128252798	37.63	99	<i>Colletotrichum chlorophyti</i>	hypothetical protein CCHL11_07025	2.00E-07	55.5
LmSTEE 1	1436207450	37.62	99	<i>Venturia inaequalis</i>	External alternative NAD(P)H-ubiquinone oxidoreductase	1.00E-07	55.5
LmSTEE 1	477533138	36.84	99	<i>Colletotrichum orbiculare</i> (MAFF 240422)	hypothetical protein Cob_07050	4.00E-06	51.6
LmSTEE 30	396473383	100	99	<i>Leptosphaeria maculans</i> (JN3)	hypothetical protein LEMA_P030000.1	7.00E-66	207
LmSTEE 30	928521612	74.24	61	<i>Bipolaris maydis</i> (ATCC 48331)	hypothetical protein COCC4DRAFT_89751. partial	7.00E-22	93.6
LmSTEE 30	627918707	72.73	61	<i>Bipolaris oryzae</i> (ATCC 44560)	hypothetical protein COCMIDRAFT_45223. partial	6.00E-22	93.6
LmSTEE 30	953429323	71.21	61	<i>Bipolaris victoriae</i> (F13)	hypothetical protein COCIDRAFT_62287. partial	2.00E-21	92
LmSTEE 30	1188282005	68.22	98	<i>Epicoccum nigrum</i>	hypothetical protein B5807_04569	8.00E-35	127
LmSTEE 30	1370662673	66.67	94	<i>Corynespora cassicola</i> (Philippines)	hypothetical protein B550DRAFT_548680	7.00E-29	112
LmSTEE 30	1029179363	63.22	81	<i>Pyrenochaeta</i> sp. (DS3sAY3a)	hypothetical protein IQ07DRAFT_649735	3.00E-26	105
LmSTEE 30	628247214	63	93	<i>Bipolaris zeicola</i> (26-R-13)	hypothetical protein COCCADRAFT_113436	8.00E-33	122
LmSTEE 30	1003744355	58.57	65	<i>Madurella mycetomatis</i>	hypothetical protein MMYC01_203772	8.00E-14	78.2
LmSTEE 30	1046771708	57.81	59	<i>Lepidopterella palustris</i> (CBS 459.81)	hypothetical protein K432DRAFT_248626. partial	2.00E-13	71.2
LmSTEE 30	1003744355	57.14	65	<i>Madurella mycetomatis</i>	hypothetical protein MMYC01_203772	5.00E-13	75.5
LmSTEE 30	930148354	57.14	59	<i>Grosmannia clavigera</i> (kw1407)	hypothetical protein CMQ_5363	5.00E-09	62.8
LmSTEE 30	1003744355	57.14	65	<i>Madurella mycetomatis</i>	hypothetical protein MMYC01_203772	1.00E-07	60.1
LmSTEE 30	1425280297	56.99	83	<i>Fusarium</i> sp. (FIESC_28)	hypothetical protein FIESC28_01413	8.00E-19	86.3
LmSTEE 30	1249075751	56.76	67	<i>Penicillium zonata</i> (CBS 506.65)	hypothetical protein ASPZODRAFT_14207	6.00E-14	75.9
LmSTEE 30	936412016	55.81	77	<i>Neonectria ditissima</i>	hypothetical protein AK830_g5975	1.00E-12	70.5
LmSTEE 30	729190790	55.56	69	<i>Torrubiella hemipterigena</i>	hypothetical protein VHEMI02218	1.00E-06	57.4
LmSTEE 30	1461209181	55.43	83	<i>Fusarium</i> sp. (FIESC_12)	hypothetical protein FIE12Z_11575	1.00E-18	85.9
LmSTEE 30	1383915034	55.26	69	<i>Meliniomyces bicolor</i>	hypothetical protein K444DRAFT_366857	5.00E-13	72.8
LmSTEE 30	913803287	55	80	<i>Verticillium longisporum</i>	hypothetical protein BN1708_002213. partial	6.00E-09	63.9
LmSTEE 30	913813945	55	80	<i>Verticillium longisporum</i>	hypothetical protein BN1723_006735	1.00E-08	63.5
LmSTEE 35	396465316	100	99	<i>Leptosphaeria maculans</i> (JN3)	predicted protein	1.00E-85	258
LmSTEE 35	396470609	53.95	61	<i>Leptosphaeria maculans</i> (JN3)	predicted protein	2.00E-12	70.5
LmSTEE 35	396493668	43.48	55	<i>Leptosphaeria maculans</i> (JN3)	predicted protein	2.00E-08	59.3
LmSTEE 35	996579733	39.32	94	<i>Colletotrichum salicis</i>	hypothetical protein CSAL01_09201	3.00E-17	83.6
LmSTEE 35	1248254514	39.29	89	<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	hypothetical protein CORC01_01713	9.00E-13	71.6
LmSTEE 35	396488590	38.71	99	<i>Leptosphaeria maculans</i> (JN3)	hypothetical protein LEMA_P086540.1	1.00E-17	84.3
LmSTEE 35	1070361672	38	80	<i>Fusarium oxysporum</i>	hypothetical protein FOXG_22493	1.00E-13	73.6
LmSTEE 35	591482299	37.38	82	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (25433)	hypothetical protein FOTG_18790	5.00E-13	72
LmSTEE 35	996596015	36.75	94	<i>Colletotrichum nymphaeae</i> (SA-01)	hypothetical protein CNYM01_08372	2.00E-13	73.6
LmSTEE 35	1248272336	36.46	73	<i>Colletotrichum orchidophilum</i>	methyltransferase domain-containing protein	1.00E-08	63.5
LmSTEE 35	588903336	36.28	90	<i>Colletotrichum fioriniae</i> (PJ7)	hypothetical protein CFIO01_07940	5.00E-12	69.7
LmSTEE 35	530470297	35.14	86	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Cg-14)	hypothetical protein CGLO_09169	4.00E-11	70.9
LmSTEE 35	996607031	35.04	94	<i>Colletotrichum simmondsii</i>	hypothetical protein CSIM01_12189	2.00E-13	73.2
LmSTEE 35	588896108	34.86	84	<i>Colletotrichum fioriniae</i> (PJ7)	hypothetical protein CFIO01_03973	6.00E-11	66.6
LmSTEE 35	429852156	34.15	96	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Nara gc5)	secreted in xylem 5	2.00E-13	73.2
LmSTEE 35	996606511	33.63	90	<i>Colletotrichum nymphaeae</i> (SA-01)	hypothetical protein CNYM01_10134	1.00E-09	62.8
LmSTEE 35	636577695	33.61	98	<i>Exserohilum turcica</i> (Et28A)	hypothetical protein SETTUDRAFT_30080	2.00E-12	70.5
LmSTEE 35	1092161670	33.33	95	<i>Rhynchosporium agropyri</i>	uncharacterized protein RAGO_07799	1.00E-11	68.6
LmSTEE 35	959098843	33.02	83	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	secreted in xylem 5	3.00E-08	58.9
LmSTEE 35	959098841	33.02	83	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	secreted in xylem 5	4.00E-08	58.9
LmSTEE 35	996578938	32.52	94	<i>Colletotrichum simmondsii</i>	hypothetical protein CSIM01_03685	3.00E-10	65.1
LmSTEE 78	396484989	100	99	<i>Leptosphaeria maculans</i> (JN3)	hypothetical protein LEMA_P078210.1	0.00E+00	599
LmSTEE 78	1029184507	75.28	91	<i>Pyrenochaeta</i> sp. (DS3sAY3a)	hypothetical protein IQ07DRAFT_70092	3.00E-150	436
LmSTEE 78	1028893375	74.23	99	<i>Stagonospora</i> sp. (SRC1sM3a)	hypothetical protein IQ06DRAFT_297825	4.00E-156	450
LmSTEE 78	909988180	74.23	99	<i>Stemphylium lycopersici</i>	ABC transporter	2.00E-147	439
LmSTEE 78	1409581194	74.23	99	<i>Stemphylium lycopersici</i>	P-loop-containing nucleoside triphosphate hydrolase protein	4.00E-147	439
LmSTEE 78	1070547762	74.15	99	<i>Alternaria alternata</i>	hypothetical protein CC77DRAFT_747136	7.00E-152	440
LmSTEE 78	1213707404	73.81	99	<i>Alternaria alternata</i>	ABC transporter	5.00E-151	438
LmSTEE 78	1188282875	71.92	88	<i>Epicoccum nigrum</i>	hypothetical protein B5807_03193	2.00E-134	399
LmSTEE 78	1370657933	71.54	91	<i>Corynespora cassicola</i> (Philippines)	hypothetical protein B550DRAFT_574310	8.00E-138	404
LmSTEE 78	169614478	71.33	99	<i>Parastagonospora nodorum</i> (SN15)	hypothetical protein SNOG_10382	1.00E-146	426
LmSTEE 78	189207513	70.79	99	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	conserved hypothetical protein	9.00E-140	409
LmSTEE 78	311324441	70.45	99	<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	hypothetical protein PTT_12499	6.00E-146	425
LmSTEE 78	1402452670	70.45	99	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	hypothetical protein A1F95_08780	2.00E-139	408
LmSTEE 78	928528284	69.85	90	<i>Bipolaris maydis</i> (ATCC 48331)	hypothetical protein COCC4DRAFT_159286	2.00E-127	378
LmSTEE 78	627819003	68.73	99	<i>Bipolaris oryzae</i> (ATCC 44560)	glycoside hydrolase family 131 protein	3.00E-130	385
LmSTEE 78	1020697408	67.91	99	<i>Ascochyta rabiei</i>	hypothetical protein ST47_g10432	7.00E-134	394
LmSTEE 78	1066274749	67.36	98	<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i>	hypothetical protein CC84DRAFT_1110906	4.00E-134	394
LmSTEE 78	628086820	67.35	99	<i>Bipolaris sorokiniana</i> (ND90P)	hypothetical protein COCSADRAFT_41601	7.00E-128	379
LmSTEE 78	628201461	67.01	99	<i>Bipolaris zeicola</i> (26-R-13)	glycoside hydrolase family 131 protein	2.00E-127	378
LmSTEE 78	953440515	67.01	99	<i>Bipolaris victoriae</i> (F13)	glycoside hydrolase family 131 protein	3.00E-127	377
LmSTEE 78	636593087	65.19	99	<i>Exserohilum turcica</i> (Et28A)	hypothetical protein SETTUDRAFT_29245	2.00E-129	383
LmSTEE 98	396484429	100	98	<i>Leptosphaeria maculans</i> (JN3)	predicted protein	4.00E-30	112

Table SI.5: PSI-BLAST results for each late effector against *Leptosphaeria biglobosa* proteins

LmSTEE genes	PSI-BLAST hit on <i>L. biglobosa</i> 'brassicae' proteins ^a	Identity (%)	Coverage (%)	Predicted function	E-value	Bitscore
LmSTEE 1	Lbb_g1214_05374	72.29	100	none	8.00E-37	121
LmSTEE 30	Lbb_g1214_12377	36.00	69	none	6.00E-04	35.8
LmSTEE 30	Lbb_g1214_10046	32.26	83	CFEM domain-containing	0.001	35.4
LmSTEE 30	Lbb_g1214_03996	24.59	56	Cytidine and deoxycytidylate deaminase zinc-binding region	0.003	34.7
LmSTEE 30	Lbb_g1214_10876	32.14	75	none	0.031	31.6
LmSTEE 35	-	-	-	-	-	-
LmSTEE 78	Lbb_g1214_05495	88.70	100	GH131	0.0	540
LmSTEE 78	Lbb_g1214_00151	23.61	47	GH131	3.00E-07	49.7
LmSTEE 78	Lbb_g1214_07752	22.99	29	GH131	0.010	35.8
LmSTEE 98	Lbb_g1214_00046	44.83	100	none	3.00E-09	47.8
LmSTEE 98	Lbb_g1214_00047	39.13	82	none	0.003	30.8

^a Results from PSI-BLAST against all *L. biglobosa* proteins with E-value < 5E-2 (*L. biglobosa* genome available at <http://www.genoscope.cns.fr/leptolife>)

Table SI.6: Cosegregation of resistance to *LmSTEE98* and two molecular markers in the 'Darmor-bzh' x 'Yudal' doubled haploid population

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

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

^b The two markers flank the region carrying resistance to LmSTEE98.

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

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

3. Résultats complémentaires

Afin d'approfondir la caractérisation de l'effecteur LmSTEE98, Julie Gervais avait déterminé la localisation subcellulaire de LmSTEE98, par expression transitoire dans *Nicotiana benthamiana* (Figure 28). Fusionné à la GFP ou à la RFP, l'effecteur présente une localisation nucléo-cytoplasmique, avec et sans son peptide signal.

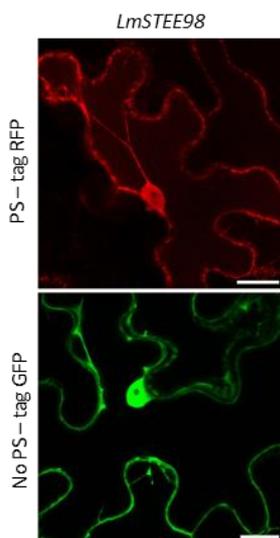


Figure 28 : Localisation cellulaire de l'effecteur LmSTEE98

Le gène codant l'effecteur tardif *LmSTEE98* de *Leptosphaeria maculans* a été fusionné avec son peptide signal (PS) à la RFP à son extrémité C-terminale, et sans son peptide signal (NoPS) à la GFP à son extrémité C-terminale. Les vecteurs ont été exprimés dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* par agroinfiltration. Les zones infiltrées ont été ensuite observées 48 h après infiltration au microscope confocal, sous un laser émettant à 488 nm pour la détection de la GFP et à 532 nm pour la détection de la RFP. L'échelle correspond à 20 µm. (Images obtenues par Julie Gervais)

Lors de l'infection de la plante, le champignon sécrète des effecteurs. Certains suppriment la mort cellulaire, tandis que d'autres en sont incapables, voire l'induisent (Jupe *et al.*, 2013; Zuluaga *et al.*, 2016). Un équilibre entre effecteurs induisant ou supprimant la mort cellulaire est nécessaire à l'infection par l'agent pathogène. Nous avons donc voulu savoir si LmSTEE98 permet de supprimer la mort cellulaire induite. Pour cela, j'ai réalisé un test de suppression de la mort cellulaire, dans le système hétérologue qu'est *Nicotiana benthamiana*. Comme l'illustre la Figure 29, l'effecteur tardif LmSTEE98 supprime la mort cellulaire induite par l'inducteur général BAX mais ne supprime pas celle provoquée par l'inducteur Inf1, impliqué dans le déclenchement de la PTI. Il serait intéressant de tester l'effet de LmSTEE98 sur l'induction de la mort cellulaire par AvrPto, un effecteur qui lorsqu'il est reconnu déclenche l'ETI et provoque donc une mort cellulaire.

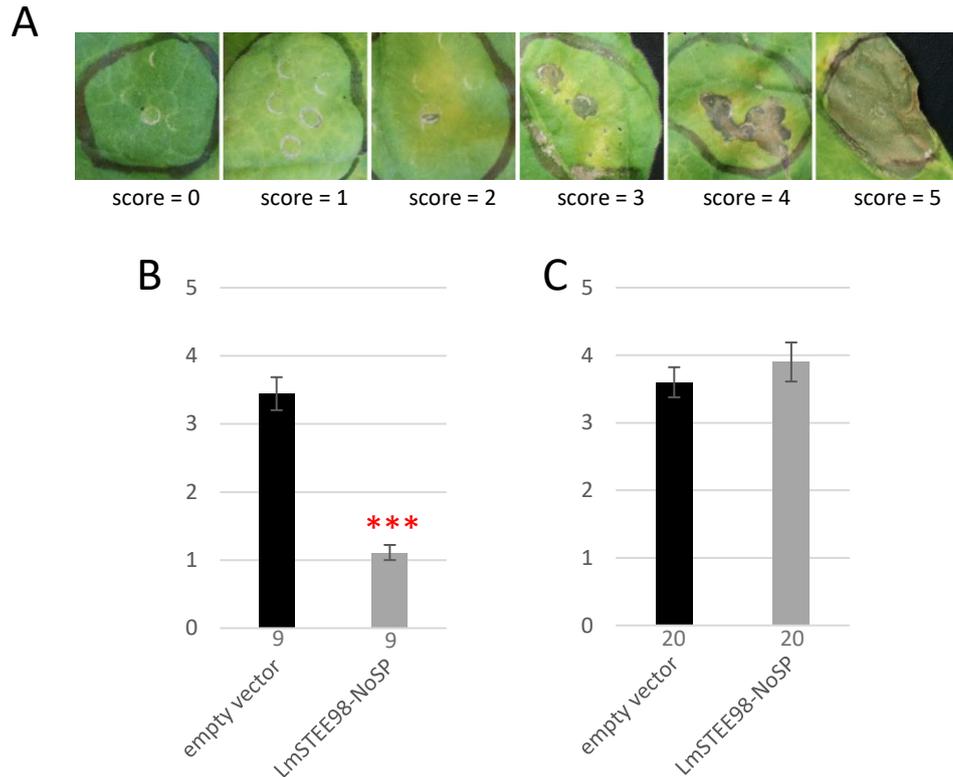


Figure 29 : Suppression de la mort cellulaire par LmSTEE98 en système hétérologue

Les feuilles de *N. benthamiana* ont été infiltrées avec *Agrobacterium tumefaciens*, ayant un vecteur vide, comme témoin négatif ou bien un vecteur contenant l'effecteur "tardif" LmSTEE98, sans son peptide signal (NoSP). Vingt-quatre heures après infiltration, les feuilles ont de nouveau été infiltrées avec *A. tumefaciens*, ayant le gène BAX (B) ou le gène Inf1 de *Phytophthora infestans* (C) pour induire la mort cellulaire. (A) L'échelle de notation correspond à : 0 : absence de symptômes visibles, 1 : décoloration de la zone infiltrée, 2 : chlorose, 3 : petites zones nécrosées, 4 : nécrose couvrant moins de 50% de la zone infiltrée, 5 : nécrose sur plus de 50% de la surface infiltrée. (B) et (C) Les symptômes ont été évalués à 12 jours après infiltration des feuilles. Les astérisques indiquent une différence significative avec le phénotype du vecteur vide (Test de Kruskal-Wallis : *** : $p < 0,001$). Les nombres sous les graphiques correspondent aux nombres d'observations, réalisées en une ou deux répétitions biologiques et les barres indiquent l'erreur standard.

4. Matériel et méthodes complémentaires

Test de suppression de la mort cellulaire

Pour l'expression transitoire en tabac, la séquence codante de *LmSTEE98*, sans peptide signal a été amplifiée, avec les amorces du Tableau 4, à partir d'ADNc, tiges de colza, infectées par JN3, extraits 30 jours après inoculation. Le fragment amplifié a été cloné dans le plasmide donneur pDONRTM221, puis dans le vecteur de destination pK2GW7, par clonage Gateway (Invitrogen). Le plasmide portant la construction *LmSTEE98*-NoPS a été transformée dans la souche *A. tumefaciens* GV3101, par électroporation (2,5kv, 200Ohms et 25µF).

L'expression transitoire dans *N. benthamiana* a été réalisée selon le protocole de Ma L. *et al.* (2012). Les agrobactéries ont été cultivées à 28°C, à 200 rpm, en milieu LB (rifampicine (50µg/ml), gentamicine (50µg/ml) et spectinomycine (50µg/ml)). Après 18h de culture, les bactéries ont été centrifugées à 5000 *g* pendant 10min, resuspendues dans un tampon MES (10 mM de MgCl₂ et 10 mM de MES, pH 5.6), avec de l'acétosyringone 200µM, à une DO_{600nm} finale de 0,5. Après une incubation de 2h, à température ambiante et à l'obscurité, les agrobactéries sont infiltrées à l'aide d'une seringue, sur des feuilles de *N. benthamiana*, âgées de 4 semaines. Le lendemain, les zones infiltrées précédemment ont été de nouveau infiltrés, avec des suspensions d'*A. tumefaciens* portant un gène d'induction de mort cellulaire, *Bax* ou *Inf1* (DO_{600nm} de 0,8), ou bien le vecteur vide pK2GW7, comme témoin négatif. Les symptômes ont été observés de 9 à 14 jours après infiltration.

Localisation cellulaire de *LmSTEE98*

Pour déterminer la localisation subcellulaire de *LmSTEE98*, Julie Gervais a amplifié la séquence codante de *LmSTEE98* avec les amorces du Tableau 4 à partir d'ADNc, comme pour l'expérience de suppression de la mort cellulaire. Les fragments amplifiés ont été insérés dans le plasmide donneur pDONRTM221, par clonage Gateway (Invitrogen). Les fragments ont été transférés dans le plasmide pSITEII-6C1 pour la construction *LmSTEE98* avec peptide signal, fusionnée à la RFP (extrémité C-terminale) ou dans le plasmide pSITEII-3C1/N1 pour la construction *LmSTEE98* sans peptide signal, fusionnée à la GFP (extrémité C-terminale) (Martin K. *et al.*, 2009). Les plasmides portant les constructions *LmSTEE98*-PS-RFP et *LmSTEE98*-NoPS-GFP ont été transformées dans la souche *A. tumefaciens* GV3101, comme décrit précédemment. Pour l'expression transitoire dans *N. benthamiana*, les infiltrations ont été réalisées comme décrites précédemment, puis les zones infiltrées ont été observées au microscope confocal, 48h après infiltration.

Tableau 4 : Liste des amorces utilisées pour les expériences complémentaires (Chapitre I)

Nom	Sequence (5'-3')	Expérience
LM31-98-PS-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAAGACCTTTATCACCATTGC	Localisation cellulaire
LM32-98-NP-GWU	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGACTCCAGTTGAGCTGGTAGCT	
LM33-98-NoStop-GWL	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAACAAGTAAAAATACCGC	
Lm98-GWL-Stop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAACAAGTAAAAATACCGCC	Test de mort cellulaire
Lm98-GWU-NP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGACTCCAGTTGAGCTGGTAGCT	

Chapitre II : Recherche de nouvelles sources de résistance aux effecteurs tardifs

1. Introduction

Dans le premier chapitre, nous avons vu qu'il est possible d'identifier de nouvelles sources de résistance, correspondant à des effecteurs tardifs. Cet article prouve que l'approche originale de crible de ressources génétiques avec des transformants exprimant des effecteurs tardifs au stade précoce est efficace.

Dans ce même chapitre, nous avons également identifié plusieurs limites à cette première analyse. Ainsi, il paraît nécessaire d'identifier des effecteurs tardifs candidats pertinents, mais également de diversifier les génotypes criblés.

Pour cela, le partenariat avec l'entreprise Innolea a permis d'avoir accès à une grande diversité de génotypes et ainsi, en sélectionner une sous-population, représentative de l'ensemble. Afin d'identifier de nouveaux effecteurs tardifs candidats, plus pertinents, nous disposons d'un vaste jeu de données transcriptomiques, issu du projet Leptolife. Avec ces données, plus précises que le premier projet pilote, j'ai pu identifier des effecteurs tardifs spécifiquement surexprimés lors de l'infection de la tige ou du pétiole, comparés à l'infection des cotylédons.

Une autre limite concerne la cinétique d'expression des gènes de résistance chez le colza. Il est généralement admis que les gènes de résistance chez les plantes sont constitutivement exprimés. Notre approche développée dans le premier chapitre, et utilisée dans ce second chapitre repose sur ce postulat. En effet, il est nécessaire que les gènes de résistance qui reconnaîtraient des effecteurs tardifs soient exprimés dans les cotylédons de *B. napus*. Afin d'évaluer la vraisemblance de ce postulat, j'ai pu utiliser les données transcriptomiques du projet Leptolife, côté plante (Gay *et al.*, 2021). Ainsi, chez *Brassica napus*, 2587 RGA sont différentiellement exprimés parmi les 3511 RGA (ici correspondant aux NB-LRR ; RLK ; RLP et SP pour « Secreted Proteins ») initialement définis par l'équipe de Régine Delourme (INRAE, Rennes). Comme l'illustre la Figure 30, ces gènes candidats semblent avoir une expression régulée lors de l'infection par *L. maculans*. On ne peut donc pas dire qu'ils soient exprimés de façon constante dans les tissus végétaux au cours de l'infection. Ces résultats mettent également en lumière une limite ; certains gènes de résistance, faiblement exprimés au stade cotylédon, ou exprimés trop tardivement à 12dpi, voire 15dpi ne pourront pas être identifiés avec notre approche de criblage au stade précoce. Sur cette même figure, on peut tout de même voir que de très nombreux gènes sont exprimés lors de l'infection des cotylédons, notamment ceux des clusters 4, 5, 7, 8 et 9 correspondant à 1157 RGA.

Avec la difficulté de réaliser un criblage au stade tige, nous avons donc choisi de poursuivre avec cette approche de criblage au stade cotylédon.

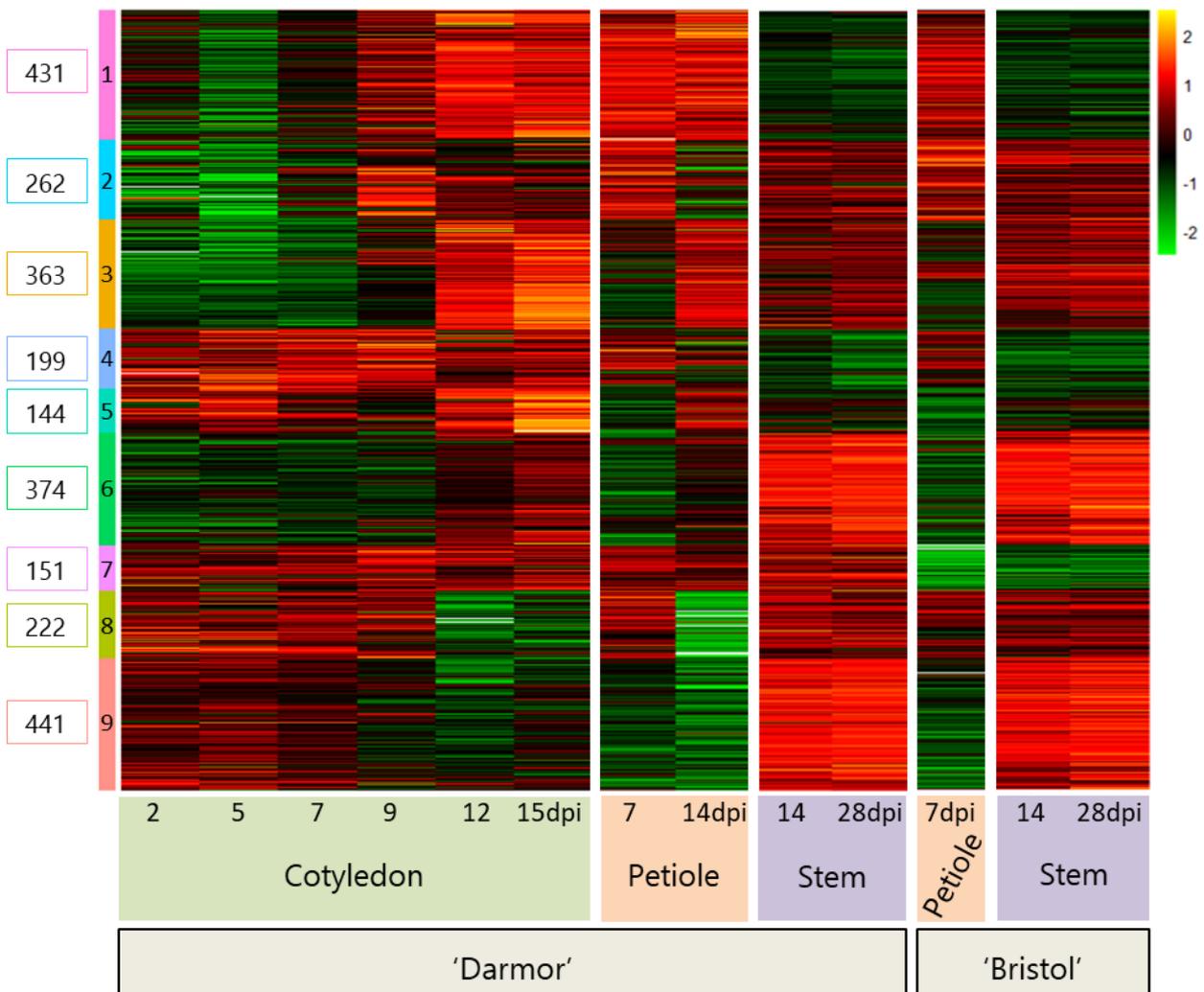


Figure 30 : Heatmap des analogues de gènes de résistance de *B. napus* lors de l'infection par *L. maculans*

A partir des données du projet LEPTOLIFE, pour chaque condition, la moyenne des FPKM a été transformée en Log_2 puis centrée-réduite. Le groupement par cluster a été obtenu à partir des valeurs en $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$ pour les 2587 analogues de gènes de résistance différentiellement exprimés lors de l'infection par *L. maculans* ($\text{Log}_2(\text{FC}) > 1,5$; $p < 0,05$). Ces gènes candidats ont été identifiés à l'INRAe de Rennes. En abscisse figurent la date de prélèvement (en dpi pour « days post-inoculation »), le type de tissus prélevé et le génotype testé. Le gène *Rlm2* se situe dans le cluster d'expression n°1, tandis que le gène *Rlm9* se situe dans le cluster d'expression n°2.

Pour cette partie de mon projet de thèse, j'ai donc sélectionné six nouveaux effecteurs tardifs candidats. L'objectif ensuite était de caractériser ces effecteurs candidats. J'ai donc pu évaluer leur polymorphisme de séquence dans les populations françaises et mondiales de *L. maculans*. Ces six effecteurs ont ensuite été placés sous le contrôle du promoteur d'*AvrLm4-7*, pour identifier de nouvelles sources de résistance, correspondant à ces effecteurs.

Ce second chapitre se présente sous la forme d'un article intitulé « Over-expression of 'late' effectors from *Leptosphaeria maculans* in cotyledons of *Brassica napus* to uncover novel sources of quantitative resistance to blackleg in a diversity panel ».

Afin de déterminer le rôle de ces six effecteurs dans la colonisation de la tige, des expériences complémentaires ont été menées. J'ai ainsi inactivé les gènes codants ces six effecteurs, par l'approche CRISPR-Cas9, puis testé l'effet de l'inactivation des gènes lors de la colonisation de la tige de colza. Ces résultats complémentaires figurent à la fin de ce second chapitre.

2. Article

Over-expression of 'late' effectors from *Leptosphaeria maculans* in cotyledons of *Brassica napus* to uncover novel sources of quantitative resistance to blackleg in a diversity panel

Authors

Audren Jiquel^{1, 2}, Elise J. Gay^{1, 3}, Justine Mas⁴, Pierre George⁴, Armand Wagner⁴, Adrien Fior⁴, Sébastien Faure⁴, Marie-Hélène Balesdent¹ and Thierry Rouxel¹ *

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

² Lidea Semences, 6 Chemin des Panedautes, 31700 Mondonville, France

³ Université Paris-Saclay, Route de l'Orme aux Merisiers, 91190 Saint-Aubin, France

⁴ Innolea, 6 Chemin des Panedautes, 31700 Mondonville, France

*Corresponding author: Tel: + 33(0)1 30 81 45 73, Fax: +33(0)1 30 81 53 06, thierry.rouxel@inrae.fr

Word count

Summary: 266

Introduction: 1345

Results: 1902

Discussion: 2503

Materials and methods: 1253

Acknowledgements: 23

Table and figure legends: 733

Total: 8025

SUMMARY

The Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*, causing stem canker (blackleg) of oilseed rape (*Brassica napus*) secretes different cocktails of effectors grouped in waves of expression at different stages of plant infection and colonisation. Some effectors are specifically produced during the long asymptomatic phase of stem colonisation. By using a screening approach based on the use of these “late” effectors during cotyledon infection, we demonstrated in a previous study that a gene-for-gene interaction occurs between a late effector and a resistance gene, during stem colonization, partly accounting for quantitative resistance. Supported by this proof-of-principle, we selected six relevant new effector genes, plus four previously selected, and we used this strategy to screen a collection of 130 *B. napus* genotypes, encompassing rutabagas, winter-types, spring types and semi-winter types, representative of the available diversity in the species. This screening comforted the previously found response of three additional genotypes to the effector LmSTEE98, along with one fully new resistance response identified towards the expression of *Lm6826*. These five *B. napus* accessions showed a typical hypersensitive response when challenged with LmSTEE98 or Lm6826 at the cotyledon stage, and all belong to the semi-winter type of the diversity panel. In addition, five genotypes displayed an intermediate response to another late effector, Lm7919, and responded to a second one, either LmSTEE35 or Lm6826. These new interactions now have to be genetically validated to check that they also correspond to gene-for-gene interactions. In all cases, they provide novel resources, easy to breed for, and potentially accounting for part of the quantitative resistance in a species for which we are currently facing a scarcity of resistance sources.

KEY WORDS

Late effectors • Qualitative resistance • Quantitative resistance • Manipulation of effector expression • Rapeseed • Canola

INTRODUCTION

Quantitative (also termed horizontal, incomplete, minor-gene, broad-spectrum, adult-stage,...) disease resistance (QDR) in plants is a complex and somewhat blurred notion that encompasses many different realities depending of the plant life cycle and its duration (from annual to perennial), the pathogen life cycle (e.g. differentiating monocyclic vs. polycyclic diseases), the duration of the interaction between the plant and its pathogen, and, as mentioned by Poland *et al.* (2009) the assumptions made by the respective authors. Thus, depending on the model, QDR may increase latency period, reduce number or size of symptoms, reduce sporulation for polycyclic diseases, and eventually reduce damages to crops without suppressing the expression of the disease (symptoms) and without suppressing the next-cycle inoculum. For breeders, QDR is of paramount importance due to its famed durability compared to major single gene resistance. However, being polygenic in nature, with each locus contributing only to a little part of the QDR, markers for marker-assisted selection (MAS) are difficult to develop and genes underlying the phenomenon remain elusive.

Stem canker disease of rapeseed (*Brassica napus*), due to the ascomycete *Leptosphaeria maculans*, is controlled mostly by qualitative resistance and QDR. QDR to *L. maculans*, also termed 'adult-stage' resistance involves several QTLs with minor effects. In Western Europe, the pathogenic cycle of *L. maculans* is long and complex, and the outcome of the disease, the stem canker, is assessed at the end of the growing season (May-July) while the first leaf symptoms were observed in autumn (October-November). Thus, differences in QDR between genotypes are difficult to evaluate in the field, since the robustness and efficiency of QDR (and the stability of the corresponding QTLs) can depend on environmental conditions summed up during this long growing period in the fields (Pilet *et al.*, 2001; Fopa Fomeju *et al.*, 2015; Jestin *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016; Raman *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018). It is even more difficult to accurately phenotype QDR under controlled conditions since it would ideally necessitate to reproduce the whole of the pathogenic cycle in the greenhouse (Jiquel *et al.*, 2021).

In Western Europe, the lifecycle of *L. maculans* alternates several times between saprotrophic, necrotrophic and biotrophic lifestyles. At the end of the growing season, *L. maculans* develops onto crop residues, and performs its sexual reproduction (Rouxel & Balesdent, 2005; Fitt *et al.*, 2006). Produced ascospores, which are transported by wind, infect cotyledons, and leaves of rapeseed, through stomata. After a short phase of biotrophic colonization of leaves, the fungus switches to a necrotrophic lifestyle and induces the formation of leaf spots. Following the appearance of leaf symptoms, fungal hyphae develop from the leaves to the stem crown, during an asymptomatic and endophytic phase that lasts several months. At the end of the growing season, the fungus switches again to a necrotrophic phase, by inducing necrotic lesions at the stem crown (Hammond *et al.*, 1985; Rouxel & Balesdent, 2005; Huang *et al.*, 2014).

While qualitative resistance expressed at the cotyledon/leaf stage is well known and a couple of major genes for resistance have been cloned (*LepR3* (Larkan *et al.*, 2013; Rouxel & Balesdent, 2013); *Rlm2* (Larkan *et al.*, 2015); *Rlm9* (Larkan *et al.*, 2020)), the QDRs supposed to operate during petiole and stem colonization associated to the long asymptomatic phase are not well characterized, in terms of mechanisms and molecules involved, but also in terms of variability between genotypes displaying QDR.

To colonize their hosts, pathogenic, endophytic, and symbiotic fungi secrete an arsenal of effectors, used to promote infection and interfere with plant defenses (Lo Presti *et al.*, 2015; Sánchez-Vallet *et al.*, 2018). During the exceptionally long interaction between *L. maculans* and its host, eight different waves of expression of genes enriched in effector genes, showing infection stage specificity or trophic specificities have been described (Gay *et al.*, 2021). Four of them may be of specific relevance for QDR. Effector genes of Wave 2 ("biotrophy", described by Gervais *et al.* (2017) as 'early' effectors) are expressed at all stages of biotrophic colonization of tissues (cotyledons, leaves, petioles, stems) and their expression is switched on/off multiple times during the plant colonization. *Rlm* and *LepR* qualitative resistance genes operate by 'recognizing' effectors of Wave 2, encompassing all currently known avirulence (*AvrLm*) genes produced during infection and colonization of cotyledons and leaves (Rouxel & Balesdent, 2017; Gay *et al.*, 2021). The Wave 4 corresponds to the transitions from biotrophy to necrotrophy, with genes expressed in cotyledons, petioles and stems, whose expression is repressed before necrotic symptoms begin to develop. The Wave 5 corresponds to stem biotrophy with genes exclusively expressed during many months of asymptomatic stem colonization. Lastly, the Wave 6 corresponds to stem necrotrophy with genes exclusively expressed in the stem at the end of the growing season. These three latter waves include effectors named 'late' effectors by Gervais *et al.* (2017) or LmSTEE (Stem Expressed Effectors) by Jiquel *et al.* (2021). At this stage of colonization, quantitative resistance operates, and, in view of the existence of fungal effectors exclusively produced during stem colonization, Jiquel *et al.* (2021) postulated that resistance genes operating in the stem may be involved in gene-for-gene relationship and thus contribute to QDR.

Screening for resistances is routinely done at the cotyledon stage, using isogenic isolates differing by only one *AvrLm* gene. However, as late effector genes are weakly or not expressed during cotyledon and leaf infection, Jiquel *et al.* (2021) used an innovative approach by placing late effector genes under the control of the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7*, so that they are expressed at the cotyledon stage of the infection. This original approach allowed the authors to screen a 204-genotype collection, searching for resistance genes recognizing late effectors, by using the high-throughput test at cotyledon stage. Using this approach, Jiquel *et al.* (2021) showed that at least part of the quantitative resistance to *L. maculans* is due to a canonical gene-for-gene interaction, thus opening avenues for easy generation of markers for MAS and knowledge-driven construction of genotypes summing up diverse types of qualitative resistance and QDR, previously shown to increase the durability of major genes (Brun *et al.*, 2010).

However, this previous study also highlighted several limitations about criteria of choice of effector genes and diversity of the collection of *B. napus* genotype screened, preventing the authors to conclude whether the new gene-for-gene interaction identified was an exception or if other such gene-for-gene interactions putatively involved in QDR exist in interactions with other genotypes. First, with > 100 effectors produced during stem colonization, the authors selected five that were scattered in Waves 4, 5 and 6. We thus wondered whether focusing on effector exclusively produced in stems and not in cotyledons could not increase the chance to find matching *Rlm* genes expressed in stems. Second, we observed that the only oilseed rape genotype that carried a new source of resistance, now identified as *RlmSTEE98*, in the screened collection was also the only "exotic" one (semi-winter type of Asian origin) among a vast majority of winter-type genotypes of European origin. Therefore, we postulated that the diversity in the screened genotype collection should be as wide as possible, to increase the probability to identify new resistance genes.

In the present study, we partially addressed these limitations, by diversifying the screened genotype collection and by selecting new effectors for screening, using a wide diversity of transcriptomic data, and choosing those showing no expression in cotyledons and specifically expressed during petiole and stem colonization. We selected six late effector candidates, specifically upregulated during stem infection, to screen a panel of 130 genotypes of *B. napus*, showing a wide diversity of origins. We confirmed that the over expression of 'late' effectors in cotyledons allows us to reinforce the existence of the previously identified resistance *RlmSTEE98*, and to identify new sources of resistance to late effectors. This study, and that of Jiquel *et al.* (2021) thus confirm the postulate that gene-for-gene interactions operate during stem colonization and provide us with additional criteria to choose effector genes that may be the best avirulence candidates and genetic resources to focus on for uncovering new resistance genes.

RESULTS

Transcriptomic analysis to select pertinent late effector candidates

To identify relevant late effector candidates, we firstly exploited RNAseq data from the LEPTOLIFE project, some of which, but not all of them, having been described in Gay *et al.* (2021). The samples were collected at different time points and in controlled or field conditions (Gay *et al.*, 2021). Here, we focused on six sampling time-points during cotyledon infection on cultivar 'Darmor', two sampling time-points during petiole infection on 'Darmor' and one on 'Bristol', and two sampling time-points during stem infection on each cultivar 'Darmor' and 'Bristol' (Tables SII.1 and SII.2).

To identify genes specifically expressed during petiole or stem infection we then discriminated them from genes also expressed during cotyledon infection. We thus found a total of 267 differentially expressed genes (DEG) in 'Bristol' and 'Darmor'. A set of 134 genes were overexpressed during stem infection of 'Darmor' compared to cotyledon infection, while during petiole colonization, 19 genes were overexpressed compared to cotyledon infection with 18 in common (Figure SII.1A). During stem and petiole colonization of 'Bristol', we found 151 and 153 genes, respectively overexpressed compared to cotyledon infection, with 54 in common between stem and petiole expression (Figure SII.1A).

The repertoire of *L. maculans* candidate effectors has recently been updated by Gay *et al.* (2021), allowing us to determine the set of effector genes present in our set of DEG genes (Figure SII.1B). Thereby, 35 effector candidate genes were overexpressed during stem and / or petiole colonization of 'Darmor' and / or 'Bristol' (excluding those exclusively expressed in petioles of 'Bristol'), compared to cotyledon infection (Figure II.1), including three previously identified "late" effector candidates, *LmSTEE1*, *LmSTEE30* and *LmSTEE35* (Jiquel *et al.*, 2021). These could be discriminated into four groups according to their level of expression during *in vitro* culture, overexpression in petioles and differential expression in petioles 7 dpi vs. 14 dpi (Figure II.1). Gay *et al.* (2021) performed a precise analysis of gene expression during all steps of the interaction between *L. maculans* and *B. napus*, from the penetration in cotyledons up to the saprophytic stage on plant residues, using a wider set of samples from the LEPTOLIFE project, including field samples. In this study, eight waves of gene expression were defined. By comparing the gene list of our analysis to the eight expression waves defined by Gay *et al.* (2021), most of these (23 out of 35, including *LmSTEE1* and *LmSTEE30*) were included in the "Stem biotrophy" wave (Wave 5) of genes exclusively expressed during the biotrophic colonization of stems. Five genes (including *LmSTEE35*) were included in the "Biotrophy-to-necrotrophy transition" wave (Wave 4), and one effector gene belonged to the "Stem necrotrophy" wave (Wave 6). Finally, six late effector genes were not included in the expression waves described in Gay *et al.* (2021), likely due to a non-negligible level of expression during *in vitro* growth, and/or to a less drastic threshold of differential expression used here compared to what was used by Gay *et al.* (2021), ($\text{Log}_2(\text{FC}) > 1.5$ in this study vs. $\text{Log}_2(\text{FC}) > 4.0$ in the Gay *et al.* study) (Figure II.1).

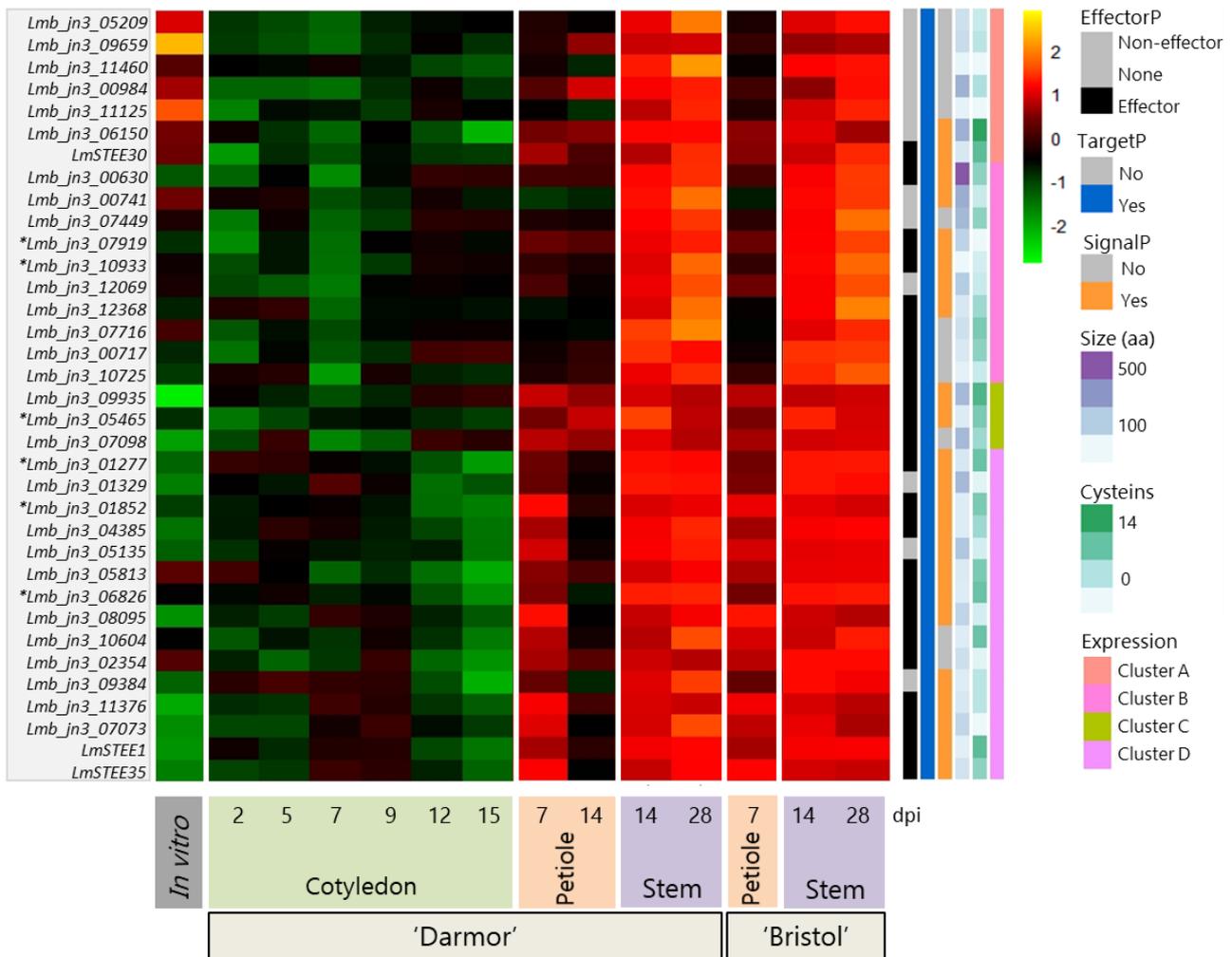


Figure II.1: Heatmap representing the clustering of 35 late effector candidates of *Leptosphaeria maculans*, overexpressed during stem colonization

The mean FPKM value of the biological replicates was calculated for each condition, and then Log_2 transformed and scaled. To define expression clusters, the method of self-organizing was used on $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$ values. Predictions by EffectorP, TargetP, SignalP, the size and the number of cysteines are indicated by different colors in legend. The experimental conditions are along the x axis and the numbers indicates sampling time points in days post-inoculation (dpi). The stars indicate the six candidates selected for screening of the *Brassica napus* diversity panel.

Late effector candidates are conserved in field populations of *L. maculans*

To have a more extensive insight into the characteristics of genes encoding late effectors, we then selected 15 genes among the 35, to perform a diversity analysis. These were selected based on their localization in GC-isochores, their size (less than 300 amino acids) and their lack of a predicted function (Figure SII.2). Their presence / absence polymorphism was first analyzed in a collection of *L. maculans* isolates consisting of 90 French isolates and 93 world-wide isolates, from Australia and New-Zealand, Canada, the USA, Mexico and Chile (Table SII.3) (Dilmaghani *et al.*, 2009, 2012). Consistently with what was observed previously for *LmSTEE* genes (Gervais, 2017; Jiquel *et al.*, 2021), these 15 genes were present in all studied isolates following PCR amplification (Figure SII.3).

For screening the *B. napus* diversity panel, we then selected six out of the 15 belonging to the "Stem biotrophy" wave described by Gay *et al.* (2021) and with the lowest possible expression level during cotyledon infection (Figure II.2). This subset of six effectors, Lm1277, Lm1852, Lm5465, Lm6826, Lm7919 and Lm10933, had common characteristic typical of effectors; they displayed a predicted signal peptide (SignalP), they were predicted as effectors according to EffectorP, and, except for Lm7919, had a high cysteine rate (Table II.1). Four of them displayed high homologies with proteins from other related fungal species (Dothideomycetes / Pleosporales), including in the most closely related species *Leptosphaeria biglobosa* (Tables II.1, SII.4 and SII.5). However, all closest blast hits corresponded to hypothetical proteins (Table II.1). Lm1852 and Lm6826 had no homologues in other fungal species, including in *L. biglobosa*.

Table II.1 : Characteristics of the "late" effector candidates studied here

Name	Accession Nr	Size (aa) ^a	Number of cysteins	Expression waves ^b	Number of BLAST hits ^c	Closest BLAST hit	E-value (% Identities)	BLAST hit coverage	Pfam domain (E-value)	Number of hits on <i>L. biglobosa</i> 'brassicae' proteins ^d
Lm1277	<i>Lmb_jn3_01277</i>	109	9 (8.3%)	Stem biotrophy (cluster 5)	48	<i>Plenodomus tracheiphilus</i>	5E-43 (68%)	94%	CFEM (1.0e-09)	1
Lm1852	<i>Lmb_jn3_01852</i>	89	8 (9.0%)	Stem biotrophy (cluster 5)	0	-	-	-	none	0
Lm5465	<i>Lmb_jn3_05465</i>	96	8 (8.3%)	Stem biotrophy (cluster 5)	214	<i>Plenodomus tracheiphilus</i>	2E-61 (82%)	98%	none	1
Lm6826	<i>Lmb_jn3_06826</i>	87	9 (10.3%)	Stem biotrophy (cluster 5)	0	-	-	-	none	0
Lm7919	<i>Lmb_jn3_07919</i>	176	0 (0.0%)	Stem biotrophy (cluster 5)	629	<i>Alternaria gaisen</i>	7E-94 (79.44%)	99%	none	1
Lm10933	<i>Lmb_jn3_10933</i>	50	2 (4.0%)	Stem biotrophy (cluster 5)	37	<i>Setomelanomma holmii</i>	5E-13 (64.15%)	98%	none	1

^a Amino acids

^b Names of expression waves and corresponding genes cluster, as defined by Gay *et al.*, 2021

^c Number of hits with a E-value < 1E-5

^d Results from BLASTp against all *L. biglobosa* proteins with E-value < 1E-5 (Table SII.5, *L. biglobosa* genome available at <http://www.genoscope.cns.fr/leptolife>, Dutreux *et al.*, 2018)

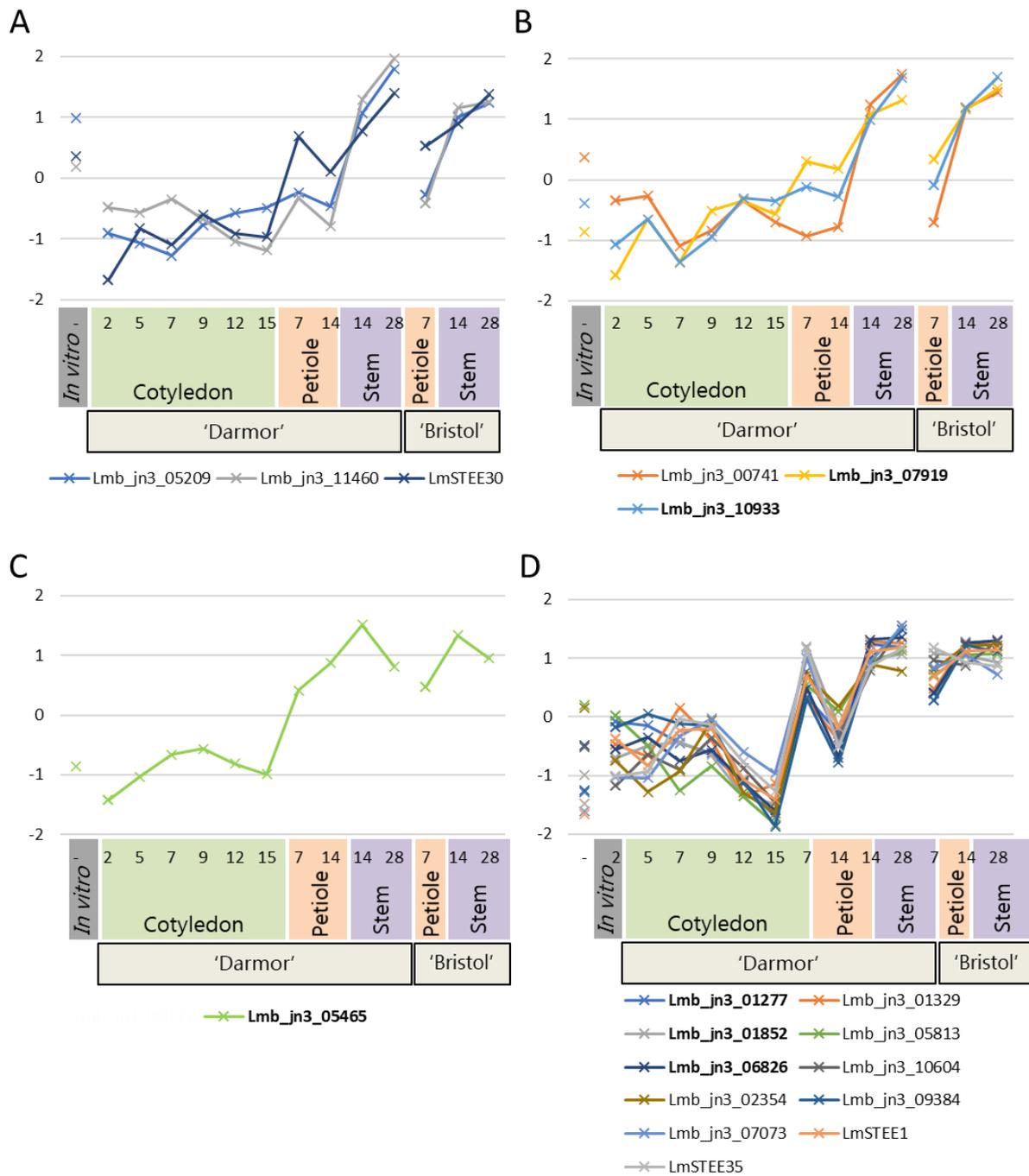


Figure II.2: Expression profiles of 15 late effector genes during cotyledon and stem colonization in controlled conditions

Experimental conditions are displayed on the x axis. Expression values (CPM - Count Per Millions of mapped reads) were \log_2 -transformed and then mean-centered. Two or three independent biological replicates were used per sampling time-point. Expression profiles are clustered as in Figure II.1, corresponding to the cluster A in panel (A), cluster B in panel (B), cluster C in panel (C) and cluster D in panel (D). Raw data and statistics of differential expressions between the dates are indicated in Tables SII.1 and SII.2. The six late effector candidates selected for further characterization are indicated in bold.

The six genes were sequenced in the French and worldwide populations, and only a very limited number of sequence polymorphisms was observed (Tables II.2 and SII.4). *Lm6826* and *Lm10933* had no mutation in their coding sequences, while *Lm1852* had only two silent mutations, in one Canadian isolate. *Lm1277* and *Lm5465* had rare non-synonymous mutations. *Lm1277* presented one V>M(13) mutation found in two French isolates and a L>M(100) mutation found in another French isolate. *Lm5465* presented one silent mutation in three French and one Canadian isolates, and one non-synonymous L>F(41) mutation in one French isolate. Finally, one non-synonymous V>I(38) mutation was found in *Lm7919* and was present at a low frequency in all populations, except in Mexican isolates obtained from *B. oleracea* in which it was the most frequent isoform of the protein (65% of the Mexican isolates analyzed here). For these six late effectors, in these populations, allelic variants are always present in distinct isolates.

Table II.2: PCR amplification and sequencing analysis of six effector genes in *Leptosphaeria maculans* isolates

Origin of isolates ^a	<i>Lm1277</i>			<i>Lm1852</i>			<i>Lm5465</i>			<i>Lm6826</i>			<i>Lm7919</i>			<i>Lm10933</i>		
	Presence	Absence ^b	Mutation ^c	Presence	Absence ^b	Mutation ^c	Presence	Absence ^b	Mutation ^c	Presence	Absence ^b	Mutation	Presence	Absence ^b	Mutation ^c	Presence	Absence ^b	Mutation ^c
France	90	0	3/90^d	90	0	0/90	90	0	4/90^f	90	0	0/90	90	0	4/90^g	90	0	0/90
Oceania	23	0	0/23	23	0	0/23	23	0	0/23	23	0	0/23	23	0	2/23^g	23	0	0/23
Canada	21	0	0/21	21	0	0/21	21	0	1/21^f	21	0	0/21	21	0	1/21^g	21	0	0/21
USA	10	0	0/10	10	0	1/10^e	10	0	0/10	10	0	0/10	10	0	1/10^g	10	0	0/10
Mexico	34	0	0/34	34	0	0/34	34	0	0/34	34	0	0/34	34	0	22/34^g	34	0	0/34
Chile	5	0	0/5	5	0	0/5	5	0	0/5	5	0	0/5	5	0	0/5	5	0	0/5
Total	183	0	3/183	183	0	1/183	183	0	5/183	183	0	0/183	183	0	30/183	183	0	0/183

^a Isolates are described in Table SII.3.

^b Lack of PCR amplification.

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

^d Observed mutations for *Lm1277* correspond to two SNPs impacting the protein sequence: V>M(13) and L>M(100).

^e The only isolate with mutations for *Lm1852* has two silent mutations.

^f Observed mutations for *Lm5465* correspond to one silent mutation for 4 isolates and to one SNP: L>F(41) for one French isolate.

^g Observed mutations for *Lm7919* correspond to one single mutation for 29 isolates: V>I(38) and one silent mutation T>T(20) for one isolate from Australia.

Diversity in the collection of *Brassica* genotypes

To increase the probability of identifying new sources of resistance corresponding to late effectors, it was necessary to screen the largest possible diversity of *B. napus* genotypes. For this purpose, we explored a selection of 99 accessions from a worldwide collection available at Innolea (Table SII.6A). The diversity present in this collection was investigated following genotyping with 6631 SNP well-distributed on the 19 chromosomes. This showed grouping into three main subgroups roughly corresponding to morphotypes, i.e. winter type genotypes (ca. 69 genotypes), spring types (ca. 12 genotypes) and rutabagas (*B. napus* var. *rapifera*) and semi-winter types, mainly of Asian origin (ca. 16 genotypes) (Figure II.3). The grouping and representative diversity was consistent with other collection studies (Wu *et al.*, 2019; Rahman *et al.*, 2021). Additionally, a set of 31 'modern' winter-type varieties grown in France, known for their behaviour in the field with regards to blackleg resistance was also genotyped (Table SII.6B). Most of these are recent elite varieties with quantitative resistance and cluster along with the winter type varieties with low levels of erucic acid and glucosinolates in the seeds (aka "00" genotypes).

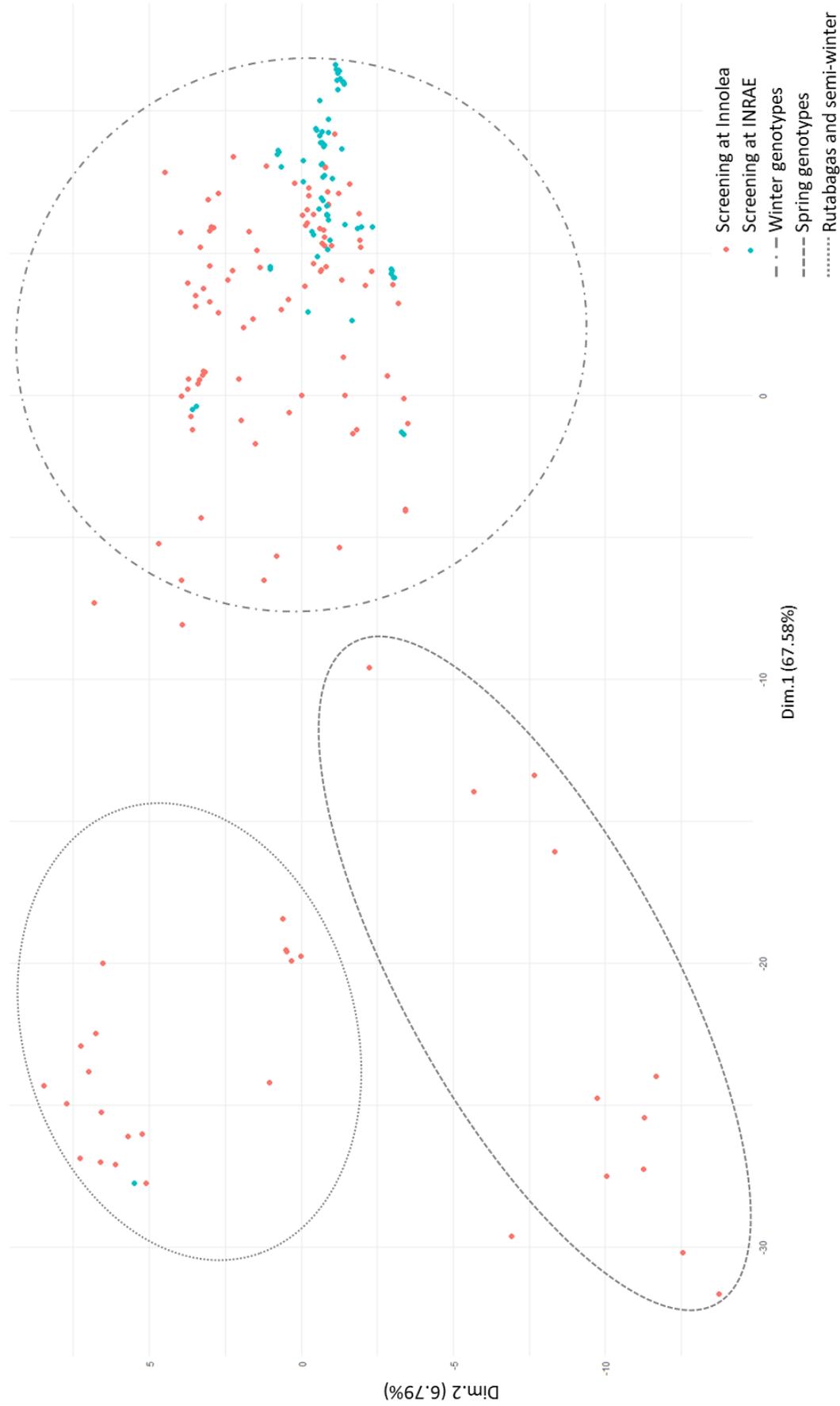


Figure II.3: Principal Coordinates Analysis of genotype diversity

130 genotypes are represented, including 99 genotypes (in red) screened at Innolea and 31 genotypes at INRAE Bioger (in blue). Genotyping data were obtained with 6631 SNP well-distributed on the 19 chromosomes. The resulting allelic matrix was used to compute an Identity by State (IBS) matrix. Then a Principal Coordinate Analysis was performed based on the IBS matrix.

Identifying sources of resistance to selected “late” effectors in the collection of 130 genotypes

A previous study (Jiquel *et al.*, 2021) allowed us to validate the efficiency of cloning late effector genes under the control of the promoter of *AvrLm4-7*, to obtain a high expression level of late effectors during the early stages of cotyledon infection. This strategy was used here to search for resistant plant genotypes recognizing the six selected late effectors using the easy-to-use cotyledon inoculation test. The six late effector candidates were thus placed under the control of *AvrLm4-7* promoter to generate “over-expressed in cotyledons” (OEC) transformants, and the expression level of late effector genes in cotyledons was checked in all transformants (Figure SII.4). Lack of pathogenicity defects of transformants was also controlled on a susceptible genotype (Figure SII.5). Two OEC transformants were selected for each late effector gene and the subset of 130 plant genotypes (Table SII.6) was screened with the two independent OEC transformants for each of the six new late effectors along with four late effector genes used for the same purpose in a previous study, *LmSTEE1*, *LmSTEE35*, *LmSTEE78* and *LmSTEE98* (Jiquel *et al.*, 2021). This screening was done in three steps.

A first screening was done with a small number of seedlings, to eliminate genotypes with no resistance phenotype (Figure II.3, Tables SII.6 and SII.7). This first step allowed us to identify 36 promising interactions involving 22 different *B. napus* genotypes and 8 different late effectors. Moreover, four genotypes, RG009, RG034, RG074 and RG099, displayed a general, seemingly non-differential response to the inoculation, but nevertheless seemed to respond to multiple effectors (Table SII.8).

These potential interactions were challenged with an increased number of plants and in two locations with slightly different inoculation conditions, except for RG099, for which we did not have enough seeds. Three genotypes (‘RG021’, ‘RG047’ and ‘RG072’) consistently displayed resistance responses to the *LmSTEE98* late effector (Figure II.4 and Figure SII.6), as previously found with the ‘Yudal’ genotype (Jiquel *et al.*, 2021) and replicated here using ‘Yudal’ as a control. RG021 or RG047 displayed a typical hypersensitive response to the OEC transformant with *LmSTEE98*, as previously observed for ‘Yudal’, while a slightly different, more intermediate interaction phenotype was observed with RG072. OEC transformants expressing another late effector candidate, *Lm6826* also induced a clear HR-type resistance phenotype when inoculated on genotype RG007 (Figure II.4 and Figure SII.6).

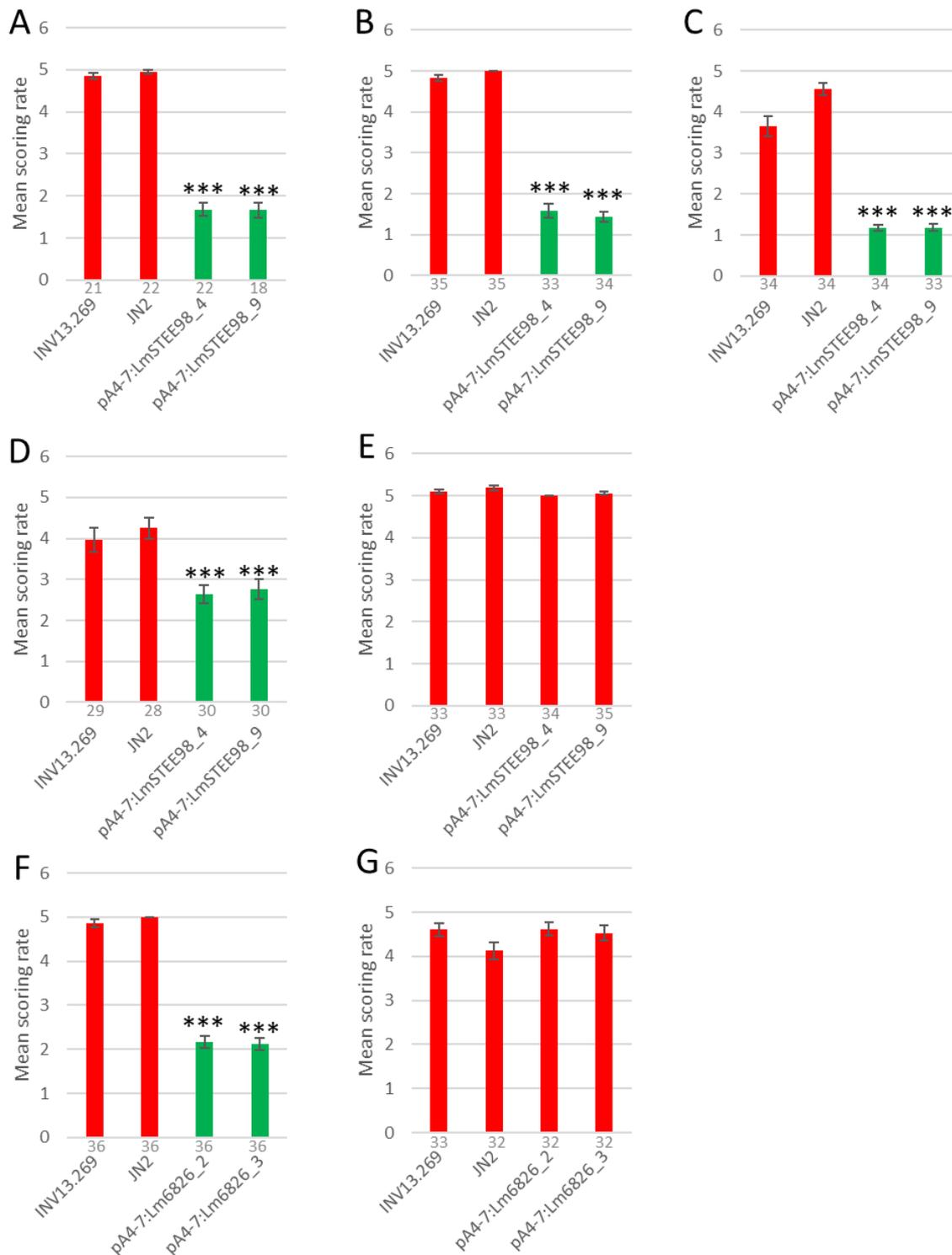


Figure II.4: Resistance response of five oilseed rape cultivars towards late effector genes, observed at INRAE *L. maculans* mutants expressing *LmSTEE98* and *Lm6826* under the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were inoculated onto the cultivars (A) 'Yudal', (B) RG021, (C) RG047, (D) RG072, (E) RG030, (F) RG007 or (G) RG088, RG030 and RG088 corresponding to susceptible controls. Two independent mutants were used per construction. The bars represent the mean score of symptoms (\pm standard error), based on the IMASCORE rating scale, with 1 and 2 corresponding to resistance, 3 to intermediate phenotype, 4 and 5 to susceptibility (Balesdent *et al.*, 2001), 14 days after inoculation. The number of plants is indicated below the x axis. Isolate INV13.269 is the wild-type isolate and isolate JN2 is used as an additional control. The asterisks indicate a significant difference between the control isolate INV13.269 and the *L. maculans* transformants (Kruskal-Wallis test: ***: p -value < 0.001).

While these genotypes displayed a clear-cut resistance response, some other genotypes consistently responded to the late effector *Lm7919* along with one or the other *LmSTEE35* or *Lm6826*. However, they did not induce typical resistance response phenotypes, but rather late resistance responses expressed as large patches of dark tissue (Figure II.5 and Figure SII.7). INN_VAR04 and INN_VAR14 reacted to both *Lm7919* and *LmSTEE35*, while INN_VAR11 and INN_VAR17 reacted to *Lm6826* and *Lm7919* (Figure II.5 and Figure SII.7). As mentioned above, RG074 and RG009, while displaying a general level of resistance at the cotyledon stage, also reacted differentially when challenged with *LmSTEE98* (RG009) or *Lm7919* and *LmSTEE35* (RG074), displaying again late responses different from typical hypersensitive responses (Figure II.5 and Figure SII.7). Other promising interactions were either not reproducible or were apparently dependent on the environmental conditions used during inoculation (Tables SII.7 and SII.8).

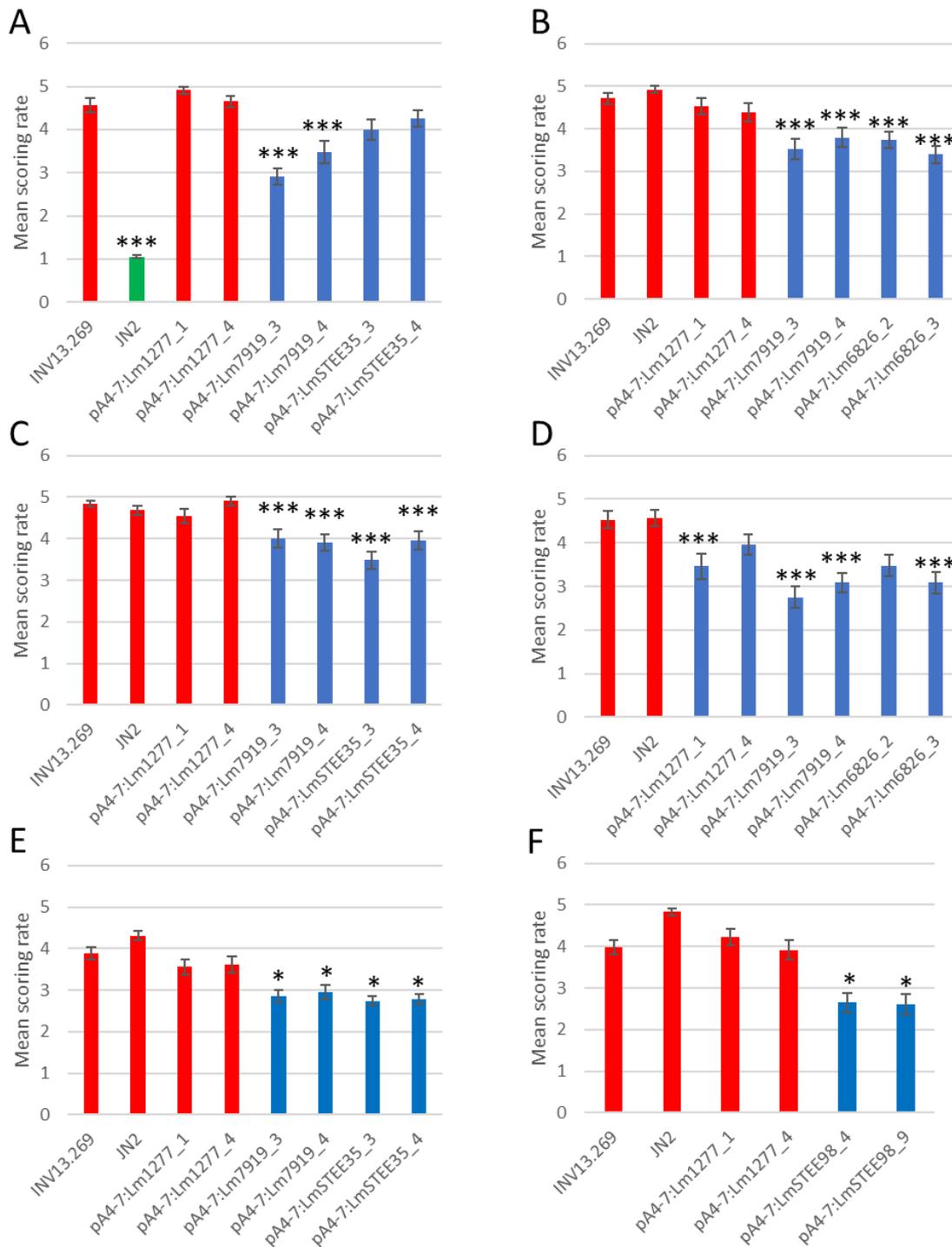


Figure II.5: Reduced susceptibility of six oilseed rape cultivars towards “late” effector genes, observed at INRAE *L. maculans* mutants expressing *Lm1277*, *LmSTEE98*, *LmSTEE35*, *Lm6826*, *Lm7919* or *LmSTEE35* under the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were inoculated onto the cultivars (A) INN_VAR04, (B) INN_VAR11, (C) INN_VAR14, (D) INN_VAR17, (E) RG074 and (F) RG009. Two independent mutants were used per construction. The bars represent the mean score of symptoms (\pm standard error, $n > 20$), based on the IMAScore rating scale, with 1 and 2 corresponding to resistance, 3 to intermediate phenotype, 4 and 5 to susceptibility (Balesdent *et al.*, 2001), 14 days after inoculation. Isolate INV13.269 is the wild-type isolate and isolate JN2 is used as an additional control. Resistance phenotype of INN_VAR04 to JN2 is linked to the presence of *Rlm7* recognizing *AvrLm4-7*. The asterisks indicate a significant difference between the control isolate INV13.269 and the *L. maculans* transformants (GLM test: *: p -value < 0.05 ; ***: p -value < 0.001), combining two biological replicates.

Relatedness of genotypes displaying resistance responses to 'late' effectors

Among the 130 genotypes tested, a total of 11 were found to react to OEC transformants expressing five different late effectors, of which three were identified in this study. The genotypes displayed consistent resistance phenotypes, from a strong hypersensitive response to a delayed resistance response (Figure II.6A). Interestingly, the four genotypes recognizing the late effector *LmSTEE98*, and reacting to it either under the form of a typical HR or a delayed resistance response (RG009) are genetically close to the genotype 'Yudal' (Minimum IBS value between 'Yudal' and the four other genotypes: 0.72), belong to the "rutabaga and semi-winter" group and are all of Asian origin (Japan or Korea) (Figure II.6B). The genotype RG007 which displayed a hypersensitive phenotype in response to the infection by *Lm6826* OEC transformants, also belongs to this "intermediate group" of Asian genotypes (IBS value: 0.71). In summary, five genotypes among the 12 genotypes tested from this "rutabaga and semi-winter" group displayed a resistance response to late effectors expressed at cotyledon stage.

The four genotypes displaying intermediate responses to *Lm7919* and either *LmSTEE35* or *Lm6826* were modern cultivars of European origin and grouped together in the dense area of the PCA, corresponding mainly to winter type oilseed rape (Figure II.6C). RG074, also reacting to *Lm7919* and *LmSTEE35* was distant from all of them (Maximum IBS value: 0.62) but was also of European origin.

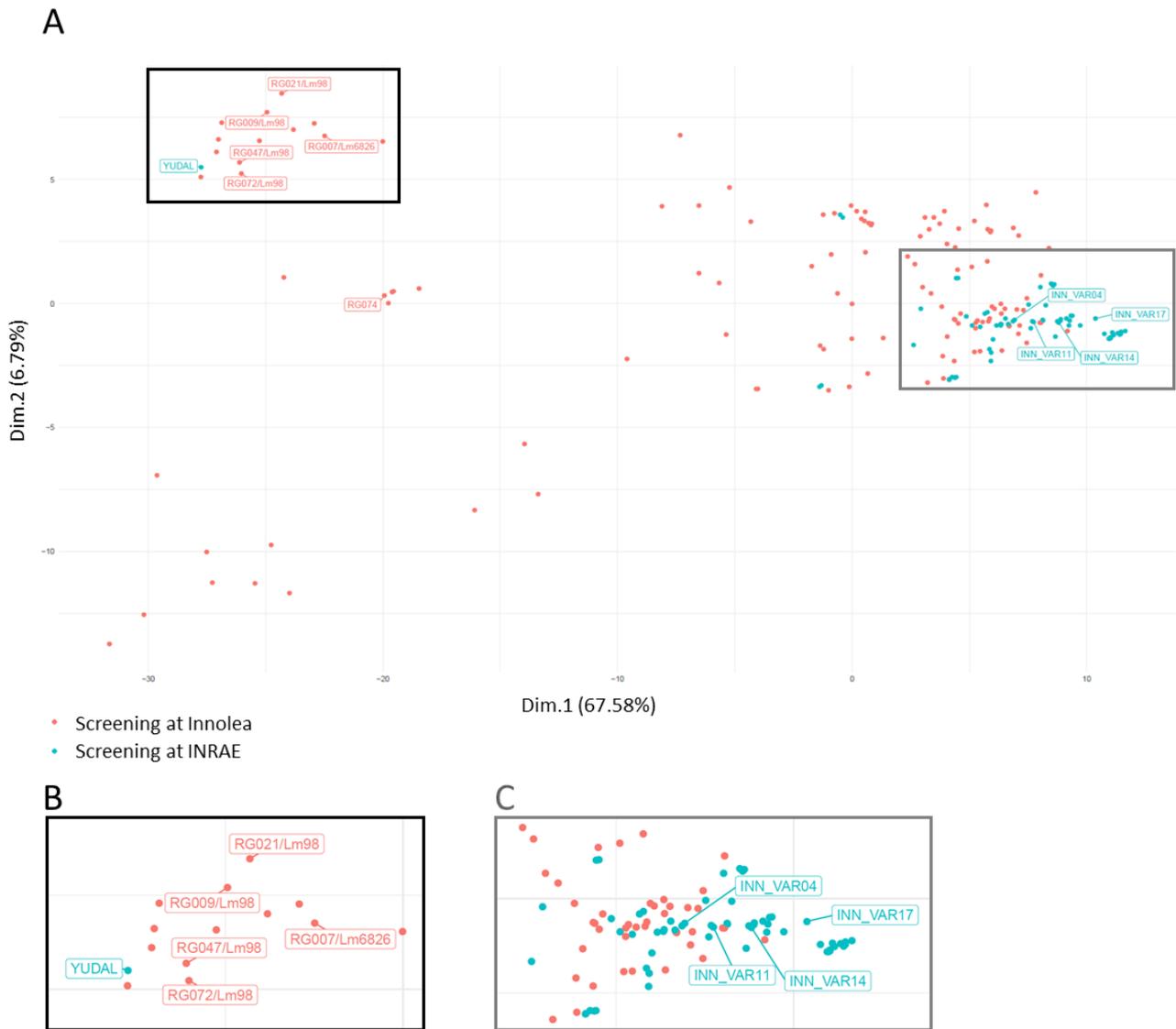


Figure II.6: Genotypic diversity of resistant genotypes

130 genotypes are represented, including 99 genotypes (in red) screened at Innolea and 31 genotypes at INRAE Bioger (in blue). (A) Genotyping data were obtained with 6631 SNP well-distributed on the 19 chromosomes. The resulting allelic matrix was used to compute an Identity by State (IBS) matrix. Then a Principal Coordinate Analysis was performed based on the IBS matrix of the 130 genotypes. (B) Enlargement of the black framed area in (A), including four genotypes and 'Yudal', displaying Hypersensitive Responses to the late effectors LmSTEE98 or Lm6826. (C) Enlargement of grey framed area in (A), displaying genotypes partially responding to one or two late effectors.

DISCUSSION

In a previous paper (Jiquel *et al.*, 2021), we investigated the feasibility to genetically engineer “late” effectors so that they are expressed during cotyledon infection, and then to use them to uncover putative matching resistance genes in genetic resources to identify new sources of resistance to *L. maculans* in rapeseed. As a proof-of-principle, we found one late effector, LmSTEE98 that allowed us to identify one new, single-locus source of resistance in cv. ‘Yudal’, operating when the fungus colonizes the stem of the plant. This finding suggested that at least part of the QDR was attributable to gene-for gene interactions. If such a finding could be generalized it would have important practical consequences for breeders, allowing them to diversify the genepool of *Rlm* genes, to generate easy-to use markers of QDR and eventually to provide them with knowledge-driven tools to improve QDR to *L. maculans* in rapeseed. However, as mentioned by Jiquel *et al.* (2021), this work, as a first shot, suffered flaws preventing the authors from reaching general conclusions on the possibility to find other such resistances with such an approach. This encompassed (i) questioning the robustness of the interaction phenotypes and the interpretation of non-conventional delayed resistance responses, (ii) questioning the best criteria to choose the “best” effectors for this purpose, and (iii) improving the diversity of genotypes available for screening to maximize the chance to find novel resistances.

To address these three points, we firstly duplicated the phenotyping experiments on the diversity panel in two locations, with slightly different operating protocols, to only keep sources of resistance expressed similarly in the two locations. We then decided to focus our choice of effectors to be investigated to those which are exclusively expressed during the stem/petiole colonization of rapeseed by *L. maculans*, i.e. which show no expression at the cotyledon stage. Last, we strongly enhanced the diversity of the *B. napus* material screened, using a subset of a large world-wide collection of *B. napus* genotypes available at Innolea. With this information at hand, our objective was then to get an evaluation grid to rank the most important criteria to privilege to identify diversified resistances.

With these improvements, we found that (i) LmSTEE98, found by Jiquel *et al.* (2021) to be able to identify the RlmSTEE98 resistance in cv. ‘Yudal’, also displays similar interaction phenotypes in three other *B. napus* genotypes, likely to also contain the putative *RlmSTEE98* gene, (ii) one other late effector, *Lm6826*, induces a clear resistance response in one genotype, (iii) three “late” effectors, including *Lm6826*, induce intermediate resistance responses in six *B. napus* genotypes when over-expressed in cotyledons, (iv) a series of genotypes displayed resistance responses to the same effector (four genotypes reacted to LmSTEE98; five to Lm7919) and were genetically related, suggesting the genetic background is shared by these different genotypes. In this study, we did not genetically identify the resistance loci corresponding to the new “late” effectors when expressed at the cotyledon stage, but we can postulate that, on the model of the AvrLmSTEE98-RlmSTEE98 interaction, major resistance genes also are present to recognize *Lm6828*, *Lm7919* and *LmSTEE35*, suggesting at least three new gene-for-gene interactions contribute to quantitative resistance.

We also noticed large phenotypic differences between the interactions involving LmSTEE98 and Lm6828 compared to those involving Lm7919 and LmSTEE35. These later were always expressed as intermediate phenotypes of resistance that may evolve towards delayed susceptibility. However, we also observed genotype-dependent interaction phenotypes as illustrated by interaction phenotypes with OEC transformants expressing LmSTEE98, with three genotypes expressing typical HR, while two others, RG009 and RG072 express intermediate resistance responses. This may be due to expression levels of R gene during infection (Cook *et al.*, 2012), insufficient matching between the avirulence effector and the resistance protein leading to incomplete or delayed expression of resistance, sometimes related to “weak” alleles of resistance genes that could lead to quantitative resistance (Roux *et al.*, 2014). We can also imagine that the expression peak of late effectors in this OEC system incompletely matches with the expression profile of the cognate R gene, that could be expressed at a low level, or late during the infection in cotyledons, leading to an intermediate response in these genotypes.

On the model of what has been done with segregating populations of ‘Yudal’, allowing identification of *RlmSTEE98*, segregating populations from genotypes expressing hypersensitive response and intermediate resistance should now be generated and phenotyped. For genotypes with intermediate resistance, the interaction phenotypes in the progeny may, however, be difficult to characterize, due to the difficulty to discriminate full susceptibility from intermediate resistance.

Jiquel *et al.* (2021) screened a collection of 204 rapeseed genotypes, quasi-exclusively comprising winter-types. The only genotype identified as expressing an HR-type resistance to one late effector, ‘Yudal’, was genetically divergent from the winter-type varieties, and the authors stressed that the limited diversity in the genepool screened may be a limitation in novel resistance discovery. Here, we overpassed this limitation by screening a wide diversity of genetic material encompassing three main *B. napus* types: winter types, spring types and semi-winter types/rutabagas. By analyzing the diversity in the screened collection of 99 genotypes, we firstly found no resistance in the 13 spring-type genotypes, which is consistent with the scarcity of native major resistance genes in these genotypes (Rouxel *et al.*, 2003), *LepR* genes having been only recently introduced from *B. rapa* (Rouxel & Balesdent, 2017), and the usually famed low level of QDR in spring types/canola (Raman *et al.*, 2016). It appeared that genotypes recognizing late effectors are grouped into the “rutabagas and semi-winter” group of genotypes, to which ‘Yudal’ also belongs. Among the 12 genotypes screened in this group, five displayed an HR-type response to two distinct late effectors, LmSTEE98 and Lm6826. While the diversity panel of 99 genotypes was screened at both Innolea and Bioger, with a focus on clearcut, easy to reproduce HR-type responses, and absence of selection of intermediate responses, the 31 modern winter-type genotypes were screened at Bioger only and included evaluation of more diffuse resistance responses.

We often observed inconsistent responses to late effectors in these genotypes, including irreproducible results between repeats or different behavior between two transformants with the same late effector gene (Table SII.7).

This is similar to what has been described in our previous screening mainly comprising winter-type genotypes (Jiquel *et al.*, 2021) preventing us to conclude on their use as a source of novel resistance. By contrast, our study also indicates that a limited amount of modern winter type genotypes (four out of 31 analyzed) consistently reacted to *Lm7919* expressed at the cotyledon stage (and to either one of *LmSTEE35* or *Lm6826*), but with intermediate phenotypes rather than typical HR. The identification of genotypes recognizing late effectors mainly in the semi-winter group could be explained by the recent domestication of *B. napus*, occurring about 400 years ago. The first oilseed rape is hypothesized to be a semi-winter type (Rahman *et al.*, 2021). After this, a selection of genotypes adapted to more diverse environmental conditions was conducted, leading to the development of winter and spring genotypes, accompanied by a reduced diversity in both these groups and possible loss of interesting agronomic traits. This recent history of *B. napus* could explain the greater diversity and the higher number of genotypes recognizing late effectors in the semi-winter type, compared to spring and winter type.

The link between the recognition of a late effector in our somewhat artificial system and actual QDR in the field remains difficult to establish, since we currently have no information on the field behavior of the “semi-winter” genotypes. Also, while the panel of 31 modern winter-type was firstly selected on their famed QDR in the field, we only have partial information on how the four winter type cultivars recognizing *Lm7919* behave, with three of them displaying a good behavior in field experiments assessing the quantitative resistance at the end of the growing season and a fourth genotype being variable between years (data not shown). These data clearly confirm the importance of investigating diversified resources and confirm previous findings that a limited diversity for *RlmSTEE* genes seems to be present in the winter type genotypes which represented the vast majority of genotypes screened by Jiquel *et al.* (2021), and in this study.

For setting up the OEC strategy with late effectors, Jiquel *et al.* (2021) selected five ‘late’ effectors produced in the stem during systemic colonization, but belonging to diverse waves of expression : *LmSTEE1* and *LmSTEE30* belong to the stem biotrophy wave (wave 5) displaying an exclusive and early expression in stems, before the development of the stem canker symptoms, *LmSTEE35* and *LmSTEE98* belong to the “biotrophy-to necrotrophy transition” wave (wave 4), expressed later than wave 5 in stems, and also displaying a limited level of expression in cotyledons at the onset of the leaf spot development, and *LmSTEE78* belongs to the stem necrotrophy wave (wave 6) and is expressed exclusively in stems at later stages of stem infection (Gay *et al.*, 2021).

For a reasoned choice of most relevant effectors for screening, we chose here to focus on genes exclusively expressed in petioles and stems of *B. napus*, the places where QDR is postulated to be operating, and therefore on effector genes associated to the "stem biotrophy" wave. If pooling information from Jiquel *et al.* (2021) and those of this study, we can notice that two out of the six new effectors chosen here, *Lm6826* and *Lm7919*, identified new resistance sources following screening.

However, *LmSTEE98* (Jiquel *et al.*, 2021; this study) and *LmSTEE35* (this study) belong to wave 4, but also identified new sources of resistance. Since we cannot discard effectors belonging to other waves than wave 5 for future screening efforts, we then wanted to know if conservation between species or polymorphism in population could help to prioritize the best candidates for screening. It is interesting to mention that the two late effectors which lead to typical HR responses, *LmSTEE98* and *Lm6826*, are those that have no homologues in other fungal species. This characteristic is reminiscent of « classical » avirulence genes, often with no homologue also in other species, as for example *AvrLm1* (Gout *et al.*, 2006), *AvrLm3* (Plissonneau *et al.*, 2016), and *AvrLm5* (Neik *et al.*, 2020). *Lm7919* and *LmSTEE35*, in contrast have homologues in other fungal species, and even paralogs in *L. maculans* for *LmSTEE35* (Jiquel *et al.*, 2021). Another criterium of choice that may be considered is conservation in *L. maculans* populations. For these four effectors, contrasted data were obtained, with *Lm6826* being always present in field populations with no sequence variation, *Lm7919* being always present in field populations with one non-silent mutation in 16% of the isolates, while *LmSTEE98* and *LmSTEE35* may be absent in a very limited number of field isolates and only *LmSTEE98* displaying sequence variation in a very special population obtained from cabbages in Mexico (Jiquel *et al.*, 2021).

Provided we can demonstrate that the new interactions found here really correspond to novel resistance sources operating in the field to contribute to QDR, this study and the one by Jiquel *et al.* (2021) provide us with a series of practices and criteria to maximize the chance to find novel relevant resistance sources using OEC transformants. First, we can stress on the importance of duplicating phenotyping efforts of genetic resources in environments and with practices that may slightly differ, to eliminate environment-dependent phenotypes or heterogeneous genotypes and to only keep robust resistance phenotypes, even when uneasy to score. The strategy of choice to identify the best effector candidates for screening is unclear from our data and those of Jiquel *et al.* (2021). A total of 117 effector genes are expressed during stem colonization (waves 4, 5, and 6), using the reference genome JN3 (Gay *et al.*, 2021), and we found that four out of 11 from waves 4 and 5 were useful to identify resistances in the collection of *B. napus* genotypes, suggesting the restriction on wave 5 effectors chosen here is irrelevant, and that we miss interesting candidates if excluding the 55 candidates included in wave 4. One other possible criteria of choice could be the presence/absence polymorphism or sequence variation of candidates within field populations, but no general feature could be drawn from these criteria.

Lastly, we found that two of the four effectors inducing resistance responses on genotypes, *LmSTEE98* and *Lm6826*, have no homolog in other fungal species, and these induce typical HR. For further analyses, it could therefore be interesting to prioritize this feature and use it as a criterion. As a matter of fact, there are other late effectors that meet this criterion. Among the 40 effectors clustered in the wave 5 of Gay *et al.* (2021), 13 have no homologs, including *Lm1852* and *Lm6826* studied here.

Among the six late effectors identified in our transcriptomic analysis, but absent from the wave 5 described by Gay *et al.* (2021), four also have no homologs in other fungal species. Moreover, among the 56 effectors clustered in the wave 4 of Gay *et al.* (2021), 21 genes have no homologs either, including *LmSTEE98*. There is thus a pool of at least 35 new "late" effectors, located in GC-isochores, that are up-regulated during stem infection, and could be good candidates for identifying genotypes specifically recognizing these effectors. The main result obtained in this study, however, is the finding that the semi winter-type/rutabaga genepool, with a prevalence of Asian genotypes, is a peculiarly promising source of novel resistances. Different studies have recently obtained deep molecular data on large collections (Wu *et al.*, 2018, Rahman *et al.*, 2021), showing that the genebank collections hold 75 to 145 accessions that could be related to this semi-winter-type/rutabaga genepool and thus representing promising routes for more resistance gene discovery.

To sum up and prioritize, next steps for this study could be (i) screen a wider range of semi-winter/rutabaga genotypes with the eleven OEC transformants available, (ii) develop segregating populations and analyze the segregation of resistance to the *Lm6826* OEC transformants to design markers for the locus, (iii) construct additional OEC transformants with genes specific to *L. maculans* to pursue the screening effort, and (iv) analyze the genetics of intermediate resistance found in winter genotypes and try to relate it to QDR in the field.

Our study and the previous one by Jiquel *et al.* (2021) thus provide new perspectives for knowledge informed building of resistant genotypes and their use for durable disease management strategies. While major genes for resistance expressed at the leaf stage are extremely efficient and useful, their scarcity in current genetic resources limits their reasoned use in the field. In contrast, if genes reacting to 'late' effectors indeed are involved in QDR, our study provides both prospects for numerous diversified genes and easy to design markers for QDR. With this diversification of genetic resources and markers (or cloned genes) at hand it will be easier to build new genotypes including relevant genes of "semi-winter" in winter-types or spring-types, and to generate diversified combinations of genes involved in qualitative and quantitative resistance that may display an additive effect in the field.

MATERIALS AND METHODS

Fungal and plant materials

The isolate JN2, a progeny from an *in vitro* cross between European field isolates (Balesdent *et al.*, 2001) was used as a control in inoculation test. Isolate INV13.269, isolated from a single pycnidiospore in a French field in 2013, was used as background for fungal transformation to screen for resistance. A worldwide collection of isolates (Table SII.3), from Australia, New Zealand, Canada, the USA, Mexico, Chile was used for diversity analysis (Dilmaghani *et al.*, 2009, 2012; Mendes-Pereira *et al.*, 2003; this study). This collection was enriched with a recent population collected in France in 2017 from four locations in France as single-pycnidia isolates recovered from individual leaf lesions as described previously (Balesdent *et al.*, 2006; Table SII.3). V8 juice agar medium was used for fungal growth and sporulation, as described by Ansan-Melayah *et al.* (1995).

To search for gene-for-gene interactions with late effectors, we screened two types of oilseed rape materials (Table SII.6A): 1) a diversity panel including 99 accessions selected based on materials available at Innolea and representing different crop morphotypes (winter, spring, semi-winter or rutabagas), geographical origins (mostly European or Asian) and seed qualities (either high or low in erucic acid or glucosinolates or both) and 2) a selection of 31 varieties based on their known field behaviour as described in Terres Inovia's crop guide (<https://www.terresinovia.fr/p/guide-culture-colza>), or according to Innolea's knowledge with an emphasis on genotypes devoid of known efficient major *Rlm* genes (Table SII.6B).

Vector construction and fungal transformation

The vector pPZPNat1 containing the promoter of the *AvrLm4-7* gene was obtained as described in (Jiquel *et al.*, 2021). The six late effector genes were amplified from their Start codon to their terminator regions, with primers described in Table SII.9. The gene *Lm_06826* was cloned by Gibson assembly (Silayeva & Barnes, 2018), after digestion of pPZPNat1 by *SaI* and *XhoI*. Amplicons of *Lm_01277*, *Lm_01852*, *Lm_05465*, *Lm_07919* and *Lm_10933* were digested with *EcoRI* and *XhoI* or *EcoRI* and *SaI* (Table SII.9). By digestion with the same enzymes, fragments were ligated into the pPZPNat1 vector containing the *AvrLm4-7* promoter.

Each construct was introduced by electroporation (2.5 kV, 200 Ω and 25 μ F) into *Agrobacterium tumefaciens* C58. Transformations of *L. maculans* with *A. tumefaciens* strains were performed as described by Gout *et al.* (2006). Selection of fungal transformants was conducted on nourseothricin (50 μ g.ml⁻¹).

Fungal DNA manipulation and polymorphism analysis

To extract fungal genomic DNA, the DNeasy 96 or DNeasy Plant Mini Kits (Qiagen) were used on conidia suspensions, in accordance with the manufacturer's recommendations. Late effector genes were amplified by PCR, using the primers in Table SII.9, and visualized on 1% agarose gels to detect presence/absence polymorphism. Amplicons were sequenced for six late effector candidates by Eurofins Genomics (Eurofins, Ebersberg, Germany), using the primers in bold in Table SII.9.

Fungal RNA manipulation and RT-qPCR

Total RNA was extracted from inoculated cotyledons, at 7 dpi corresponding to the peak of *AvrLm4-7* expression (Parlange *et al.*, 2009). For the reverse transcription reaction, RNA samples were adjusted to 1 µg of RNA. Single-strand cDNAs were generated by oligo-dT-primed reverse transcription with the PowerScript reverse transcriptase according to the manufacturer's protocol (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Two technical replicates were performed on two biological replicates. The RT-qPCR experiments were performed, with the primers indicated in Table SII.9, as described by Fudal *et al.* (2007). The method from Muller *et al.* (2002) was used to analyse Ct values. Actin was used as a constitutively expressed reference gene and levels of tubulin expression relative to actin expression were analysed as a control.

Transcriptomic analysis

Biological samples from *in vitro* conditions, *in planta* controlled conditions and field conditions, and RNAseq sequencing were described in Gay *et al.* (2021). In this study, we used RNAseq data from V8 medium as *in vitro* condition, from cotyledon, petiole, and stem infection by *L. maculans* JN2 in controlled conditions. Mapping of RNAseq data has been done in the study of Gay *et al.* (2021), using the reference genomes of *B. napus* (Chalhoub *et al.*, 2014) and of *L. maculans*. Only genes with at least 15 reads in one condition were analyzed and were normalized using « Trimmed Mean of M-values » method, with the EdgeR package (Robinson *et al.*, 2010). The glmQLFit function was used to fit a negative binomial generalized linear model to the data. To compare gene expression, we used the glmLRT function. Differentially expressed genes were selected with a $\text{Log}_2(\text{FC}) > 1.5$ and a p-value < 0.05 . Clustering was done on genes with a FPKM > 1 , which were $\text{Log}_2(\text{FPKM} + 1)$ -transformed and scaled. Then effectors specifically overexpressed in stem or petiole condition compared to the six cotyledon conditions were extracted, and the Kohonen R package was used to cluster these genes. Finally, signal peptide and extracellular localisation were predicted using respectively SignalP 4.1 and TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2007; Nielsen, 2017).

Structuration of the plant genotype collection

Both sets of *B. napus* materials were genotyped with an internal array of 6331 SNP covering the 19 chromosomes. Briefly, DNA was extracted from eight punches of young leaves per genotype using the the DNeasy plant 96 kit (Qiagen) and 1.5 µg were used on an Affymetrix Axiom MyDesign chip array according to manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific Inc.). The resulting allelic matrix was used to compute kinship matrix using the R package emma represented by the Identity By State (IBS) between each accession. A Principal Coordinate Analysis was also performed based on the IBS matrix using the R packages FactoMineR and factoextra while graphical representations were obtained using the R package ggplot2, allowing a visualization of the overall diversity present in the panel.

Plant inoculations and resistance assessment

Plant genotypes were tested independently in two locations with slightly different protocols. The first step of the screening was performed on five plants at Innolea and on 10 plants at INRAE, with four transformants/control isolates on each plant. Repetitions were conducted for promising interactions, allowing us to have at least 20 plants, in two biological replicates, still with four transformants/control isolates on each plant. Inoculations performed at INRAE Bioger were done as described by Balesdent *et al.* (2001), on cotyledons of 10-day-old seedlings. Punctures were inoculated with 10 μL of inoculum (10^7 pycnidiospores ml^{-1}), with four different isolates, one per half-cotyledon. Inoculated plants were incubated 48 h at room temperature and then placed in a growth chamber (19°C (night) / 24°C (day)), 16 h photoperiod, 90% humidity). Using the IMAScore rating scale, with scores of 1 and 2 corresponding to resistance, 3 to intermediate phenotype, 4 and 5 to susceptibility (Balesdent *et al.*, 2001), symptoms were assessed at 10, 14 and 16 dpi. Inoculations at Innolea were slightly different, starting by inoculations on 16-day-old seedlings. After inoculations, plants were incubated 48h in the dark at 18°C (night) and 22°C (day). Symptoms were scored at 12, 13 and 14 dpi, using the rating scale from Williams (1985), with scores of 1 and 3 corresponding to resistance, 5 to intermediate phenotype, 7 and 9 to susceptibility.

For both experiments, mean scores for symptoms and the percentage of virulent and avirulent phenotypes induced by OEC mutants were determined for each cultivar and compared with the symptoms induced by the wild-type isolate on the same cultivar, at the same date (Kruskal-Wallis test, Chi^2 test and GLM test). Differences between transformants and the control INV13.269 were assessed by using a Kruskal-Wallis test or by applying a generalized linear model (GLM), assuming a quasipoisson distribution of the data. Statistical analyses were performed with R (R Core Team, 2015).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization SF, MHB, TR; Formal Analysis AJ, EJG; Funding Acquisition, SF, TR, MHB; Investigation AJ, EJG, JM, PG, MHB; Methodology, AJ, SF, MHB, TR; Project Administration, SF, MHB, TR; Resources, AJ, JM, PG, MHB; Supervision, SF, TR, MHB; Validation, TR, MHB, SF; Visualization, AJ, AW, AF; Writing draft AJ, TR, MHB, SF; Writing review, AJ, EJG, SF, JM, PG, AW, AF, MHB, TR.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Yanick Monet and John-Paul Morris from INRAE BIOGER, for plant management and Anaëlle Briand from Innolea for screening management and Bénédicte Ollivier (INRAE Bioger) for technical help. A. J. was funded by ANRT and Euralis semences (Cifre project no. 2017/1374). The authors acknowledge financial support from SOFIPROTEOL as part of the FASO EPHICAS Project. The UMR Bioger benefits from the support of Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-17-EUR-0007).

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Ansan-Melayah D, Balesdent MH, Buée M, Rouxel T. 1995.** Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **85**: 1525-1529.
- 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, Louvard K, Pinochet X, Rouxel T. 2006.** A large-scale survey of races of *Leptosphaeria maculans* occurring on oilseed rape in France. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 53-65.
- Brun H, Chèvre AM, Fitt BD, Powers S, Besnard AL, Ermel M, Huteau V, Marquer B, Eber F, Renard M, et al. 2010.** Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* **185**: 285-299.
- 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.
- Cook DE, Lee TG, Guo X, Melito S, Wang K, Bayless AM, Wang J, Hughes TJ, Willis DK, Clemente TE, et al. 2012.** Copy number variation of multiple genes at *Rhg1* mediates nematode resistance in soybean. *Science* **338**: 1206-1209.
- Dilmaghani A, Balesdent MH, Didier JP, Wu C, Davey J, Barbetti MJ, Li H, Moreno-Rico O, Phillips D, Despeghel JP, et al. 2009.** The *Leptosphaeria maculans* - *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathology* **58**: 1044-1058.
- Dilmaghani A, Gladioux P, Gout L, Giraud T, Brunner PC, Stachowiak A, Balesdent MH, Rouxel T. 2012.** Migration patterns and changes in population biology associated with the worldwide spread of the oilseed rape pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Ecology* **21**: 2519-2533.
- Dutreux F, Da Silva C, Agata L, Couloux A, Gay EJ, 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. *Scientific data* **5**: 1-11.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007.** Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nature Protocols* **2**: 953-971.
- Fitt BDL, Brun H, Barbetti MJ, Rimmer SR. 2006.** World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 3-15.
- Fopa Fomeju B, Falentin C, Lassalle G, Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R. 2015.** Comparative genomic analysis of duplicated homoeologous regions involved in the resistance of *Brassica napus* to stem canker. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1-14.
- Fudal I, Ross S, Gout L, Blaise F, Kuhn ML, Eckert MR, Cattolico L, Bernard-Samain S, Balesdent MH, Rouxel T. 2007.** Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of *AvrLm6*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **20**: 459-470.
- Gay EJ, Soyer JL, Lapalu N, Linglin J, Fudal I, Da Silva C, Wincker P, Aury J-M, Cruaud C, Levrel A, et al. 2021.** Large-scale transcriptomics to dissect 2 years of the life of a fungal phytopathogen interacting with its host plant. *BMC Biology* **19**: 55.
- Gervais J. 2017.** Identification et analyse fonctionnelle des effecteurs tardifs impliqués dans la colonisation systémique du colza par *Leptosphaeria maculans*.
- 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 ML, Blaise F, Eckert M, Cattolico L, Balesdent MH, Rouxel T. 2006.** Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Microbiology* **60**: 67-80.
- Hammond KE, Lewis BG, Musa TM. 1985.** A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **34**: 557-565.
- Huang YJ, Jestin C, Welham SJ, King GJ, Manzaneres-Dauleux MJ, Fitt BDL, Delourme R. 2016.** Identification of environmentally stable QTL for resistance against *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Theoretical and Applied Genetics* **129**: 169-180.
- Huang YJ, Qi A, King GJ, Fitt BDL. 2014.** Assessing quantitative resistance against *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) in young plants. *PLoS ONE* **9**: eB4924.
- Jestin C, Bardol N, Lodé M, Duffé P, Domin C, Vallée P, Mangin B, Manzaneres-Dauleux MJ, Delourme R. 2015.** Connected populations for detecting quantitative resistance factors to phoma stem canker in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Molecular Breeding* **35**: 1-16.
- Jiquel A, Gervais J, Geistodt-Kiener A, Delourme R, Gay EJ, Ollivier B, Fudal I, Faure S, Balesdent M-H, Rouxel T. 2021.** A gene-for-gene interaction involving a 'late' effector contributes to quantitative resistance to the stem canker disease in *Brassica napus*. *New Phytologist*. nph.17292.
- Kumar V, Paillard S, Fopa-Fomeju B, Falentin C, Deniot G, Baron C, Vallée P, Manzaneres-Dauleux MJ, Delourme R. 2018.** Multi-year linkage and association mapping confirm the high number of genomic regions involved in oilseed rape quantitative resistance to blackleg. *Theoretical and Applied Genetics* **131**: 1627-1643.
- Larkan NJ, Lydiate DJ, Parkin IAP, Nelson MN, Epp DJ, Cowling WA, Rimmer SR, Borhan MH. 2013.** The *Brassica napus* blackleg resistance gene *LepR3* encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector AVRML1. *New Phytologist* **197**: 595-605.
- Larkan NJ, Ma L, Borhan MH. 2015.** The *Brassica napus* receptor-like protein RLM2 is encoded by a second allele of the *LepR3/Rlm2* blackleg resistance locus. *Plant Biotechnology Journal* **13**: 983-992.
- Larkan NJ, Ma L, Haddadi P, Buchwaldt M, Parkin IAP, Djavaheri M, Borhan MH. 2020.** The *Brassica napus* wall-associated kinase-like (WAKL) gene *Rlm9* provides race-specific blackleg resistance. *Plant Journal* **104**: 892-900.
- Mendes-Pereira E, Balesdent MH, Brun H, Rouxel T. 2003.** Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*-*L. biglobosa* species complex. *Mycological Research* **107**: 1287-1304.
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. 2002.** Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* **32**: 1372-1374, 1376, 1378-1379.
- Neik TX, Ghanbarnia K, Ollivier B, Scheben A, Severn-Ellis A, Larkan NJ, Haddadi P, Fernando WGD, 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*. 1-35.
- Nielsen H. 2017.** Predicting secretory proteins with SignalP. *Methods in Molecular Biology* **1611**: 59-73.

- Parlange F, Daverdin G, Fudal I, Kuhn ML, Balesdent MH, Blaise F, Grezes-Besset B, Rouxel T. 2009.** *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents Rlm4-mediated recognition through a single amino acid change. *Molecular Microbiology* **71**: 851-863.
- Pilet ML, Duplan G, Archipiano M, Barret P, Baron C, Horvais R, Tanguy X, Lucas MO, Renard M, Delourme R. 2001.** Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oilseed rape. *Crop Science* **41**: 197-205.
- Plissonneau C, Daverdin G, Ollivier B, Blaise F, Degrave A, Fudal I, Rouxel T, Balesdent MH. 2016.** A game of hide and seek between avirulence genes *AvrLm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist* **209**: 1613-1624.
- Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ. 2009.** Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science* **14**: 21-29.
- 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**: 513-45.
- Rahman M, Hoque A, Roy J. 2021.** Linkage disequilibrium and population structure in a core collection of *Brassica napus* (L.). *bioRxiv* 2021.04.06.438572: 1-48.
- Raman H, Raman R, Coombes N, Song J, Diffey S, Kilian A, Lindbeck K, Barbulescu DM, Batley J, Edwards D, et al. 2016.** Genome-wide association study identifies new loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* in canola. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1513.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010.** edgeR: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139-140.
- Roux F, Voisin D, Badet T, Balagué C, Barlet X, Huard-Chauveau C, Roby D, Raffaele S. 2014.** Resistance to phytopathogens *e tutti quanti*: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology* **15**: 427-432.
- Rouxel T, Balesdent MH. 2005.** The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Molecular Plant Pathology* **6**: 225-241.
- Rouxel T, Balesdent MH. 2013.** From model to crop plant-pathogen interactions: cloning of the first resistance gene to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* **197**: 356-358.
- Rouxel T, Balesdent MH. 2017.** Life, death and rebirth of avirulence effectors in a fungal pathogen of *Brassica* crops, *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist* **214**: 526-532.
- Rouxel T, Willner E, Coudard L, Balesdent MH. 2003.** Screening and identification of resistance to *Leptosphaeria maculans* (stem canker) in *Brassica napus* accessions. *Euphytica* **133**: 219-231.
- Sánchez-Vallet A, Fouché S, Fudal I, Hartmann FE, Soyer JL, Tellier A, Croll D. 2018.** The genome biology of effector gene evolution in filamentous plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **56**: 21-40.
- Silayeva O, Barnes AC. 2018.** Gibson Assembly facilitates bacterial allelic exchange mutagenesis. *Journal of Microbiological Methods* **144**: 157-163.
- Williams PH. 1985.** The Crucifer Genetics Cooperative. *Plant Molecular Biology Reporter* **3**: 129-144.
- Wu D, Liang Z, Yan T, Xu Y, Xuan L, Tang J, Zhou G, Lohwasser U, Hua S, Wang H, et al. 2019.** Whole-genome resequencing of a worldwide collection of rapeseed accessions reveals the genetic basis of ecotype divergence. *Molecular Plant* **12**: 30-43.

Supporting information

Figure SII.1: Genes and effectors differentially expressed during stem/petiole colonization compared to cotyledon infection

RNAseq data from stem and petiole of 'Darmor' and 'Bristol' genotypes were compared to data from cotyledon infection. (A) Comparison of differentially expressed genes (DEG) lists. (B) Comparison of differentially expressed effector genes (SSP) lists.

Figure SII.2: Selection of 15 late effector candidates

From 13047 annotated genes, we found 35 candidate effector genes (SSPs; predicted by Gay *et al.* in 2021) specifically overexpressed during petiole and/or stem colonization. We selected 27 genes in GC-isochores, with a predicted protein smaller than 300 amino acids, and without predicted function. From these 27 candidate effectors, we selected 15 genes for further characterization, combining at least two criteria among criteria indicated in the last box.

Figure SII.3: Presence / absence analysis of 15 late effector candidates

Isolates used are described in Table SII.3. The presence of the gene was determined by PCR amplification using primers listed in Table SII.9.

Figure SII.4: Expression values of late effector genes in "over-expressed in cotyledons" (OEC) mutants during early stage of cotyledon colonization

OEC mutants were built, expressing the effector candidate genes *Lm1277*, *Lm1852*, *Lm5465*, *Lm6826*, *Lm7919* and *Lm10933* under the control of the promoter of the *AvrLm4-7* gene, specifically over-expressed during the early colonization stage of cotyledons. The expression of the effector genes in the different OEC mutants was assessed seven days post inoculation, by qRT-PCR in infected cotyledons of the cultivar 'Darmor'. Expression data from three different mutants are represented by grey bars, while expression in the wild-type isolate (INV13.269) is represented by a black bar. For the screening of plant genotypes, the OEC mutants selected are indicated by red arrows. The mean expression is normalized with actin, and tubulin was used as a control. Error bars represent the standard error for two biological and two technical replicates.

Figure SII.5: Pathogenicity phenotypes of *L. maculans* "over-expressed in cotyledons" (OEC) transformants during early stages of cotyledon colonization

L. maculans transformants expressing late effector genes under the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were inoculated onto the susceptible cultivar 'Darmor'. Three independent transformants were used per gene construction (A) *Lm1277*, (B) *Lm1852*, (C) *Lm5465*, (D) *Lm6826*, (E) *Lm7919* and (F) *Lm10933*. The bars represent the mean score of symptoms (\pm standard-error, $n > 16$), based on the IMAScore rating scale, with 1 and 2 corresponding to resistance, 3 to intermediate phenotype, 4 and 5 to susceptibility (Balesdent *et al.*, 2001), 14 days after inoculation. Isolate INV13.269 is the wild-type isolate and isolate JN2 is used as an additional control. Black arrows indicate transformants selected to screen genotypes of *B. napus*.

Figure SII.6: Validation of resistance responses of five oilseed rape cultivars towards late effector genes, at Innolea

L. maculans transformants expressing *LmSTEE98* and *Lm6826* under the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were inoculated onto the cultivars (A) 'Yudal', (B) RG021, (C) RG047, (D) RG072, (E) RG030, (F) RG007 or (G) RG088, RG030 and RG088 corresponding to susceptible controls. Two independent transformants were used per construction. The boxplots represent the median score of symptoms, based on the rating scale from Williams (1985), with 1 and 3 corresponding to resistance, 5 to intermediate phenotype, 7 and 9 to susceptibility, 12 days after inoculation (n>20). Isolate INV13.269 is the wild-type isolate and isolate JN2 is used as an additional control. The asterisks indicate a significant difference between the control isolate INV13.269 and the *L. maculans* transformants (Kruskal-Wallis test: ***: *p*-value < 0.001).

Figure SII.7: Reduced susceptibility of six oilseed rape cultivars towards "late" effector genes, observed at INRAE

L. maculans mutants expressing *Lm1277*, *LmSTEE98*, *LmSTEE35*, *Lm6826*, *Lm7919* or *LmSTEE35* under the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were inoculated onto the cultivars (A) INN_VAR04, (B) INN_VAR11, (C) INN_VAR14, (D) INN_VAR17, (E) RG074 and (F) RG009. Two independent mutants were used per construction. The bars represent the proportion of avirulent (in green) and virulent (in red) phenotypes, based on the IMAScore rating scale, considering scores of 1 and 2 as resistant phenotypes and scores of 3 to 5 as susceptible phenotypes (Balesdent *et al.*, 2001), 14 days after inoculation. Isolate INV13.269 is the wild-type isolate and isolate JN2 is used as an additional control. Resistance phenotype of INN_VAR04 to JN2 is linked to the presence of *Rlm7* recognizing *AvrLm4-7*. The asterisks indicate a significant difference between the control isolate INV13.269 and the *L. maculans* transformants (Chi² test: **: *p*-value < 0.01; ***: *p*-value < 0.001), combining two biological replicates.

Table SII.1: Data from Leptolife project, used for expression profiles of *LmSTEE* genes. (A) Raw count. (B) Library size.

Table SII.2: Statistics of differential expression for late effector genes, using RNAseq controlled conditions data from Leptolife project.

Table SII.3: Isolates used for polymorphism studies in *Leptosphaeria maculans* populations

Table SII.4: Twenty first BLASTp results details for each selected "late" effector

Table SII.5: BLASTp results details for each late effector against *Leptosphaeria biglobosa* proteins

Table SII.6: List of *Brassica napus* genotypes screened for resistance

Table SII.7: Results from the screening of a 130 genotypes collection

Table SII.8: Results from the confirmation tests for promising interactions

Table SII.9: List of primers used in this study

Figure II.1: Heatmap representing the clustering of 35 late effector candidates of *Leptosphaeria maculans*, overexpressed during stem colonization

The mean FPKM value of the biological replicates was calculated for each condition, and then Log_2 transformed and scaled. To define expression clusters, the method of self-organizing was used on $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$ values. Predictions by EffectorP, TargetP, SignalP, the size and the number of cysteines are indicated by different colors in legend. The experimental conditions are along the x axis and the numbers indicates sampling time points in days post-inoculation (dpi). The stars indicate the six candidates selected for screening of the *Brassica napus* diversity panel.

Figure II.2: Expression profiles of 15 late effector genes during cotyledon and stem colonization in controlled conditions

Experimental conditions are displayed on the x axis. Expression values (CPM - Count Per Millions of mapped reads) were log_2 -transformed and then mean-centered. Two or three independent biological replicates were used per sampling time-point. Expression profiles are clustered as in Figure II.1, corresponding to the cluster A in panel (A), cluster B in panel (B), cluster C in panel (C) and cluster D in panel (D). Raw data and statistics of differential expressions between the dates are indicated in Tables SII.1 and SII.2. The six late effector candidates selected for further characterization are indicated in bold.

Figure II.3: Principal Coordinates Analysis of genotype diversity

130 genotypes are represented, including 99 genotypes (in red) screened at Innolea and 31 genotypes at INRAE Bioger (in blue). Genotyping data were obtained with 6631 SNP well-distributed on the 19 chromosomes. The resulting allelic matrix was used to compute an Identity by State (IBS) matrix. Then a Principal Coordinate Analysis was performed based on the IBS matrix.

Figure II.4: Resistance response of five oilseed rape cultivars towards late effector genes, observed at INRAE

L. maculans mutants expressing *LmSTEE98* and *Lm6826* under the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were inoculated onto the cultivars (A) 'Yudal', (B) RG021, (C) RG047, (D) RG072, (E) RG030, (F) RG007 or (G) RG088, RG030 and RG088 corresponding to susceptible controls. Two independent mutants were used per construction. The bars represent the mean score of symptoms (\pm standard error), based on the IMAScore rating scale, with 1 and 2 corresponding to resistance, 3 to intermediate phenotype, 4 and 5 to susceptibility (Balesdent *et al.*, 2001), 14 days after inoculation. The number of plants is indicated below the x axis. Isolate INV13.269 is the wild-type isolate and isolate JN2 is used as an additional control. The asterisks indicate a significant difference between the control isolate INV13.269 and the *L. maculans* transformants (Kruskal-Wallis test: ***: p -value < 0.001).

Figure II.5: Reduced susceptibility of six oilseed rape cultivars towards "late" effector genes, observed at INRAE.

L. maculans mutants expressing *Lm1277*, *LmSTEE98*, *LmSTEE35*, *Lm6826*, *Lm7919* or *LmSTEE35* under the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were inoculated onto the cultivars (A) INN_VAR04, (B) INN_VAR11, (C) INN_VAR14, (D) INN_VAR17, (E) RG074 and (F) RG009. Two independent mutants were used per construction. The bars represent the mean score of symptoms (\pm standard error, $n > 20$), based on the Imascore rating scale, with 1 and 2 corresponding to resistance, 3 to intermediate phenotype, 4 and 5 to susceptibility (Balesdent *et al.*, 2001), 14 days after inoculation. Isolate INV13.269 is the wild-type isolate and isolate JN2 is used as an additional control. Resistance phenotype of INN_VAR04 to JN2 is linked to the presence of *Rlm7* recognizing *AvrLm4-7*. The asterisks indicate a significant difference between the control isolate INV13.269 and the *L. maculans* transformants (GLM test: *: p -value < 0.05 ; ***: p -value < 0.001), combining two biological replicates.

Figure II.6: Genotypic diversity of resistant genotypes

130 genotypes are represented, including 99 genotypes (in red) screened at Innolea and 31 genotypes at INRAE Bioger (in blue). (A) Genotyping data were obtained with 6631 SNP well-distributed on the 19 chromosomes. The resulting allelic matrix was used to compute an Identity by State (IBS) matrix. Then a Principal Coordinate Analysis was performed based on the IBS matrix of the 130 genotypes. (B) Enlargement of the black framed area in (A), including four genotypes and 'Yudal', displaying Hypersensitive Responses to the late effectors *LmSTEE98* or *Lm6826*. (C) Enlargement of grey framed area in (A), displaying genotypes partially responding to one or two late effectors.

Table II.1: Characteristics of the "late" effector candidates studied here

Table II.2: PCR amplification and sequencing analysis of six effector genes in *Leptosphaeria maculans* isolates

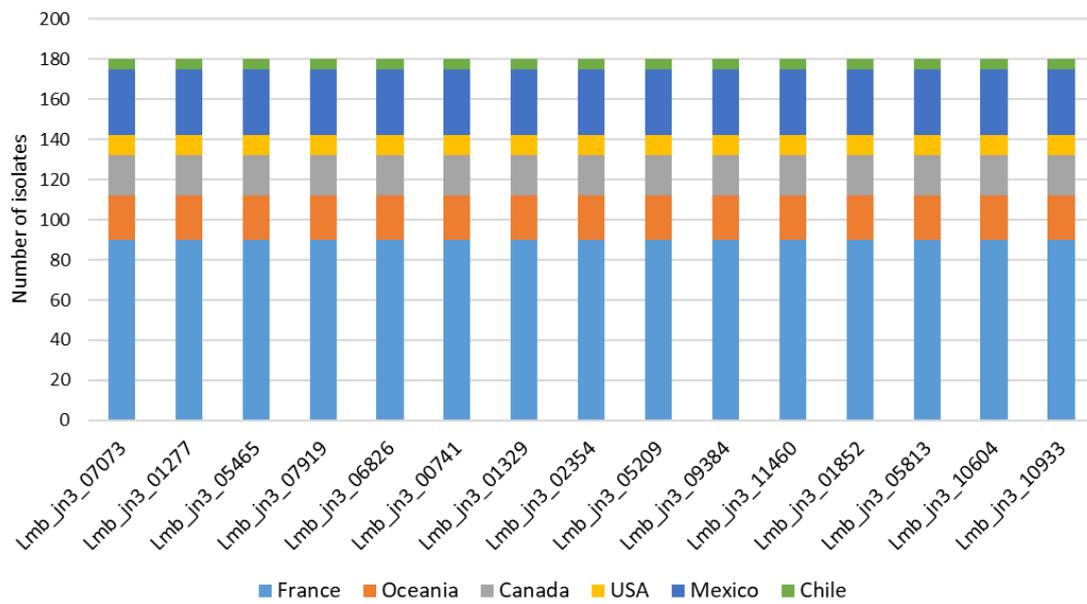


Figure SII.3: Presence / absence analysis of 15 late effector candidates

Isolates used are described in Table SII.3. The presence of the gene was determined by PCR amplification using primers listed in Table SII.9.

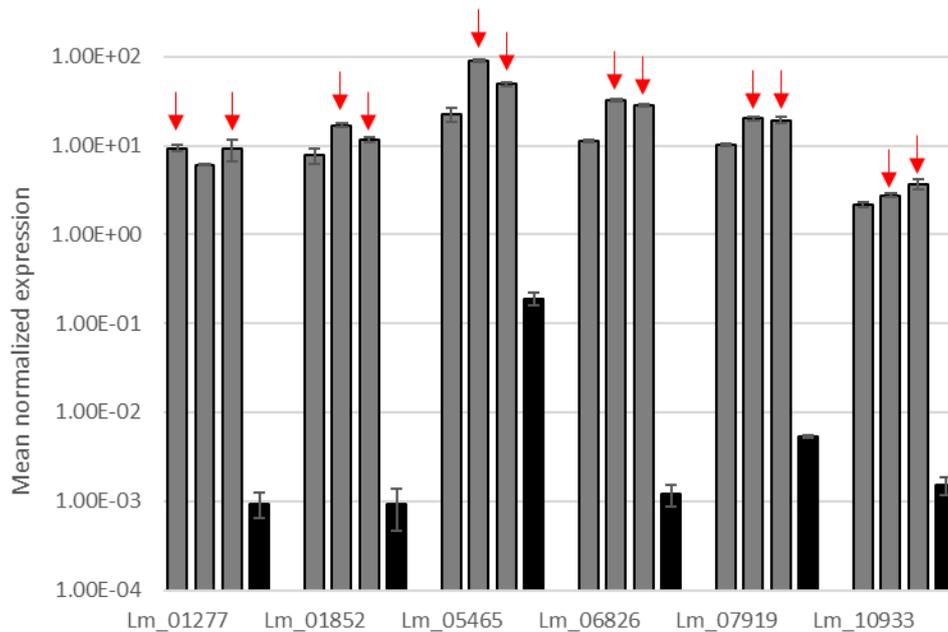


Figure SII.4: Expression values of late effector genes in “over-expressed in cotyledons” (OEC) mutants during early stage of cotyledon colonization

OEC mutants were built, expressing the effector candidate genes *Lm1277*, *Lm1852*, *Lm5465*, *Lm6826*, *Lm7919* and *Lm10933* under the control of the promoter of the *AvrLm4-7* gene, specifically over-expressed during the early colonization stage of cotyledons. The expression of the effector genes in the different OEC mutants was assessed seven days post inoculation, by qRT-PCR in infected cotyledons of the cultivar ‘Darmor’. Expression data from three different mutants are represented by grey bars, while expression in the wild-type isolate (INV13.269) is represented by a black bar. For the screening of plant genotypes, the OEC mutants selected are indicated by red arrows. The mean expression is normalized with actin, and tubulin was used as a control. Error bars represent the standard error for two biological and two technical replicates.

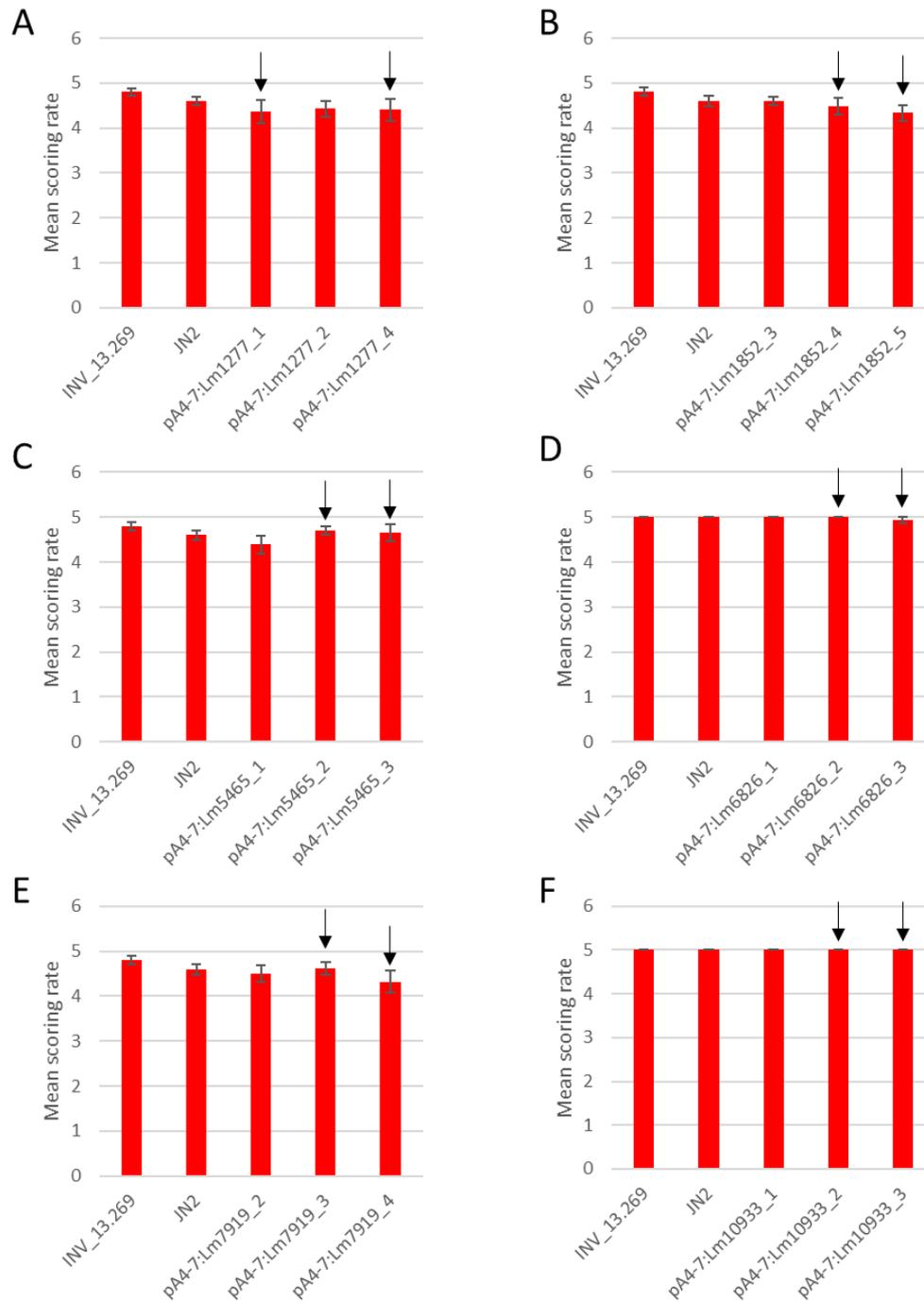


Figure SII.5: Pathogenicity phenotypes of *L. maculans* “over-expressed in cotyledons” (OEC) transformants during early stages of cotyledon colonization

L. maculans transformants expressing late effector genes under the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were inoculated onto the susceptible cultivar ‘Darmor’. Three independent transformants were used per gene construction (A) *Lm1277*, (B) *Lm1852*, (C) *Lm5465*, (D) *Lm6826*, (E) *Lm7919* and (F) *Lm10933*. The bars represent the mean score of symptoms (± standard-error, n>16), based on the IMAScore rating scale, with 1 and 2 corresponding to resistance, 3 to intermediate phenotype, 4 and 5 to susceptibility (Balesdent *et al.*, 2001), 14 days after inoculation. Isolate INV13.269 is the wild-type isolate and isolate JN2 is used as an additional control. Black arrows indicate transformants selected to screen genotypes of *B. napus*.

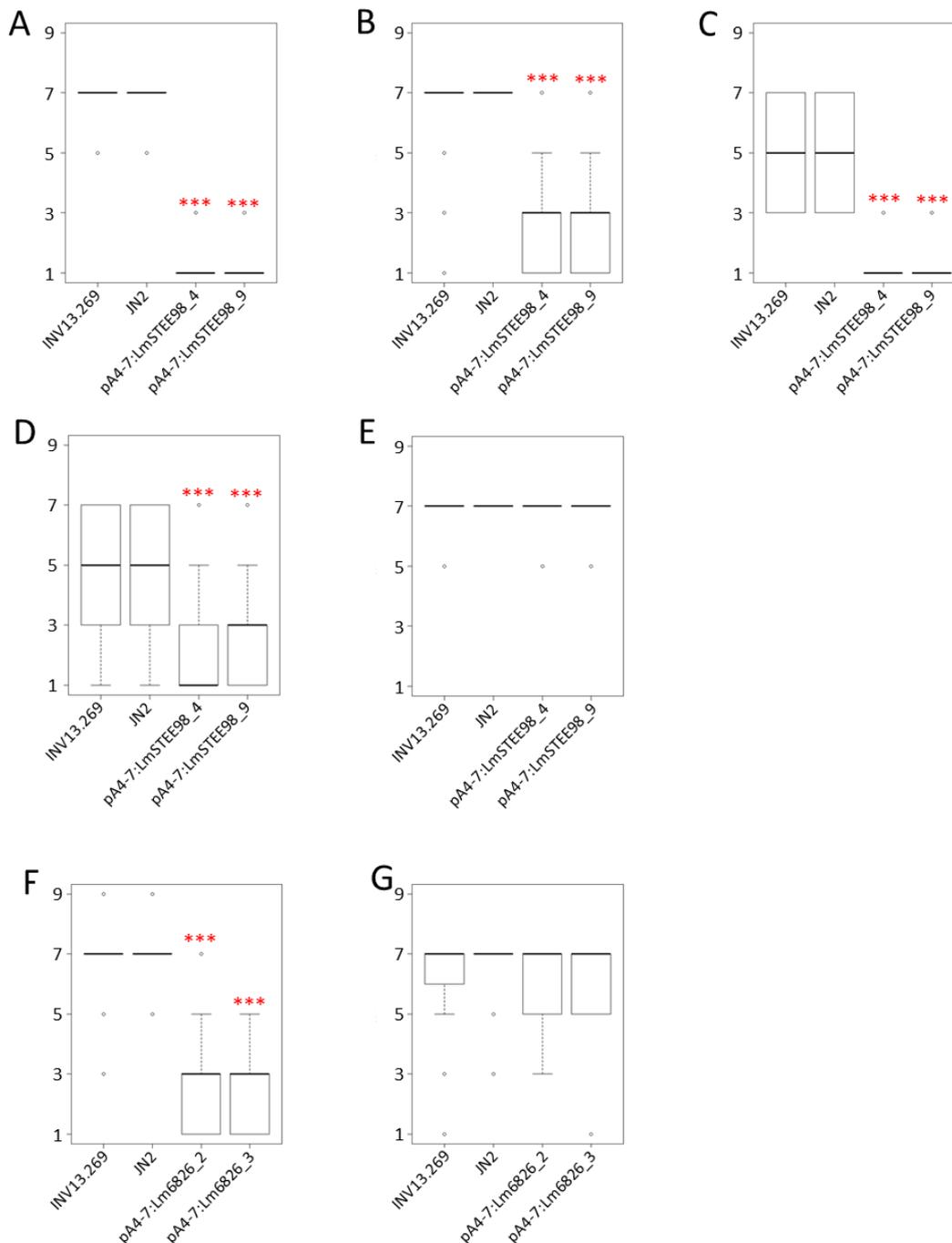


Figure SII.6: Validation of resistance responses of five oilseed rape cultivars towards late effector genes, at Innolea.

L. maculans transformants expressing *LmSTEE98* and *Lm6826* under the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were inoculated onto the cultivars cultivars (A) 'Yudal', (B) RG021, (C) RG047, (D) RG072, (E) RG030, (F) RG007 or (G) RG088, RG030 and RG088 corresponding to susceptible controls. Two independent transformants were used per construction. The boxplots represent the median score of symptoms, based on the rating scale from Williams (1985), with 1 and 3 corresponding to resistance, 5 to intermediate phenotype, 7 and 9 to susceptibility, 12 days after inoculation (n>20). Isolate INV13.269 is the wild-type isolate and isolate JN2 is used as an additional control. The asterisks indicate a significant difference between the control isolate INV13.269 and the *L. maculans* transformants (Kruskal-Wallis test: ***: p-value < 0.001).

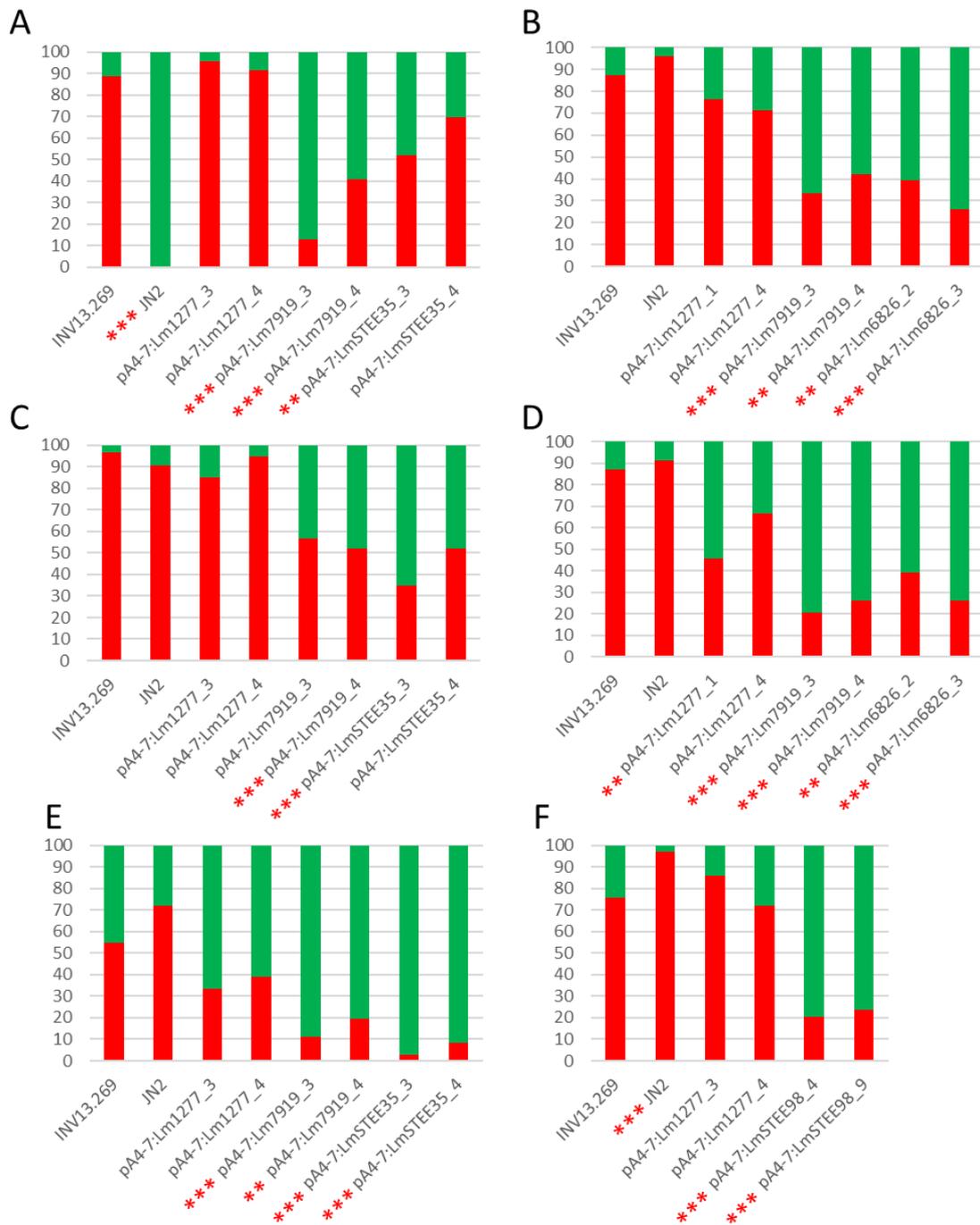


Figure SII.7: Reduced susceptibility of six oilseed rape cultivars towards “late” effector genes, observed at INRAE

L. maculans mutants expressing *Lm1277*, *LmSTEE98*, *LmSTEE35*, *Lm6826*, *Lm7919* or *LmSTEE35* under the promoter of the avirulence gene *AvrLm4-7* were inoculated onto the cultivars (A) INN_VAR04, (B) INN_VAR11, (C) INN_VAR14, (D) INN_VAR17, (E) RG074 and (F) RG009. Two independent mutants were used per construction. The bars represent the proportion of avirulent (in green) and virulent (in red) phenotypes, based on the IMAScore rating scale, considering scores of 1 and 2 as resistant phenotypes and scores of 3 to 5 as susceptible phenotypes (Balesdent *et al.*, 2001), 14 days after inoculation. Isolate INV13.269 is the wild-type isolate and isolate JN2 is used as an additional control. Resistance phenotype of INN_VAR04 to JN2 is linked to the presence of *Rlm7* recognizing *AvrLm4-7*. The asterisks indicate a significant difference between the control isolate INV13.269 and the *L. maculans* transformants (Chi² test: **: *p*-value < 0.01; ***: *p*-value < 0.001), combining two biological replicates.

Table SII.1: Data from Leptolife project, used for expression profiles of *LmSTEE* genes

(A) Raw count

Experimental conditions	Lmb_jn3_01277		Lmb_jn3_01852		Lmb_jn3_05465		Lmb_jn3_06826		Lmb_jn3_07919		Lmb_jn3_10933	
	In vitro	'Bristol'	In vitro	'Darmor-bzh'	In vitro	'Darmor-bzh'	In vitro	'Darmor-bzh'	In vitro	'Bristol'	In vitro	'Darmor-bzh'
V8	3	-	3	-	180	-	15	-	152	-	186	-
	0	-	5	-	316	-	12	-	212	-	194	-
2	-	12	-	0	-	17	-	1	-	12	-	15
	-	0	-	0	-	10	-	0	-	4	-	1
5	-	3	-	0	-	7	-	0	-	11	-	9
	-	1	-	0	-	22	-	1	-	23	-	7
7	-	13	-	9	-	130	-	3	-	50	-	16
	-	0	-	1	-	174	-	2	-	31	-	25
9	-	29	-	14	-	611	-	22	-	518	-	180
	-	39	-	35	-	1235	-	39	-	949	-	241
12	-	14	-	7	-	1032	-	11	-	1226	-	804
	-	10	-	8	-	825	-	11	-	1257	-	703
15	-	2	-	1	-	604	-	1	-	717	-	638
	-	2	-	8	-	789	-	4	-	1018	-	717
7	-	73	-	306	-	2545	-	118	-	526	-	218
	-	162	-	448	-	638	-	128	-	848	-	290
Petiole	-	23	-	77	-	6573	-	5	-	1415	-	601
	-	213	-	125	-	10515	-	62	-	3938	-	1160
14	-	177	-	45	-	413	-	86	-	262	-	219
	-	124	-	19	-	564	-	98	-	234	-	129
Stem	-	140	-	22	-	496	-	95	-	188	-	135
	-	72	-	29	-	99	-	83	-	140	-	248
28	-	67	-	5	-	113	-	29	-	141	-	127
	-	11	-	4	-	21	-	12	-	40	-	78
	-	148	-	4	-	211	-	70	-	370	-	388

(B) Library size

Experimental conditions	Sampling time-point	<i>In vitro</i>	'Darmor-bzh'	'Bristol'
V8	-	15945450	-	-
	-	16764350	-	-
Cotyledons	2	-	2293844	-
		-	1532671	-
	5	-	1013318	-
		-	1368517	-
	7	-	5765158	-
		-	10805171	-
	9	-	45569791	-
		-	40273217	-
	12	-	58085469	-
		-	56705331	-
15	-	70025188	-	
	-	46162195	-	
Petiole	7	-	28746337	26977086
		-	10520496	10871577
	14	-	69361925	-
		-	62020873	-
Stem	14	-	2019016	4240984
		-	1594391	1942580
		-	1486340	1871299
	28	-	1016410	1390614
		-	204272	1211021
		-	646605	1270712

Table SII. 2: Statistics of differential expression for late effector genes, using RNAseq controlled conditions data from Leptolife project
 Cotyledons, petiole and stem samples from controlled conditions, on cultivar 'Darmor' (A)
 Bold values correspond to $\text{Log}_2(\text{FC}) > 1.5$ and a p-value < 0.05

'Darmor'	2dpi		5dpi		7dpi		9dpi		12dpi		15dpi		7dpi		14dpi		14dpi		28dpi		Lmb genes
	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	
In vitro	-5.55	0.01	-4.64	0.13	-3.91	0.07	-3.48	0.06	-1.34	0.51	0.87	0.73	-7.10	0.00	-4.86	0.01	-10.02	0.00	9.87	0.00	Lmb_jn3_01277
	5.11	0.56	5.11	0.63	-2.15	0.14	-1.69	0.15	0.65	0.62	1.10	0.44	-7.35	0.00	-3.25	0.01	-6.29	0.00	6.50	0.00	Lmb_jn3_01852
2dpi	0.47	0.39	-0.21	0.70	-1.10	0.02	-1.02	0.03	-0.33	0.46	-0.18	0.68	-2.83	0.00	-3.75	0.00	-4.55	0.00	3.31	0.00	Lmb_jn3_05465
	1.03	0.65	0.43	0.86	0.65	0.62	-0.26	0.76	1.85	0.06	3.64	0.00	-3.86	0.00	0.03	0.97	-6.31	0.00	6.47	0.00	Lmb_jn3_06826
5dpi	0.81	0.37	-0.89	0.27	0.28	0.69	-1.12	0.10	-1.19	0.08	-0.95	0.16	-2.79	0.00	-2.54	0.00	-3.85	0.00	4.27	0.00	Lmb_jn3_07919
	0.91	0.24	0.23	0.76	1.45	0.03	0.77	0.18	-0.40	0.47	-0.50	0.37	-1.20	0.04	-0.85	0.13	-3.26	0.00	4.75	0.00	Lmb_jn3_10933
7dpi	0.90	0.67	1.64	0.33	2.07	0.18	4.21	0.02	6.41	0.00	0.69	0.62	-1.55	0.24	0.69	0.62	-4.47	0.00	-4.32	0.00	Lmb_jn3_01277
	0.00	1.00	-7.27	0.25	-6.80	0.30	-4.46	0.64	-4.01	0.69	-4.01	0.69	-12.46	0.00	-8.37	0.10	-11.40	0.00	-11.61	0.00	Lmb_jn3_01852
9dpi	-0.68	0.28	-1.57	0.01	-1.49	0.01	-0.80	0.15	-0.66	0.23	-0.66	0.23	-3.31	0.00	-4.22	0.00	-5.03	0.00	-3.78	0.00	Lmb_jn3_05465
	-0.60	0.86	-0.38	0.88	-1.29	0.56	0.82	0.76	2.60	0.41	-4.89	0.01	-1.00	0.66	-1.00	0.66	-7.35	0.00	-7.50	0.00	Lmb_jn3_06826
12dpi	-1.70	0.10	-0.53	0.57	-1.93	0.04	-1.99	0.03	-1.75	0.06	-1.75	0.06	-3.60	0.00	-3.34	0.00	-4.65	0.00	-5.08	0.00	Lmb_jn3_07919
	-0.68	0.47	0.54	0.52	-0.14	0.85	-1.31	0.09	-1.41	0.07	-1.41	0.07	-2.11	0.01	-1.76	0.03	-4.17	0.00	-5.66	0.00	Lmb_jn3_10933
15dpi	0.74	0.74	1.17	0.59	3.31	0.20	5.51	0.02	4.78	0.02	4.78	0.02	-2.45	0.16	-0.22	0.91	-5.38	0.00	-5.22	0.00	Lmb_jn3_01277
	-7.27	0.33	-6.80	0.39	-4.46	0.70	-4.01	0.74	-12.46	0.00	-8.37	0.16	-11.40	0.00	-11.40	0.00	-11.40	0.00	-11.61	0.00	Lmb_jn3_01852
Cotyledons	-0.89	0.11	-0.81	0.14	-0.12	0.83	0.03	0.96	-2.62	0.00	-3.54	0.00	-4.34	0.00	-4.34	0.00	-4.34	0.00	-3.10	0.00	Lmb_jn3_05465
	0.21	0.94	-0.69	0.77	1.42	0.62	3.20	0.34	-4.30	0.02	-0.40	0.87	-6.75	0.00	-6.75	0.00	-6.75	0.00	-6.90	0.00	Lmb_jn3_06826
7dpi	1.17	0.17	-0.23	0.77	-0.30	0.70	-0.06	0.94	-1.90	0.02	-1.65	0.04	-2.96	0.00	-2.96	0.00	-2.96	0.00	-3.38	0.00	Lmb_jn3_07919
	1.22	0.17	0.54	0.49	-0.63	0.41	-0.73	0.34	-1.43	0.07	-1.08	0.16	-3.49	0.00	-3.49	0.00	-3.49	0.00	-4.98	0.00	Lmb_jn3_10933
9dpi	0.43	0.76	2.57	0.11	4.78	0.02	3.19	0.02	-3.19	0.00	-0.95	0.47	-6.11	0.00	-6.11	0.00	-6.11	0.00	-5.96	0.00	Lmb_jn3_01277
	0.47	0.69	2.81	0.05	3.26	0.03	2.81	0.05	3.26	0.03	3.26	0.03	-5.20	0.00	-5.20	0.00	-5.20	0.00	-4.35	0.00	Lmb_jn3_01852
12dpi	0.08	0.85	0.77	0.09	0.92	0.05	1.74	0.00	-2.65	0.00	-2.65	0.00	-3.46	0.00	-3.46	0.00	-3.46	0.00	-2.21	0.00	Lmb_jn3_05465
	-0.91	0.46	1.21	0.40	2.99	0.09	-4.51	0.00	-0.62	0.62	-0.62	0.62	-6.96	0.00	-6.96	0.00	-6.96	0.00	-7.12	0.00	Lmb_jn3_06826
15dpi	-1.40	0.06	-1.46	0.05	-1.23	0.09	-3.07	0.00	-2.81	0.00	-2.81	0.00	-4.13	0.00	-4.13	0.00	-4.13	0.00	-4.55	0.00	Lmb_jn3_07919
	-0.68	0.29	-1.85	0.01	-1.95	0.01	-2.65	0.00	-2.30	0.00	-2.30	0.00	-6.54	0.00	-6.54	0.00	-6.54	0.00	-6.39	0.00	Lmb_jn3_01277
Cotyledons	2.14	0.08	4.34	0.01	-3.62	0.00	-1.39	0.18	-6.54	0.00	-6.54	0.00	-4.60	0.00	-4.60	0.00	-4.60	0.00	-4.81	0.00	Lmb_jn3_01852
	2.34	0.03	2.79	0.02	-5.66	0.00	-1.57	0.07	-3.54	0.00	-3.54	0.00	-2.73	0.00	-2.73	0.00	-2.73	0.00	-2.29	0.00	Lmb_jn3_05465
Cotyledons	0.69	0.12	0.83	0.07	-1.82	0.00	-3.61	0.00	-3.61	0.00	-3.61	0.00	-6.06	0.00	-6.06	0.00	-6.06	0.00	-6.21	0.00	Lmb_jn3_06826
	2.11	0.02	3.89	0.00	-1.67	0.02	-1.42	0.04	-2.73	0.00	-2.73	0.00	-4.03	0.00	-4.03	0.00	-4.03	0.00	-5.52	0.00	Lmb_jn3_07919
Cotyledons	-0.07	0.92	0.17	0.79	-1.67	0.02	-1.42	0.04	-1.62	0.01	-1.62	0.01	-8.68	0.00	-8.68	0.00	-8.68	0.00	-8.53	0.00	Lmb_jn3_01277
	-1.17	0.05	-1.27	0.03	-5.76	0.00	-3.52	0.01	-3.52	0.01	-3.52	0.01	-6.94	0.00	-6.94	0.00	-6.94	0.00	-7.15	0.00	Lmb_jn3_01852
Cotyledons	0.45	0.71	-8.00	0.00	-3.91	0.00	-3.91	0.00	-3.91	0.00	-3.91	0.00	-4.23	0.00	-4.23	0.00	-4.23	0.00	-2.98	0.00	Lmb_jn3_05465
	0.14	0.74	-2.51	0.00	-5.72	0.00	-1.83	0.04	-8.17	0.00	-8.17	0.00	-2.66	0.00	-2.66	0.00	-2.66	0.00	-3.08	0.00	Lmb_jn3_06826
Cotyledons	1.78	0.15	-1.60	0.02	-1.35	0.05	-0.45	0.40	-7.96	0.00	-7.96	0.00	-10.89	0.00	-10.89	0.00	-10.89	0.00	-10.73	0.00	Lmb_jn3_07919
	0.24	0.71	-1.60	0.02	-1.35	0.05	-0.45	0.40	-7.96	0.00	-7.96	0.00	-10.89	0.00	-10.89	0.00	-10.89	0.00	-10.73	0.00	Lmb_jn3_10933
Cotyledons	-0.10	0.85	-7.96	0.00	-8.45	0.00	-4.36	0.00	-7.39	0.00	-7.39	0.00	-4.37	0.00	-4.37	0.00	-4.37	0.00	-3.12	0.00	Lmb_jn3_01852
	-0.70	0.21	-1.84	0.01	-1.59	0.02	-2.76	0.00	-2.76	0.00	-2.76	0.00	-9.95	0.00	-9.95	0.00	-9.95	0.00	-10.11	0.00	Lmb_jn3_05465
Cotyledons	-0.70	0.21	-1.84	0.01	-1.59	0.02	-2.76	0.00	-2.76	0.00	-2.76	0.00	-9.95	0.00	-9.95	0.00	-9.95	0.00	-10.11	0.00	Lmb_jn3_06826
	-0.70	0.21	-1.84	0.01	-1.59	0.02	-2.76	0.00	-2.76	0.00	-2.76	0.00	-9.95	0.00	-9.95	0.00	-9.95	0.00	-10.11	0.00	Lmb_jn3_07919
Cotyledons	-0.70	0.21	-1.84	0.01	-1.59	0.02	-2.76	0.00	-2.76	0.00	-2.76	0.00	-9.95	0.00	-9.95	0.00	-9.95	0.00	-10.11	0.00	Lmb_jn3_10933

Cotyledons, petiole and stem samples from controlled conditions, on cultivar 'Darmor' (A)
 Bold values correspond to Log2(FC) > 1.5 and a p-value < 0.05

	2dpi		5dpi		7dpi		9dpi		12dpi		15dpi		7dpi		14dpi		14dpi		14dpi		28dpi		Lmb_genes		
	LogFC	p-value																							
Petiole																									
Stem																									

Cotyledons, petiole and stem samples from controlled conditions, on cultivar 'Bristol' (B)
Bold values correspond to Log2(FC) > 1.5 and a p-value <0.05

'Darmor' and 'Bristol'	2dpi		5dpi		7dpi		9dpi		12dpi		15dpi		7dpi		14dpi		28dpi		Lmb genes
	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	
In vitro	-5.45	0.00	-4.53	0.05	-3.88	0.02	-3.43	0.01	-1.29	0.37	0.90	0.62	-7.12	0.00	-10.04	2.3E-08	-10.02	2.4E-08	Lmb_jn3_01277
	4.96	0.45	4.96	0.53	-2.15	0.07	-1.65	0.08	0.69	0.51	1.15	0.30	-6.78	0.00	-6.33	4.2E-07	-5.97	1.4E-06	Lmb_jn3_01852
Coty_J2	0.57	0.25	-0.11	0.83	-1.10	0.01	-0.98	0.02	-0.28	0.46	-0.13	0.73	-2.85	0.00	-4.14	4.3E-09	-3.40	5.8E-08	Lmb_jn3_05465
	1.12	0.44	0.53	0.73	0.64	0.44	-0.22	0.67	1.89	0.00	3.67	0.00	-3.45	0.00	-6.00	3.0E-10	-6.13	2.4E-10	Lmb_jn3_06826
Coty_J5	0.89	0.20	-0.79	0.20	0.28	0.59	-1.08	0.03	-1.15	0.03	-0.90	0.07	-2.65	0.00	-3.88	4.7E-07	-4.49	9.2E-08	Lmb_jn3_07919
	0.99	0.09	0.34	0.55	1.44	0.01	0.80	0.06	-0.36	0.37	-0.45	0.26	-1.09	0.01	-3.57	4.7E-08	-4.55	1.6E-09	Lmb_jn3_10933
Coty_J7	0.93	0.54	1.57	0.20	2.02	0.07	4.16	0.00	4.16	0.00	6.36	0.00	-1.66	0.08	-4.58	3.8E-05	-4.57	4.2E-05	Lmb_jn3_01277
	0.00	1.00	-7.11	0.14	-6.61	0.19	-4.27	0.55	-3.81	0.61	-11.74	0.00	-11.74	0.00	-11.29	9.5E-05	-10.93	2.7E-04	Lmb_jn3_01852
Coty_J9	-0.67	0.25	-1.67	0.00	-1.55	0.00	-0.85	0.09	-0.70	0.16	-3.41	0.00	-3.41	0.00	-4.70	5.1E-09	-3.97	6.2E-08	Lmb_jn3_05465
	-0.58	0.79	-0.48	0.78	-1.34	0.34	0.77	0.65	2.55	0.21	-4.57	0.00	-4.57	0.00	-7.11	4.1E-08	-7.24	3.1E-08	Lmb_jn3_06826
Coty_J11	-1.68	0.04	-0.61	0.39	-1.98	0.01	-2.04	0.01	-1.80	0.01	-1.80	0.01	-3.55	0.00	-4.77	4.8E-07	-5.38	1.0E-07	Lmb_jn3_07919
	-0.66	0.36	0.45	0.48	-0.19	0.74	-1.35	0.02	-1.44	0.01	-2.08	0.00	-2.08	0.00	-4.56	3.3E-08	-5.64	1.5E-09	Lmb_jn3_10933
Coty_J12	0.64	0.69	1.10	0.48	3.23	0.09	5.43	0.02	2.59	0.03	4.78	0.00	-2.59	0.04	-5.51	3.8E-05	-5.49	4.1E-05	Lmb_jn3_01277
	-7.11	0.21	-6.61	0.27	-4.27	0.62	-3.81	0.68	-11.74	0.00	-11.74	0.00	-11.74	0.00	-11.29	3.4E-04	-10.93	8.9E-04	Lmb_jn3_01852
Coty_J15	-0.99	0.05	-0.87	0.08	-0.18	0.71	-0.03	0.96	-2.74	0.00	-4.63	0.00	-4.63	0.00	-4.03	3.9E-08	-3.29	6.9E-07	Lmb_jn3_05465
	0.11	0.95	-0.76	0.61	1.35	0.46	3.13	0.15	-3.98	0.00	-6.53	2.3E-07	-6.66	1.7E-07	-6.53	2.3E-07	-6.66	1.7E-07	Lmb_jn3_06826
Coty_J17	1.07	0.10	-0.30	0.61	-0.36	0.53	-0.11	0.85	-1.86	0.00	-3.09	2.6E-05	-3.70	3.4E-06	-3.09	2.6E-05	-3.70	3.4E-06	Lmb_jn3_07919
	1.11	0.10	0.47	0.43	-0.69	0.22	-0.79	0.17	-1.42	0.02	-3.91	3.0E-07	-4.99	8.6E-09	-3.91	3.0E-07	-4.99	8.6E-09	Lmb_jn3_10933
Coty_J19	0.45	0.65	2.59	0.03	4.78	0.00	-3.23	0.00	-3.23	0.00	-6.15	1.3E-06	-6.14	1.3E-06	-6.15	1.3E-06	-6.14	1.3E-06	Lmb_jn3_01277
	0.50	0.59	2.84	0.01	3.29	0.01	-4.63	0.00	-4.63	0.00	-4.18	4.3E-05	-3.82	1.7E-04	-4.18	4.3E-05	-3.82	1.7E-04	Lmb_jn3_01852
Coty_J21	0.12	0.76	0.05	0.97	0.02	0.02	0.02	0.02	-3.04	2.5E-07	-2.30	8.0E-06	-3.04	2.5E-07	-2.30	8.0E-06	-3.04	2.5E-07	Lmb_jn3_05465
	-0.87	0.27	1.25	0.18	3.02	0.01	-4.09	0.00	-6.64	1.2E-09	-6.77	9.9E-10	-6.64	1.2E-09	-6.77	9.9E-10	-6.64	1.2E-09	Lmb_jn3_06826
Coty_J23	-1.37	0.02	-1.43	0.01	-1.18	0.03	-2.93	0.00	-4.16	3.9E-07	-4.77	7.9E-08	-4.16	3.9E-07	-4.77	7.9E-08	-4.16	3.9E-07	Lmb_jn3_07919
	-0.64	0.18	-1.80	0.00	-1.89	0.00	-5.01	2.1E-09	-6.09	1.5E-10	-6.60	1.4E-07	-6.59	1.5E-07	-6.60	1.4E-07	-6.59	1.5E-07	Lmb_jn3_10933
Coty_J25	2.14	0.02	4.33	0.00	-3.69	0.00	-3.69	0.00	-4.68	1.9E-06	-4.32	7.5E-06	-4.68	1.9E-06	-4.32	7.5E-06	-4.68	1.9E-06	Lmb_jn3_01852
	0.69	0.08	0.85	0.04	-1.87	0.00	-3.16	1.2E-07	-2.42	3.4E-06	-3.16	1.2E-07	-2.42	3.4E-06	-3.16	1.2E-07	-2.42	3.4E-06	Lmb_jn3_05465
Coty_J27	2.11	0.00	3.89	0.00	-5.77	2.5E-10	-5.90	2.1E-10	-2.79	1.4E-05	-3.40	1.7E-06	-2.79	1.4E-05	-3.40	1.7E-06	-2.79	1.4E-05	Lmb_jn3_07919
	-0.06	0.89	0.18	0.69	-4.37	3.6E-09	-5.45	2.2E-10	-8.74	1.4E-08	-8.73	1.4E-08	-8.74	1.4E-08	-8.73	1.4E-08	-8.73	1.4E-08	Lmb_jn3_10933
Coty_J29	-1.16	0.01	-1.25	0.00	-8.02	0.00	-8.02	0.00	-7.93	4.5E-08	-7.11	1.3E-07	-7.93	4.5E-08	-7.11	1.3E-07	-7.93	4.5E-08	Lmb_jn3_01852
	2.20	0.09	0.46	0.63	-7.47	0.00	-7.47	0.00	-3.85	9.5E-09	-3.12	1.5E-07	-3.85	9.5E-09	-3.12	1.5E-07	-3.85	9.5E-09	Lmb_jn3_05465
Coty_J31	0.15	0.69	1.78	0.03	-5.34	0.00	-7.88	9.2E-12	-8.02	8.0E-12	-2.73	1.8E-05	-3.34	2.1E-06	-2.73	1.8E-05	-3.34	2.1E-06	Lmb_jn3_06826
	0.25	0.60	-0.09	0.81	-3.22	1.5E-07	-4.29	3.9E-09	-10.94	5.0E-09	-10.92	5.3E-09	-10.94	5.0E-09	-10.92	5.3E-09	-10.92	5.3E-09	Lmb_jn3_07919
Coty_J33	-0.73	0.07	-8.02	0.00	-7.93	0.00	-4.01	5.9E-09	-3.27	8.7E-08	-9.66	2.9E-12	-9.79	2.6E-12	-9.66	2.9E-12	-9.79	2.6E-12	Lmb_jn3_06826
	-0.73	0.07	-1.75	0.00	-1.75	0.00	-3.12	2.2E-07	-4.20	5.2E-09	-3.12	2.2E-07	-4.20	5.2E-09	-3.12	2.2E-07	-4.20	5.2E-09	Lmb_jn3_10933

Cotyledons, petiole and stem samples from controlled conditions, on cultivar 'Bristol' (B)
 Bold values correspond to Log2(FC) > 1.5 and a p-value <0.05

	'Darmor' and 'Bristol'		Cotyledons 'Darmor'		Petiole 'Bristol'		Stem 'Bristol'		Lmb genes
	2dpi	5dpi	7dpi	9dpi	15dpi	7dpi	14dpi	28dpi	
	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	LogFC	p-value	
Petiole									
									Lmb_jn3_01277
							-2.92	0.00	0.00
Pet_17							0.45	0.40	0.81
							-1.29	0.00	-0.55
							-2.55	0.00	-2.68
							-1.22	0.01	-1.84
							-2.49	0.00	-3.56
									Lmb_jn3_01277
Stem									
									Lmb_jn3_01852
									Lmb_jn3_05465
									Lmb_jn3_06826
									Lmb_jn3_07919
									Lmb_jn3_10933
									Lmb_jn3_01277
									Lmb_jn3_01852
									Lmb_jn3_05465
									Lmb_jn3_06826
									Lmb_jn3_07919
									Lmb_jn3_10933

Table SII.3: Isolates used for polymorphism studies in *Leptosphaeria maculans* populations

Name	Country	Region	Sampling date	Reference	Isolated from <i>B. napus</i> cv.	Lm1277 (PCR)	Lm1277 (Seq.)	Lm1852 (PCR)	Lm1852 (Seq.)	Lm5465 (PCR)	Lm5465 (Seq.)	Lm6826 (PCR)	Lm6826 (Seq.)	Lm7919 (PCR)	Lm7919 (Seq.)	Lm10933 (PCR)	Lm10933 (Seq.)
IBCN14	Australia	na	1988	Mendes-Pereira et al., 2003	<i>B. napus</i>	presence	0	presence	0								
IBCN18	Australia	na			<i>B. napus</i>	presence	0	presence	0	presence	0	presence	0	presence	>I (38)	presence	0
WA74	Australia	Western Australia	2005	Mendes-Pereira et al., 2003	<i>B. napus</i>	presence	0	presence	0	presence	0	presence	0	presence	>I (20)	presence	0
WT47	Australia	Western Australia	2005		<i>B. napus</i>	presence	0	presence	0								
WT86	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT101	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT15	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT3	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT30	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT31	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT32	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT50	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT51	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT57	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT75	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT08	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT92	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT12	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT91	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT64	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT33	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
WT78	Australia	Western Australia	2005		Westar	presence	0	presence	0								
AD1198	Canada	Lanigan (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD1294	Canada	Fort Saskatchewan (Alberta)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD1366	Canada	We Saskatchewan (Alberta)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD323	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD336	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0	presence	L>1 (12)	presence	0	presence	0	presence	0
AD372	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD379	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD420	Canada	Kincardine (Ontario)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD478	Canada	Rosherm (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD539	Canada	Saskatoon (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD717	Canada	Roland (Manitoba)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0	presence	0	presence	0	presence	>I (38)	presence	0
AD752	Canada	Camrose (Alberta)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD847	Canada	Birch hills (Saskatchewan)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD879	Canada	Elm Creek (Manitoba)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD917	Canada	Brandon (Manitoba)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD987	Canada	Letellier (Manitoba)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD1018	Canada	Moris (Manitoba)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD1120	Canada		2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD951	Canada		2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD673	Canada		2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD462	Canada		2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD190	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Surpass 400	presence	0	presence	0								
AD194	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Surpass 400	presence	0	presence	0								
AD217	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD219	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Westar	presence	0	presence	0								
AD238	Chile	Chile (Temuco)	2005 and 2006	Dilmaghani et al., 2009	Surpass 400	presence	0	presence	0								
EPH17.1	France	Veneuil (Etiang Seine-et-Maine)	2017	unpublished (EPHICAS project)		presence	0	presence	0								
EPH17.4	France	Veneuil (Etiang Seine-et-Maine)	2017	unpublished (EPHICAS project)		presence	0	presence	0	presence	L>1 (12)	presence	0	presence	0	presence	0
EPH17.7	France	Veneuil (Etiang Seine-et-Maine)	2017	unpublished (EPHICAS project)		presence	0	presence	0								
EPH17.10	France	Veneuil (Etiang Seine-et-Maine)	2017	unpublished (EPHICAS project)		presence	0	presence	0								
EPH17.13	France	Veneuil (Etiang Seine-et-Maine)	2017	unpublished (EPHICAS project)		presence	0	presence	0								
EPH17.16	France	Veneuil (Etiang Seine-et-Maine)	2017	unpublished (EPHICAS project)		presence	0	presence	0								
EPH17.19	France	Veneuil (Etiang Seine-et-Maine)	2017	unpublished (EPHICAS project)		presence	0	presence	0								
EPH17.22	France	Veneuil (Etiang Seine-et-Maine)	2017	unpublished (EPHICAS project)		presence	0	presence	0								
EPH17.26	France	Veneuil (Etiang Seine-et-Maine)	2017	unpublished (EPHICAS project)		presence	0	presence	0								
EPH17.29	France	Veneuil (Etiang Seine-et-Maine)	2017	unpublished (EPHICAS project)		presence	0	presence	0								

Table SII.4: Twenty first BLASTp results details for each selected "late" effector

Late effector genes	Accession ID	Identity (%)	Coverage (%)	Species	Predicted Function	E-value	Bitscore	Accession length
Lmb_jn3_01277	XP_003834199.1	95	90	<i>Leptosphaeria maculans</i> (JN3)	hypothetical protein LEMA_P058680.1	1E-62	197	139
Lmb_jn3_01277	KAF2847049.1	68	94	<i>Plenodomus tracheiphilus</i> (IPT5)	hypothetical protein T440DRAFT_471373	5E-43	145	102
Lmb_jn3_01277	KAF1843469.1	54	94	<i>Cucurbitaria berberidis</i> (CBS 394.84)	hypothetical protein K460DRAFT_341652	1E-33	122	102
Lmb_jn3_01277	KAF1913180.1	49	99	<i>Ampelomyces quisqualis</i>	hypothetical protein BDU57DRAFT_532261	2E-26	104	102
Lmb_jn3_01277	XP_014076182.1	55	98	<i>Bipolaris maydis</i> (ATCC 48331)	hypothetical protein COCC4DRAFT_52498	2E-26	103	98
Lmb_jn3_01277	XP_014559143.1	55	98	<i>Bipolaris victoriae</i> (F13)	hypothetical protein COCV1DRAFT_92660	3E-26	103	98
Lmb_jn3_01277	XP_007710003.1	55	98	<i>Bipolaris zeicola</i> (26-R-13)	hypothetical protein COCCADRAFT_90064	3E-26	103	98
Lmb_jn3_01277	XP_033446723.1	48	94	<i>Didymella exigua</i> (CBS 183.55)	uncharacterized protein M421DRAFT_422805	8E-26	102	104
Lmb_jn3_01277	XP_007699379.1	54	98	<i>Bipolaris sorokiniana</i> (ND90Pr)	uncharacterized protein COCSADRAFT_180833	9E-26	102	98
Lmb_jn3_01277	XP_033387713.1	50	96	<i>Aaosphaeria arxii</i> (CBS 175.79)	uncharacterized protein BU24DRAFT_489351	1E-24	99.8	106
Lmb_jn3_01277	OAL03409.1	58	76	<i>Stagonospora sp.</i> (SRC1sM3a)	hypothetical protein IQ06DRAFT_344662	2E-24	99.4	101
Lmb_jn3_01277	XP_033560677.1	56	84	<i>Macroventuria anomochaeta</i>	uncharacterized protein BU25DRAFT_422636	3E-24	101	189
Lmb_jn3_01277	XP_007684870.1	53	98	<i>Bipolaris oryzae</i> (ATCC 44560)	hypothetical protein COCM1DRAFT_86760	4E-24	98.2	98
Lmb_jn3_01277	XP_033519343.1	48	94	<i>Dothidothia symphoricarpi</i> (CBS 119687)	uncharacterized protein P153DRAFT_400453	9E-24	97.1	98
Lmb_jn3_01277	EFQ91633.1	51	74	<i>Pyrenophora teres f. teres</i>	hypothetical protein PTT_11465	5E-23	95.9	113
Lmb_jn3_01277	KAE8827770.1	51	74	<i>Pyrenophora teres f. teres</i>	hypothetical protein HRS9122_09751	5E-23	95.9	122
Lmb_jn3_01277	KAF2787985.1	47	95	<i>Melanomma pulvis-pyrius</i> (CBS 109.77)	hypothetical protein K505DRAFT_366876	8E-23	94.4	87
Lmb_jn3_01277	KAF3034837.1	66	56	<i>Didymella keratinophila</i>	hypothetical protein E8E11_005193	9E-23	95.1	112
Lmb_jn3_01277	XP_033677978.1	68	59	<i>Trematosphaeria pertusa</i>	uncharacterized protein BU26DRAFT_570388	1E-22	94	91
Lmb_jn3_01277	KAF2437809.1	43	89	<i>Karstenula rhodostoma</i> (CBS 690.94)	hypothetical protein P171DRAFT_449571	6E-22	92.8	105
Lmb_jn3_05465	XP_003845079.1	100	98	<i>Leptosphaeria maculans</i> (JN3)	hypothetical protein LEMA_uP003870.1	2E-61	191	95
Lmb_jn3_05465	KAF2851957.1	82	98	<i>Plenodomus tracheiphilus</i> (IPT5)	hypothetical protein T440DRAFT_447411	2E-50	164	95
Lmb_jn3_05465	KNG46087.1	76	98	<i>Stemphylium lycopersici</i>	hypothetical protein TW65_07109	6E-46	152	95
Lmb_jn3_05465	XP_018036841.1	80	98	<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i>	hypothetical protein CC84DRAFT_1091117	8E-46	152	94
Lmb_jn3_05465	XP_018387840.1	77	98	<i>Alternaria alternata</i>	hypothetical protein CC77DRAFT_1059325	6E-45	150	95
Lmb_jn3_05465	RYN34371.1	76	98	<i>Alternaria tenuissima</i>	hypothetical protein AA0115_g2914	3E-45	150	95
Lmb_jn3_05465	XP_007716142.1	80	98	<i>Bipolaris zeicola</i> (26-R-13)	hypothetical protein COCCADRAFT_8254	7E-44	147	95
Lmb_jn3_05465	XP_007692448.1	81	98	<i>Bipolaris oryzae</i> (ATCC 44560)	hypothetical protein COCM1DRAFT_107234	7E-44	147	95
Lmb_jn3_05465	KAF3052068.1	77	93	<i>Didymella keratinophila</i>	hypothetical protein E8E11_007589	8E-42	142	93
Lmb_jn3_05465	KAF5854330.1	81	98	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	hypothetical protein GGP41_007113	2E-41	141	105
Lmb_jn3_05465	XP_007696524.1	81	98	<i>Bipolaris sorokiniana</i> (ND90Pr)	uncharacterized protein COCSADRAFT_34049	2E-41	141	95
Lmb_jn3_05465	KAF3035827.1	76	93	<i>Didymella heteroderae</i>	hypothetical protein E8E12_006378	2E-40	138	97
Lmb_jn3_05465	KAF4924517.1	90	75	<i>Colletotrichum viniferum</i>	hypothetical protein CGCVW01_v004036	6E-40	138	115
Lmb_jn3_05465	XP_014081883.1	79	98	<i>Bipolaris maydis</i> (ATCC 48331)	hypothetical protein COCC4DRAFT_48195	6E-40	137	95
Lmb_jn3_05465	XP_036497387.1	90	75	<i>Colletotrichum siamense</i>	uncharacterized protein CGCS363_v005299	8E-40	137	115
Lmb_jn3_05465	E0846244.1	90	75	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Cg-14)	hypothetical protein CGLO_14737	8E-40	137	115
Lmb_jn3_05465	XP_031891456.1	90	75	<i>Colletotrichum fructicola</i>	uncharacterized protein CGMCC3_g2117	8E-40	137	115
Lmb_jn3_05465	KAF4824274.1	90	75	<i>Colletotrichum siamense</i>	hypothetical protein CGCS363_v001005	9E-40	137	115
Lmb_jn3_05465	TDZ59830.1	89	75	<i>Colletotrichum trifolii</i>	hypothetical protein CTRI78_v005000	1E-39	137	114
Lmb_jn3_05465	TEA22262.1	89	75	<i>Colletotrichum sidae</i>	hypothetical protein C8034_v006768	1E-39	137	115
Lmb_jn3_06826	XP_003845708.1	100	98	<i>Leptosphaeria maculans</i> (JN3)	predicted protein	3E-56	177	86
Lmb_jn3_07919	XP_003837080.1	100	99	<i>Leptosphaeria maculans</i> (JN3)	hypothetical protein LEMA_P033140.1	2E-119	345	190
Lmb_jn3_07919	KAB2102271.1	79	99	<i>Alternaria gaisen</i>	hypothetical protein AG0111_Og10036	3E-94	281	180
Lmb_jn3_07919	XP_028506518.1	79	99	<i>Alternaria arborescens</i>	hypothetical protein AA0111_g6108	7E-94	280	180
Lmb_jn3_07919	KAF7670834.1	79	99	<i>Alternaria burnsii</i>	hypothetical protein GT037_011127	1E-93	280	180
Lmb_jn3_07919	OWY49847.1	79	99	<i>Alternaria alternata</i>	small secreted protein	4E-93	278	180
Lmb_jn3_07919	XP_018383135.1	79	99	<i>Alternaria alternata</i>	hypothetical protein CC77DRAFT_1063719	5E-93	278	180
Lmb_jn3_07919	KAF2845500.1	84	98	<i>Plenodomus tracheiphilus</i> (IPT5)	hypothetical protein T440DRAFT_265751	5E-89	267	173
Lmb_jn3_07919	OAL45397.1	77	97	<i>Pyrenochaeta sp.</i> (DS3sAY3a)	hypothetical protein IQ07DRAFT_520363	1E-83	258	292
Lmb_jn3_07919	KNG51022.1	78	99	<i>Stemphylium lycopersici</i>	small secreted protein	9E-83	252	179
Lmb_jn3_07919	KAF1841235.1	75	97	<i>Cucurbitaria berberidis</i> (CBS 394.84)	hypothetical protein K460DRAFT_348068	5E-81	251	277
Lmb_jn3_07919	KAF5847417.1	71	98	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	hypothetical protein GGP41_000170	3E-77	238	173
Lmb_jn3_07919	XP_007691180.1	71	98	<i>Bipolaris oryzae</i> (ATCC 44560)	hypothetical protein COCM1DRAFT_103885	1E-76	236	173
Lmb_jn3_07919	XP_033675946.1	73	97	<i>Trematosphaeria pertusa</i>	uncharacterized protein BU26DRAFT_405030	7E-76	234	175
Lmb_jn3_07919	PSN62273.1	71	98	<i>Corynespora cassiicola</i> (Philippines)	hypothetical protein BS50DRAFT_53300	9E-75	231	171
Lmb_jn3_07919	KAF1363004.1	70	98	<i>Lizania empirigonia</i>	hypothetical protein E107DRAFT_75885	2E-74	230	173
Lmb_jn3_07919	XP_033387769.1	70	99	<i>Aaosphaeria arxii</i> (CBS 175.79)	uncharacterized protein BU24DRAFT_459103	6E-74	229	174
Lmb_jn3_07919	KAF1938196.1	72	98	<i>Clothospora elyinae</i>	hypothetical protein E102DRAFT_469076	1E-72	228	221
Lmb_jn3_07919	KAF1839380.1	70	97	<i>Decorspora gaudefruyi</i>	hypothetical protein BDW02DRAFT_585053	4E-71	222	170
Lmb_jn3_07919	KAF3044917.1	70	97	<i>Didymella keratinophila</i>	hypothetical protein E8E11_005525	5E-71	225	265
Lmb_jn3_07919	KAF9705394.1	69	96	<i>Ascochyta rabiei</i>	hypothetical protein EKO05_007693	1E-70	225	285
Lmb_jn3_10933	XP_003841554.1	100	98	<i>Leptosphaeria maculans</i> (JN3)	predicted protein	2E-26	100	49
Lmb_jn3_10933	KAF2025049.1	64	98	<i>Setomelanomma holmii</i>	hypothetical protein EK21DRAFT_77352	5E-13	66.2	53
Lmb_jn3_10933	XP_001802371.1	64	98	<i>Parastagonospora nodorum</i> (SN15)	hypothetical protein SNOG_12139	7E-12	63.2	49
Lmb_jn3_10933	KAF2849298.1	78	98	<i>Plenodomus tracheiphilus</i> (IPT5)	hypothetical protein T440DRAFT_519232	7E-12	63.2	50
Lmb_jn3_10933	OAK99847.1	58	98	<i>Stagonospora sp.</i> (SRC1sM3a)	hypothetical protein IQ06DRAFT_348367	1E-11	62.8	50
Lmb_jn3_10933	KAF2743671.1	63	98	<i>Sporormia fimetaria</i> (CBS 119925)	hypothetical protein M011DRAFT_480614	2E-11	62.4	52
Lmb_jn3_10933	XP_033581139.1	57	98	<i>Mytilinidion resinicola</i>	uncharacterized protein BDZ99DRAFT_516785	7E-11	60.8	51
Lmb_jn3_10933	XP_033380079.1	61	98	<i>Aaosphaeria arxii</i> (CBS 175.79)	uncharacterized protein BU24DRAFT_466419	7E-11	60.8	51
Lmb_jn3_10933	KAF1839600.1	71	98	<i>Decorspora gaudefruyi</i>	hypothetical protein BDW02DRAFT_593486	2E-10	59.7	49
Lmb_jn3_10933	KAF2685528.1	64	98	<i>Lentithecium fluviatile</i> (CBS 122367)	hypothetical protein K458DRAFT_387492	2E-10	59.3	52
Lmb_jn3_10933	KAF2500713.1	57	98	<i>Lophium mytilinum</i>	hypothetical protein BU16DRAFT_557167	6E-10	58.5	51
Lmb_jn3_10933	KAF1956769.1	63	98	<i>Byssothecium circinans</i>	hypothetical protein CC80DRAFT_412819	8E-10	58.2	51
Lmb_jn3_10933	OCK99641.1	57	98	<i>Cenococcum geophilum</i> (1.58)	hypothetical protein K441DRAFT_536963	2E-09	57	53
Lmb_jn3_10933	KAF1843794.1	58	98	<i>Cucurbitaria berberidis</i> (CBS 394.84)	hypothetical protein K460DRAFT_408117	4E-09	56.2	49
Lmb_jn3_10933	KAF2869002.1	68	98	<i>Massariosphaeria phaeospora</i>	hypothetical protein BDV95DRAFT_609254	9E-09	55.5	50
Lmb_jn3_10933	XP_018390156.1	72	98	<i>Alternaria alternata</i>	hypothetical protein CC77DRAFT_1057930	1E-08	55.5	50
Lmb_jn3_10933	XP_033687583.1	64	98	<i>Trematosphaeria pertusa</i>	uncharacterized protein BU26DRAFT_562313	1E-08	55.5	53
Lmb_jn3_10933	XP_028512134.1	70	98	<i>Alternaria arborescens</i>	hypothetical protein AA0111_g544	2E-08	54.7	50
Lmb_jn3_10933	KAF2200966.1	53	98	<i>Delitschia confertaspera</i> (ATCC 74209)	hypothetical protein GQ43DRAFT_441012	2E-08	54.7	51
Lmb_jn3_10933	KAF1946580.1	71	98	<i>Clothospora elyinae</i>	hypothetical protein E102DRAFT_418329	2E-08	54.3	49

Table SII.5: BLASTp results details for each late effector against *Leptosphaeria biglobosa* proteins

Late effector genes	BLAST hit on <i>L. biglobosa</i> 'brassicae' proteins ^a	Identity (%)	Coverage (%)	<i>L. biglobosa</i> predicted function	E-value	Bitscore
<i>Lmb_jn3_01277</i>	<i>Lbb_g1214_01270</i>	66	95	none (CFEM-domain)	5E-39	154
<i>Lmb_jn3_01852</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Lmb_jn3_05465</i>	<i>Lbb_g1214_11488</i>	84	100	none	2E-45	175
<i>Lmb_jn3_06826</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Lmb_jn3_07919</i>	<i>Lbb_g1214_10845</i>	90	100	none	5E-85	308
<i>Lmb_jn3_10933</i>	<i>Lbb_g1214_09107</i>	73	100	none	1E-17	83

Table SII.6: List of *Brassica napus* genotypes screened for resistance

(A) 99 genotypes screened at Innolea

Species	Genotypes	Year released	Accession type ^a	Diversity group (PCA)	Origin	Localization of screening	Localization of confirmation tests
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG001	1969	0/+	Winter	The Netherlands	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG002 / ALPAGA	2007	00	Winter	France	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG003	1982?	++	Winter	Belgium	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG004 *	1992	00	Winter	Germany/United-Kingdom	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG005	NA	0/+	Winter	United-Kingdom	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG006	2006	00	Winter	United-Kingdom	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG007	<1979	++	Semi-winter	Japan	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_ANNUA	RG008	<1981	NA	Semi-winter	Korea	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG009	<1981	++	Semi-winter	Japan	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG010	NA	00	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG011	1986?	0/+	Winter	Poland	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG012	2005	00	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG013	NA	++	Winter	Belgium	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.PABULARIA	RG014	NA	NA	Semi-winter	United-Kingdom	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG015	NA	NA	Winter	NA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG016	<1980	++	Winter	Poland	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG017	2004	0/NA	Winter	France	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG018	<2003	00	Winter	USA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG019	<1981	NA	Spring	Czech Republic	Innolea	-
BRASSICA_CARINATA	RG020	NA	NA	Spring	China?	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS	RG021	<1979	NA	Semi-winter	Japan	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG022 *	2000	00	Winter	United-Kingdom	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG023	1985?	++	Winter	United-Kingdom	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG024	NA	0/NA	Winter	NA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS	RG025	1973	NA/+	Semi-winter	North Korea	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L_NAPOBRASSICA	RG026	NA	NA	Rutabaga	Denmark	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG027	<1970	++	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG028	<1981	NA	Winter	NA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG029	1979	0/+	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG030	1974	0/+	Winter	Germany	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG031	NA	0/NA	Winter	United-Kingdom	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG032	NA	00	Winter	NA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L_NAPOBRASSICA	RG033	NA	NA	Rutabaga	Canada	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG034	NA	++	Winter	Poland	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_ANNUA	RG035	1985?	00	Spring	Sweden	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS	RG036	1973	++	Semi-winter	Japan	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_ANNUA	RG037	NA	NA	Spring	Finland	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG038	NA	++	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG039	NA	00	Winter	United-Kingdom	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_ANNUA	RG040	1987	NA	Spring	Romania	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG041	#N/A	NA	Winter	#N/A	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG042	1986?	00	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG043	1986?	00	Winter	Poland	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG044	NA	0/+	Winter	Sweden	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG045	NA	+/NA	Winter	NA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_ANNUA	RG046	NA	NA	Semi-winter	Japan?	Innolea	-
Unknown	RG047	NA	NA	Semi-winter	Japan?	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG048	NA	0/+	Winter	NA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG049	NA	NA	Semi-winter	Korea	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG050	NA	0/NA	Winter	NA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG051	NA	00	Winter	NA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG052	<1985	00	Winter	Germany	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG053	2003	00	Winter	France	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG054	2002	0/NA	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_ANNUA	RG055	1953	NA	Spring	Germany/Canada	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG056	2005	00	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG057	1980	0/+	Winter	France	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG058	NA	0/NA	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG059	1985?	0/+	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG060	NA	00	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG061	1997	NA/0	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG062	NA	++	Winter	NA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG063	NA	NA	Winter	Germany/The Netherlands	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG064	NA	+/0	Winter	United-Kingdom	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG065	NA	++	Semi-winter	Japan	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG066	1994	00	Winter	Poland	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG067	<1980	++	Winter	Sweden	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG069	<1982	++	Winter	Czech Republic	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG070	NA	NA	Winter	NA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_ANNUA	RG071	NA	NA/+	Spring	Sweden	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_ANNUA	RG072	NA	NA	Semi-winter	Japan	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG073	NA	NA/+	Winter	Ukraine	Innolea	-
Unknown	RG074	NA	NA	Semi-winter	United-Kingdom	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG075	NA	0/NA	Winter	Russia	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_ANNUA	RG076	NA	NA	Winter	Pakistan	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG077	1996	++	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_ANNUA	RG078	1963	++	Spring	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG079	NA	00	Winter	Poland	Innolea	-
Unknown	RG080	NA	NA	Semi-winter	United-Kingdom	Innolea	-

(A) 99 genotypes screened at Innolea

Species	Genotypes	Year released	Accession type ^a	Diversity group (PCA)	Origin	Localization of screening	Localization of confirmation tests
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG081	NA	++	Winter	Germany/France	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG082	1996	00	Winter	Germany	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG083	NA	+/0	Winter	NA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG084	NA	NA	Winter	NA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG085	NA	NA/+	Winter	Russia	Innolea	-
Unknown	RG086	NA	NA	Semi-winter	NA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG087	NA	00	Winter	NA	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG088	NA	0/NA	Spring	Germany	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG089	<1980	++	Winter	Czech Republic/Poland	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG090	NA	00	Winter	Germany	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG091	NA	++	Winter	Poland	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG092	1954	++	Winter	Germany	Innolea	-
Unknown	RG093 *	1999	00	Winter	Germany	Innolea	Innolea/INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG094	NA	NA/+	Semi-winter	Japan	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG095	NA	00	Winter	Denmark	Innolea	-
Unknown	RG096 *	NA	NA	Winter	Sweden	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG097	<1982	++	Winter	Czech Republic	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG098	NA	++	Winter	Poland	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPOBRASSICA	RG099	NA	NA	Rutabaga	Germany/United-Kingdom/USA	Innolea	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	RG101	NA	0/NA	Winter	NA	Innolea	-

(B) 31 genotypes screened at INRAE

Species	Genotypes	Breeder	Year released	Accession type ^a	Diversity group (PCA)	Origin	Localization of screening	Localization of confirmation tests
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR01	RAGT	2019	00	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR02	LIMAGRAIN	NA	00	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPOBRASSICA	INN_VAR03	SEMENCES de France	2016	00	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR04	LIMAGRAIN	2013	00	Winter	France	INRAE	INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR05	NPZ	2011	00	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR06	DANISCO	2000	00	Winter	Denmark	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR07	RAGT	2014	00	Winter	Germany	INRAE	INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR08	ELSOMS	2014	00	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR09	EURALIS	2011	00	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR10	EURALIS	2015	00	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR11	EURALIS	NA	00	Winter	France	INRAE	INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR12	EURALIS	NA	00	Winter	France	INRAE	INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR13	EURALIS	NA	00	Winter	France	INRAE	INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR14	EURALIS	2014	00	Winter	France	INRAE	INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR15	FALCON	1991	00	Winter	Germany	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR16	GRIZZLY	2003	00	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR17	JETNEUF	1977	0/+	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR18	NA	2004	NA/+	Winter	France	INRAE	INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR19	DSV	<1986	0/+	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR20	LIMAGRAIN	2011	00	Winter	France	INRAE	INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR21	KWS	2011	00	Winter	Germany	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR22	RAGT	2016	00	Winter	Germany	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR23	LIMAGRAIN	2007	00	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR24	LIMAGRAIN	2003	00	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR25	LIMAGRAIN	2009	00	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR26	CORTEVA	2007	00	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR27	INRA	1973	0/+	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_ANNUA	Yudal	INRA	1974	++	Semi-winter	Korea	INRAE	INRAE
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR28	NPZ	1976	0/+	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR29	CARGILL	1993	00	Winter	France	INRAE	-
BRASSICA_NAPUS_L.NAPUS_BIENNIS	INN_VAR30	DSV	2015	00	Winter	Germany/Switzerland	INRAE	-

Genotypes displaying a high or intermediate resistance to one or several late effectors are in bold

^a The accession type (++, +/0, 0/+ or 00) is indicated with:

" ++ ", varieties rich in erucic acid (C22:1) and glucosinolates (GSL)

" +/0 ", varieties rich in C22:1 and poor in GSL

" 0/+ ", varieties poor in C22:1 and rich in GSL

" 00 ", varieties poor in C22:1 and in GSL

NA: Missing data

* Missing data for PCA diversity analysis

Table SII.7: Results from the screening of a 130 genotypes collection

* To determine avirulent phenotype, scoring rate ≤ 3 at INRAE and scoring rate ≤ 2 at Innolea, from the IMASORE rating scale (Balesdent *et al.* 2001)

Promising interactions between genotypes and transformants are indicated in bold and green

Non-tested interactions are indicated by a dash

Species	Genotypes	Screening	Percentage of avirulent phenotype*																									
			INV13.269	JN2	pa4-7:1277_1	pa4-7:1277_4	pa4-7:1852_4	pa4-7:1852_5	pa4-7:5465_2	pa4-7:5465_3	pa4-7:6826_2	pa4-7:6826_3	pa4-7:7919_3	pa4-7:7919_4	pa4-7:10933_2	pa4-7:10933_3	JN2	INV13.269	pa4-7:lmstEE1_1	pa4-7:lmstEE1_3	pa4-7:lmstEE3_3	pa4-7:lmstEE3_4	pa4-7:lmstEE7_1	pa4-7:lmstEE7_4	pa4-7:lmstEE8_4	pa4-7:lmstEE9_4	pa4-7:lmstEE9_9	
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG001	Innolea	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG002 / ALPAGA	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG003	Innolea	0.0	20.0	0.0	0.0	20.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	60.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Unknown	RG004	Innolea	0.0	20.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG005	Innolea	0.0	0.0	33.3	33.3	20.0	20.0	20.0	0.0	0.0	0.0	66.7	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG006	Innolea	0.0	12.5	75.0	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	50.0	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	60.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG007	Innolea	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	20.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_ANNUA	RG008	Innolea	0.0	11.1	50.0	40.0	100.0	25.0	40.0	0.0	0.0	40.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	20.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	25.0	25.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG009	Innolea	40.0	40.0	80.0	60.0	60.0	20.0	60.0	100.0	80.0	100.0	40.0	80.0	80.0	0.0	0.0	0.0	100.0	40.0	20.0	40.0	60.0	60.0	60.0	80.0	80.0	80.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG010	Innolea	0.0	10.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	0.0	33.3	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG011	Innolea	20.0	30.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG012	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG013	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_PABULARIA	RG014	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG015	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG016	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG017	Innolea	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG018	Innolea	0.0	16.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	33.3	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG019	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0
BRASSICA_CARINATA	RG020	Innolea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS	RG021	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0
Unknown	RG022	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG023	Innolea	0.0	0.0	33.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG024	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS	RG025	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPOBRASSICA	RG026	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG027	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG028	Innolea	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG029	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG030	Innolea	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	40.0	60.0	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	40.0	40.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG031	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG032	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPOBRASSICA	RG033	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG034	Innolea	30.0	30.0	60.0	20.0	100.0	80.0	20.0	20.0	60.0	60.0	60.0	100.0	40.0	0.0	0.0	0.0	0.0	80.0	80.0	40.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_ANNUA	RG035	Innolea	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS	RG036	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_ANNUA	RG037	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG038	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG039	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_ANNUA	RG040	Innolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Species	Genotypes	Screening	Percentage of avirulent phenotype*																						
			JN2	INV13.269	pA4-7:1277_1	pA4-7:1852_4	pA4-7:1852_5	pA4-7:5465_2	pA4-7:5465_3	pA4-7:6826_2	pA4-7:6826_3	pA4-7:7919_3	pA4-7:7919_4	pA4-7:10933_2	pA4-7:10933_3	JN2	INV13.269	pA4-7:1mSTE1_1	pA4-7:1mSTE1_3	pA4-7:1mSTE35_3	pA4-7:1mSTE35_4	pA4-7:1mSTE78_1	pA4-7:1mSTE78_4	pA4-7:1mSTE98_4	pA4-7:1mSTE98_9
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG087	Inmolea	14.3	14.3	0.0	0.0	50.0	20.0	25.0	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	40.0	50.0	33.3	66.7	25.0	60.0	66.7	25.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG088	Inmolea	10.0	44.4	100.0	50.0	40.0	0.0	75.0	50.0	80.0	60.0	25.0	20.0	0.0	20.0	0.0	100.0	66.7	50.0	20.0	0.0	0.0	25.0	20.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG089	Inmolea	0.0	0.0	0.0	50.0	100.0	50.0	33.3	0.0	0.0	33.3	0.0	33.3	0.0	33.3	0.0	100.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG090	Inmolea	0.0	14.3	33.3	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	66.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	50.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG091	Inmolea	0.0	50.0	0.0	0.0	100.0	0.0	33.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG092	Inmolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	33.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Unknown	RG093	Inmolea	16.7	33.3	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	33.3	0.0	0.0	0.0	0.0	50.0	50.0	0.0	0.0	33.3	0.0	0.0	33.3
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG094	Inmolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG095	Inmolea	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0
Unknown	RG096	Inmolea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG097	Inmolea	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	33.3	33.3	0.0	0.0	0.0	100.0	25.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPOBRASSICA	RG098	Inmolea	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPOBRASSICA	RG099	Inmolea	30.0	50.0	80.0	60.0	60.0	40.0	80.0	60.0	60.0	40.0	40.0	100.0	80.0	0.0	0.0	100.0	80.0	60.0	100.0	80.0	80.0	100.0	100.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	RG101	Inmolea	0.0	10.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	20.0	40.0	0.0	40.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	20.0	40.0	50.0	0.0	0.0	0.0
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	FALCON	INRAE	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	33.3	80.0	33.3	60.0	50.0	66.7	33.3	60.0	
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	GRIZZLY	INRAE	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	100.0	25.0	75.0	16.7	25.0	25.0	
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR01	INRAE	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.1	0.0	0.0	
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR02	INRAE	0.0	0.0	9.1	9.1	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	9.1	0.0	0.0	0.0	11.1	0.0	0.0	0.0	33.3	0.0	9.1	0.0	
BRASSICA_NAPUS_L_NAPOBRASSICA	INN_VAR03	INRAE	9.1	18.2	20.0	30.0	27.3	18.2	20.0	40.0	22.2	33.3	10.0	10.0	16.7	8.3	20.0	25.0	50.0	40.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR04	INRAE	100.0	8.3	0.0	0.0	25.0	25.0	40.0	0.0	10.0	10.0	90.0	70.0	42.9	42.9	100.0	0.0	10.0	10.0	80.0	70.0	0.0	9.1	
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR05	INRAE	0.0	0.0	27.3	18.2	9.1	9.1	10.0	10.0	0.0	9.1	45.5	54.5	18.2	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR06	INRAE	9.1	0.0	9.1	0.0	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0	40.0	0.0	20.0	60.0	0.0	0.0		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR07	INRAE	0.0	27.3	42.9	28.6	40.0	40.0	28.6	28.6	80.0	100.0	71.4	28.6	40.0	60.0	30.0	27.3	18.2	72.7	63.6	10.0	10.0		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR08	INRAE	33.3	83.3	60.0	80.0	83.3	91.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	83.3	0.0	14.3	0.0	22.2	0.0	12.5	12.5		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR09	INRAE	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.7	16.7	41.7	16.7	0.0	9.1		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR10	INRAE	0.0	0.0	18.2	0.0	16.7	8.3	36.4	0.0	9.1	36.4	54.5	9.1	0.0	16.7	0.0	16.7	0.0	25.0	0.0	0.0	9.1		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR11	INRAE	0.0	0.0	10.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	33.3	33.3	45.5	44.4	0.0	10.0	0.0	8.3	0.0	33.3	8.3	8.3	8.3		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR12	INRAE	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	10.0	0.0	0.0	8.3	16.7	50.0	25.0	30.0	10.0	0.0	9.1	16.7	0.0	41.7	0.0	11.1	11.1	
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR13	INRAE	9.1	9.1	0.0	9.1	0.0	18.2	11.1	11.1	0.0	20.0	54.5	72.7	20.0	0.0	27.3	50.0	8.3	50.0	33.3	8.3	0.0		
Unknown	INN_VAR14	INRAE	0.0	0.0	0.0	0.0	11.1	22.2	20.0	40.0	0.0	0.0	50.0	75.0	27.3	9.1	0.0	9.1	25.0	25.0	83.3	75.0	45.5	36.4	
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR15	INRAE	0.0	0.0	18.2	18.2	22.2	33.3	9.1	18.2	50.0	60.0	72.7	75.0	0.0	11.1	0.0	72.7	0.0	8.3	0.0	10.0	10.0		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR16	INRAE	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	22.2	37.5	10.0	0.0	33.3	100.0	0.0	16.7	0.0	0.0	33.3		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR17	INRAE	0.0	0.0	16.7	16.7	0.0	9.1	8.3	8.3	45.5	72.7	58.3	54.5	9.1	27.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR18	INRAE	0.0	9.1	0.0	0.0	11.1	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR19	INRAE	55.6	100.0	100.0	55.6	54.5	72.7	27.3	54.5	77.8	88.9	77.8	55.6	81.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR20	INRAE	10.0	0.0	0.0	0.0	8.3	8.3	10.0	50.0	33.3	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	10.0	20.0	20.0	0.0	0.0	0.0		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR21	INRAE	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11.1	10.0	9.1	30.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18.2	12.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR22	INRAE	0.0	0.0	8.3	8.3	9.1	9.1	11.1	0.0	9.1	45.5	8.3	16.7	9.1	18.2	0.0	10.0	40.0	63.6	81.8	18.2	36.4		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR23	INRAE	10.0	0.0	14.3	0.0	0.0	10.0	20.0	11.1	55.6	0.0	12.5	0.0	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR24	INRAE	16.7	8.3	33.3	8.3	16.7	8.3	16.7	0.0	25.0	25.0	45.5	41.7	0.0	0.0	50.0	83.3	25.0	33.3	0.0	0.0	0.0		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR25	INRAE	0.0	0.0	0.0	18.2	10.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	36.4	36.4	20.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.0	33.3	0.0	0.0		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR26	INRAE	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	25.0	8.3	0.0		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	INN_VAR27	INRAE	100.0	0.0	27.3	30.0	14.3	12.5	22.2	30.0	12.5	22.2	63.6	66.7	0.0	8.3	100.0	50.0	16.7	16.7	55.6	54.5	8.3		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_BIENNIS	JETNEUF	INRAE	33.3	22.2	22.2	33.3	70.0	40.0	44.4	44.4	0.0	50.0	66.7	55.6	12.5	12.5	0.0	27.3	27.3	18.2	9.1	0.0	0.0		
BRASSICA_NAPUS_L_NAPUS_ANNUA	Yudal	INRAE	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		

Table SII.9: List of primers used in this study

Primers used for the one-way sequencing are indicated in bold.

Name	Sequence (5'-3')	Experiment	Tm (°C)	gDNA (bp)	cDNA (bp)
Lm_01277_EcoRI_Up	GAGAGAGAATTCATGAGATCAACATGCGTATTACTT	Cloning	62.1	725	-
Lm_01277_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGTCCCCTTAGTCCAATCAGA				
Lm1277_qUp	GCCACATTCACACCAACATC	<i>In planta</i> expression	60	112	112
Lm1277_qLow	CGGTACTGTGGGGATCTTA				
Lm_01277_FW_Out	CCAATCAGAGCTAAACGGTAGG	Sequence polymorphism	61	898	-
Lm_01277_Rv_Out	CACCATACATGCGTGTCTCTTC				
Lm_01852_EcoRI_Up	GAGAGAGAATTCATGAGACTTACTATTCTGCTTACC	Cloning	62.9	738	-
Lm_01852_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGAGAAGTACCCTCTGCTGCT				
Lm1852_qUp	CCCTTCTTACAGCAGGAATTGA	<i>In planta</i> expression	60	105	105
Lm1852_qLow	CGAGGAACACCCATTCAAAA				
Lm_01852_FW_Out	TGTGTCCGCTACCTATCTCTCA	Sequence polymorphism	61	764	-
Lm_01852_Rv_Out	TCCATCAGCCAGCTAGGATATT				
Lm_05465_EcoRI_Up	GAGAGAGAATTCATGCGCTTCAACCTCAATC	Cloning	62	776	-
Lm_05465_SalI_Low	GAGAGAGTCGACTCCCTCCCTTCAAGATATGC				
Lm5465_qUp	CAGCGTCCACTCTCTCCATT	<i>In planta</i> expression	60	135	135
Lm5465_qLow	CTCCCTCTCTGCGCTTGTAG				
Lm_05465_FW_out	CACATTTGCTCCCAATCTCAA	Sequence polymorphism	61	771	-
Lm_05465_Rv_Out	AGTCTTGGGTATGCGTGTG				
Gib_pA4-7:6826_Fw	CGAATTCGTTAAACAAGCTTGTGACATGCGCATCTCACTTGCTG	Cloning	62.8	829	-
Gib_pA4-7:6826_Rv	CTTCTGTCGAATCGGTACCCTCGAGATGGAGCATGAGGTTGCTTG				
Lm6826_qUp	ACGCGTTGTAGGCTATCGTC	<i>In planta</i> expression	60	117	117
Lm6826_qLow	CATCTCACTGCTGCGATT				
Lm_06826_FW_Out	CAGCCTCTTGACAATAAATTAGGA	Sequence polymorphism	61	772	-
Lm_06826_Rv_Out	AACCCCTATACCTACCCTTGA				
Lm_07919_EcoRI_Up	GAGAGAGAATTCATGCGTTATCAATCAATCG	Cloning	56.8	1412	-
Lm_07919_SalI_Low	GAGAGAGTCGACAACTCGGCAGGCTTATCT				
Lm7919_qUp1	TGGCGACATTGTGACTTGT	<i>In planta</i> expression	60	118	118
Lm7919_qLow1	GAGCGTGTAAACGCTGAGTC				
Lm_07919_FW_Out	GTACCTGATGCGCATGATAAG	Sequence polymorphism	61	1052	-
Lm_07919_Rv_Out	TCCGATATTCTTCAACAATCA				
Lm_10933_EcoRI_Up	GAGAGAGAATTCATGAGATCACCCTATTGCG	Cloning	60.9	748	-
Lm_10933_XhoI_Low	GAGAGACTCGAGATGGCGTTGGTAGAGGTGT				
Lm10933_qUp5	TTTGCCATTGCTGCGCCTAT	<i>In planta</i> expression	60	117	63
Lm10933_qLow5	GCACATGCCGTGGTTCTGA				
Lm_10933_FW_Out	TACGTACTGTCACTGGGAGCA	Sequence polymorphism	61	729	-
Lm_10933_Rv_Out	GGCATGCTGAAGAGATATACGA				
Tubulin_qUp	AAGAATCATCTACTCTCT	<i>In planta</i> expression	60	130	130
Tubulin_qLow	TGAATAGCTCCTGAATGG	<i>In planta</i> expression			
Actin_qUp	AGTGGCATGTCGATGTCAG	<i>In planta</i> expression	60	160	110
Actin_qLow	AAGAGCGGTGATTCCTTCT	<i>In planta</i> expression			
promAvrLm4-7_Up	GTITGGTTAGGTTAGGGTCT	Cloning	59	1402	-
promAvrLm4-7_Down BamHI	GAGAGAGATCCGTTGTTAAGTCTCAAAGGGTT	Cloning			
LM_00741_Up	CGCCTCCAAAATGGACAAC	Presence / absence polymorphism	61	1183	-
LM_00741_Low	ATGGGGGCTGTGTTATGA	Presence / absence polymorphism			
LM_01277_Up	TCTCATTATTGCGCATTC	Presence / absence polymorphism	61	540	-
LM_01277_Low	TTGAGAGTCGTCAGGTAATCG	Presence / absence polymorphism			
LM_01329_Up	CCGAAAATTCGTTCACTG	Presence / absence polymorphism	61	1482	-
LM_01329_Low	CAAATCCCTCCGACTCAG	Presence / absence polymorphism			
LM_02354_Up	GCATTACCTTGCTCTGTC	Presence / absence polymorphism	61	487	-
LM_02354_Low	GAGTTTCATCAAGCGTTCCG	Presence / absence polymorphism			
LM_05209_Up	CACCACGTTGACTCCACCTA	Presence / absence polymorphism	61	518	-
LM_05209_Low	TTCTCCGGAATGAGACTG	Presence / absence polymorphism			
LM_06826_Up	CCCGTCAATACATTCATACTAGCC	Presence / absence polymorphism	61	461	-
LM_06826_Low	TGACTACACGCTTATCCGTA	Presence / absence polymorphism			
LM_07073_Up	TCGATTGATCAACTTACTCCAA	Presence / absence polymorphism	61	800	-
LM_07073_Low	TTGCTAGCCTACTTGTGAACG	Presence / absence polymorphism			
LM_09384_Up	TTGCATGACTGAACACTCTCTT	Presence / absence polymorphism	61	500	-
LM_09388_Low	CACTATTGCTTAGGTTTAGTTAGGG	Presence / absence polymorphism			
LM_11460_Up	TCAACTACCCACACACAA	Presence / absence polymorphism	61	278	-
LM_11460_Low	CGTATCCCGTATCCATCAC	Presence / absence polymorphism			
LM_01852_Up	CGCATCACATAACGCAATCT	Presence / absence polymorphism	61	400	-
LM_01852_Low	TATAATCCGGTCCGACTA	Presence / absence polymorphism			
LM_05465_Up	ACGCTACCACGATTCGAAGA	Presence / absence polymorphism	61	434	-
LM_05465_Low	CTTCTCCATCATCCCTGT	Presence / absence polymorphism			
LM_05813_Up	AAAGCCCCAAAACCAATAC	Presence / absence polymorphism	61	355	-
LM_05813_Low	ACGGAATCCAGGTCTCCAAT	Presence / absence polymorphism			
LM_10604_Up	CTAGGGGATCCGGCCTAT	Presence / absence polymorphism	61	367	-
LM_10604_Low	TAGGGGGTGAGGGTAAGGAA	Presence / absence polymorphism			
LM_10933_Up	CCAGCCTTTGCCAGATTCTA	Presence / absence polymorphism	61	286	-
LM_10933_Low	TTCTGTTGCTCTCGTTTC	Presence / absence polymorphism			
LM_07919_Up	TTGCTCTCACCCCACTT	Presence / absence polymorphism	61	684	-
LM_07919_Low	GATGAAAAGTGGCGTTTGT	Presence / absence polymorphism			

3. Résultats complémentaires

3.1. Inactivation des effecteurs tardifs par CRISPR-Cas9

En parallèle des criblages de génotypes, j'ai inactivé par la méthode CRISPR-Cas9 les six effecteurs tardifs sélectionnés dans ce chapitre. Pour chaque gène, quatre mutants indépendants ont été sélectionnés, en choisissant ceux dont la séquence protéique semblait la plus impactée. Nous avons également sélectionné lorsque c'était possible un mutant avec une délétion de 3 x n paires de base, comme mutant témoin, dont la séquence protéique était probablement peu affectée (Figure 31). Ensuite, la capacité des mutants à se développer *in vitro* (Figure 32), à sporuler et à infecter les cotylédons de génotypes sensibles ont été évaluées (Figure 33). Tous les mutants sélectionnés présentaient un phénotype d'infection des cotylédons, un développement *in vitro* et un niveau de sporulation similaires à ceux de la souche témoin, JN2-Cas9.

Ensuite, afin d'évaluer l'impact de l'inactivation sur la colonisation de la tige, j'ai inoculé quatre mutants indépendants pour chaque gène, sur de jeunes plants du cultivar sensible 'Bristol'. Aucun des gènes inactivés n'a eu d'impact sur la colonisation de la tige (Figure 34). Pour chaque effecteur, les mutants provoquent autant de symptômes que la souche témoin JN2-Cas9.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette absence d'effet de l'inactivation de ces effecteurs tardifs sur la colonisation de la tige. D'une part, s'il y a de la redondance fonctionnelle entre effecteurs impliqués dans la colonisation de la tige, alors inactiver un effecteur tardif à la fois ne suffit pas à observer un phénotype. De plus, ces six effecteurs tardifs font partie d'une même vague d'expression d'effecteurs, la vague n°.5 (Gay *et al.*, 2021). S'ils ont des fonctions similaires et qu'ils ont des profils d'expression proches, alors, il n'est pas illogique que l'inactivation d'un seul effecteur n'entraîne pas de variation phénotypique. D'autre part, si ces effecteurs tardifs sont liés à la résistance quantitative, inoculer des mutants entraîne une variation quantitative de la réponse de la plante, peut-être trop faible pour être détectée avec ce test tige et le type de mesure utilisé.



Figure 31 : Séquences protéiques prédites pour chacun des mutants CRISPR-Cas9 sélectionnés
 Pour chaque gène, (A) *Lm1277*, (B) *Lm1852*, (C) *Lm5465*, (D) *Lm6826*, (E) *Lm7919* et (F) *Lm10933*, muté par la méthode CRISPR-Cas9, les séquences protéiques ont été prédites par traduction de la séquence génique obtenue après séquençage de l'ADNg des mutants.

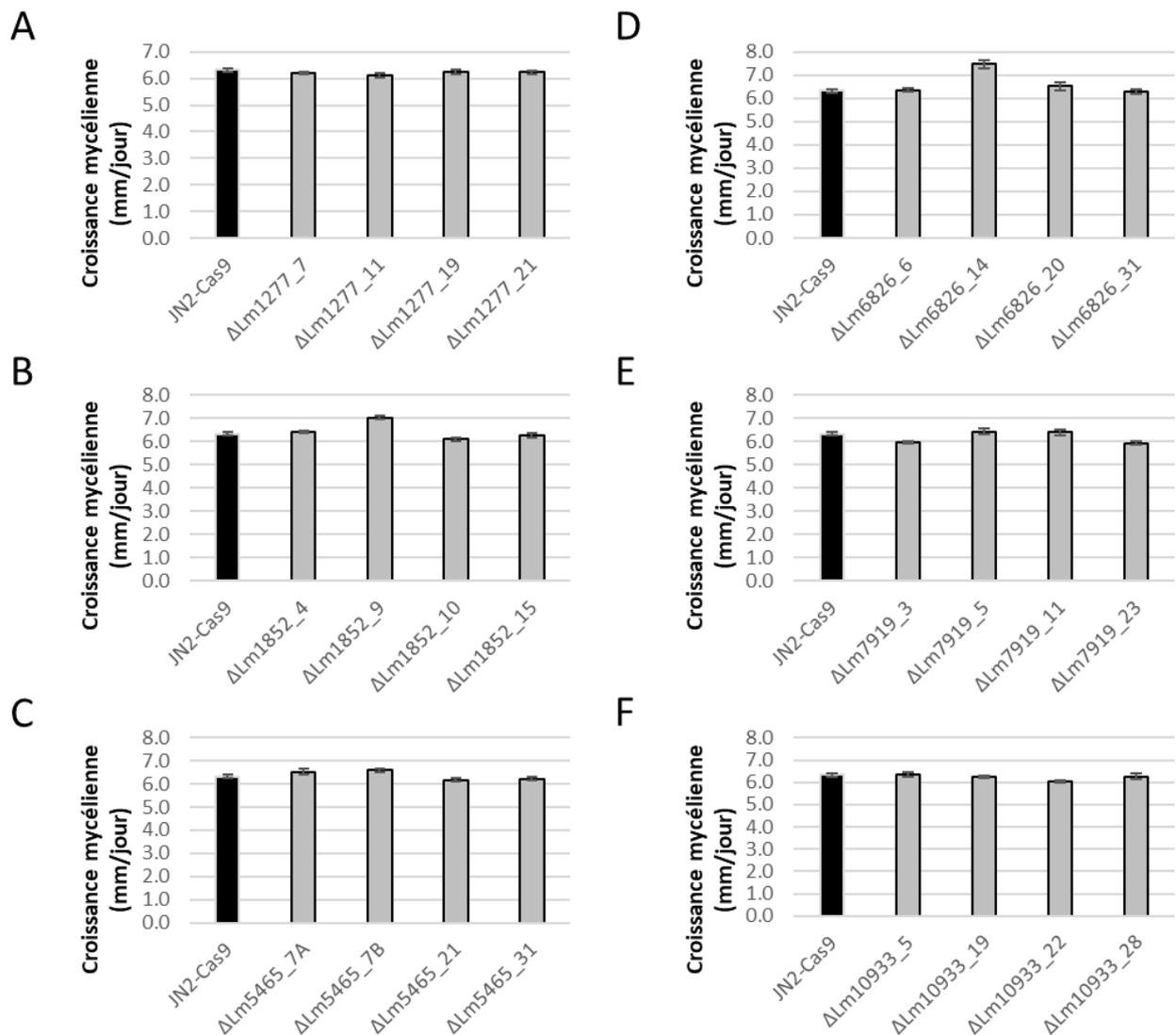


Figure 32 : Croissance *in vitro* des mutants de *L.maculans*, inactivés par la méthode CRISPR-Cas9

Quatre mutants indépendants pour chaque effecteur ont été générés par la méthode de mutagenèse dirigée CRISPR-Cas9. Le taux de croissance moyen (mm/jour) des mutants inactivés a été évalué à 6 jours, sur mycelium obtenu sur milieu V8 agar, à 25°C. Les graphiques (A), (B), (C), (D), (E) et (F) représentent les résultats pour les mutants des gènes *Lm1277*, *Lm1852*, *Lm5465*, *Lm6826*, *Lm7919* et *Lm10933*. JN2_Cas9 est la souche témoin, représentée par une barre noire. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (n=10).

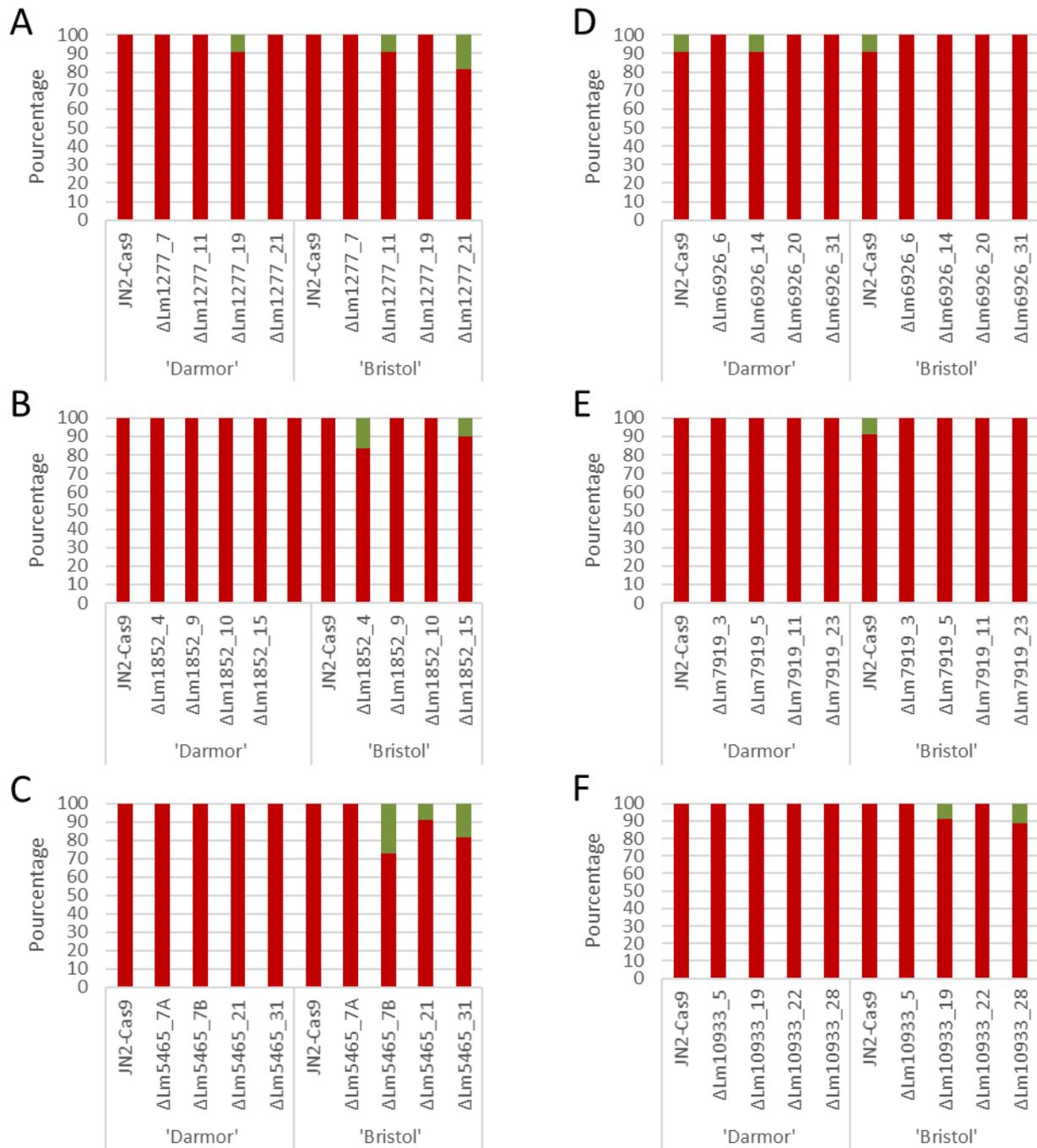


Figure 33 : Phénotypes de pathogénie des mutants de *L. maculans*, inactivés par CRISPR-Cas9

Quatre mutants indépendants pour chaque effecteur ont été générés par la méthode de mutagenèse dirigée CRISPR-Cas9. Le pourcentage de plantes inoculées présentant un phénotype de résistance (vert) ou sensible (rouge). Les tests de pathogénie ont été réalisés sur cotylédons des géotypes 'Darmor' and 'Bristol'. Les graphiques (A), (B), (C), (D), (E) et (F) représentent les résultats pour les mutants des gènes *Lm1277*, *Lm1852*, *Lm5465*, *Lm6826*, *Lm7919* et *Lm10933*, JN2_Cas9 étant la souche témoin. Les phénotypes ont été évalués à l'aide de l'échelle de notation IMASCORE (Balesdent 2006), 14 jours après inoculation (n>10).

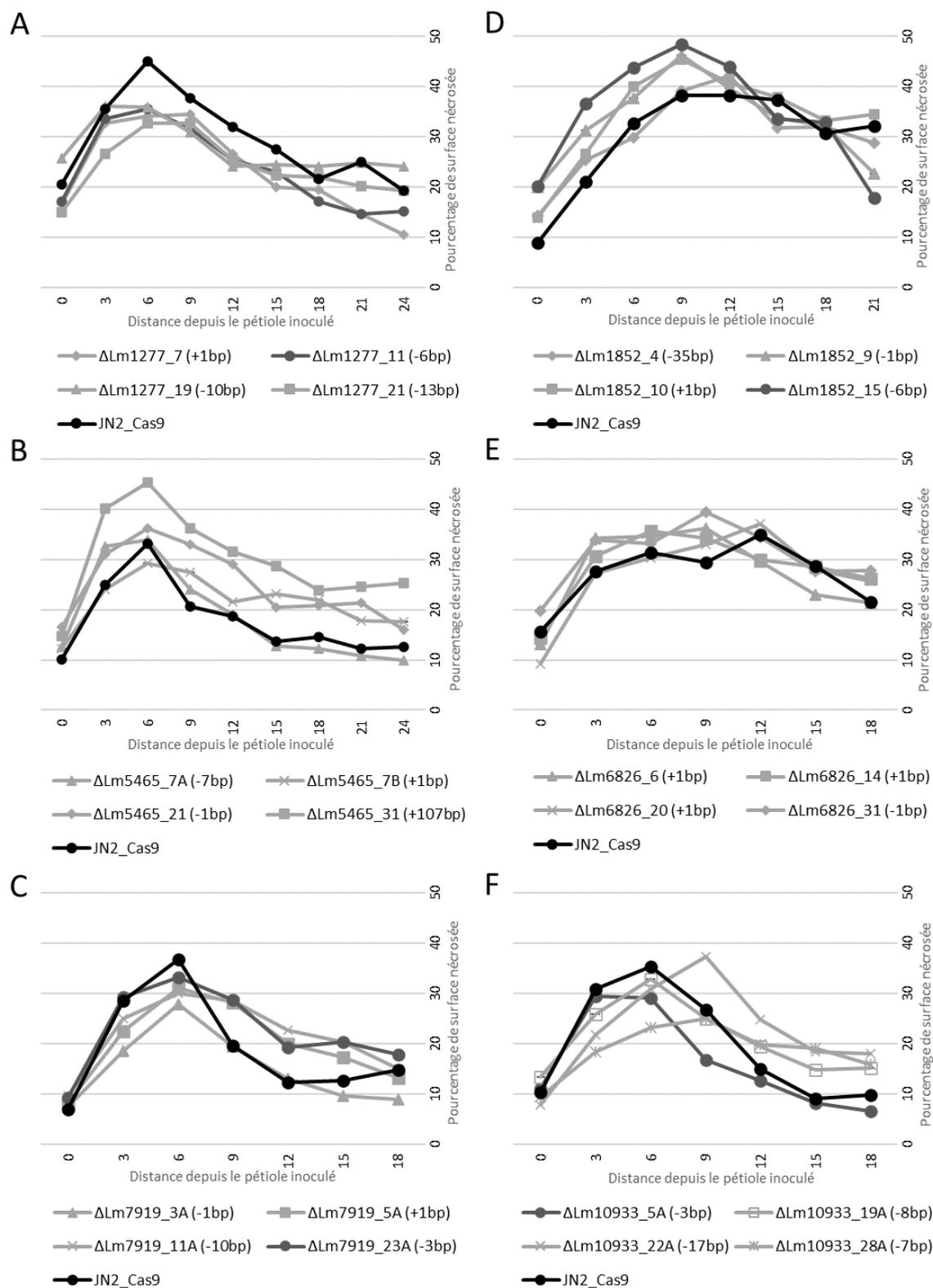


Figure 34 : Effet de l'inactivation par CRISPR-Cas9 des six effecteurs candidats

Pour chaque gène inactivé, quatre mutants indépendants ont été inoculés sur le pétiole de la seconde feuille du cultivar 'Bristol', coupé à 1 cm de son insertion avec la tige. Les symptômes ont été mesurés à 30 jours après inoculation. Le pourcentage de surface nécrosée est représenté le long de la tige pour les mutants des gènes *Lmb_jn3_01277* (A), *Lmb_jn3_05465* (B), *Lmb_jn3_07919* (C), *Lmb_jn2_01852* (D), *Lmb_jn3_06826* (E) et *Lmb_jn3_10933* (F).

3.2. Suppression de la mort cellulaire par les effecteurs tardifs

Pour donner suite aux résultats de screening, j'ai voulu savoir quel pouvait être le rôle de ces effecteurs tardifs dans l'induction ou la suppression de la mort cellulaire. J'ai donc choisi quatre des six candidats pour ce test, correspondant aux quatre candidats ayant donné des résultats intéressants lors du screening. De la même manière que *LmSTEE98*, les quatre effecteurs tardifs candidats ; *Lm01277*, *Lm05465*, *Lm06826* et *Lm07919* ont été testés pour leur capacité à supprimer la mort cellulaire induite, chez *N. benthamiana*. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus pour *LmSTEE98*, comme l'illustre la Figure 35. Ainsi, les quatre effecteurs tardifs candidats ne suppriment pas la mort cellulaire induite par l'inducteur Inf1, lié à la PTI, mais ils suppriment la mort cellulaire provoquée par l'inducteur général BAX. De même que pour *LmSTEE98*, il serait intéressant de compléter ces résultats en testant leurs effets sur la mort cellulaire induite par l'effecteur AvrPto, qui déclenche l'ETI chez la plante.

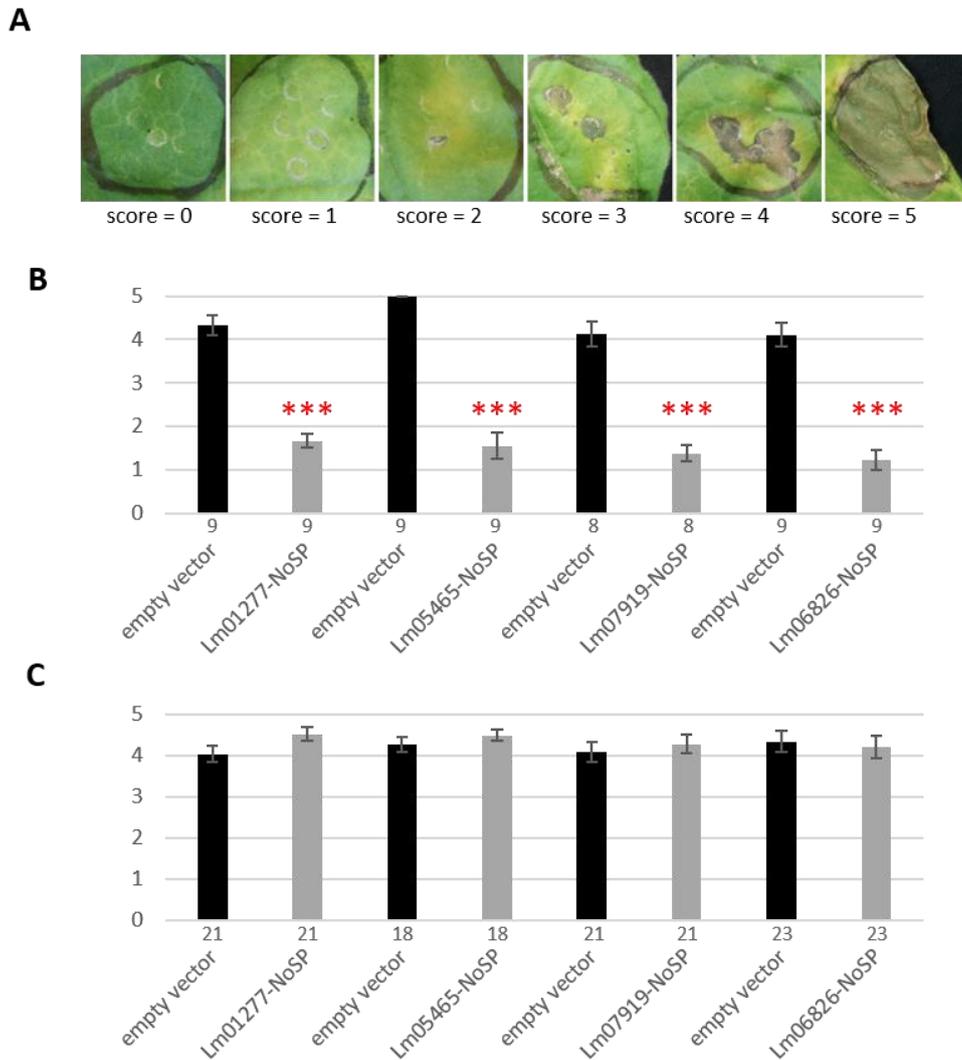


Figure 35 : Suppression de la mort cellulaire par quatre des six effecteurs tardifs candidats

Les feuilles de *N. benthamiana* ont été infiltrées avec *Agrobacterium tumefaciens*, contenant un vecteur vide, comme témoin négatif ou bien un vecteur contenant un effecteur "tardif" (*Lm01277*, *Lm05465*, *Lm06826*, *Lm07919*), sans peptide signal (NoSP). Vingt-quatre heures après l'infiltration des effecteurs, les feuilles ont de nouveau été infiltrées avec *A. tumefaciens*, ayant le gène BAX (B) ou le gène Inf1 de *Phytophthora infestans* (C) pour induire la mort cellulaire. (A) L'échelle de notation correspond à : 0: absence de symptômes visibles, 1: décoloration de la zone infiltrée, 2: chlorose, 3: petites zones nécrosées, 4: nécrose couvrant moins de 50% de la zone infiltrée, 5: nécrose sur plus de 50% de la surface infiltrée. (B) et (C) Les symptômes ont été évalués à 12 jours après infiltration des feuilles. Les astérisques indiquent une différence significative avec le phénotype du vecteur vide (Test de Kruskal-Wallis : *** : p-value < 0,001). Sous les graphiques, les nombres indiquent le nombre d'observations réalisées en une ou deux répétitions biologiques. Les barres correspondent à l'erreur standard.

4. Matériel et méthodes complémentaires

Inactivation de six effecteurs tardifs par la méthode CRISPR-Cas9

Pour inactiver les six effecteurs tardifs étudiés dans ce chapitre, par la méthode CRISPR-Cas9, les plasmides pLAU2 (gène Cas9 ; résistance à l'hygromycine) et pLAU53 (insertion de l'ARNguide ; résistance à la généticine), ont été utilisés, comme décrit par Idnurm *et al.* (2017) et Jiquel *et al.* (2021). Les ARN guide ont été conçus à l'aide du site web de prédiction CRISPOR^[7], en utilisant le génome de *L. maculans* comme référence (Dutreux *et al.*, 2018). Les ARN guide ont été amplifiés avec les amorces MAI0309 et MAI0310 (Tableau 5). Par clonage Gibson (Silayeva & Barnes, 2018), les ARNs guides ont été insérés au niveau du site *XhoI* dans le plasmide pLAU53. Les constructions obtenues ont été insérées dans la souche *E.coli*Top10, par choc thermique. Les six plasmides ont été introduits dans la souche C58 d'*Agrobacterium tumefaciens*, contenant le plasmide pGV2260, par électroporation (2,5 kV, 200 Ω et 25 μ F). La souche JN2-Cas9 de *L. maculans* a été transformée avec les souches d'agrobactéries obtenues, comme décrit par Gout *et al.* (2006). Ensuite, les transformants fongiques ont été sélectionnés avec 50 μ g/mL de généticine, 50 μ g/mL d'hygromycine et 250 μ g/mL de cefotaxime.

Nous avons vérifié que les transformants inactivés par CRISPR-Cas9 ne présentaient pas de défaut de croissance *in vitro*. Pour cela, un plug de mycélium a été placé au centre d'une boîte de Petri, contenant du milieu V8, et la croissance mycélienne a été mesurée tous les deux jours, pendant six jours (Figure 32). Leur pathogénie a également été vérifiée par une inoculation sur cotylédon, sur les cultivars sensibles 'Darmor' et 'Bristol' (Figure 33).

Enfin, l'effet de l'inactivation de ces six gènes codant des effecteurs tardifs a été évalué par un test tige. Les plantes adultes ont été inoculées comme décrit par Gervais *et al.* (2017). Le pétiole de la seconde vraie feuille a été coupé à 1 cm de son insertion avec la tige. L'inoculum (10 μ L, contenant 10⁷ pycnidiospores/ml) a ensuite été appliqué sur le pétiole coupé. Pour évaluer les symptômes à 38 jpi, nous avons coupé la tige en sections de 3mm, depuis le point d'insertion du pétiole inoculé jusqu'à la base de la tige. Les sections de tige ont été scannées et le pourcentage de nécrose interne a été mesurée sur chaque section de tige, à l'aide d'ImageJ (Figure 34).

Tableau 5 : Liste des amorces utilisées pour les expériences complémentaires (Chapitre II)

Nom	Sequence (5'-3')	Expérience
ARN guide Lm_01277	GAAACCTAATCAATCAACAGTACGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCCGACTGCCGCACGAGATGT GTTTTAGAGCTAGAAATAGC	ARN guide (CRISPR-Cas9)
ARN guide Lm_01852	GAAACCTAATCAATCAACCGAATGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCCATTCGGGCCGCCGAGCAC GTTTTAGAGCTAGAAATAGC	ARN guide (CRISPR-Cas9)
ARN guide Lm_05465	GAAACCTAATCAATCAACATGCTGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCCAGCATGCACCTTCAGGGAC GTTTTAGAGCTAGAAATAGC	ARN guide (CRISPR-Cas9)
ARN guide Lm_06826	GAAACCTAATCAATCAACAAATTGCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCCAAATTTATTGCATGCCACTCGT TTTAGAGCTAGAAATAGC	ARN guide (CRISPR-Cas9)
ARN guide Lm_07919	GAAACCTAATCAATCAACACCTTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCAAGGTGGTATCCGCTAGCACG TTTTAGAGCTAGAAATAGC	ARN guide (CRISPR-Cas9)
ARN guide Lm_10933	GAAACCTAATCAATCAACAGGGTACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTCTACCTTCACGCACATGCCGG TTTTAGAGCTAGAAATAGC	ARN guide (CRISPR-Cas9)
MAI0309	ACCTCTAATCGAAACCTAATCAATCAAC	Amplification ARN guide (CRISPR-Cas9)
MAI0310	ATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC	
MAI0198	TGGGGAGTTTGCTTATGG	
Lm1277-GWU-NP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCAACGGCCACATCCCTACATCTCG	Test de mort cellulaire
Lm1277-GWL-Stop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAAGTGCAAGCAGGTTGAAGGAAG	
Lm5465-GWU-NP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGCCCTCTCCGCAAAATGAGAAT	Test de mort cellulaire
Lm5465-GWL-Stop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTACGCACCAGGAGTACGGCGGCA	
Lm6826-GWU-NP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGAGCGCCTGGGCAAAATCACCTGAGT	Test de mort cellulaire
Lm6826-GWL-Stop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATGATAGTGGGACTGGCCCGCAC	
Lm7919-GWU-NP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCTCCCACTTCTATGAAGCGCCAAA	Test de mort cellulaire
Lm7919-GWL-Stop	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAGTTTCTCCGCCAGAGATGGTG	

Chapitre III : Caractérisation de la résistance quantitative au champ

Dans les deux premiers chapitres de ce manuscrit, nous avons vu qu'une approche originale de criblage variétal a permis d'identifier (I) une interaction gène-pour-gène impliquée dans la résistance quantitative de *B. napus*, (II) d'autres génotypes reconnaissant l'effecteur tardif *LmSTEE98*, (III) un génotype « semi-hiver » reconnaissant un second effecteur tardif, *Lm6826* et (IV) sept génotypes dont la reconnaissance d'au moins un effecteur tardif mène à un phénotype de résistance intermédiaire.

Puisqu'il est possible d'identifier des interactions gène-pour-gène impliquées dans la résistance quantitative, à l'inverse, il devrait être possible d'identifier des gènes marqueurs de la résistance quantitative.

Pour ce chapitre, nous sommes donc partis d'un postulat : l'expression de certains gènes de *L. maculans* devrait varier selon le niveau de résistance quantitative du génotype infecté. De la même manière, entre un génotype sensible et un génotype avec un bon niveau de résistance quantitative, l'expression de certains gènes de *B. napus* devrait varier. Notre objectif était donc double : (I) affiner l'analyse de la cinétique d'infection de *B. napus* par *L. maculans* et (II) identifier des gènes candidats, marqueurs de la résistance quantitative, du côté du champignon et de la plante.

1. Introduction

A la fin du cycle cultural du colza, *L. maculans* qui provoque la nécrose du collet, entraîne la verse parasitaire des plantes, pouvant entraîner jusqu'à 50% de perte de rendement (Terres Inovia¹). Pour lutter contre cette maladie, le moyen le plus utilisé en Europe consiste à déployer des variétés résistantes au champ. Il peut s'agir de variétés contenant un ou des gènes majeurs de résistance qualitative (*R/m*) et/ou présentant un bon niveau de résistance quantitative (Terres Inovia, Guide de culture²).

Au cours du cycle infectieux de *L. maculans*, les gènes fongiques impliqués dans les étapes de colonisation des cotylédons sont bien étudiés. Les gènes fongiques exprimés lors de la colonisation asymptomatique de la tige de colza commencent à être étudiés, comme nous l'avons vu dans les chapitres I et II de ce manuscrit. En revanche, la phase tardive du cycle, lorsque le champignon devient nécrotrophe et provoque la verse des plantes, est moins bien caractérisée. De nombreux QTL (ou des régions génomiques mises en évidence par approche GWAS) de résistance au phoma ont été identifiés chez *B. napus* (Pilet *et al.*, 2001; Jestin *et al.*, 2011, 2012; Kumar *et al.*, 2018; Raman *et al.*, 2018, 2020), mais comme mentionné dans les chapitres précédents, leur contribution à la résistance quantitative est souvent faible, et leur robustesse et reproductibilité souvent problématiques. Jusqu'à présent, la résistance quantitative des cultivars est évaluée à la fin de la saison culturale, via la note G2 en France (Figures III.1 et 23). Cette méthode est fastidieuse et nécessite au minimum une année d'expérimentation au champ, avec plusieurs essais en différents sites pour obtenir une note fiable.

Un agent pathogène peut exprimer au cours de l'infection des sets distincts de gènes différentiellement exprimés, selon le niveau de résistance quantitative entre génotypes d'une même espèce hôte. C'est notamment le cas de *Magnaporthe oryzae*, lors de l'infection d'une variété sensible de riz ou d'une variété avec un bon niveau de résistance quantitative (Bagnaresi *et al.*, 2012). Ainsi, concernant notre pathosystème, nous avons émis l'hypothèse que *L. maculans* n'exprimerait pas les mêmes gènes, ou bien avec des niveaux d'expression variables selon le niveau de résistance quantitative du génotype infecté. De même, il est probable que l'expression de certains gènes de *B. napus* varie et ceci pourrait être à l'origine de différences de niveau de résistance quantitative entre génotypes. Identifier des gènes marqueurs, aussi bien de *L. maculans* que de *B. napus*, permettant de distinguer les génotypes sensibles des génotypes ayant un niveau élevé de résistance quantitative serait une véritable avancée, d'importance pour la sélection du colza. Cela permettrait de discriminer rapidement les génotypes à faible niveau de résistance quantitative, puis de valider le niveau de résistance quantitative, voire différents types de résistance quantitative dans des fonds génétiques diversifiés, lors d'essais au champ.

Dans le cadre du projet Leptolife/MetaPhoR, des données transcriptomiques ont été obtenues aux différentes étapes du cycle de vie de *L. maculans* (Annexe A). En particulier, des échantillons correspondent à des plantes prélevées au champ, soumises à une infection naturelle et dont le collet a été prélevé à sept dates entre novembre et juillet, mais sur une unique saison culturale (Gay *et al.*, 2021). Avec des échantillonnages réalisés une fois par mois, des dates de prélèvement non pertinentes car ne présentant pas suffisamment de 'reads' de champignon (novembre-février), et un manque d'échantillonnage entre début mai et début juillet, les données Leptolife/MetaPhoR ne sont pas suffisamment précises en ce qui concerne les échantillons au champ. Pour pallier ces manques, nous avons planifié, dans le cadre du projet FRSO Ephicas d'affiner l'analyse de l'expression génique lors d'une cinétique d'infection, en ayant un plus grand nombre de dates de prélèvements, avec deux prélèvements par mois au lieu d'un, et surtout, des dates plus proches les unes des autres à la fin de la saison culturale.

L'objectif est double : (i) affiner la cinétique d'infection sur tige de *B. napus* par *L. maculans*, en conditions d'infection naturelle et (ii) identifier des gènes candidats, comme marqueurs potentiels de la résistance quantitative, tant du côté du champignon que de la plante. Pour répondre à ces deux objectifs, j'ai généré de nouvelles données RNAseq au champ, obtenues sur le cultivar sensible 'Bristol' et le cultivar présentant un bon niveau de résistance quantitative 'Darmor', deux cultivars de référence. Pour compléter cette approche, nous avons réalisé des prélèvements sur une gamme diversifiée de 15 génotypes, présentant des niveaux variés de résistance quantitative et incluant des variétés plus récentes, actuellement commercialisées et étudiées dans le chapitre II.

La stratégie choisie était tout d'abord d'identifier des gènes du champignon ou de la plante différentiellement exprimés entre 'Darmor' (ou 'Darmor-*bzh*') et 'Bristol', en exploitant les deux années de cinétique RNAseq. Puis, une fois ces gènes candidats sélectionnés, les valider (ou non) par qRT-PCR sur les échantillons de collets infectés du set de 15 génotypes. Corréler leur niveau d'expression dans ces génotypes avec la note G2 en fin de saison culturale permettrait d'en savoir plus sur le lien entre l'expression de ces marqueurs et le niveau de résistance quantitative. Comme nous le verrons plus en détail dans la discussion de ce chapitre, ces analyses n'ont pu être menées jusqu'au bout dans le cadre de la thèse. Il convient de préciser que les analyses présentées dans ce chapitre sont en cours et que les résultats sont donc des résultats intermédiaires. La liste des gènes marqueurs candidats n'est pas encore complètement arrêtée et les critères de sélection pourraient être discutés.

2. Matériel et méthodes

Matériel fongique et végétal

Dans le cadre du projet Leptolife/MetaPhoR, une expérience au champ a été mise en place à Grignon (France), à l'automne 2013, avec deux cultivars, 'Darmor-*bzh*' et 'Bristol', semés dans des microparcelles (10 x 1,75m ; 60 graines/m²), réparties en trois blocs (Gay *et al.*, 2021). Les essais ont été réalisés en condition d'inoculum renforcé (ajout de résidus de culture). Des collets de plantes ont été collectés à six dates (20/11/2013 ; 18/12/2013 ; 13/02/2014 ; 13/03/2014 ; 04/04/2014 ; 14/05/2014 ; 08/07/2014). Pour chaque cultivar et chaque bloc, six collets, correspondant à une section de 1 cm au niveau des cicatrices foliaires, ont été prélevés par microparcelle. Les collets de trois plantes ont été regroupés dans un tube, constituant un échantillon. Pour un cultivar, à une date donnée, trois échantillons ont été soumis au séquençage de l'ARN.

Dans le cadre du projet Ephicas, une expérience similaire a été mise en place au champ, toujours à Grignon (France), à l'automne 2017, avec les cultivars 'Darmor' et 'Bristol'. Les collets de trois plantes ont été collectés à sept dates, dans chaque microparcelle (03/04/2018 ; 16/04/2018 ; 02/05/2018 ; 18/05/2018 ; 08/06/2018 ; 26/06/2018). Ainsi, trois collets ont été groupés, pour chaque microparcelle de l'expérimentation.

Pour chaque essai, à la fin de la saison culturale, l'évaluation du niveau d'infection a été réalisée via la note G2 (Figures III.1 et 23), comme décrit par Aubertot *et al.* (2004). Pour l'analyse statistique, un test de Mann & Whitney a été réalisé, avec le logiciel R.

Extractions ARN

Pour chaque échantillon, les collets de tiges provenant du champ ont été broyés à l'aide d'un broyeur- Retsch MM300, avec des bols et des billes d'oxyde de zirconium, pendant 40 s, à 30 oscillations par seconde. L'ARN total a été extrait à partir de 100mg de collets de colza, avec du Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), comme décrit par Fudal *et al.* (2007). Pour la transcription inverse, la quantité d'ARN de chaque échantillon a été ajustée à 1µg. Selon les recommandations du fabricant, les ADNc ont été générés par transcription inverse amorcée par oligo-dT, avec la transcriptase inverse PowerScript (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Un réplicat technique a été réalisé pour chaque réplicat biologique. Le séquençage des ARN pour la saison 2013-2014 est décrit dans Gay *et al.* (2021). Pour la saison 2017-2018, les banques ont été préparées par Genewiz, en utilisant le kit « NEBNext Ultra RNA Library Prep » puis séquencées par méthode Illumina 2x150bp (Illumina HiSeq 4000), après sélection des ARN par queue polyA.

« Mapping » des données RNAseq sur deux génomes fongiques

Les données brutes issues du séquençage RNAseq ont été mappées à l'aide du logiciel STAR, version 2.6.0 (Dobin *et al.*, 2013). Les échantillons provenant du champ contiennent entre autres des ARN de *B. napus*, de *L. maculans* et de *L. biglobosa*. Les données ont été mappées sur un génome artificiel, concaténant celui de *L. maculans* et de *L. biglobosa* (Dutreux *et al.*, 2018), en utilisant les paramètres optimisés par Gay *et al.* (2021). L'outil SAMtools a été utilisé pour sélectionner les reads correctement appariés (Li *et al.*, 2009). Enfin, l'outil FeatureCounts (Liao *et al.*, 2014) a permis de quantifier l'expression des gènes. Par la suite, je n'ai pas exploité les données mappées sur le génome de *L. biglobosa*.

« Mapping » des données RNAseq sur le génome de *Brassica napus*

Les données brutes de séquençage issues du projet Ephicas ont été mappées à l'aide du logiciel STAR, version 2.6.0 (Dobin *et al.*, 2013), sur la version V10 du génome de *Brassica napus* (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020), en utilisant les paramètres suivants : outFilterMultimapNmax 20 ; outFilterMismatchNmax 999 ; alignIntronMin 20 ; alignIntronMax 1000000 ; alignMatesGapMax 1000000. Les données RNAseq pour le projet MetaPhoR ont été mappées sur la version V5 du génome de *B. napus* (Chalhoub *et al.*, 2014), à l'INRAE de Rennes (Données en cours de publication). Contrairement à la version V5 du génome de *B. napus*, la version V10 (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020) a été obtenue à partir d'un séquençage « long-reads », complété de données RNAseq pour l'annotation des gènes.

Analyses d'expression différentielle chez *L. maculans* et *B. napus*

Afin de caler les dates de prélèvements les unes par rapport aux autres entre les deux années, j'ai calculé la somme des degrés-jours pour chaque de prélèvement, à compter du 1^{er} janvier de chaque année. Pour cela les données météorologiques de la Station de Grignon ont été utilisées (Station n° 78615002). Le cumul des degré-jours a été calculé selon la formule suivante : $\frac{(T_{max}+T_{min})}{2} + T_{base}$

La température de base (« *Tbase* ») correspond au zéro végétatif, c'est-à-dire la température en-dessous de laquelle la plante ne se développe pas. En l'absence d'information fiable sur le zéro végétatif du colza, j'ai fixé la température de base à 0°C, le colza étant une plante rustique, qui reste au stade végétatif durant l'hiver.

Les analyses de gènes différentiellement exprimés (DEG pour « Differentially-expressed gene ») ont été réalisées à l'aide du package EdgeR v3.20.9 (Robinson *et al.*, 2010). Pour ces trois analyses, les échantillons ont été normalisés par la méthode TMM. Les données ont été ajustées à un modèle linéaire généralisé, suivant une loi binomiale, avec la fonction glmFIT. Ensuite, la fonction glmLRT a été utilisée pour comparer l'expression des gènes. Selon les analyses statistiques, différents filtres ont été appliqués.

Pour la cinétique d'expression des gènes de *L. maculans*, les gènes ayant au moins 15 reads dans au moins un échantillon ont été conservés puis les gènes différentiellement exprimés ont été déterminés avec un $\text{Log}_2(\text{FC}) > 1,5$ et $p < 0,05$.

Pour l'identification de gènes marqueurs chez *B. napus*, une première analyse des gènes différentiellement exprimés entre 'Darmor' et 'Bristol' a été réalisée, avec les filtres suivants : au moins 15 reads dans au moins un échantillon, un $\text{Log}_2(\text{FC}) > 2,5$ et $p < 0,05$. Pour l'analyse plus sélective des gènes différentiellement exprimés entre 'Darmor' et 'Bristol', les filtres suivants ont été appliqués : au moins 30 reads dans au moins un échantillon, un $\text{Log}_2(\text{FC}) > 10$ et $p < 0,01$.

Pour l'étape de clustering des gènes, les reads des gènes avec plus de deux FPKM dans au moins une condition ont été transformés en Log_2 et centrés-réduits. Les sets de gènes différentiellement exprimés ont été extraits de ces tables de comptage transformées et la méthode de clustering hiérarchique du package R Kohonen a été utilisée, pour classer les gènes en clusters d'expression (Wehrens & Buydens, 2007).

Les listes I, II et III de gènes de colza différentiellement exprimés entre 'Darmor'/'Darmor-bzh' et 'Bristol' du projet MetaPhoR ont été obtenues en réalisant des analyses d'expression différentielles avec les données obtenues en conditions contrôlées. Ces différentes analyses ont été réalisées à l'INRAE de Rennes, par l'équipe de Régine Delourme (Résultats en cours de publication). La liste I correspond aux gènes de *B. napus* différentiels, dont l'expression est induite uniquement chez les cultivars résistants 'Darmor' & 'Darmor-bzh' après inoculation avec deux souches de *L. maculans*, JN2 & NZT4. La liste II contient les gènes de *B. napus* différentiels, constitutivement exprimés et surexprimés lors de l'infection chez les cultivars résistants 'Darmor' & 'Darmor-bzh'. Enfin, la liste III regroupe les gènes de *B. napus* différentiels, constitutivement surexprimés chez 'Darmor' & 'Darmor-bzh' par rapport à 'Bristol'.

Analyse d'enrichissement en « Gene Ontology »

Chez *L. maculans*, les analyses d'enrichissement en GO ont été menées à l'aide du plugin Bingo du logiciel Cytoscape, version 3.6.0 (Shannon *et al.*, 2003). Pour chaque gène, l'identifiant GO a été généré par le logiciel BLAST2GO. Les enrichissements significatifs en fonctions moléculaires, en processus biologiques et en composantes cellulaires ont été détectés avec un test hypergéométrique, en comparant la proportion d'une fonction GO dans le sous-groupe étudié, à sa proportion dans le protéome entier de *L. maculans*.

Chez *B. napus*, les analyses d'enrichissement ont été réalisées avec l'outil SeqEnrich (Becker *et al.*, 2017), en utilisant les paramètres par défaut. L'enrichissement en analogues de gènes de résistance (RGA) a été évalué à l'aide d'un test du Chi^2 .

Annotation des RGA et des QTL chez *B. napus*

Les RGA de *B. napus* ont été prédits dans le cadre du projet MetaPhoR, par l'équipe de Régine Delourme à l'IGEPP de Rennes. Les RGA correspondent à une réannotation experte basée sur les données de la littérature, incluant la recherche d'homologues chez *A. thaliana* (Delourme, Gravot *et al.*, non publié). L'annotation des QTL provient de l'étude menée par Kumar *et al.* (2018).

3. Résultats

Evaluation de la sévérité de l'infection par *L. maculans* en 2014 et 2018

L'évaluation du niveau d'infection a été effectuée pour chacun des deux essais, *via* la note G2, réalisée à la fin de la saison culturale (Figure III.1). La sévérité de la maladie a été plus importante en 2014 qu'en 2018. Un effet année est donc notable. Toutefois, pour les deux années, les géotypes 'Darmor' ou 'Darmor'-*bzh* présentent des notes statistiquement inférieures à celles du géotype 'Bristol', fournissant ainsi des échantillons exploitables pour identifier des marqueurs de la résistance quantitative.

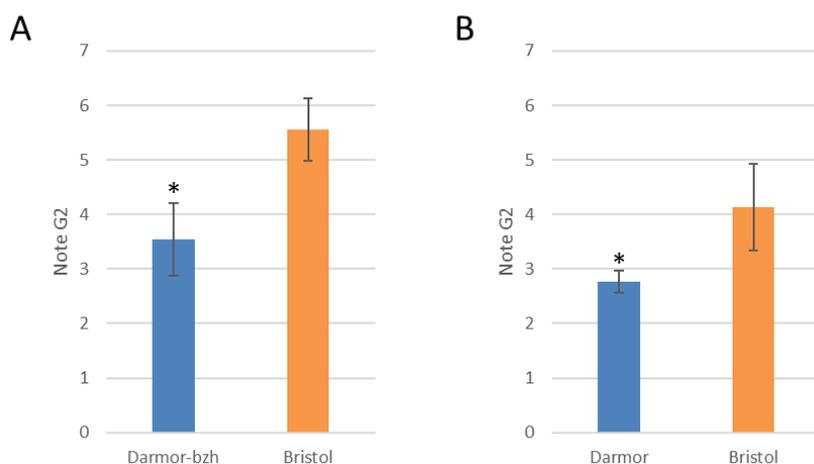


Figure III.1 : Notes G2 obtenues pour les deux géotypes de *B. napus* étudiés ici, lors d'essais au champ en 2014 et 2018

Les notes G2 ont été réalisées à la fin de la saison culturale, comme décrit par Aubertot *et al.* (2004). Ces notations ont été effectuées dans les essais au champ, implantés à Grignon, dans le cadre des projets Leptolife en 2014 (A) et Ephicas en 2018 (B). L'échelle suivante est utilisée pour classer les sections de collets selon le pourcentage de surface nécrosée : 1 : plante saine, sans lésion visible ; 2 : 0-25% ; 3 : 25-50% ; 4 : 50-75% ; 5 : 75-100% ; 6 : section sans tissu vivant, plante versée ou cassée au niveau du collet. Ensuite, pour calculer la note G2 de chaque géotype, le nombre de collets dans chaque classe est pondéré par un coefficient. Plus la note G2 d'un géotype est faible, meilleure est sa résistance quantitative. Les astérisques indiquent une différence significative entre les deux cultivars (Test de Mann & Whitney : * : $p < 0,05$).

Sélection des échantillons analysables

Les données obtenues à partir des échantillons de collets au champ de 2014 ont donné lieu à deux projets menés séquentiellement. Le projet Leptolife consistait à générer et séquencer 420 échantillons représentant tous les stades d'interaction du colza avec *L. maculans* de façon à disséquer le cycle parasitaire de *L. maculans* et à identifier les mécanismes impliqués dans la résistance quantitative de 'Darmor' à *L. maculans* (Gay *et al.*, 2021 ; Delourme *et al.*, en préparation). Le projet Promosol MetaPhoR quant à lui visait à l'analyse des données générées par LeptoLife avec une focalisation côté champignon à l'INRAE Bioger dans l'équipe EPLM et une focalisation côté plante à l'INRAE IGEPP (Rennes).

Les collets isolés de plantes naturellement infectées au champ se caractérisent par une grande hétérogénéité en ce qui concerne la présence et l'activité transcriptomique du champignon dans les tissus. Ainsi, seule une partie des échantillons est exploitable et malheureusement ce n'est que pour certaines dates de prélèvement que les trois répétitions sont exploitables. De plus les échantillons issus de 'Darmor' (ou de 'Darmor-bzh'), un génotype présentant un bon niveau de résistance quantitative, contiennent souvent peu de reads fongiques jusqu'aux dates les plus tardives, les rendant difficiles à exploiter (Tableau III.1). Ainsi, parmi les échantillons des projets Leptolife et Ephicas, seuls les échantillons obtenus à partir des collets au champ du cultivar 'Bristol' et à partir de l'échantillonnage d'avril présentent suffisamment de reads de *L. maculans* pour être statistiquement exploitables. Pour affiner la cinétique d'infection par *L. maculans*, j'ai donc analysé les échantillons obtenus avec le cultivar 'Bristol', issus des projets Leptolife et Ephicas (Tableau III.1).

Tableau III.1 : Données brutes de *L. maculans* issues des projets RNAseq (A) Leptolife et (B) Ephicas.

Les nombres correspondent aux comptages bruts de reads de *L. maculans*.

En gras, figurent les échantillons contenant suffisamment de reads de champignon pour être statistiquement exploitables.

A				B			
Projet	Date de prélèvement	'Darmor-bzh'	'Bristol'	Projet	Date de prélèvement	'Darmor'	'Bristol'
		571	1771			-	15205
	20/11/2013	8301	1153		03/04/2018	-	11054
		3530	2960			-	3293
		440	4204			-	3710
	18/12/2013	610	2649		16/04/2018	-	79065
		411	1187			-	82403
		791	5411			27834	902023
	13/02/2014	1318	23934		02/05/2018	179258	5174673
		1080	2179			862851	524316
		1515	69762	EPHICAS		275598	1850834
LEPTOLIFE	13/03/2014	988	2359179		18/05/2018	2081338	2624867
		22371	77000			50482	1024386
		723	391304			45603	1099464
	04/04/2014	19734	114233		08/06/2018	1265899	9445280
		156308	572108			798337	8685191
		25399	4124235			11114845	-
	14/05/2014	3072	1473017		26/06/2018	1528479	-
		85523	8085839			3216359	-
		38312016	21999128				
	08/07/2014	43187427	21701794				
		50443308	21382380				

Cinétique d'expression des gènes de *L. maculans* lors de l'infection de *B. napus*, en culture au champ

Afin d'obtenir une cinétique d'infection affinée, j'ai analysé ensemble les données RNAseq de 2014 et de 2018. Ainsi, six dates de prélèvement au champ ont pu être exploitées pour analyser la cinétique de colonisation des tiges de *B. napus* par *L. maculans*, d'avril à juillet. Toutefois, les données du projet Leptolife et du projet Ephicas ont été obtenues sur deux années différentes d'expérimentation au champ. Afin de s'assurer de la cohérence entre les dates calendaires et l'avancement réel de la culture de colza entre les deux années, les dates de prélèvements ont été ordonnées selon le cumul des degrés-jours, décompté à partir du 1^{er} janvier. Comme l'illustre la Figure III.2, l'ordre des dates calendaires correspond à celui obtenu en tenant compte du nombre de degrés-jours, à l'exception du 16/04/2018, où le cumul de degrés-jours était légèrement supérieur à celui au 03/04/2014 et à l'exception du 18/05/2018, où de même, le cumul de degrés-jours est supérieur à celui du 15/05/2014.

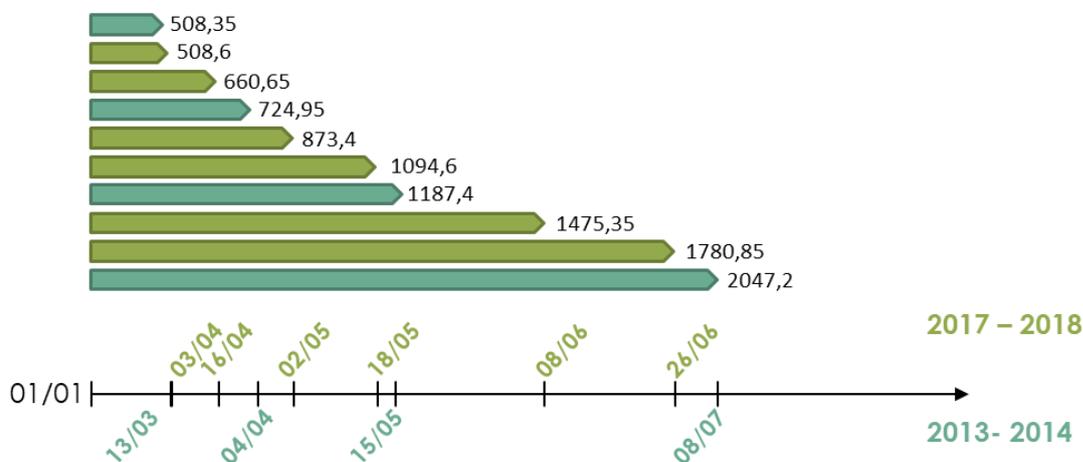


Figure III.2 : Dates de prélèvements ordonnées selon le nombre de degrés-jours à partir du 1^{er} janvier

Afin d'ordonner les dates de prélèvement de chacune des deux années, le cumul de degrés-jours a été calculé pour chaque date, à partir du 1^{er} janvier de l'année d'échantillonnage

Au cours de la cinétique d'infection, 4510 gènes de *L. maculans* sont différentiellement exprimés entre dates ($\text{Log}_2(\text{FC}) > 1,5$; $p < 0,05$) et ont été regroupés en neuf clusters d'expression (Figure III.3A). Comme l'illustre la Figure III.3B, les clusters A2, A3, A4 et A5 en particulier présentent des profils d'expression en « dents de scie ». En effet, les profils d'expression des gènes semblent alterner d'une date à l'autre entre une régulation positive et une régulation négative des gènes. Or, vu l'ordre des échantillons, cela semble correspondre à une variation entre années plutôt qu'entre dates. J'ai donc tenté d'estimer la proportion de gènes dont l'expression subirait un effet « année » (Figure III.4).

Parmi ces 4510 DEG, 1096 gènes sont différentiellement exprimés entre deux dates de 2014 (Leptolife), tandis que seuls 248 gènes sont différentiellement exprimés entre deux dates de 2018 (Ephicas). 4310 gènes sont différentiellement exprimés entre au moins une date de 2014 et une date de 2018, dont 3212 DEG spécifiques des comparaisons entre 2014 et 2018. Ces derniers représentent une part importante des gènes différentiellement exprimés au cours de l'infection au champ. Toutefois, on ne peut pas conclure directement que ces 3212 DEG sont des gènes dont l'expression ne varie que selon l'année d'expérimentation.

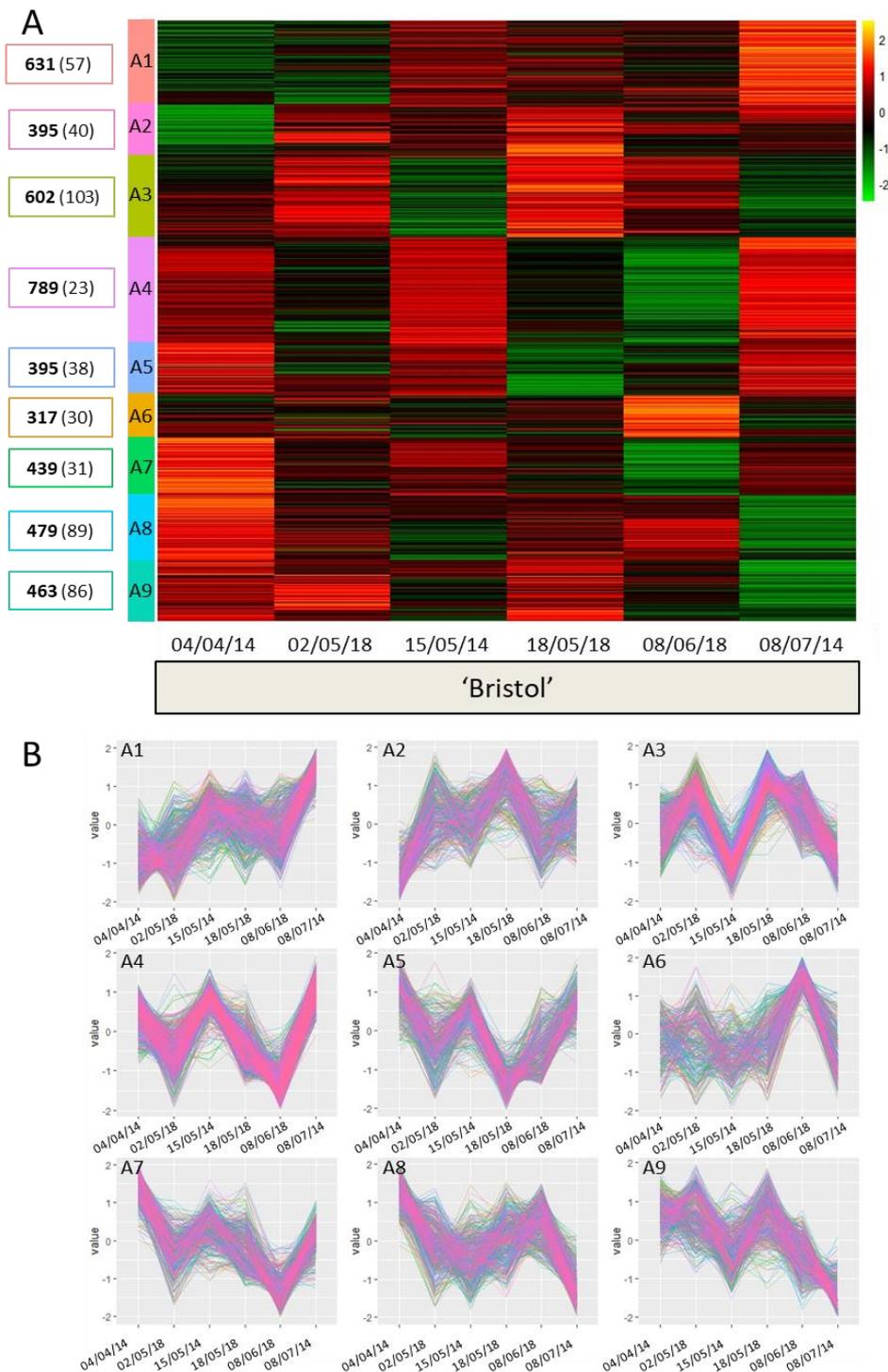


Figure III.3 : Profils d'expression des gènes de *L. maculans*, différentiellement exprimés lors de l'infection en conditions naturelles

Les échantillons de collets ont été collectés lors d'essais en conditions naturelles d'infection, à différentes dates indiquées en abscisse sur les deux figures. La moyenne des FPKM entre réplicats biologiques a été calculée pour chaque condition, puis transformée en Log_2 et centrée-réduite. La méthode de clustering hiérarchique a été utilisée sur les valeurs de $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$ pour définir des clusters d'expression. Les 4510 gènes différentiellement exprimés ont été sélectionnés avec un $\text{Log}_2\text{FoldChange} > 1,5$ et une $p\text{-value} < 0,05$. A gauche de la figure, figurent le nombre de gènes dans chaque cluster, avec entre parenthèses le nombre de PPS. Les tailles des bibliothèques sont indiquées dans le Tableau III.1.

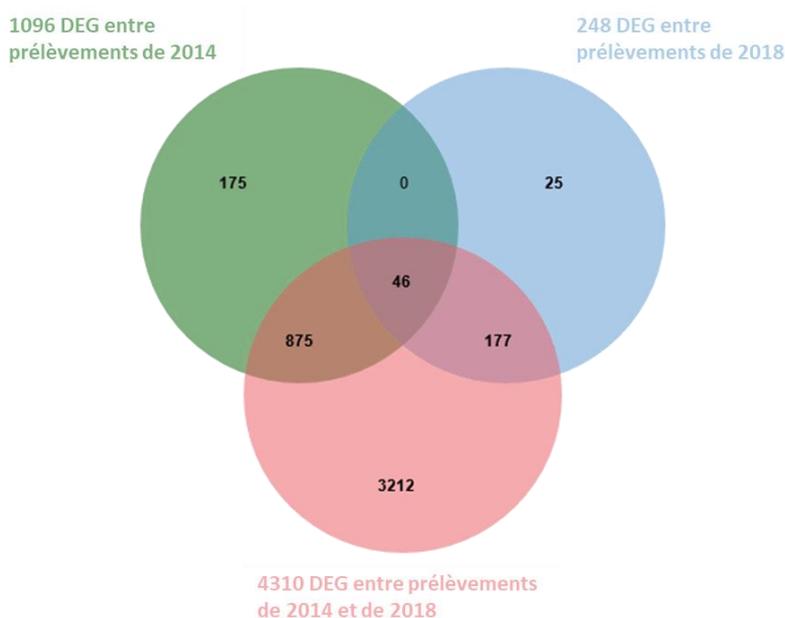


Figure III.4 : Comparaison du nombre de gènes de *L. maculans* différentiellement exprimés entre années d'expérimentation

Parmi les 4510 gènes de *L. maculans* différentiellement exprimés (DEG), identifiés dans la cinétique d'infection (Figure III.3), 1096 gènes sont différentiellement exprimés entre dates de prélèvements de 2014 (Leptolife), 248 le sont entre dates de prélèvements de 2018 (Ephicas) et 4310 gènes le sont entre dates de 2014 et de 2018.

Pour en savoir plus, je me suis intéressée plus précisément aux profils d'expression de gènes précis. En effet, au vu du nombre de gènes différentiellement exprimés dans cette cinétique d'expression, les clusters d'expression regroupent de nombreux gènes (>317 DEG). Malgré ces importantes variations entre années, que nous avons du mal à quantifier précisément, j'ai voulu savoir si certains gènes, parmi les gènes connus notamment, présentaient une cinétique d'expression cohérente par rapport à celle obtenue avec les données Leptolife (Gay *et al.*, 2021). J'ai donc réalisé une analyse d'enrichissement, permettant d'obtenir des informations supplémentaires sur les fonctions des gènes dans chaque cluster. Parmi les neuf clusters, six présentent des enrichissements fonctionnels. Le cluster A1 est enrichi en gènes liés aux processus de dégradation, avec notamment des activités d'oxydoréductase ($p=1,0376E-13$), catalytiques ($p=2,0375E-4$) et d'hydrolase ($p=2,0375E-4$). De même, le cluster A2 est enrichi en activités catalytiques ($p= 3,1825E-8$), en oxydoréductases ($p=2,4690E-4$) et en activités de « peptidase-like » ($p < 3,2412E-2$). Le cluster A4 quant à lui est enrichi en gènes impliqués dans la régulation (transcription, biosynthèse d'ARN, métabolisme des ARN ; $p < 6,1428E-6$). De façon similaire, le cluster A7 se caractérise par un enrichissement en gènes se liant aux acides nucléiques ($p= 3,0762E-2$). Les clusters A3 et A9 présentent de nombreux enrichissements fonctionnels. En s'intéressant aux cinq fonctions les plus statistiquement enrichies, le cluster A3 est enrichi en activités de nucléases et d'endonucléases ($p < 9,0653E-15$) et en activités de transport transmembranaire ($p < 3,6824E-8$). Le cluster A9 quant à lui est enrichi en processus liés à la synthèse des ribosomes ($p < 1,8031E-28$), la traduction ($p= 3,7685E-27$) et la synthèse / le métabolisme des peptides ($p < 8,0652E-27$).

Cinétique d'expression des métabolites secondaires de *L. maculans*, au champ

Lors de l'infection de *B. napus*, *L. maculans* produit des métabolites secondaires. Les gènes permettant leur synthèse sont organisés en cluster d'expression (Stergiopoulos *et al.*, 2013; Collado & Viaud, 2015). Parmi ces gènes, plusieurs types d'enzymes ont un rôle important dans la synthèse des métabolites secondaires. Il s'agit notamment des polykétides synthases (PKS) et des peptides synthétases non-ribosomiques (NRPS). Je me suis donc intéressée à la cinétique d'expression chez *L. maculans* de ces enzymes clés de la synthèse des métabolites secondaires.

Parmi les PKS identifiées chez *L. maculans*, onze sont différentiellement exprimées en condition d'infection naturelle, dont six sont regroupées dans le cluster A1 de la cinétique d'infection (*Lmb_jn3_01173*, *Lmb_jn3_01181*, *Lmb_jn3_02584*, *Lmb_jn3_05348*, *Lmb_jn3_06412* et *Lmb_jn3_11345*). Dans ce cluster, se trouvent également une NRPS-like (*Lmb_jn3_11822*) et une NRPS (*Lmb_jn3_03490*). Deux PKS se situent dans le cluster A2 (*Lmb_jn3_00998* et *Lmb_jn3_10200*), ainsi qu'une NRPS (*Lmb_jn3_00988*), tandis que les trois dernières PKS différentiellement exprimées se répartissent respectivement dans les clusters A4, A5 et A8 (*Lmb_jn3_11305*, *Lmb_jn3_12570* et *Lmb_jn3_05162*). Ces PKS et NRPS sont donc groupés dans cinq clusters d'expression différents, avec des profils d'expression très différents entre gènes

Au cours de l'infection, *L. maculans* produit un métabolite secondaire, la sirodesmine PL. Parmi les 29 gènes qui constituent le cluster de la sirodesmine PL, 16 sont différentiellement exprimés dans l'étude de Gay *et al.* (2021), sont regroupés dans la vague d'expression 6, correspondant à la nécrotrophie en tige et présentent une expression croissante dans les collets au cours de l'infection. Dans notre analyse regroupant les données de 2014 et 2018, 20 gènes parmi les 29 sont différentiellement exprimés et ils se situent dans trois clusters d'expression différents, à savoir les clusters A1, A2 et A4 (Figure III.5). Le gène *Lmb_jn3_00988*, codant la NRPS de ce cluster se trouve dans le cluster d'expression A2, tandis que le facteur de transcription *Lmb_jn3_00971* se situe dans le cluster d'expression A4. Ces 20 gènes, même s'ils sont groupés dans trois clusters d'expression différents dans cette analyse, présentent tout de même des profils similaires. De plus, entre les 16 gènes de la vague d'expression 6 (Gay *et al.*, 2021) et nos 20 gènes différentiellement exprimés, 14 sont communs (indiqués par des astérisques, Figure III.5). Les deux études tendent donc à aller dans le même sens.

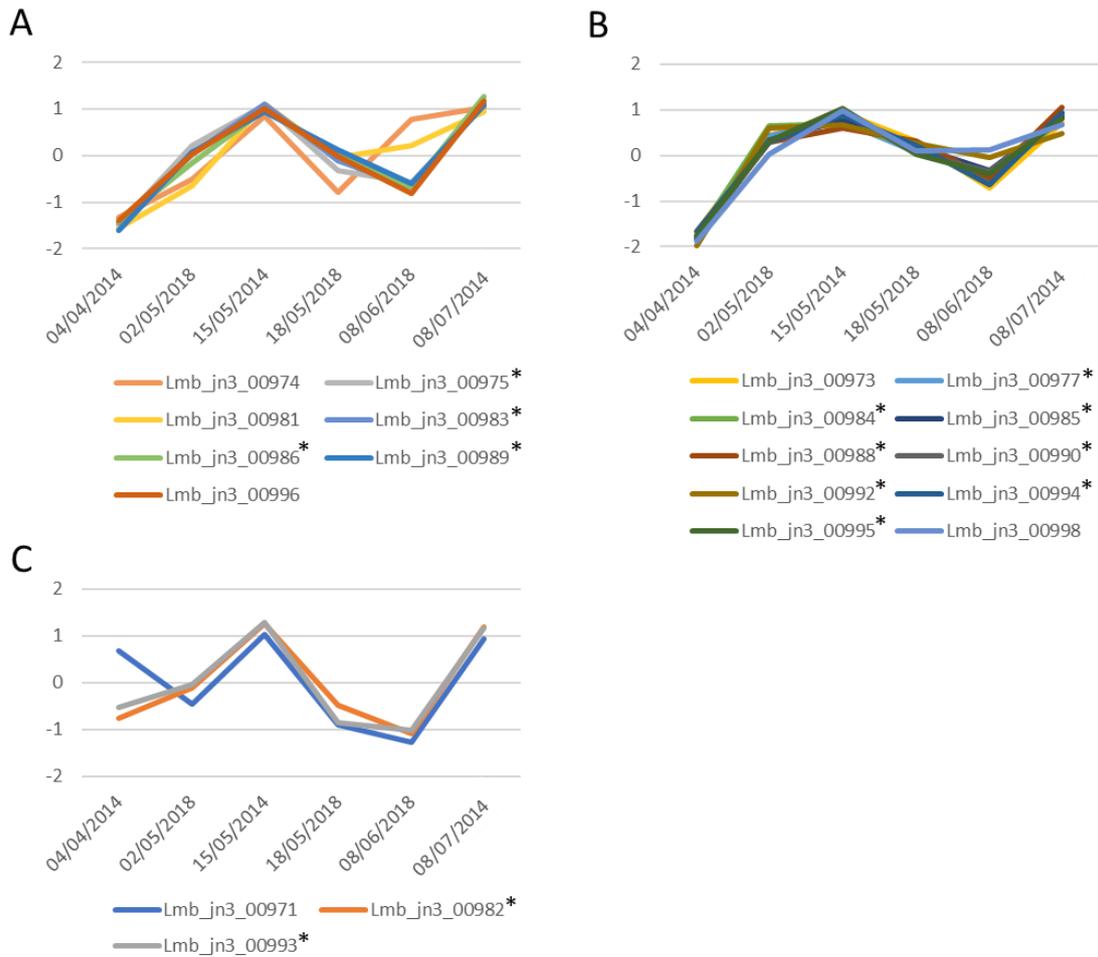


Figure III.5 : Profils d'expression des gènes différentiellement exprimés du cluster de la si-rodsmine PL

Les échantillons de collets ont été collectés lors d'essais en conditions naturelles d'infection, à différentes dates indiquées en abscisse sur les trois figures. La moyenne des FPKM entre réplicats biologiques a été calculée pour chaque condition, puis transformée en Log_2 et centrée-réduite. Les effecteurs ont été regroupés selon les clusters d'expression de la Figure III.3. (A) Les gènes différentiellement exprimés, groupés dans le cluster d'expression A1. (B) Les gènes différentiellement exprimés, groupés dans le cluster d'expression A2. (C) Les gènes différentiellement exprimés, groupés dans le cluster d'expression A4. Les astérisques indiquent les gènes qui ont été groupés dans la vague 6 de l'étude de Gay *et al.* (2021).

Cinétique d'expression des gènes codant des PPS de *L. maculans* en condition d'infection naturelle

D'un point de vue général, trois clusters présentent un enrichissement en petites protéines sécrétées (PPS), le cluster A3 ($p= 3,7122E-19$) avec 103 PPS sur 602 gènes différentiellement exprimés (DEG), le cluster A8 ($p= 1,7557E-18$) avec 89 PPS sur 479 DEG et le cluster A9 ($p= 1,1981E-11$) avec 88 PPS sur 463 DEG. Comme nous l'avons vu précédemment, les profils d'expression des gènes sont très irréguliers au cours de la cinétique (Figure III.3B). Je me suis tout de même intéressée à une partie des gènes caractérisés chez *L. maculans*, à savoir les gènes d'avirulence et les effecteurs tardifs connus. De façon surprenante et intéressante, ces gènes présentent des profils d'expression plus cohérents que ce que nous avons observé d'une manière générale sur la cinétique (Figure III.6). En effet, quatre effecteurs tardifs, groupés dans le cluster A2, sont exprimés de manière croissante jusqu'à mi-mai, puis leur expression chute. Ces quatre effecteurs sont groupés dans la vague 5 de Gay *et al.* (2021), correspondant à la biotrophie en tige, et qui présente un pic en avril-mai, ce qui est cohérent avec ce que nous avons obtenu.

Les trois gènes d'avirulence, *AvrLm2*, *AvrLm11* et *AvrLm5-9*, inclus dans le cluster A7 sont fortement exprimés début avril, puis leur niveau d'expression diminue drastiquement et n'atteint plus le niveau initial de la première date de prélèvement (Figure III.6B). Dans l'étude de Gay *et al.* (2021), ces trois gènes sont groupés dans la vague 2, c'est-à-dire la vague de la biotrophie dans les cotylédons, pétioles et tiges. Dans les collets au champ, cette vague est fortement exprimée en mars puis décroît jusqu'en juillet, ce qui est similaire à ce que nous avons observé pour ces trois gènes dans le cluster A7. De nouveau, ces résultats vont dans le même sens que ce qui avait été observé par Gay *et al.* (2021).

Dans le cluster A8, se trouvent six gènes d'avirulence (*AvrLm4-7*, *AvrLm3*, *AvrLm6*, *AvrLm13*, *AvrLm10A* et *AvrLm10B*), ainsi que l'effecteur tardif *LmSTEE98*, bien que son profil d'expression diffère notablement des autres (Figure III.6C). Les six gènes d'avirulence présents dans ce cluster A8, sont groupés dans la vague 2. Leur profil est cohérent entre notre analyse et celle de Gay *et al.* (2021), à savoir un pic d'expression en avril, puis une expression qui décroît ensuite. *A contrario*, *LmSTEE98* présente plutôt un pic d'expression début juin.

Enfin, cinq effecteurs tardifs appartiennent au cluster A9. Ils présentent un niveau d'expression relativement constant d'avril à mi-mai puis il diminue jusqu'à atteindre un niveau d'expression très faible début juillet (Figure III.6D). Parmi les cinq effecteurs tardifs du cluster A9, *Lm1277*, *Lm6826* et *LmSTEE1* appartiennent à la vague 5 décrite par Gay *et al.* (2021), c'est-à-dire la biotrophie en tige. Au champ, les gènes de cette vague présentent un pic en avril, avec une décroissance relativement lente de l'expression jusqu'en juillet (Gay *et al.*, 2021). Quant à *LmSTEE35* et *LmSTEE11*, ils sont situés dans la vague 4, qui dans les échantillons au champ présente également un pic, voire un plateau en avril-mai. Finalement, dans ce cluster A9, les effecteurs présentent aussi un profil d'expression relativement cohérent avec celui observé par Gay *et al.* (2021).

Dans cette analyse de la cinétique d'infection, l'un des cinq effecteurs tardifs étudiés dans le chapitre I, *LmSTEE78* n'est pas différentiellement exprimé.

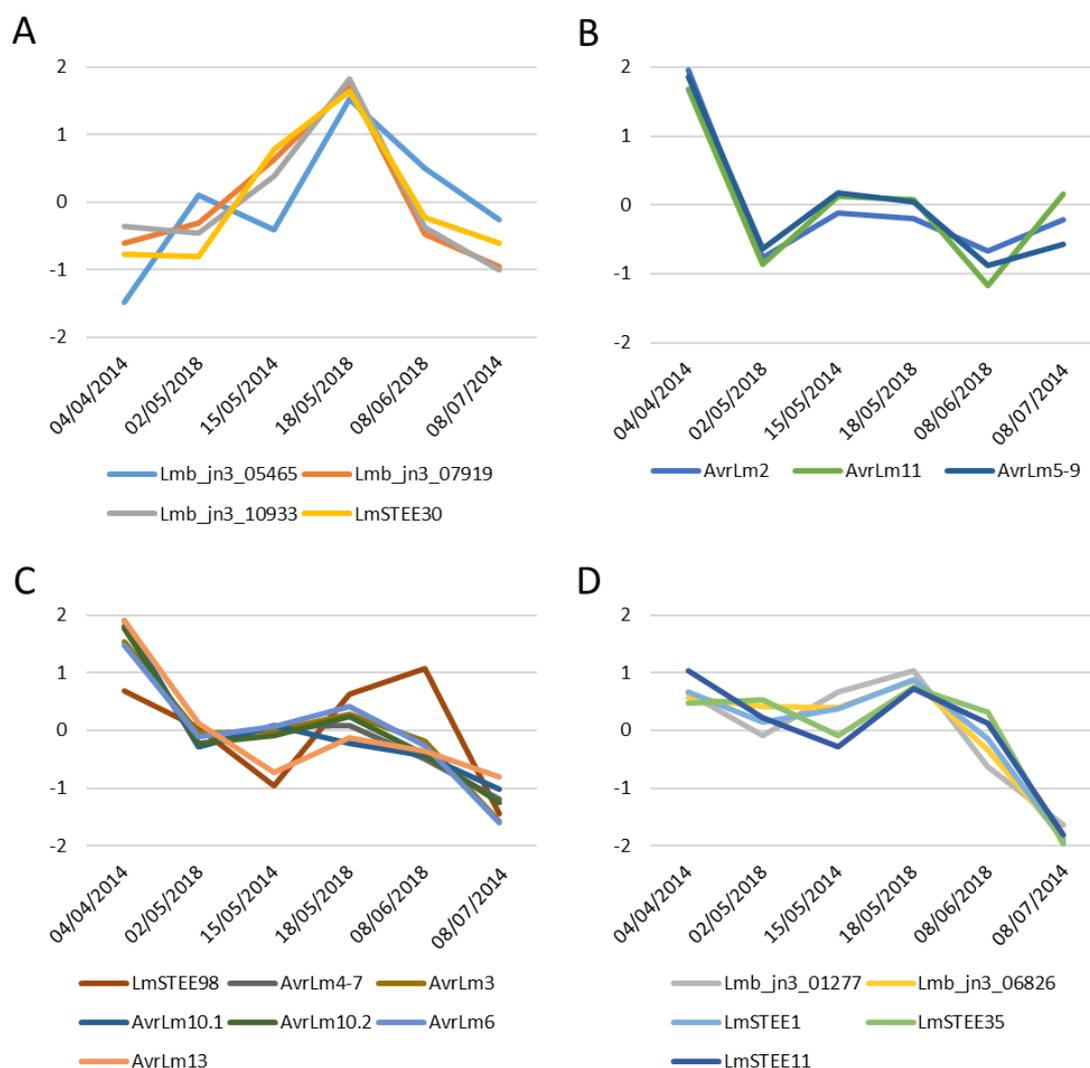


Figure III.6 : Profils d'expression des effecteurs précoces et tardifs de *L. maculans* au champ

Les échantillons de collets ont été collectés lors d'essais en conditions naturelles d'infection, à différentes dates indiquées en abscisse sur les quatre figures. La moyenne des FPKM entre réplicats biologiques a été calculée pour chaque condition, puis transformée en Log₂ et centrée-réduite. Les effecteurs ont été regroupés selon les clusters d'expression de la Figure III.3. (A) Les effecteurs tardifs différentiellement exprimés, appartenant au cluster A2. (B) Les effecteurs précoces différentiellement exprimés, appartenant au cluster A7. (C) Les effecteurs précoces et tardifs différentiellement exprimés, appartenant au cluster A8. (D) Les effecteurs précoces et tardifs différentiellement exprimés, appartenant au cluster A9.

Cinétique d'expression des autres gènes de *L. maculans* impliqués dans la pathogénie

Les autres gènes impliqués dans la pathogénie de *L. maculans* ne sont pas regroupés dans un cluster d'expression. Ainsi, le gène *Lmb_jn3_05329*, codant un peptide RALF (« Rapid Alkalinization Factor ») se trouve dans le cluster A7. Parmi les quatre gènes ayant un domaine LysM, trois sont différentiellement exprimés en conditions naturelles d'infection. *Lmb_jn3_00461*, *Lmb_jn3_10047* et *Lmb_jn3_04300* sont respectivement dans les clusters A7, A8 et A5. De même, parmi les sept gènes codant des isochorismatases, quatre sont différentiellement exprimées : *Lmb_jn3_11641* (cluster A9), *Lmb_jn3_10045* (cluster A8), *Lmb_jn3_06552* (cluster A1) et *Lmb_jn3_09920* (cluster A6). Enfin, l'un des deux gènes codant une protéine NEP-like (« Necrosis and Ethylene-inducing Peptide »), *Lmb_jn3_10035* se trouve dans le cluster A9, tandis que le second gène n'est pas différentiellement exprimé dans cette analyse de l'infection au champ. Ces gènes présentent des profils très différents les uns des autres, dont certains semblent fortement influencés par l'année d'expérimentation, contrairement à ce que l'on observe pour les effecteurs.

Notre approche n'a pas permis d'obtenir des clusters d'expression aussi bien définis que l'analyse menée sur les données Leptolife seules (Gay *et al.*, 2021). Pour une majorité de gènes, les différences d'expression entre années sont vraiment importantes. Il est tout de même intéressant (I) de noter qu'à l'exception de *LmSTEE98*, les effecteurs présentent des profils d'expression cohérents avec ce qui avait été observé dans l'étude de Gay *et al.* (2021), et (II) d'observer l'impact des conditions environnementales sur l'expression des gènes fongiques au cours de l'infection. Une approche de comparaison à une condition « témoin », telles que les conditions *in vitro*, pourrait peut-être en partie palier à cette contrainte de variabilité interannuelle et aurait peut-être permis d'obtenir des clusters d'expression mieux définis.

En final, cette étude ne nous permet ni d'affiner la cinétique d'expression des gènes de *L. maculans* par rapport à ce qui a été fait par Gay *et al.* (2021), ni de définir de marqueurs robustes de la résistance quantitative côté champignon, du fait de l'insuffisance des reads de *L. maculans* dans les collets de 'Darmor'.

Identification de gènes candidats, marqueurs de la résistance quantitative

Les données obtenues dans le cadre du projet Ephicas nous ont permis d'analyser les gènes différentiellement exprimés, du côté de la plante, entre le cultivar sensible 'Bristol' et le cultivar 'Darmor' présentant un bon niveau de résistance quantitative, avec trois dates communes entre les deux, entre mai et juin 2018 (Tableau III.2).

Tableau III.2 : Données brutes de *B. napus* issues du projet RNAseq Ephicas

Les nombres correspondent aux comptages bruts de reads de *B. napus*.

Projet	Date de prélèvement	'Darmor'	'Bristol'
EPHICAS	03/04/2018	-	108235539
		-	67074844
		-	121442178
	16/04/2018	-	103786702
		-	57379035
		-	32381211
	02/05/2018	102753876	125131568
		165272935	67510974
		136566156	89756873
	18/05/2018	101676380	74470829
		133601886	84248687
		160443980	103901861
	08/06/2018	82200815	37509573
		82266647	54639893
		57339577	45215331
26/06/2018	45280459	-	
	71690850	-	
	68593226	-	

J'ai ainsi identifié 12886 gènes de *B. napus* différentiellement exprimés entre les cultivars 'Darmor' et 'Bristol' ($\text{Log}_2\text{FC} > 2,5$, $p < 0,05$), regroupés en neuf clusters (Figure III.7). Pour cela les deux cultivars ont été comparés, à chaque date de prélèvement ou bien avec la date la plus proche lorsqu'un seul des deux cultivars était disponible à une date de prélèvement. Deux clusters se distinguent des autres, les clusters B1 et B9. En effet, ils sont tous deux fortement différentiellement exprimés entre 'Darmor' et 'Bristol', à toutes les dates analysées. Le cluster B1 regroupe des gènes régulés positivement chez 'Bristol' en comparaison à 'Darmor', tandis que c'est l'inverse pour le cluster B9. Dans une moindre mesure, les clusters montrant des similitudes d'expression différentielle avec B1, soit B4 et B5, montrant une induction d'expression plus intense chez 'Bristol' que chez 'Darmor', pourraient également inclure des gènes marqueurs candidats intéressants.

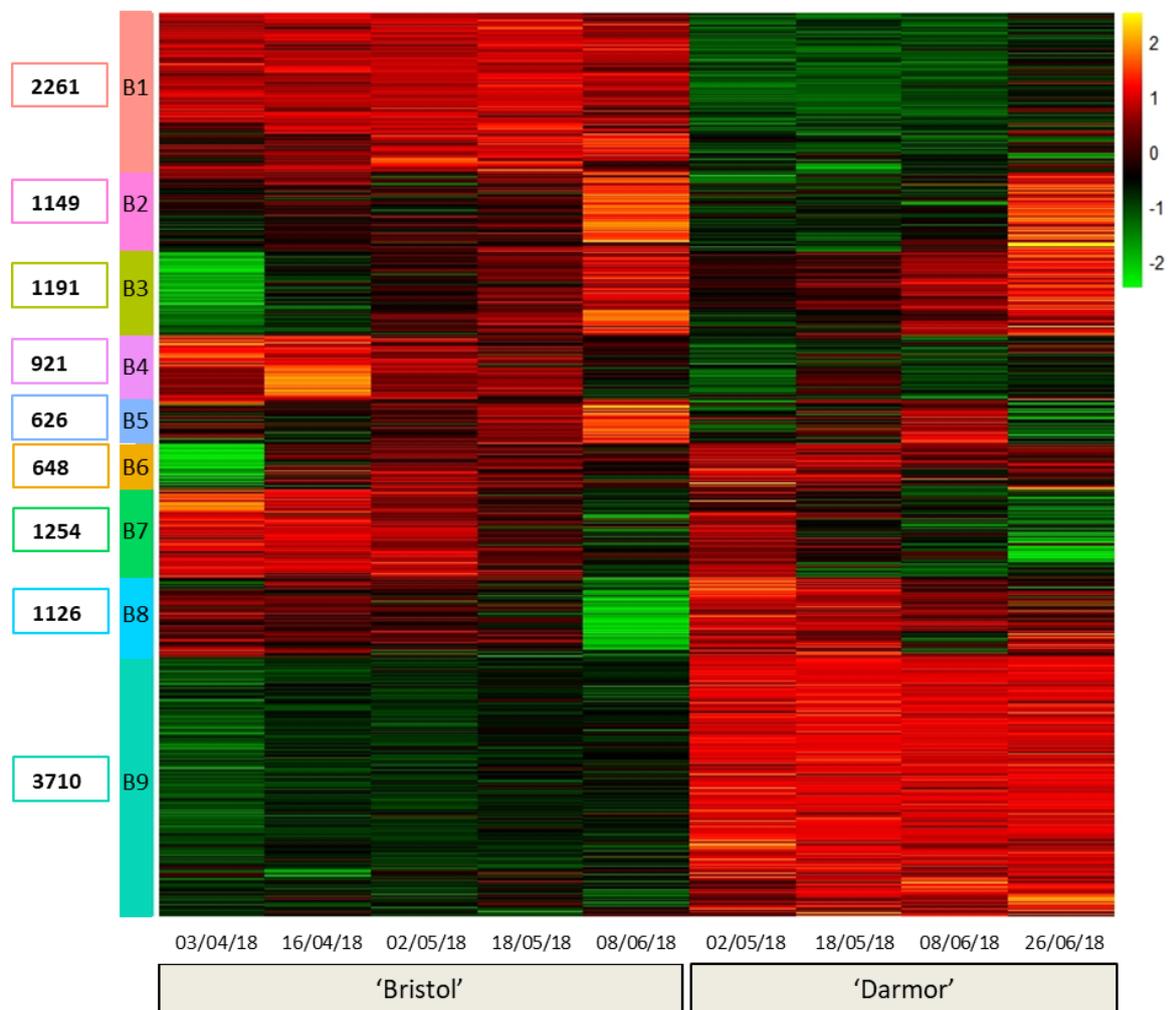


Figure III.7 : Heatmap des gènes de *B. napus* différentiellement exprimés entre un cultivar sensible et un cultivar présentant de la résistance quantitative en conditions d'infection naturelles

Des échantillons de collets de deux génotypes, le génotype sensible 'Bristol' et le génotype 'Darmor' présentant un bon niveau de résistance quantitative, ont été collectés en condition d'infection naturelle, à différentes dates indiquées sur l'axe x. La valeur FPKM moyenne des réplicats biologiques a été calculée pour chaque condition, puis transformée en Log_2 et centrée-réduite. Pour définir les clusters d'expression, un clustering hiérarchique a été utilisé sur les valeurs $\text{Log}_2(\text{FPKM}+1)$. Les 12886 gènes différentiellement exprimés ont été identifiés par comparaison entre les échantillons 'Bristol' et 'Darmor', date par date. Ils ont été sélectionnés avec un $\text{Log}_2\text{FoldChange} > 2,5$ et une valeur $p < 0,05$. Les tailles des bibliothèques sont indiquées dans le Tableau III.2. A gauche de la figure, figurent le nombre de gènes dans chaque cluster.

Enrichissement en fonctions prédites chez *B. napus*

Parmi les neuf clusters, six présentent entre 69 et 202 fonctions et motifs enrichis (Figure III.8). A l'exception du cluster B4, huit clusters sont entre autres enrichis en gènes liés aux réponses de défense de la plante. En s'intéressant plus particulièrement aux clusters B1 et B9, compte-tenu de leur nombre de gènes différentiellement exprimés, respectivement 2261 DEG et 3710 DEG, il s'avère que ces deux clusters présentent peu de fonctions enrichies, soit respectivement 8 et 28 fonctions. Dans le cluster B1, plusieurs fonctions attirent l'attention, notamment les voies de signalisation hormonales et la régulation de la réponse immunitaire innée. Dans le cluster B9, nous retrouvons également les réponses de défense. Par la suite, je me suis focalisée sur l'enrichissement en RGA dans les neuf clusters de cette analyse.

Cluster B1	8 fonctions enrichies	Régulation de la réponse immunitaire innée Voie de signalisation hormonale
Cluster B2	93 fonctions enrichies	Réponse au stress oxydatif Réponse cellulaire à la privation de saccharose
Cluster B3	202 fonctions enrichies	Réponse / liaison à la chitine / Activités de chitinase Réponse de défense aux champignons Réponse de défense par dépôt de callose Résistance systémique induite / Résistance systémique acquise Réponse à l'acide salicylique / éthylène
Cluster B4	12 fonctions enrichies	Synthèse des parois végétales
Cluster B5	121 fonctions enrichies	Réponse à la chitine Régulation de la voie de signalisation de l'acide jasmonique Régulation de la voie de signalisation de l'acide salicylique Réponses au peroxyde d'hydrogène / stress oxydatifs Métabolisme des espèces réactives de l'oxygène
Cluster B6	69 fonctions enrichies	Réponse / liaison à la chitine / Activités de chitinase Réponse de défense Réponse à l'acide salicylique Résistance systémique acquise Voie de signalisation hormonale Réponse hypersensible de la plante
Cluster B7	144 fonctions enrichies	Réponse à la chitine Régulation des défenses de la plante / Réponse aux champignons Réponse à l'acide salicylique Voie de signalisation activée par l'éthylène
Cluster B8	58 fonctions enrichies	Biosynthèse d'acide jasmonique
Cluster B9	28 fonctions enrichies	Réponse de défense

Figure III.8 : Enrichissement en Gene Ontology pour chacun des neuf clusters d'expression correspondant aux 12 886 gènes différentiellement exprimés entre 'Bristol' et 'Darmor'

Pour chaque cluster d'expression, l'enrichissement en fonctions biologiques a été évalué à l'aide de l'outil SeqEnrich (Becker *et al.*, 2017). Seuls les enrichissements possiblement en lien avec l'infection par *L. maculans* figurent dans la partie droite.

Enrichissement en RGA

Delourme *et al.* ont identifié 3637 analogues de gènes de résistance (RGA, ici incluant les NB-LRR, « Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat » ; RLK, « Receptor-like kinase » ; WAKL, « Wall-associated kinase-like » ; RLP, « Receptor-like protein » et SP, « Secreted proteins ») ont été prédits dans le génome de *B. napus* (résultats en cours de publication). Afin d'identifier des gènes marqueurs de la résistance quantitative, j'ai analysé l'enrichissement en RGA dans chaque cluster de gènes différentiellement exprimés entre 'Bristol' et 'Darmor'. Parmi les neuf clusters, quatre présentent un enrichissement en RGA, dont le cluster B9, qui regroupe des gènes différentiellement exprimés entre 'Darmor' et 'Bristol', à toutes les dates étudiées (Tableau III.3).

Tableau III.3 : Enrichissement en analogues de gènes de résistance (RGA) parmi les gènes différentiellement exprimés entre 'Darmor' et 'Bristol'

L'analyse de DEG a été réalisée sur les données RNAseq de 2018, mappées sur la V10 du génome de 'Darmor' (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020).

L'enrichissement en RGA dans chaque cluster a été évalué par un test du Chi² : *** <0,001.

Clusters	Génome	Génome	Nombre de RGA ^c	Pourcentage de RGA ^d
	'Darmor' V10 ^a	'Darmor' V5 ^b		
B1	2261	1449	56	3,86%
B2	1149	958	25	3,34%
B3	1191	1020	70	6,96% ***
B4	921	465	31	7,10% ***
B5	626	530	9	2,08%
B6	648	529	72	13,80% ***
B7	1254	1081	34	3,05%
B8	1126	938	31	3,09%
B9	3710	2346	124	5,71% ***
Total	108190	101040	3511	3,6%

^a Nombre de DEG dans chaque cluster (V10)

^b Nombre de DEG ayant une correspondance dans la V5 du génome (Chalhoub *et al.*, 2014)

^c Nombre de RGA déterminé dans chaque cluster, sur la base de la V5 du génome

^d Pourcentage de RGA correspondant au nombre de RGA par rapport au nombre de DEG de la V5

Par la suite, j'ai mené deux analyses complémentaires en parallèle, une première analyse des gènes induits chez 'Darmor' au champ et en conditions contrôlées, sur le set de 12 886 gènes (Figures III.7 et III.9A) et une seconde analyse des gènes les plus différentiellement exprimés, sur un set plus restreint de 684 DEG ($\text{Log}_2(\text{FC}) > 10,0$; $p < 0,01$) (Figure III.9B). Pour ces deux analyses, deux filtres communs ont été appliqués : les gènes sont différentiellement exprimés entre 'Darmor-bzh' et 'Bristol', en conditions d'infection naturelle à au moins une date en 2014 (Entre novembre et mai ; $\text{Log}_2(\text{FC})$ fixés au même seuil que celui de l'analyse correspondante) et les gènes différentiellement exprimés sont groupés dans le cluster d'expression B9 en 2018. Ces deux critères ont permis de restreindre les listes des deux analyses à respectivement 1171 DEG et 250 DEG.

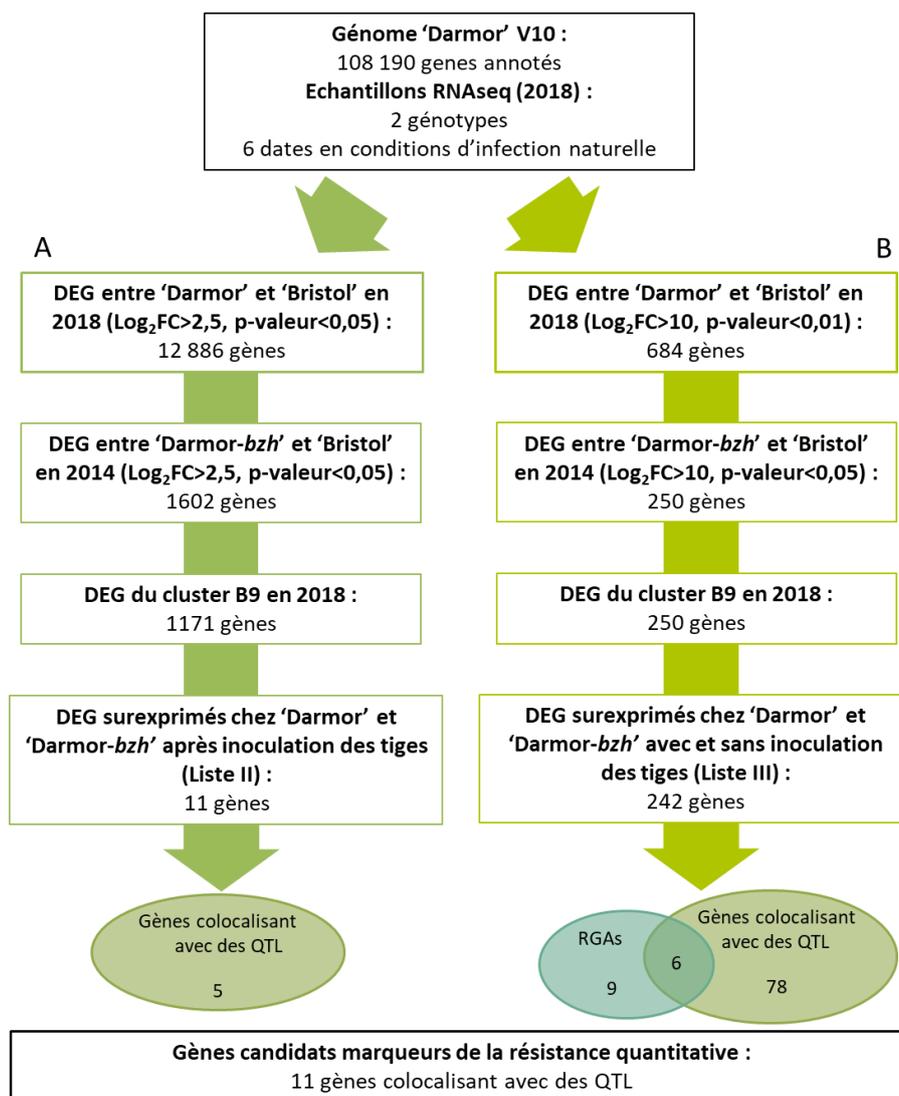


Figure III.9 : Sélection de 11 gènes candidats, marqueurs de la résistance quantitative

Deux approches ont été utilisées en parallèle. Ces deux approches consistaient à identifier des gènes marqueurs différemment exprimés entre 'Darmor' et 'Bristol' en 2018 (données Ephicas) et en 2014 (Données MtaPhoR), à partir d'un set de 12 886 gènes différemment exprimés (A) ou à partir d'un set de 684 gènes très fortement différemment exprimés (B). Pour ces deux approches, nous avons sélectionnés les gènes appartenant au cluster B9 de la Figure III.7. Ensuite, ont été sélectionnés des gènes induits chez 'Darmor' au champ et en tiges en conditions contrôlées (A) ou constitutivement induits dans les tiges chez 'Darmor' (B). DEG pour « Differentially Expressed Gene ».

Afin d'identifier des gènes marqueurs candidats induits chez 'Darmor' au champ et en conditions contrôlées (Figure III.9A), je me suis intéressée aux gènes différentiellement exprimés entre 'Darmor' et 'Bristol' lors de tests sur plantes entières, réalisés en conditions contrôlées. L'équipe de Régine Delourme a sélectionné des gènes spécifiquement induits à 14 et/ou 28 jours après inoculation, dans 'Darmor' & 'Darmor-*bzh*' après inoculation avec JN2 & NZT4 et jamais induits dans 'Bristol' avec JN2 ou NZT4 (Liste II, Résultats MetaPhoR en cours de publication). Ainsi, 11 gènes parmi les 1171 DEG de cette analyse sont inclus dans la liste II, avec parmi les 11 gènes, cinq qui colocalisent avec cinq régions QTL de résistance au phoma du colza différentes (Tableau III.4 et Figure III.9A).

Afin d'identifier les gènes les plus différentiellement exprimés entre 'Darmor' et 'Bristol', j'ai poursuivi la seconde analyse, sur le set restreint des 250 DEG (Figure III.9B). Parmi eux, 242 gènes sont constitutivement surexprimés chez le cultivar résistant 'Darmor' ou 'Darmor-*bzh*' par rapport à 'Bristol' (Liste III, Résultats MetaPhoR en cours de publication). Pour affiner la liste, j'ai alors recherché les QTL de résistance au phoma et les analogues de gènes de résistance (RGA) parmi ces 242 gènes. J'ai ainsi pu identifier six RGA qui colocalisent avec des QTL de résistance (Tableau III.4 et Figure III.9B). Ces six RGA correspondent à des gènes prédits, codant deux NLR, trois RLK et un RLP et sont situés dans trois régions QTL différentes. Les 78 autres gènes de cette analyse, colocalisant avec des QTL de résistance, se situent dans 17 régions QTL différentes. Parmi ces 78 gènes, 48 ont une fonction prédite, mais sans lien évident avec la résistance de la plante.

Ainsi, les cinq gènes colocalisant avec des QTL de résistance, identifiés en recherchant les gènes induits chez 'Darmor' au champ et en conditions contrôlées, et les six RGA colocalisant également avec des QTL de résistance, identifiés en recherchant les gènes les plus surexprimés, pourraient constituer de bons gènes marqueurs candidats.

Tableau III.4 : Liste des gènes marqueurs candidats

Gènes différentiellement exprimés entre 'Darmor' et 'Bristol'	Annotation sur le génome de 'Darmor_V5'	Seuil de significativité Log2(FC)	Clusters	Fonction (Chalhoub et al., 2014)	Fonction (Girard et al., 2017)	Categorie 1	Categorie 2	QTL region (Kumar et al., 2018)	Liste MetaPhoR	FC_Field_MetaPhoR (2014) - Darmor-bzh VS Bristol					
										Novembre	Décembre	Février	Mars	Avril	Mai
A07p19870.1_BnaDAR	BnaA07g146100	>2.5	cluster:9	RmC-like_cupins_superfamily_protein	germin-like protein 9	-	-	A07-2	I & II	46.02	81.69	34.55	201.89	20.87	286.03
C01p20460.1_BnaDAR	BnaC01g169800	>2.5	cluster:9	Acyl_carrier_protein_4%2C_chloroplastic	acyl carrier protein 4	-	-	C01-2	II & III	3.74	5.38	5.96	8.33	4.34	5.57
C07p22920.1_BnaDAR	BnaC07g152600	>2.5	cluster:9	Protein_NLP4	Plant regulator RWP-RK family protein	-	-	C07-1	II	1.73	8.21	1.45	4.35	6.00	2.52
C04p10000.1_BnaDAR	BnaC04g076000	>2.5	cluster:9	Protein_NRT1_PTR_FAMILY_5.6	Major facilitator superfamily protein	-	-	C04-2	II	2.64	9.39	3.36	3.44	9.03	3.67
A01p34120.1_BnaDAR	BnaA01g255900	>2.5	cluster:9	Domain_of_unknown_function_(DUF1995)	Domain of unknown function (DUF1995)	-	-	A01-2	II	2.55	6.39	4.16	3.15	4.37	3.14
A09p21600.1_BnaDAR	BnaA09g175300	>10.0	cluster:9	Disease_resistance_protein_RP34	Toll-interleukin-Resistance (TIR) domain family protein	RGA	NLR	A09-3	III	1505.52	290.76	545.32	2581.37	755.04	267.51
C03p13440.1_BnaDAR	BnaC03g117500	>10.0	cluster:9	Receptor-like_protein_kinase_At5g59670	Leucine-rich repeat protein kinase family protein	RGA	RLK	C03-1	III	1739.23	354.57	1285.92	162.24	2633.24	49.22
C08p46750.1_BnaDAR	BnaC08g405500	>10.0	cluster:9	-	RP55-like 1	RGA	NLR	C08-3	III	3987.47	4338.96	5116.43	3382.11	4783.80	356.80
C08p47590.1_BnaDAR	BnaC08g414700	>10.0	cluster:9	Aldolase_superfamily_protein	-	RGA	RLP	C08-3	III	699.96	920.29	1210.04	841.46	618.69	121.57
C08p48220.1_BnaDAR	BnaC08g421000	>10.0	cluster:9	G-type_lectin_S-receptor-like_serine/threonine-protein_kinase_At1g11410	-	RGA	RLK	C08-3	III	1258.73	2426.77	420.34	1640.53	639.64	189.19
C08p48230.1_BnaDAR	BnaC08g421100	>10.0	cluster:9	G-type_lectin_S-receptor-like_serine/threonine-protein_kinase_SDI-13	-	RGA	RLK	C08-3	III	617.69	1124.86	6482.57	554.70	813.56	190.58

Liste I: gènes spécifiquement induits à 14 et/ou 28 jours post-inoculation chez 'Darmor' & 'Darmor-bzh' après inoculation avec 'Bristol' & jamais induits chez 'Bristol' avec JN2 ou NZT4

Liste II: gènes dont l'expression est similaire chez 'Darmor'/'Darmor-bzh' & 'Bristol' dans les plantes inoculées avec de l'eau et significativement plus exprimés à 14 et/ou 28 jpi chez 'Darmor' & 'Darmor-bzh' par rapport à 'Bristol' après inoculation avec JN2 & NZT4

Liste III: gènes significativement plus exprimés à 14 et/ou 28 jpi dans 'Darmor' & 'Darmor-bzh' par rapport à 'Bristol' dans les plantes inoculées avec de l'eau et après inoculation avec JN2 & NZT4

RGA : "Resistance Gene Analog"

4. Discussion

Dans ce chapitre, l'objectif était double : (I) affiner l'analyse transcriptomique de la cinétique d'infection de *B. napus* par *L. maculans* en conditions naturelles d'infection pour décortiquer les phases clé de la colonisation et (II) identifier des gènes marqueurs de la résistance quantitative pour corrélérer leur expression au champ avec la note G2.

Avec les données transcriptomiques acquises, nous voulions détailler la cinétique d'infection des deux côtés du pathosystème et identifier des gènes différentiellement exprimés selon le niveau de résistance quantitative du génotype infecté, du côté du champignon dans un premier temps puis du côté de la plante ensuite.

Concernant la cinétique d'infection, selon le projet RNAseq, les données du côté de la plante n'ont pas été mappées sur la même version du génome de *B. napus* (Données MetaPhoR mappées sur la V5 (Chalhoub *et al.*, 2014) ; Données Ephicas mappées sur la V10 (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020)). Seule la cinétique d'infection du côté du champignon a donc pu être réalisée, sur les deux jeux de données. Pour l'identification de gènes fongiques marqueurs de la résistance quantitative, les données de 2014 et de 2018 ne contenaient pas suffisamment de données fongiques chez 'Darmor' pour être statistiquement exploitables. Les deux années d'échantillonnage sont cohérentes concernant la faible quantité de reads fongiques chez 'Darmor' et l'augmentation de la quantité de reads fongiques à partir d'avril chez 'Bristol'. Il serait intéressant de parvenir à améliorer le protocole de prélèvement et d'extraction, afin d'obtenir des données fongiques plus précocement dans la saison culturale, ainsi que des données pour des cultivars tels que 'Darmor'. Toutefois, nos données suggèrent une forte variabilité interannuelle de l'expression génique chez *L. maculans*. De même, si le postulat selon lequel la résistance quantitative a surtout pour effet de retarder la progression du champignon, on peut penser qu'il n'y aura pas de différence qualitative (mais plutôt séquentielle) d'expression des gènes fongiques entre un cultivar sensible et un cultivar présentant une bonne résistance quantitative. Ces deux points rendront sans doute difficile l'identification de gènes marqueurs fongiques. Pour le moment, la recherche de gènes marqueurs de la résistance quantitative n'a donc été menée que du côté de *B. napus*, avec les données de 2018, mappées sur une version améliorée du génome. Le parallèle avec les données de 2014 a tout de même été en partie réalisé.

Malgré ces contraintes techniques, nous avons pu réaliser des analyses sur la cinétique d'infection de *L. maculans* au champ. En combinant les données RNAseq des échantillons de collets, prélevés en 2014 et en 2018, nous avons constaté que le niveau d'expression d'une majorité des gènes fongiques différentiellement exprimés varie, au moins en partie à cause d'un effet « année ». Cette différence entre années n'est pas vraiment inattendue. Les conditions environnementales, incluant la cinétique d'infection, la variation des populations fongiques et l'intensité de la maladie, peuvent être très différentes entre une année et la suivante.

Cette analyse illustre bien la variabilité interannuelle, les différences de conditions environnementales et par conséquent les répercussions sur l'expression des gènes fongiques. De plus, les souches de *L. maculans* présentes dans les échantillons ont évoluées entre 2014 et 2018, avec notamment une augmentation des souches avirulentes pour *Rlm7* (12,3% en 2013 et 48,9% en 2018). Ces différences de composition de la population pourraient expliquer une partie des différences interannuelles d'expression des gènes. Les populations ont été isolées en 2013 et 2017. Il serait donc possible d'en savoir plus, avec des approches de génétique des populations. Ces résultats confirment la nécessité d'évaluer la résistance quantitative des génotypes en répétant les essais au champ sur plusieurs années et en plusieurs lieux.

Malgré ces variations interannuelles, lorsque l'on s'intéresse à des gènes particulièrement pertinents pour la pathogénèse fongique, tels que les effecteurs, la plupart d'entre eux présentent un profil d'expression cohérent avec ce qui avait été décrit par Gay *et al.* (2021) et associé à des vagues d'expression cohérentes avec un stade clé de la colonisation des tissus. En effet, à l'exception de *LmSTEE98*, dont le profil diffère légèrement de l'attendu, les 18 effecteurs précoces et tardifs différentiellement exprimés dans notre cinétique ont des profils d'expression comparables à ceux des vagues d'expression auxquels ils ont été affectés par Gay *et al.* (2021). Il convient de préciser que dans l'étude de Gay *et al.* (2021), les vagues d'expression sont basées sur le profil moyen des petites protéines sécrétées de chaque vague, cette valeur moyenne pouvant masquer des disparités individuelles. En ce sens, une analyse de la corégulation des gènes de chaque vague de Gay *et al.* (2021) montre que la seule forte corégulation est observée pour les gènes de la vague 2 (biotrophie), alors qu'elle est beaucoup plus limitée pour les gènes des vagues 4, 5 et 6 qui abritent les effecteurs tardifs. Il n'est donc pas étonnant que les profils d'expression des gènes codant des effecteurs précoces et tardifs que nous avons étudiés ici, soient moins lissés dans notre étude. De la même manière, une majorité des gènes du cluster de la sirodesmine PL présentent un profil d'expression similaire à celui de la vague dans laquelle ils sont situés, c'est-à-dire la vague 6 (nécrotrophie en tige) de l'étude de Gay *et al.* (2021).

Bien que légèrement différents, les résultats de ces deux analyses transcriptomiques vont dans le même sens. Les effecteurs tardifs étudiés jusqu'à présents, à l'exception de *LmSTEE78* dans notre étude, sont exprimés durant la colonisation de la tige au champ, avant le passage du champignon à la nécrotrophie, ce qui confirme qu'ils contribuent à la biotrophie en tige. Cette grande cohérence entre les deux années pour ce qui concerne l'expression des effecteurs candidats tend à confirmer l'importance de ces molécules pour le succès parasitaire du champignon alors que leur rôle précis dans le pouvoir pathogène n'est pas encore caractérisé. Pouvoir détailler plus finement la cinétique d'infection au champ nécessitera de réaliser l'analyse du côté de l'agent pathogène en parallèle de celle du côté de l'hôte. Cela permettrait d'identifier les mécanismes de défense et de résistance de la plante qui se mettent en place en réaction à l'infection par *L. maculans* et savoir s'ils correspondent aux pics d'expression des effecteurs par exemple.

Ces gènes de défense et de résistance de la plante dont l'expression serait calquée sur celle des gènes de *L. maculans* seraient potentiellement de bons gènes marqueurs candidats. Croiser les résultats de la cinétique d'infection avec la liste des gènes candidats marqueurs de la résistance quantitative aurait été intéressant et aurait pu confirmer la pertinence des gènes marqueurs de la plante identifiés dans cette étude.

Généralement, l'identification de QTL de résistance s'effectue en utilisant des approches de cartographie de QTL ou bien de GWAS (Pilet *et al.*, 2001; Jestin *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2018; Raman *et al.*, 2018). Notre approche qui consiste à identifier des gènes candidats marqueurs de la résistance quantitative, en se basant sur des différences d'expression de ces gènes, est assez novatrice pour le pathosystème *L. maculans* / *B. napus*, et fait suite aux analyses effectuées à l'INRAE IGEPP. Nous avons utilisé deux approches en parallèle, afin de (I) sélectionner des gènes candidats qui distinguent 'Darmor' et 'Bristol', spécifiquement lors de l'infection par *L. maculans*, en conditions d'infection naturelle et en conditions contrôlées sur plantes entières et (II) sélectionner des gènes candidats parmi les plus différenciellement exprimés entre 'Darmor' et 'Bristol'. Il s'agissait par ailleurs d'identifier un nombre limité de gènes les plus robustes possible, qu'il soit ensuite matériellement possible de valider par des approches complémentaires. Nos deux approches se sont révélées complémentaires puisque nous avons sélectionné un petit nombre de, respectivement, cinq et six gènes candidats, sans qu'aucun ne soit commun aux deux analyses.

Utiliser les résultats issus du projet MetaPhoR a permis de sélectionner des gènes qui discriminent 'Darmor' de 'Bristol' sur au moins deux années d'expérimentation au champ. Cela traduit une certaine stabilité de l'expression de ces gènes entre années d'expérimentation, ce qui est indispensable si l'on souhaite les utiliser comme marqueurs de la résistance quantitative. De même, les gènes qui distinguent 'Darmor' de 'Bristol' lors de l'infection des tiges en conditions contrôlées sont tout à fait intéressants. S'ils sont robustes, nous pourrions envisager d'identifier des génotypes avec un bon niveau de résistance quantitative, validé en conditions d'infection naturelle, en réalisant des tests en conditions contrôlées, bien plus rapides que les essais au champ. Pour tester la validité de ces marqueurs en conditions contrôlées, il faudrait dans un premier temps réaliser un test d'inoculation sur plantes entières, en commençant par les 15 génotypes dont nous avons également des échantillons prélevés au champ, comme décrit par la suite. Si les niveaux d'expression de nos gènes marqueurs en conditions contrôlées d'infection sur tige sont cohérents avec le niveau de résistance quantitative des génotypes tel qu'il est exprimé au champ, alors ils pourraient constituer de bons marqueurs pour faciliter la caractérisation du niveau de résistance quantitative des génotypes. C'est pour cette raison, que j'ai pris le parti de sélectionner des gènes candidats qui distinguent également 'Darmor' de 'Bristol' en conditions contrôlées.

Après avoir restreint les deux sets aux gènes distinguant 'Darmor' et 'Bristol' en 2018 et en 2014, puis aux gènes différentiellement exprimés en conditions contrôlées (Listes II et III), j'ai choisi de m'intéresser aux gènes colocalisant avec des QTL de résistance. De nombreuses études ont permis d'identifier des QTL de résistance au phoma chez *B. napus* (Pilet *et al.*, 2001; Jestin *et al.*, 2011, 2012; Kumar *et al.*, 2018; Raman *et al.*, 2018, 2020). Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur les QTL identifiés chez 'Darmor', correspondant à ceux décrits dans l'étude de Kumar *et al.* (2018). En combinant des analyses GWAS et des analyses de cartographie de QTL, cette étude compilant 50 QTL est la référence la plus récente pour les QTL de résistance à *L. maculans* chez *B. napus*. Pour tenter d'évaluer le niveau de résistance quantitative d'un génotype avec des gènes marqueurs, sélectionner onze gènes qui soient dans des QTL de résistance paraissait être un bon début. Toutefois, rien ne garantit qu'ils soient impliqués dans la résistance quantitative. Pour en savoir plus, il faudrait commencer par valider ces gènes marqueurs sur un set de génotypes présentant des niveaux variés de résistance quantitative et une origine commune avec 'Darmor', comme nous le discuterons ensuite.

D'autres critères de sélection étaient envisageables. Nous aurions pu choisir les gènes les plus différentiellement exprimés entre 'Bristol' et 'Darmor', sans tenir compte de l'annotation des gènes. Avec des données de génotypage, nous aurions également pu choisir les gènes les moins polymorphes parmi les candidats différentiellement exprimés. Cela permettrait peut-être de s'assurer que ces gènes sont présents dans une majorité de génotypes. Seulement, nous ne disposons pas des données génomiques pour 'Bristol', ce qui ne nous permet pas, à ce stade d'évaluer le polymorphisme des orthologues chez les deux génotypes. Sélectionner les RGA colocalisant avec des QTL de résistance était un choix, qui peut être discuté, mais qui est cohérent vis-à-vis de notre approche (identifier des effecteurs tardifs reconnaissant des gènes de résistance impliqués dans la résistance quantitative). Dans la littérature, des RGA ont été identifiés comme impliqués dans la résistance quantitative. C'est le cas par exemple d'un récepteur WAK chez le maïs, qui serait lié à la résistance quantitative à *Exserohilum turcicum* (Hurni *et al.*, 2015). De même, toujours chez le maïs, de multiples gènes candidats pour d'autres QTL de résistance incluent des RLK (Poland *et al.*, 2011). Cela semble assez cohérent avec l'hypothèse que la résistance quantitative pourrait être en partie due à des interactions gène mineur-pour-gène mineur (Chapitre I ; Parlevliet & Zadoks, 1977; Roux *et al.*, 2014). Les six RGA identifiés dans notre étude et colocalisant avec des QTL pourraient donc être impliqués dans la résistance quantitative et constituer des gènes marqueurs pertinents. En revanche, parmi les gènes impliqués dans la résistance quantitative identifiés à ce jour, la majorité d'entre eux ne sont pas des RGA (Roux *et al.*, 2014). De plus, jusqu'à présent, aucun gène n'a été identifié comme jouant un rôle dans la résistance quantitative du colza au phoma, malgré les nombreuses études de recherche de QTL qui ont été menées chez *B. napus* (Pilet *et al.*, 2001; Jestin *et al.*, 2011, 2012; Kumar *et al.*, 2018; Raman *et al.*, 2018, 2020).

L'approche d'identification des gènes les plus surexprimés a mis en évidence 78 autres gènes colocalisant avec des QTL (Figure III.9B). Il serait donc intéressant d'aller plus loin pour ces gènes, qui constituent également de potentiels marqueurs candidats.

L'objectif de validation des marqueurs sélectionnés sur les 15 génotypes n'ayant pu être achevé dans le cadre de ma thèse, les perspectives sont encore nombreuses. Pour ces 11 gènes marqueurs, l'objectif était de mesurer leur niveau d'expression au champ chez d'autres génotypes. Ensuite, nous aurions vérifié si l'expression de ces gènes marqueurs peut être rapportée à la note G2 de ces génotypes (Figure III.10). Ces expériences ont été engagées dans le cadre de ma thèse. J'ai prélevé les collets de 15 génotypes, présentant des niveaux variés de résistance quantitative, à deux dates clés (Blois, les 09/05/2019 et 05/06/2019). La note G2 de ces 15 génotypes a été évaluée dans ce même essai de Blois en fin de saison culturale (Figure III.10). Lors de cet essai, les 15 génotypes ont bien montré des niveaux variés de résistance quantitative, certains tels ES-Mambo ou ESC16061 montrant des niveaux de résistance quantitative encore meilleurs que la référence Jet Neuf (le géniteur +0 de 'Darmor'). La corrélation entre l'expression des gènes marqueurs et la note G2 des 15 génotypes devrait donc être informative sur la pertinence de ces gènes. L'identification de gènes marqueurs s'est avérée plus longue que prévue et je n'ai malheureusement pas eu le temps d'aller jusqu'à l'étape de validation des gènes marqueurs. Les deux génotypes sur lesquels nous avons travaillé dans cette étude sont relativement anciens maintenant ('Darmor' inscrit en 1984 ; 'Bristol' inscrit en 1993). Depuis, d'importants efforts de sélection ont été déployés afin d'obtenir des génotypes modernes avec de bons niveaux de résistance quantitative. Cette résistance quantitative ne provient pas forcément de 'Darmor' et implique sûrement d'autres généalogies. S'intéresser à 'Darmor' peut permettre d'identifier des mécanismes et/ou des marqueurs conservés, c'est ce que nous aimerions tester ici. En revanche, il est probable que ces marqueurs ne permettent pas d'identifier toutes les sources de résistance quantitative, si elles ont une origine génétique différente. En ce sens, il semble particulièrement intéressant de valider ces gènes marqueurs sur les génotypes modernes montrant un excellent niveau de résistance quantitative que nous avons collecté.

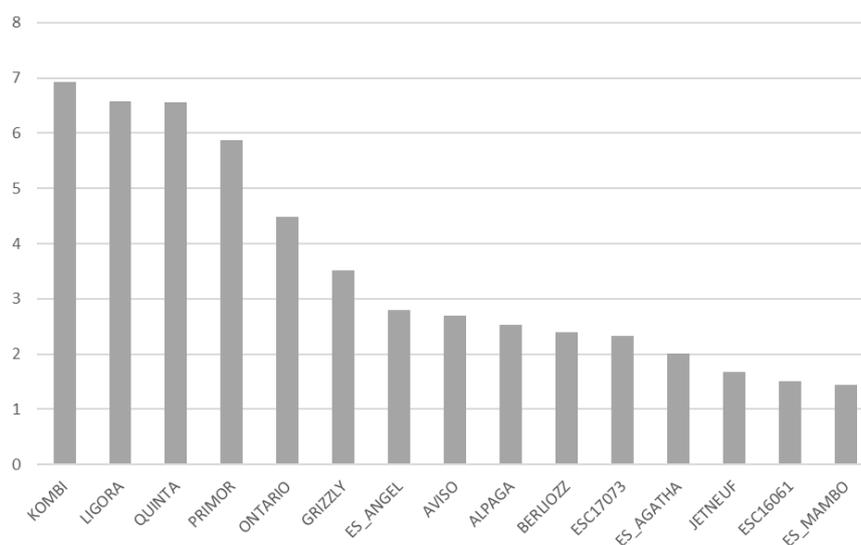


Figure III.10 : Notes G2 des 15 génotypes testés dans le cadre du projet Ephicas, en 2018

Les notes G2 ont été réalisées à la fin de la saison culturale en 2019, comme décrit par Aubertot *et al.* (2004), ainsi que dans la Figure III.1. Ces notations ont été effectuées dans l'essai au champ implanté à Blois, dans le cadre du projet Ephicas.

Pour conclure, des analyses supplémentaires sont nécessaires pour faire le parallèle entre la cinétique d'infection de *L. maculans* et celle de *B. napus*. Concernant l'identification de gènes candidats, marqueurs de la résistance quantitative, nous avons mené deux approches afin d'obtenir des résultats complémentaires. Les critères sont en partie arbitraires, comme souvent lorsqu'il faut drastiquement réduire des listes de gènes. Valider la pertinence de ces 11 gènes marqueurs candidats sur un panel varié de génotype est donc indispensable. Il serait également pertinent d'évaluer le niveau d'expression de ces 11 gènes marqueurs dans une population de génotypes dont 'Darmor' serait le parent, tout en évaluant la note G2 de cette population au champ en fin de saison culturale. En effet, le gène marqueur peut être localisé dans un QTL de résistance, mais le polymorphisme entraînant sa variation d'expression pourrait se trouver dans un régulateur situé ailleurs dans le génome. Il pourrait donc être intéressant de chercher les facteurs de transcription présents dans les QTL.

REFERENCES

¹ Terres Inovia. <https://www.terresinovia.fr>

² Terres Inovia. <https://www.terresinovia.fr/-/telecharger-le-guide-colza>

Aubertot JN, Sohbi Y, Brun H, Penaud A, Nutter Jr. FW. 2004. Phomadidacte: a computer-aided training program for the severity assessment of phoma stem canker of oilseed rape. *Integrated Control in Oilseed Crops* **29**: 247-254.

Bagnaresi P, Biselli C, Orrù L, Urso S, Crispino L, Abbruscato P, Piffanelli P, Lupotto E, Cattivelli L, Valè G. 2012. Comparative transcriptome profiling of the early response to *Magnaporthe oryzae* in durable resistant vs susceptible rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *PLoS ONE* **7**: 1-26.

Becker MG, Walker PL, Pulgar-Vidal NC, Belmonte MF. 2017. SeqEnrich: a tool to predict transcription factor networks from co-expressed *Arabidopsis* and *Brassica napus* gene sets. *PLoS ONE* **12**: 1-13.

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.

Collado IG, Viaud M. 2015. Secondary metabolism in *Botrytis cinerea*: combining genomic and metabolomic approaches. In: Fillinger S, Elad Y, éd. *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. 1-486.

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**: 15-21.

Dutreux F, Da Silva C, Agata L, Couloux A, Gay EJ, 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. *Scientific data* **5**: 1-11.

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

Gay EJ, Soyer JL, Lapalu N, Linglin J, Fudal I, Da Silva C, Wincker P, Aury J-M, Cruaud C, Levrel A, et al. 2021. Large-scale transcriptomics to dissect 2 years of the life of a fungal phytopathogen interacting with its host plant. *BMC Biology* **19**: 55.

Hurni S, Scheuermann D, Krattinger SG, Kessel B, Wicker T, Herren G, Fitze MN, Breen J, Presterl T, Ouzunova M, et al. 2015. The maize disease resistance gene *Htn1* against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 8780-8785.

- Jestin C, Lodé M, Vallée P, Domin C, Falentin C, Horvais R, Coedel S, Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R. 2011.** Association mapping of quantitative resistance for *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Molecular Breeding* **27**: 271-287.
- Jestin C, Vallée P, Domin C, Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R. 2012.** Assessment of a new strategy for selective phenotyping applied to complex traits in *Brassica napus*. *Open Journal of Genetics* **2**: 190-201.
- Kumar V, Paillard S, Fopa-Fomeju B, Falentin C, Deniot G, Baron C, Vallée P, Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R. 2018.** Multi-year linkage and association mapping confirm the high number of genomic regions involved in oilseed rape quantitative resistance to blackleg. *Theoretical and Applied Genetics* **131**: 1627-1643.
- 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.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. 2014.** FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**: 923-930.
- Parlevliet JE, Zadoks JC. 1977.** The integrated concept of disease resistance: a new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica* **26**: 5-21.
- Pilet ML, Duplan G, Archipiano M, Barret P, Baron C, Horvais R, Tanguy X, Lucas MO, Renard M, Delourme R. 2001.** Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oilseed rape. *Crop Science* **41**: 197-205.
- Poland JA, Bradbury PJ, Buckler ES, Nelson RJ. 2011.** Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 6893-6898.
- Raman H, McVittie B, Pirathiban R, Raman R, Zhang Y, Barbulescu DM, Qiu Y, Liu S, Cullis B. 2020.** Genome-Wide Association Mapping identifies novel loci for quantitative resistance to blackleg disease in canola. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1184.
- Raman H, Raman R, Diffey S, Qiu Y, McVittie B, Barbulescu DM, Salisbury PA, Marcroft S, Delourme R. 2018.** Stable quantitative resistance loci to blackleg disease in canola (*Brassica napus* L.) over continents. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1622.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010.** edgeR: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139-140.
- Rousseau-Gueutin M, Belser C, Silva C Da, Richard G, Istace B, Cruaud C, Falentin C, Boideau F, Boute J, Delourme R, et al. 2020.** Long-reads assembly of the *Brassica napus* reference genome, Darmorbzh. *bioRxiv* 2020.07.22.215749: 1-34.
- Roux F, Voisin D, Badet T, Balagué C, Barlet X, Huard-Chauveau C, Roby D, Raffaele S. 2014.** Resistance to phytopathogens *e tutti quanti*: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology* **15**: 427-432.

- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Trey I. 2003.**
Cytoscape: a software environment for integrated models. *Genome Research* **13**: 2498-2504.
- Stergiopoulos I, Collemare J, Mehrabi R, De Wit PJGM. 2013.** Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic Dothideomycete fungi. *FEMS Microbiology Reviews* **37**: 67-93.
- Wehrens R, Buydens LMC. 2007.** Self- and super-organizing maps in R: the kohonen package. *Journal of Statistical Software* **21**: 1-19.

Discussion et perspectives

Le cycle infectieux de *L. maculans* est bien décrit, et pourtant certaines phases sont encore méconnues comme la colonisation endophyte de la tige, qui dure plusieurs mois. Alors que la thèse de Julie Gervais avait permis d'obtenir de premières informations sur les gènes exprimés lors de la colonisation de la tige, durant le déroulé de mon propre projet de thèse, le projet Leptolife a permis d'obtenir des données transcriptomiques sur le cycle complet de *L. maculans*.

Mon projet de thèse s'inscrit donc dans le prolongement de celui de Julie Gervais. Lorsque j'ai débuté ma thèse en 2018, l'étude des effecteurs tardifs débutait. En effet, deux vagues d'expression d'effecteurs lors du cycle infectieux de *L. maculans* avaient été identifiées (Gervais *et al.*, 2017). Un premier projet d'analyses transcriptomiques avait permis de distinguer des effecteurs spécifiquement exprimés lors de l'infection des cotylédons du colza et d'autres, spécifiquement exprimés lors de la colonisation de la tige. Ce projet a donc révélé l'existence d'effecteurs nommés « tardifs », dont la présence était ignorée jusque-là. En dehors de leur profil d'expression distinct de celui des gènes *AvrLm*, étudiés jusqu'à présent, ces effecteurs tardifs présentent plusieurs particularités, qui les distinguent des gènes d'avrulence connus. Avec des nuances, comme je l'exposerai en partie 1.2, ils sont localisés dans des régions génomiques équilibrées en GC, les isochores GC, riches en gènes, contrairement aux gènes *AvrLm*, localisés dans les isochores AT, riches en éléments transposables. Parmi les cinq premiers effecteurs tardifs étudiés, quatre ont des gènes homologues chez d'autres espèces de champignons (Gervais, 2017), ce qui est rarement le cas pour les gènes d'avrulence, tels que *AvrLm1* (Gout *et al.*, 2006), *ArLm3* (Plissonneau *et al.*, 2016) ou *AvrLmS* (Neik *et al.*, 2020).

Avec des données transcriptomiques obtenues en conditions d'infection naturelle, Julie Gervais a établi un modèle simplifié des vagues d'expression des effecteurs au champ (Figure 36). *L. maculans* exprimerait des effecteurs durant l'hiver et le printemps, permettant de supprimer les défenses de la plante et donc de coloniser de manière endophyte les tiges du colza. A la fin du printemps, la diminution d'expression de ces effecteurs, accompagnée d'une augmentation de la synthèse d'enzymes de dégradation entraineraient un changement de mode de nutrition, passant de biotrophe à nécrotrophe et provoquant la nécrose du collet. Puisque ces effecteurs tardifs sont spécifiquement exprimés lors de la colonisation de la tige, il n'est pas possible d'utiliser le test cotylédonaire classiquement utilisé pour cribler des ressources variétales à la recherche de sources de résistance de type gène-pour-gène qui pourraient être d'autant plus pertinentes à la lumière des connaissances actuelles et en particulier des données présentées en Figure 30. Une stratégie novatrice a été mise au point avant mon arrivée, pour identifier des sources de résistances aux effecteurs tardifs, en les plaçant sous le contrôle du promoteur d'un gène d'avrulence, *AvrLm4-7*. Ainsi, il a été possible de cribler 204 génotypes, au stade cotylédonaire, dans l'objectif d'identifier des génotypes reconnaissant ces effecteurs tardifs. Un locus de résistance, *RlmSTEE98*, a ainsi été identifié dans le cultivar 'Yudal', reconnaissant l'effecteur tardif LmSTEE98.

L'objectif de mon projet de thèse était de poursuivre les travaux de recherche déjà amorcés, (I) en caractérisant l'interaction *LmSTEE98/RlmSTEE98*, (II) en criblant une collection diversifiée de génotypes pour identifier des sources de résistance à des effecteurs tardifs pertinents et (III) en identifiant des gènes marqueurs de la résistance quantitative.

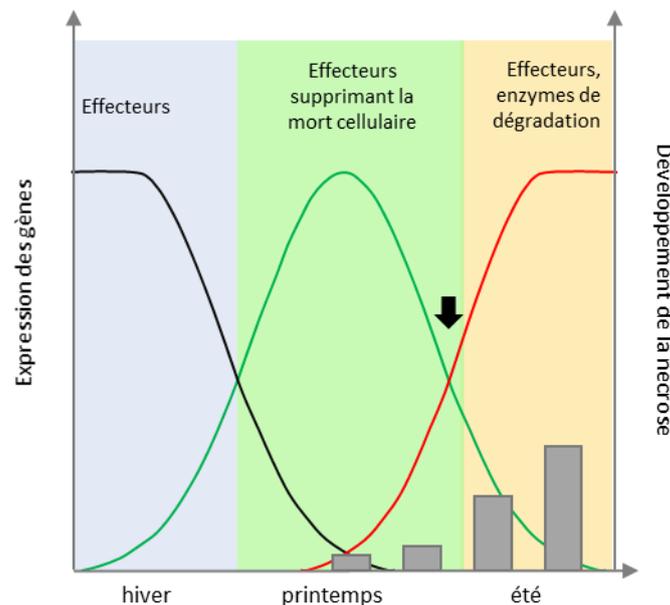


Figure 36 : Modèle théorique et simplifié des vagues d'expression d'effecteurs lors de la colonisation de la tige de colza par *Leptosphaeria maculans*

Trois vagues d'expression de gènes codant pour des effecteurs sont postulées, en hiver (en noir), au printemps (en vert) et en été (en rouge). Au cours du processus infectieux de la tige de colza, *L. maculans* exprimerait en hiver et au printemps, avant l'établissement de la nécrose, des effecteurs interférant avec les réactions de défenses de la plante. A la fin de la saison culturale, la diminution de l'expression de ces effecteurs ainsi que la surexpression d'enzymes de dégradation permettraient au champignon de passer d'un stade de vie biotrophe à un stade de vie nécrotrophe et d'induire la nécrose au collet. Cette transition entre les deux modes de vie (indiquée par une flèche noire) serait donc basée sur un équilibre entre effecteurs supprimant la mort cellulaire et effecteurs induisant la mort cellulaire. Les histogrammes (gris) correspondent au développement de la nécrose observée à la base de la tige de colza, d'après Gervais (2017).

Durant ma thèse, j'ai ainsi validé une interaction gène-pour-gène entre un effecteur tardif et un gène de résistance. Cette interaction a lieu au stade cotylédonaire dans notre système d'expression artificiel, mais également au stade de la colonisation de la tige, indiquant un rôle probable dans la résistance quantitative. J'ai également sélectionné six effecteurs tardifs pertinents, qui m'ont permis d'identifier 10 génotypes avec des phénotypes de résistance totale ou intermédiaire à un ou plusieurs effecteurs tardifs. Enfin, le jeu de données RNAseq que j'ai pu acquérir durant ma thèse m'a permis de sélectionner 13 gènes candidats chez *B. napus*, qui pourraient distinguer un génotype sensible d'un génotype présentant un bon niveau de résistance quantitative. Ces résultats ouvrent la voie à plusieurs éléments de discussion, qui seront traités dans cette partie.

1. Spécificité des effecteurs tardifs de *L. maculans*

1.1. Des vagues d'expression spécifiques des effecteurs tardifs

Chez de nombreux champignons phytopathogènes, l'infection de l'hôte implique des vagues d'expression d'effecteurs, spécifiques de l'hôte, de l'organe ou encore de la phase du cycle infectieux (Dobon *et al.*, 2016; Haueisen *et al.*, 2019). *L. maculans*, en tant que champignon hémibiotrophe ne déroge pas à la règle (Gay *et al.*, 2021). En revanche, contrairement à beaucoup d'autres champignons phytopathogènes, le cycle infectieux de *L. maculans* est particulièrement long, durant plus de dix mois. Durant la longue phase endophyte et asymptomatique de colonisation de la tige du colza, des effecteurs spécifiques sont produits par le champignon (Gervais *et al.*, 2017). L'étude récente de Gay *et al.* (2021) a permis de conclure que trois vagues d'expression d'effecteurs tardifs se succèdent lors de la colonisation de la tige. Après étude de ces vagues d'effecteurs, une question émerge : les effecteurs tardifs sont-ils exprimés lors de différentes phases du cycle infectieux ?

Gay *et al.* (2021) ont montré que certains gènes sont réutilisés à plusieurs stades de vie du champignon (Figure 17). Il s'agit notamment des gènes de la transition entre la biotrophie et la nécrotrophie. Ces gènes sont exprimés à chaque transition biotrophie-nécrotrophie. De même, les gènes de la biotrophie au stade cotylédonaire de l'infection sont aussi exprimés aux autres étapes de la biotrophie. Ces gènes incluent notamment les gènes d'avirulence connus, regroupés dans la vague 2. En revanche, les effecteurs exprimés lors de la colonisation biotrophe des tiges (vague 5) ne sont pas exprimés lors de l'infection des cotylédons, mais le sont en conditions d'infection naturelle au champ. Ces effecteurs semblent donc spécifiques des phases de colonisation du pétiole, de la tige et du collet. Il est tout de même important de préciser que les vagues définies dans l'étude de Gay *et al.* (2021) correspondent à une expression moyenne des effecteurs de chaque vague. Il peut y avoir des écarts entre le profil moyen d'expression et celui de certains effecteurs, nécessitant donc un examen individuel des cinétiques d'expression, tel que nous l'avons fait dans le chapitre II.

A la fin de la thèse de Julie Gervais, plusieurs questions subsistaient. Une question concernait notamment la possibilité que des effecteurs tardifs soient spécifiquement exprimés lors de la colonisation du pétiole. En effet, le cycle infectieux de *L. maculans* commence par une première étape d'infection des cotylédons et des feuilles, suivie du développement du champignon dans le pétiole puis dans la tige. L'étape de colonisation du pétiole semble assez cruciale, puisque le champignon doit atteindre la tige de la plante avant que la feuille ne tombe par sénescence. On pourrait donc imaginer que des gènes soient spécifiques de cette étape de colonisation afin d'assurer un développement rapide et efficace du champignon dans le pétiole, en direction de la tige.

Depuis, l'analyse transcriptomique que j'ai réalisée dans le chapitre II, ainsi que l'étude des vagues d'expression menée par Gay *et al.* (2021) apportent des informations supplémentaires. Comme l'indique la Figure SII.1, 95 gènes dont 15 effecteurs candidats sont spécifiquement exprimés lors de la colonisation du pétiole chez le cultivar 'Bristol', par rapport à l'infection des cotylédons. En revanche, l'étude globale des vagues d'expression n'a pas permis d'identifier une vague de gènes spécifique de la colonisation du pétiole. Cela peut s'expliquer par des différences d'approche (comparaison aux conditions *in vitro* ou bien aux conditions d'infection des cotylédons, seuils de significativité choisis). Avec les données actuelles, nous n'avons pas pu conclure quant à l'existence d'une vague d'expression de gènes spécifique de la colonisation du pétiole. Pour en savoir plus, il serait intéressant de réaliser des inoculations sur pétioles entiers et d'obtenir plus de dates de prélèvement pour réaliser une cinétique d'infection plus précise.

Lors de la colonisation de la tige, quatre vagues se succèdent, respectivement les vagues 2, 4, 5 et 6 (Figures 17 et 37). La vague 4 correspond à la transition biotrophie-nécrotrophie qui a lieu au stade cotylédonnaire. Cette vague d'effecteurs est également exprimée lors de la colonisation des tiges. La vague 5 correspond à la colonisation biotrophe des tiges tandis que la vague 6 correspond au stade nécrotrophe dans les tiges de colza (Gay *et al.*, 2021). Lors de l'infection des collets au champ, ces quatre vagues se succèdent également. La vague 2 est exprimée au mois de mars, lors de la reprise du développement du colza, puis les vagues 4 et 5 succèdent à la vague 2. Enfin, la vague 6 prend le relais lors du stade nécrotrophe dans le collet des plantes.

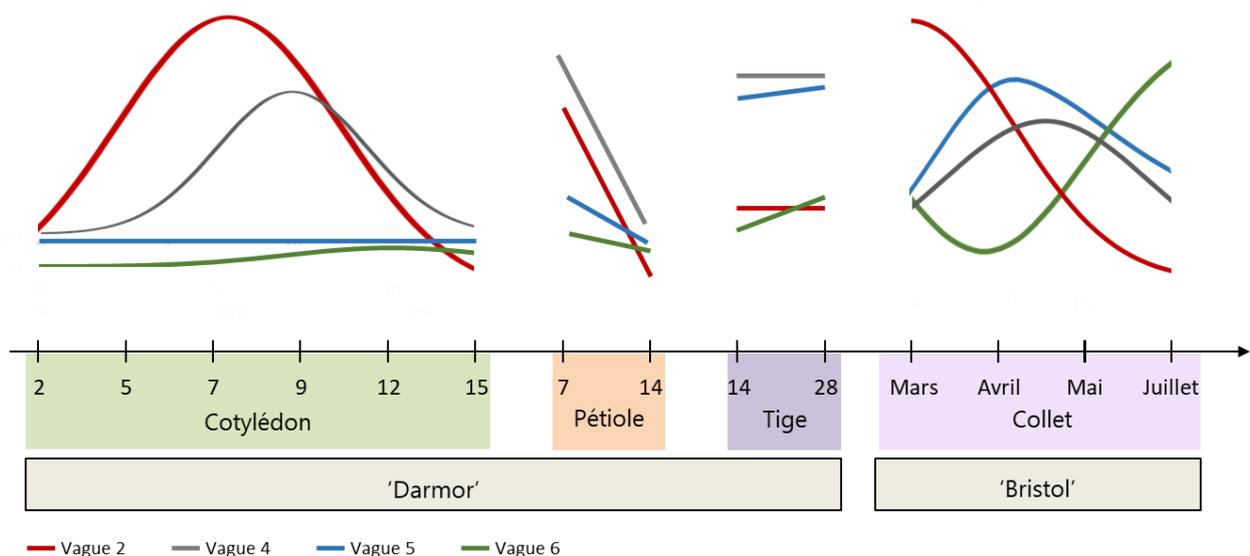


Figure 37 : Modèle simplifié des vagues d'expression d'effecteurs au cours de l'infection

Les vagues d'expression de Gay *et al.* (2021) sont ici représentées de façon schématique, au cours de l'infection (temps d'infection indiqués en jpi le long de l'axe x).

Dans le chapitre III, nous avons tenté d'affiner la cinétique d'infection de *L. maculans* au champ. Nous n'avons pas obtenu de clusterisation claire entre effecteurs tardifs et effecteurs précoces exprimés au champ, comme cela est le cas dans l'étude de Gay *et al.* (2021). Cela pourrait s'expliquer par le fait que nous n'avons analysé que les conditions au champ, tandis que les données obtenues en conditions contrôlées ont été incluses pour l'analyse et la clusterisation des gènes dans l'étude de Gay *et al.* (2021). Il serait donc intéressant de combiner les données obtenues en conditions contrôlées avec celles obtenues au champ en 2014 et 2018, pour préciser la cinétique d'infection au champ.

Concernant le rôle des effecteurs tardifs, plusieurs études indiquent que des effecteurs exprimés dans des vagues caractéristiques de la biotrophie ou bien de la nécrotrophie auraient des effets antagonistes (Kleemann *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012). Chez *L. maculans*, plusieurs effecteurs, comme *AvrLm10A* (Petit-Houdenot *et al.*, 2019) et *AvrLm13* (Degrave *et al.*, soumis) régulent négativement l'agressivité du champignon en limitant le développement des lésions foliaires. Exprimés dans la vague d'expression 2, leur effet est donc plutôt inverse à celui des autres effecteurs de cette vague, comme *AvrLm4-7* important pour la fitness des souches et le développement de la taille des symptômes (Parlange *et al.*, 2009; Nováková *et al.*, 2016). Ainsi, au sein d'une même vague d'expression, il existe un équilibre entre effecteurs contribuant à la formation de nécroses et effecteurs limitant le développement des symptômes. De même, il pourrait y avoir un équilibre entre vagues d'expression. Pour passer d'un mode de vie à l'autre, il s'agirait d'un équilibre entre effecteurs induisant ou supprimant la mort cellulaire. Nous pouvons donc supposer que les effecteurs exprimés lors de la vague 5 de *L. maculans* supprimeraient la mort cellulaire, tandis que ceux exprimés durant la vague 6 contribueraient à la mort cellulaire et donc la formation de nécroses. L'étude de Gay *et al.* (2021) a mis en évidence le fait qu'un des deux NLP de *L. maculans* est différentiellement exprimés lors de l'infection de *B. napus* et qu'il se trouve dans la vague d'expression 4, correspondant à la transition biotrophie-nécrotrophie. On peut donc imaginer que certains effecteurs tardifs de la vague 4 seraient aussi impliqués dans la suppression ou l'induction de la mort cellulaire et dans la transition vers la nécrotrophie.

Pour tenter de connaître le rôle d'un effecteur dans l'induction ou la suppression de la mort cellulaire, plusieurs expériences sont possibles. Dans le cadre de ma thèse, j'ai réalisé des tests de suppression de la mort cellulaire dans *N. benthamiana*. Les résultats de ces expériences figurent en résultats complémentaires présentés dans les chapitres I et II. L'effecteur *LmSTEE98*, exprimé lors de la vague 4 supprime la mort cellulaire induite par l'inducteur général BAX, mais ne supprime pas la PTI induite par l'élicite INF1. De même, les effecteurs *Lm1277*, *Lm5465*, *Lm6826* et *Lm7919*, tous exprimés lors de la vague 5 spécifique de la colonisation biotrophe de la tige, suppriment l'induction de la mort cellulaire par BAX, mais ne suppriment pas la PTI induite par INF1.

Afin d'établir plus finement le rôle des effecteurs tardifs dans la suppression ou l'induction de la mort cellulaire, il serait nécessaire d'étudier l'effet de ces effecteurs tardifs sur l'ETI induite par l'effecteur AvrPto (Oh & Martin, 2011). Il serait également intéressant d'étudier le rôle des effecteurs tardifs exprimés lors de la vague 6, correspondant à la colonisation nécrotrophe des tiges. Selon l'hypothèse émise précédemment, ces effecteurs pourraient contribuer à la mort cellulaire.

En revanche, jusqu'à présent ce test ne nous a pas permis d'identifier d'effecteurs de *L. maculans* induisant la mort cellulaire. Cela ne signifie pas pour autant qu'il n'en existe pas. Les effecteurs testés jusqu'ici sont peut-être tous impliqués dans la suppression de la mort cellulaire. Une seconde explication pourrait être que le test de suppression de la mort cellulaire dans *N. benthamiana* est en système hétérologue. En effet, ce test est assez controversé, puisque la majorité des effecteurs testés ont souvent un rôle de suppression de la mort cellulaire (Petit, 2017). Il est assez peu probable que tous les effecteurs aient uniquement un rôle de suppression de la mort cellulaire, ce qui questionne sur la robustesse de ce test réalisé dans *N. benthamiana*. Pour en savoir plus sur leur rôle dans l'infection, il serait utile de mettre en place un test similaire sur une plante mieux adaptée comme *B. rapa* ou bien de tenter d'identifier le(s) cible(s) de ces effecteurs tardifs, en réalisant un crible double-hybride par exemple. Des perspectives s'ouvrent donc encore pour caractériser le rôle des effecteurs tardifs dans la colonisation de *B. napus*.

1.2. Une localisation génomique dans les isochores GC

En dehors de leur profil d'expression, les effecteurs tardifs présentent des spécificités qui les distinguent des effecteurs précoces, exprimés lors de l'infection des cotylédons et feuilles. Comme nous l'avons vu en introduction (cf. partie 3.2.2), le génome de *L. maculans*, ainsi que celui d'autres champignons, est structuré en isochores, avec donc des isochores GC et des isochores AT (Rouxel *et al.*, 2011). Les gènes d'avirulence connus chez *L. maculans* se situent dans les isochores AT, riches en éléments transposables, tandis que les effecteurs tardifs se trouvent principalement dans les isochores GC, riches en gènes.

Cette localisation génomique très contrastée pose la question de la régulation de leur expression au cours de la cinétique d'infection. Lors de l'infection des cotylédons, il semble indispensable au champignon de pouvoir exprimer de manière concertée l'ensemble des effecteurs précoces, nécessaires à cette étape de colonisation. Cette expression concertée semble liée à un contrôle épigénétique de l'expression de ces gènes. Il a été démontré qu'en condition *in vitro*, les isochores AT et notamment les gènes d'avirulence sont réprimés, par condensation de la chromatine sous forme d'hétérochromatine. Cette hétérochromatine constitutive est due à la marque épigénétique H3K9me3 (Soyer *et al.*, 2014).

Lors de l'infection des cotylédons, une modification de l'état chromatinien s'opèrerait. L'hétérochromatine serait décondensée, permettant l'expression concertée des gènes situés dans les isochores AT, en grande majorité des gènes codant des effecteurs précoces. Ce phénomène a également été observé sur un nombre restreint de gènes chez *Z. tritici* (Soyer *et al.*, 2019).

Compte-tenu de la longueur de la phase de colonisation de la tige et du collet, il ne semble pas nécessaire que l'expression des effecteurs tardifs soit concertée. En revanche, une certaine synchronisation est sans doute indispensable, en particulier pour abolir leur expression lors de la mise en place de la nécrose du collet. Cela semble cohérent avec le fait que les effecteurs tardifs soient regroupés en vagues d'expression, indiquant une expression concertée. Une étude menée par Soyer *et al.* (2020) à l'échelle du génome a permis de cartographier la répartition des marques répressives H3K9me3 et H3K27me3 chez *L. maculans*. Cette répartition non-aléatoire se caractérise par un enrichissement en marques hétérochromatiniennes constitutives (H3K9me3) dans les isochores AT tandis que la majorité des marques hétérochromatiniennes facultatives (H3K27me3) se trouvent dans les régions riches en gènes, soit les isochores GC.

L'étude de Gay *et al.* (2021) a permis d'identifier les gènes corégulés dans les différentes vagues d'expression de la cinétique d'infection. Cette corégulation pourrait en partie être due aux marques hétérochromatiniennes. Dans la vague 2, parmi les PPS exprimés, 58% sont co-régulés. Dans les vagues 4, 5 et 6, il s'agit respectivement de 35%, 18% et 17% des PPS qui semblent co-régulés. Il y a donc une corégulation partielle des effecteurs, aussi bien lors de l'infection précoce que lors de la colonisation de la tige. En revanche, comme l'illustre la Figure 38, le parallèle entre la corégulation des gènes dans une vague d'expression et le contrôle chromatinien par les marques épigénétiques n'est pas si simple. En effet, dans la vague 2, une majorité des gènes sont sous l'influence de la marque H3K9me3 (58%) mais ils ne sont pas tous co-régulés (Figure 38A). On peut également noter un recouvrement fort entre les marques H3K9me3 et H3K27me3. Dans la vague 4, 75% des effecteurs sont sous le contrôle de la marque hétérochromatinienne H3K27me3 et pourtant seuls 34% d'entre eux sont co-régulés (Figure 38B). Concernant la vague 5, parmi les effecteurs exprimés dans cette vague, 86% sont sous l'influence de la marque H3K27me3 tandis que seuls 16% d'entre eux sont co-régulés (Figure 38C). De même, 82% des gènes de la vague 6 sont sous l'influence de la marque H3K27, tandis que 22% d'entre eux sont co-régulés (Figure 38D).

Il semble donc qu'un contrôle chromatinien s'exerce sur les effecteurs de ces quatre vagues, avec une majorité de marques H3K9me3 contrôlant les effecteurs de la vague 2 tandis que les effecteurs des vagues 4, 5 et 6 sont plutôt sous le contrôle de marques H3K27me3. Avec peu d'effecteurs tardifs co-régulés, il semble que le contrôle chromatinien exercé par les marques H3K27me3 soit plus lâche, ce qui pourrait expliquer la plus grande diversité des profils d'expression des effecteurs tardifs. La relaxation de la chromatine étant un prérequis à l'action des facteurs de transcription, on peut aussi supposer qu'un nombre plus important de facteurs de transcription est nécessaire pour l'expression des gènes soumis à la régulation par H3K27me3 par rapport à celle par H3K9me3.

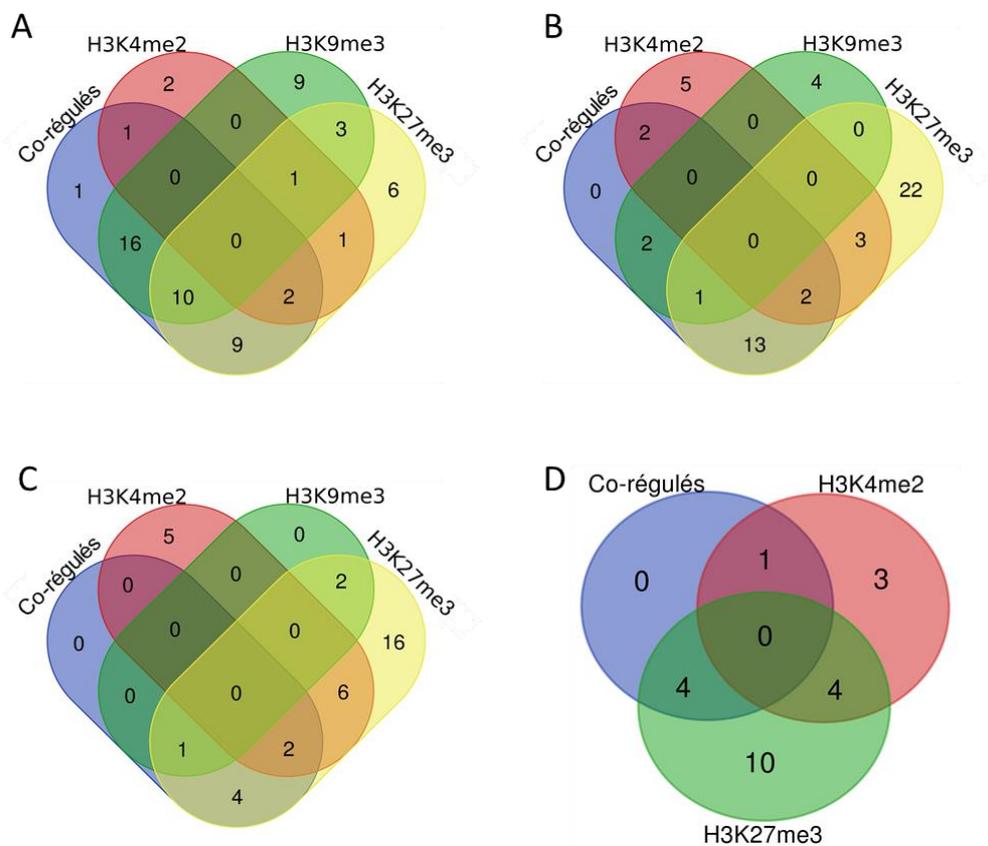


Figure 38 : Proportions des différentes marques épigénétiques selon les vagues d'expression d'effecteurs

Lors de l'infection par *L. maculans*, plusieurs vagues d'expression d'effecteurs se succèdent. Ici, nous avons sélectionné les vagues d'expression n°2 (A), n°4 (B), n°5 (C) et n°6 (D). Pour chaque vague, le nombre d'effecteurs co-régulés au sein de la vague provient de l'étude de Gay *et al.* (2021), tandis que le nombre de gènes de chaque vague, sous l'influence des différentes marques épigénétiques H3K4me2, H3K9me3 et H3K27me3 provient de l'étude de Soyer *et al.* (2020).

Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux vagues d'expression des gènes lors de l'infection, les gènes de la vague 5 correspondant à la biotrophie dans les tiges sont notamment enrichis en marques H3K27me3 (Gay *et al.*, 2021). En ce qui concerne les 11 effecteurs tardifs étudiés jusqu'à présents, huit d'entre eux sont enrichis en marques H3K27me3, deux autres sont enrichis en marques H3K4me2 et enfin un dernier est enrichi en marques H3K9me3 (Figures 39 et 40, Tableau 6). Bien qu'ils soient tous considérés comme étant dans des isochores GC, la localisation génomique peut légèrement varier d'un effecteur à l'autre, et seuls quatre d'entre eux, *Lm5465*, *Lm10933*, *LmSTEE30* et *LmSTEE78* sont inclus dans des régions riches en gènes et éloignés d'éléments transposables. Deux d'entre eux, en accord avec leur localisation génomique sont enrichis en marques H3K4me2 (Tableau 6). En effet, *LmSTEE1* et *LmSTEE35* se trouvent dans de petits isochores GC, de respectivement moins de 10kb et 20kb, au milieu de mosaïques d'éléments transposables. On peut noter que les effecteurs *Lm1852* et *Lm7919* se situent plutôt en bordure d'isochores GC. Enfin, plusieurs effecteurs tardifs sont associés à des éléments transposables. *Lm1277*, *Lm1852* et *LmSTEE98* sont associés au transposon à ADN DTX_Gimli, tandis que *Lm6826* est associé à un transposon à ADN, DTM_Sahana. Cette diversité d'environnements génomiques diffère de ce qui est observé pour les gènes *AvrLm* et contribue peut-être aussi à ces différences d'expression au sein d'une même vague. En comparant avec la localisation du gène d'virulence *AvrLm4-7*, on observe bien que les effecteurs tardifs sont entourés de gènes, tandis qu'*AvrLm4-7* est entouré de transposons (Figures 39 et 40).

Tableau 6 : Localisation génomique et marques chromatiniennes des 11 effecteurs tardifs étudiés
ET : Elément Transposable. Marques chromatiniennes d'après Soyer *et al.* (2020).

Nom	N° accession	Vagues d'expression (Gay <i>et al.</i> , 2021)	Localisation génomique				Marque chromatinienne	Nombre de résultats par BLASTp
			Isochore GC	Ilot GC en région AT	Bordure AT/GC	Associé à un ET en région GC		
<i>Lm1277</i>	<i>Lmb_jn3_01277</i>	vague 5	X			DTX_Gimli 3'	H3K27	48
<i>Lm1852</i>	<i>Lmb_jn3_01852</i>	vague 5			X	DTX_Gimli 3'	H3K27	0
<i>Lm5465</i>	<i>Lmb_jn3_05465</i>	vague 5	X				H3K27	214
<i>Lm6826</i>	<i>Lmb_jn3_06826</i>	vague 5	X			DTM_Sahana 3'	H3K27	0
<i>Lm7919</i>	<i>Lmb_jn3_07919</i>	vague 5			X		H3K27	629
<i>Lm10933</i>	<i>Lmb_jn3_10933</i>	vague 5	X				H3K4	37
<i>LmSTEE1</i>	<i>Lmb_jn3_03177</i>	vague 5		X (2 gènes)			H3K27	24
<i>LmSTEE30</i>	<i>Lmb_jn3_04778</i>	vague 5	X				H3K27	230
<i>LmSTEE35</i>	<i>Lmb_jn3_08094</i>	vague 4		X (6 gènes)			H3K9	26
<i>LmSTEE78</i>	<i>Lmb_jn3_00617</i>	vague 6	X				H3K4	458
<i>LmSTEE98</i>	<i>Lmb_jn3_11364</i>	vague 4	X			DTX_Gimli 5'	H3K27	0

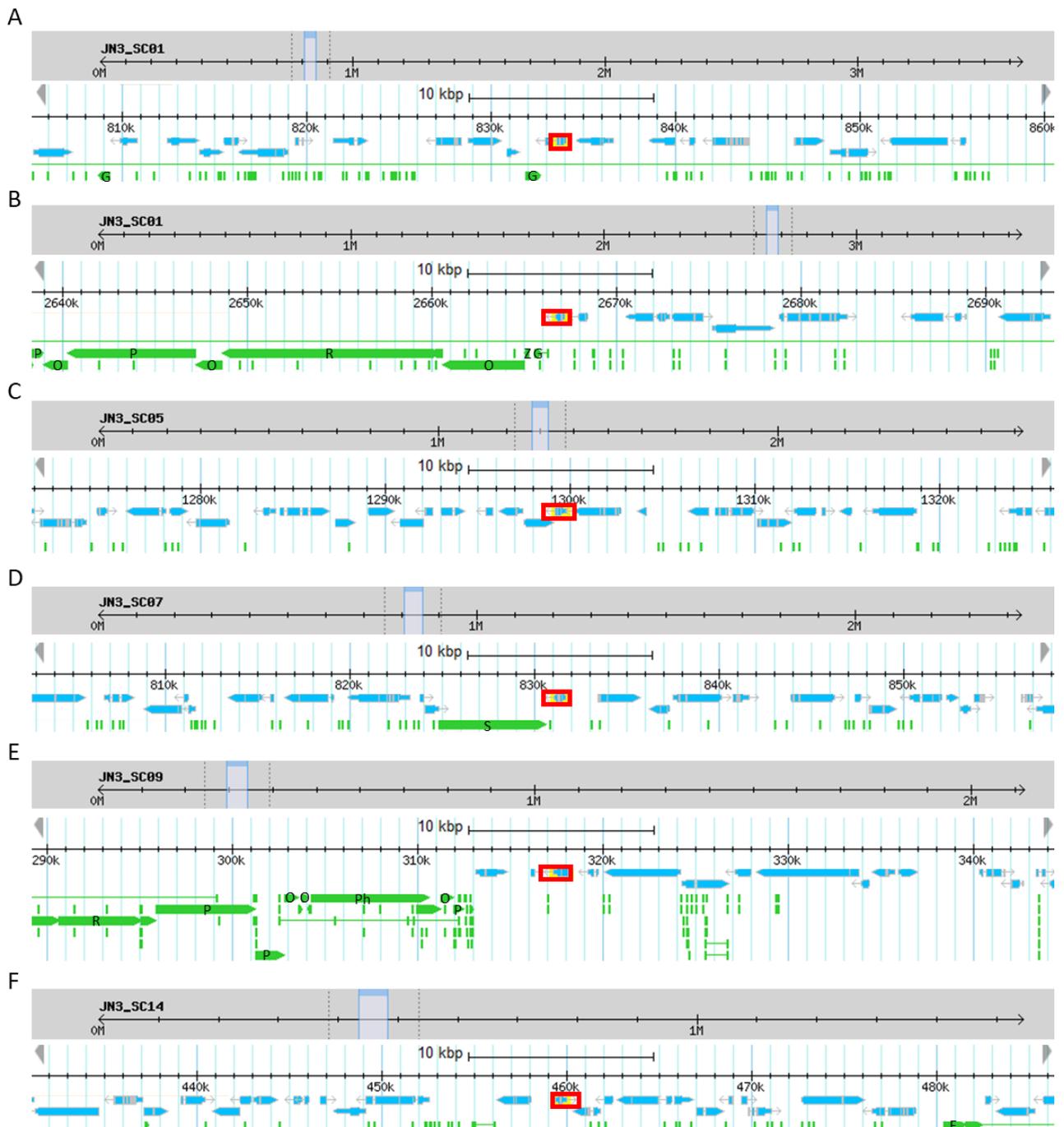


Figure 39 : Localisation génomique des six effecteurs tardifs sélectionnés dans ce projet

Les effecteurs tardifs étudiés sont encadrés en rouge (A) *Lmb_jn3_01277*, (B) *Lmb_jn3_01852*, (C) *Lmb_jn3_05465*, (D) *Lmb_jn3_06826*, (E) *Lmb_jn3_07919*, et (F) *Lmb_jn3_10933*. A l'exception du gène *Lmb_jn3_10933*, enrichi en marques H3K4me2, les cinq autres effecteurs tardifs sont enrichis en marques H3K27me3. Les gènes sont représentés en bleu tandis que les éléments répétés et transposables sont en vert. Les transposons connus sont annotés par leur initiale (E : Elwe, G : Gimli, O : Olly, Ph : Pholy, P : Polly, R : Rolly, S : Sahana, Z : Zolly).

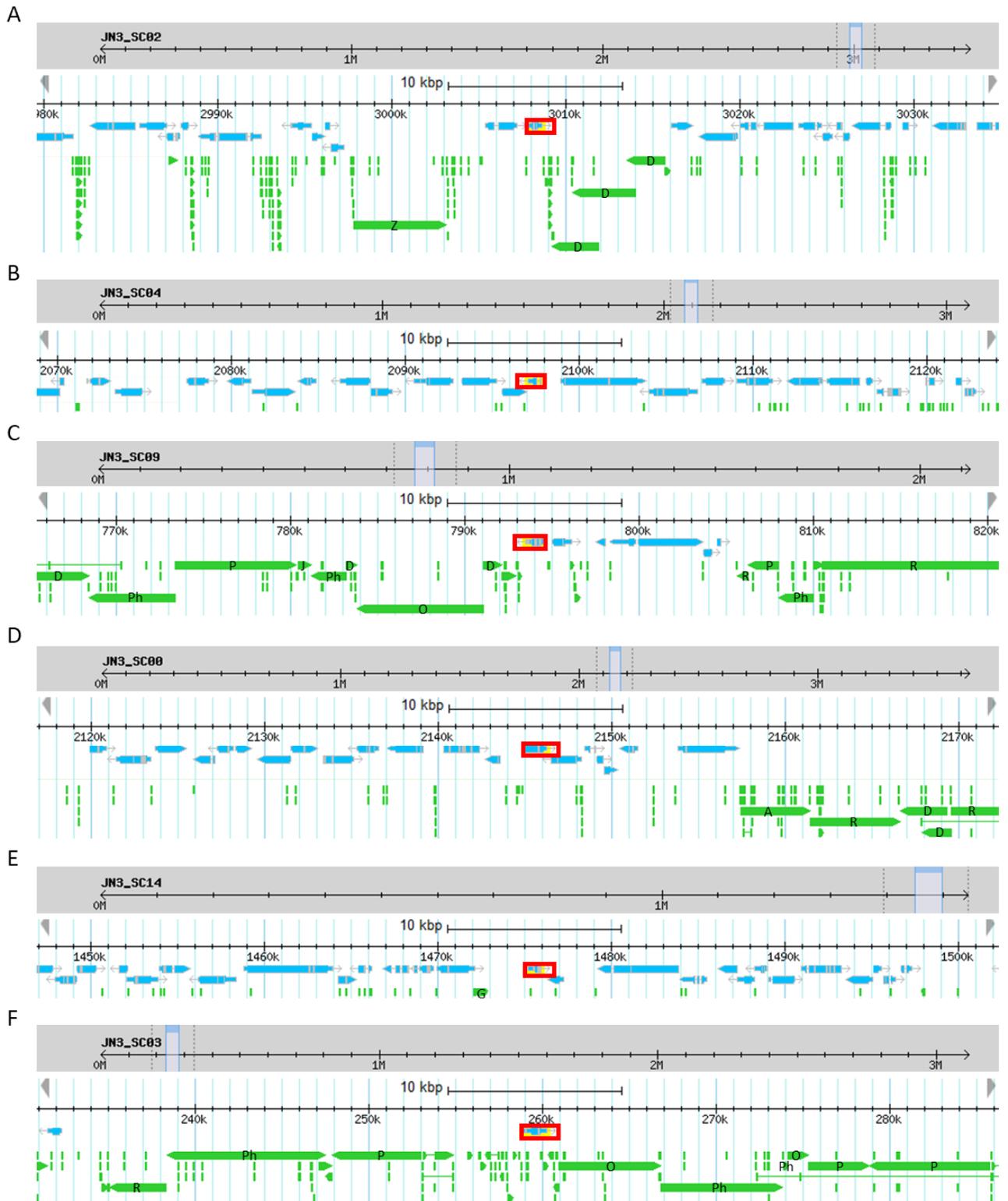


Figure 40 : Localisation génomique des cinq effecteurs tardifs *LmSTEE* et du gène *AvrLm4-7*

Les effecteurs tardifs étudiés sont encadrés en rouge (A) *Lmb_jn3_03177* (*LmSTEE1*), (B) *Lmb_jn3_04778* (*LmSTEE30*), (C) *Lmb_jn3_08094* (*LmSTEE35*), (D) *Lmb_jn3_00617* (*LmSTEE78*), (E) *Lmb_jn3_11364* (*LmSTEE98*), et (F) *Lmb_jn3_03262* (*AvrLm4-7*). Les gènes *Lmb_jn3_03177*, *Lmb_jn3_04778* et *Lmb_jn3_11364* sont enrichis en marques H3K27me3, *Lmb_jn3_00617* est enrichi en marques H3K4me2. *Lmb_jn3_08094* est enrichi en marques H3K9me3, tout comme *AvrLm4-7*. Les gènes sont représentés en bleu. Les éléments répétés et transposables sont en vert, annotés par leur initiale (A : Ayoly, G : Gimli, J : Jolly, O : Oilly, Ph : Pholy, P : Polly, R : Rolly, Z : Zolly).

Ainsi, les effecteurs tardifs sont exprimés en plusieurs vagues bien définies au cours de l'infection. Ils se trouvent dans des régions sur lesquelles un contrôle épigénétique semble s'exercer. Ces deux éléments tendent à indiquer une régulation d'expression de l'ensemble des effecteurs tardifs, exprimés en plusieurs phases. Les gènes *KMT1* et *KMT6* jouent un rôle respectivement dans le dépôt des marques H3K9me3 et H3K27me3. Durant la thèse de Colin Clairet (2019) des mutants ont été obtenus pour chacun de ces deux gènes, par l'approche CRISPR-Cas9 (Clairet, 2019). Des travaux antérieurs menés sur des souches silencées pour *KMT1* et *KMT6* semblaient indiquer que le silencing de *KMT6* entraîne une dérégulation de l'expression des effecteurs tardifs (Soyer *et al.*, 2014). En inactivant *KMT6*, nous nous attendions à un phénomène similaire. Chez le mutant Δ *KMT6*, l'expression de *LmSTEE98* n'est pas impactée lors de l'infection des cotylédons, c'est-à-dire qu'il n'est que très faiblement exprimé, comme chez les souches sauvages. En revanche, lors de l'infection des cotylédons par le mutant Δ *KMT1*, *LmSTEE98* présente un pic d'expression à sept jours après inoculation, mesurée par RT-qPCR (Clairet, 2019). Il serait intéressant d'étudier plus finement la dérégulation des effecteurs tardifs chez le mutant Δ *KMT6*. Des travaux sont en cours dans l'équipe pour déterminer si la mutation de ces deux gènes impliqués dans le dépôt des marques hétérochromatiniennes impacte la régulation concertée des effecteurs précoces et tardifs au cours de l'infection (Contrat postdoctoral d'Antoine Porquier débuté en 2020). Pour le moment, nous ne pouvons en dire plus quant à la concertation de l'expression des effecteurs tardifs, en dehors de leur expression en plusieurs vagues.

Comme nous l'avons vu dans la partie 3.1.3, à quelques exceptions près, chez *L. maculans*, la majorité des gènes d'avirulence ne présentent pas d'homologue chez d'autres espèces de champignon et sont polymorphes. A l'inverse, parmi les effecteurs tardifs, la plupart des gènes sont très peu polymorphes (cf. chapitres I et II). De même, parmi les 11 effecteurs tardifs étudiés jusqu'à présent, huit présentent des niveaux d'homologies élevés avec des gènes présents chez d'autres espèces fongiques, en particulier des Dothidéomycètes. Huit d'entre eux sont également conservés chez l'une des espèces du complexe d'espèces, *L. biglobosa* (de 25% à 90% d'identité des séquences protéiques), *LmSTEE35*, *Lm1852* et *Lm6826* n'en ayant pas. Les hypothèses qui permettraient d'expliquer cette conservation des effecteurs tardifs seront abordées dans la partie 4 de cette discussion. Toutefois, il est intéressant de noter que les deux effecteurs tardifs, pour lesquels nous avons identifié des phénotypes de résistance spécifique de type réponse hypersensible (HR), sont des effecteurs très conservés dans les populations de *L. maculans*, mais qui ne présentent pas d'homologue chez les autres espèces référencées dans les bases de données. Sur ce dernier aspect, ils se rapprochent plus des gènes d'avirulence décrits jusqu'à présent.

Les effecteurs tardifs se distinguent donc des effecteurs précoces par leur profil d'expression, liée à leur localisation génomique, c'est-à-dire qu'ils ne sont jamais seuls au milieu de grandes régions AT, par leur régulation hétérochromatinienne plus lâche liée à la marque H3K27me3 et par leur conservation chez *L. maculans*, mais également chez d'autres espèces de champignons, pour la majorité d'entre eux.

2. Validation de l'approche de screening

2.1. Une approche novatrice et efficace

La résistance des génotypes à la colonisation de la tige, c'est-à-dire la résistance quantitative s'évalue avec la note G2. Cette notation, effectuée à la fin de la saison culturale est lourde à mettre en place. Comme nous l'avons vu en introduction, la résistance quantitative est variable selon les conditions environnementales, et la reproductibilité des QTL est souvent variable (Pilet *et al.*, 2001; Fopa Fomeju *et al.*, 2015; Jestin *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016; Raman *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018), ce qui complique sa caractérisation. Afin de simplifier la caractérisation de la résistance au stade adulte, il est possible de réaliser des tests sur plantes adultes, en conditions contrôlées. Ces tests restent coûteux en temps d'expérimentation et en espace dans les chambres de culture. Ils sont parfois peu reproductibles et ne sont pas toujours suffisamment précis pour distinguer des différences fines entre des phénotypes de résistance et de sensibilité. Cette méthode n'était donc pas adaptée pour cribler une grande collection de génotypes dans l'objectif d'identifier des génotypes reconnaissant des effecteurs tardifs.

Pour contourner cette difficulté, une stratégie novatrice de criblage a été mise au point dans l'équipe avant mon arrivée, permettant d'identifier un génotype reconnaissant l'effecteur tardif LmSTEE98. Cette méthode a fait ses preuves et s'est avérée efficace lors d'un second criblage variétal, effectué durant mon projet de thèse. En diversifiant les effecteurs tardifs choisis et la collection de génotypes criblés dans ce projet, plusieurs éléments convergent. Nous avons identifié deux types de réponses aux effecteurs tardifs. Quatre génotypes ont affiché des phénotypes clairs de résistance spécifique, entraînant des réponses hypersensibles. Ces quatre génotypes sont regroupés parmi le genepool des génotypes « semi-hiver », asiatiques et rutabagas. Il serait donc intéressant de cribler d'autres génotypes parmi eux, afin d'identifier d'autres génotypes résistants, à ces deux effecteurs tardifs ou peut-être même à d'autres. Pour sept autres génotypes, des phénotypes intermédiaires de résistance ont été observés. Ces génotypes, bien que présentant des phénotypes intermédiaires sont probablement tout aussi intéressants que ceux présentant des phénotypes de résistance spécifique. Comme nous le verrons plus en détails dans la partie 3 de cette discussion, ces phénotypes intermédiaires pourraient aussi correspondre à un phénotype de résistance quantitative. De plus, nous avons identifié au moins un génotype présentant un phénotype de résistance spécifique à LmSTEE1, mais avec un seul des deux transformants. Bien que ce résultat ne puisse être vraiment expliqué dans cette étude, il n'en reste pas moins intéressant. Des décalages de cinétiques d'expression pourraient être une explication. Cette interaction avec LmSTEE1 mériterait d'être analysée plus en détail à l'avenir.

Le premier screening a mis en lumière, et le second a confirmé, qu'il est nécessaire de choisir des effecteurs pertinents et de diversifier au maximum les génotypes criblés. La précision des vagues d'effecteurs exprimés lors de l'infection par Gay *et al.* (2021) a permis de distinguer plusieurs vagues d'expression d'effecteurs tardifs. Lors de ces deux criblages, nous avons identifié des génotypes répondant à des effecteurs tardifs de la vague 5, mais également de la vague 4. Les effecteurs exprimés dans ces deux vagues sont donc probablement de bons candidats pour identifier des sources de résistance leur correspondant. Concernant la vague 6, il est plus difficile de conclure sur ces gènes, puisque nous n'avons testé qu'un seul gène, *LmSTEE78*, et qu'il n'est pas reconnu par les génotypes que nous avons criblés. De plus, diversifier la sélection de génotypes criblés, représentative de la diversité des colzas a permis d'identifier des phénotypes de résistance parmi des génotypes exotiques.

Comme nous l'avons vu dans la partie 1.2 de cette discussion, les effecteurs tardifs et plus généralement les gènes de la vague 5 sont enrichis en marques hétérochromatiniennes H3K27me3 (Soyer *et al.*, 2020; Gay *et al.*, 2021). Les travaux menés par Colin Clairet durant sa thèse ont permis d'inactiver plusieurs gènes impliqués dans la régulation hétérochromatienne (Clairet, 2019). Le gène *KMT6* est notamment responsable du dépôt des marques H3K27me3 sur l'ADN. L'hypothèse est que son inactivation dérégulerait l'expression des effecteurs tardifs, menant à l'expression d'un pool d'effecteurs tardifs dès l'infection précoce des cotylédons. Il serait intéressant de réaliser un criblage variétal avec un mutant $\Delta KMT6$. Si les effecteurs tardifs sont effectivement dérégulés, un tel criblage apporterait deux types de résultats. Cela permettrait d'observer le comportement des génotypes en réaction à un pool d'effecteurs sécrétés par le champignon. Cela permettrait également de voir si les phénotypes intermédiaires observés pour certains génotypes en réaction à plusieurs effecteurs exprimés indépendamment sont également observés lorsque les effecteurs tardifs sont exprimés de manière concertée au stade cotylédonaire.

Ce criblage était envisagé dans mon projet de thèse. Colin Clairet avait obtenu un mutant $\Delta KMT6$, par l'approche CRISPR-Cas9 en utilisant une souche JN3-Cas9 (Avr1-4-5-6-7-8-10-11-S). Afin d'éliminer la Cas9 et l'ARNguide du génome, il avait croisé ce mutant avec JN2-GFP (Avr5-6-7-8-10-11-S) (Neik *et al.*, 2020). Les deux parents de ce croisement diffèrent pour les allèles d'*AvrLm1* et d'*AvrLm4*. A partir d'un descendant de ce croisement, j'ai réalisé de premiers criblages sur les 31 génotypes criblés à l'INRAE (Chapitre II). Seulement, ce descendant muté pour *KMT6* n'avait pas été caractérisé pour son contenu en gènes d'avirulence. Les résultats de phénotypage obtenus sur les 30 génotypes testés à l'INRAE ont révélé que ce descendant $\Delta KMT6$ est avirulent sur les génotypes contenant les gènes *Rlm4*, *Rlm1* ou *Rlm7* (Données non présentées). La majorité des 31 génotypes criblés contenait un gène *Rlm* correspondant à un gène d'avirulence de ce descendant $\Delta KMT6$. Il nous était donc impossible d'évaluer l'effet de la dérégulation des effecteurs tardifs sur ces génotypes.

Cette approche a donc été abandonnée pour la suite du screening mais reste intéressante. Il faudrait utiliser pour ce faire des descendants au phénotype a1, a4, a7 ou générer une souche INV13.269 – Δ KMT6. Cela permettrait de cribler des génotypes variés, pour rechercher des génotypes répondant à la sécrétion d'un pool d'effecteurs tardifs, au stade cotylédonnaire.

2.2. Les limites de cette approche

Précédemment, nous avons vu que cette approche de screening repose sur l'hypothèse que les effecteurs tardifs pourraient être reconnus lors de la colonisation de la tige, au même titre que les gènes d'avirulence sont reconnus lors de l'infection des cotylédons et des feuilles. Comme l'a illustré le premier chapitre de ce manuscrit, les effecteurs tardifs peuvent être impliqués dans des résistances de type gène-pour-gène, y compris lors de la colonisation de la tige.

En revanche, le pendant de cette hypothèse concerne l'expression des gènes de résistance. En effet, pour être identifiés avec cette approche de screening, il est nécessaire que les gènes de résistance de la plante, susceptibles de reconnaître des effecteurs tardifs, soient exprimés aussi bien dans la tige que dans les cotylédons. Il s'agit ici d'une limite à notre approche, difficile à contourner. Les gènes de résistance ont longtemps été considérés comme exprimés constitutivement, bien qu'il ne soit pas toujours clair si constitutif dans ce cas correspond à un même niveau d'expression ou bien à une expression basale qui pourrait augmenter au cours de l'infection par exemple.

Toutefois, comme nous l'avons vu précédemment (cf. introduction, partie 4.1), plusieurs études indiquent une régulation de l'expression des RGA au cours de l'infection. Par exemple, l'expression des NBS-LRR d'*Arabidopsis thaliana* est régulée selon le tissu, le stade de développement, l'organe, ou encore le génotype (Michelmore *et al.*, 2013). Cette régulation de l'expression des RGA met en lumière une limite à notre approche de screening. Si le niveau ou la cinétique d'expression d'un gène de résistance peut varier selon le génotype, alors il est indispensable de diversifier le matériel végétal criblé, comme nous l'avons fait dans le chapitre II. Malgré une diversification des génotypes, il est possible de manquer un gène de résistance qui serait spécifiquement exprimé lors de la colonisation de la tige.

L'analyse transcriptomique que j'ai faite en introduction du chapitre II indique que les RGA du colza (génotype 'Darmor') sont régulés au cours de l'infection. On y distingue plusieurs clusters d'expression de RGA (Figure 30). Certains gènes sont régulés positivement lors de la phase nécrotrophe d'infection des cotylédons et de la colonisation du pétiole, d'autres le sont tout au long de l'infection des cotylédons. Cette analyse illustre le fait que les RGA sont régulés au cours de l'infection par *L. maculans*. Avec notre approche de criblage, nous avons utilisé des souches transformées, exprimant 10 effecteurs tardifs au stade cotylédonnaire.

Ces effecteurs tardifs, placés sous le contrôle du promoteur du gène *AvrLm4-7* ont normalement la cinétique d'expression d'*AvrLm4-7* lors de l'infection des cotylédons, à savoir un pic d'expression à sept jours après inoculation (Figure 37). Puisque l'expression des RGA semble régulée au cours de l'infection, certains RGA ne peuvent être identifiés avec notre approche de screening (Figure 41). En effet, les gènes des clusters 1, 3 et 6 semblent être exprimés trop tardivement par rapport au pic d'expression artificiel des effecteurs tardifs à sept jours sur cotylédons. De même, pour les gènes du cluster 2, il n'est pas certain que le niveau d'expression soit suffisant à sept jours pour entraîner une reconnaissance des effecteurs tardifs (Figure 41). Ces gènes sont donc exprimés, mais potentiellement après l'expression des symptômes de *L. maculans*. *A contrario*, il existe une quantité non négligeable de gènes qui, comme *Rlm2* (Figure 30) sont exprimés en cotylédons, mais pas en tiges et ne peuvent donc contribuer à la résistance quantitative que si celle-ci s'exprime dans d'autres organes tels que les pétioles. Une expression faible ou retardée, en cotylédon ou feuille, d'un RGA reconnaissant un des effecteurs tardifs pourrait expliquer les phénotypes intermédiaires obtenus ici lors du screening.

Toutefois, les RGA des clusters 4 et 5 sont intéressants car exprimés à la fois à sept jours après inoculation des cotylédons et également au début ou à la fin de la colonisation des pétioles. De même, les RGA des clusters 7, 8 et 9 sont intéressants car ils devraient être suffisamment exprimés pour entraîner une reconnaissance des effecteurs tardifs lors de nos criblages, et sont fortement exprimés lors de l'infection des tiges (Figure 41). Il est intéressant de noter que les deux gènes de résistance présents dans le cultivar 'Darmor', à savoir *Rlm2* (l'allèle sensible) et *Rlm9* se trouvent respectivement dans les clusters d'expression 1 et 2 (Figure 30). Pour les quatre autres clusters, il est plus difficile de juger, puisque nous ne savons pas quels niveaux d'expression, du RGA, mais également de l'effecteur seraient suffisants pour entraîner une reconnaissance de l'effecteur tardif. Notre approche ne permet donc peut-être pas d'identifier tous les RGA, dont les produits reconnaissent des effecteurs tardifs. Toutefois, elle a le mérite de rendre possible un criblage de ressources variétales, qui ne pourrait être réalisé au stade plante entière, trop chronophage et trop peu reproductible.

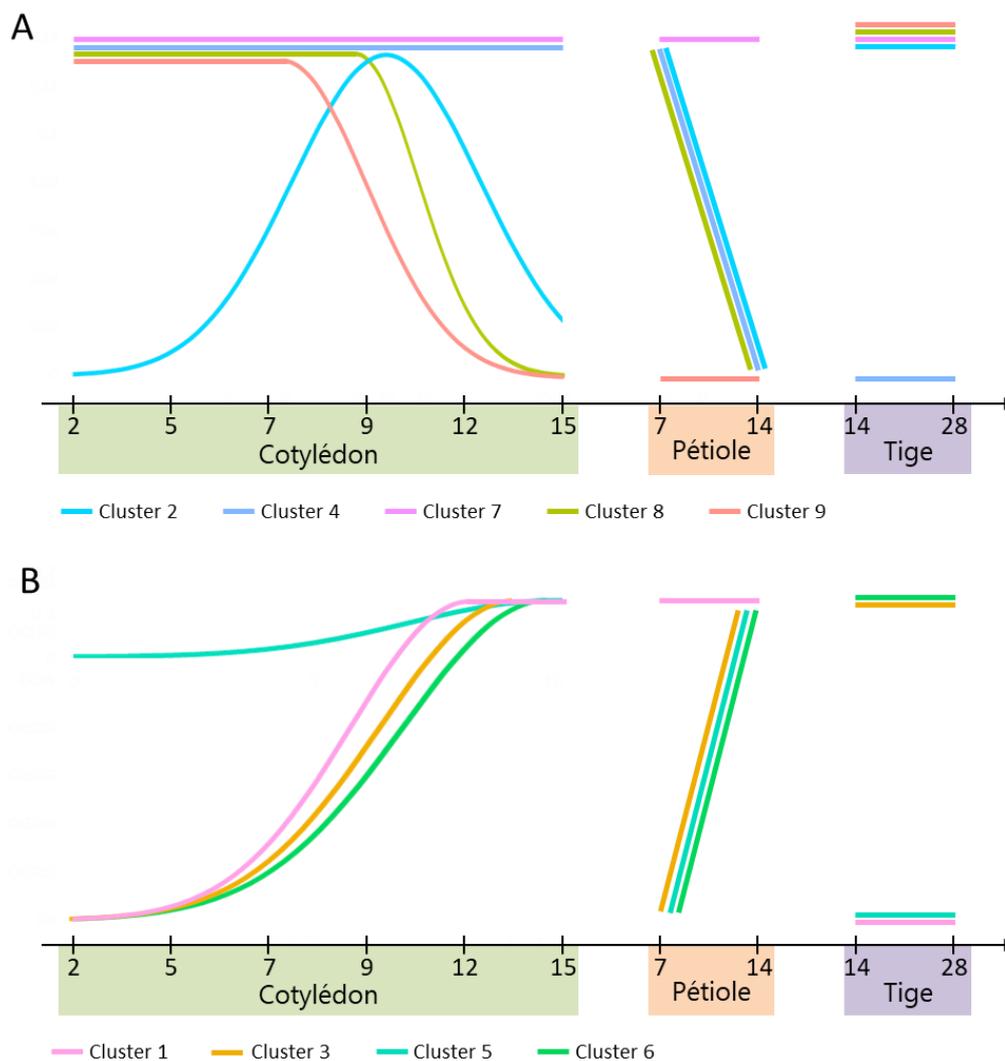


Figure 41 : Modèle simplifié des vagues d'expression des RGA au cours de l'infection par *L. maculans*

Les clusters d'expression de la Figure 30 sont ici représentés de façon schématique, au cours de l'infection (temps d'infection indiqués en jpi le long de l'axe x). Les gènes de trois des neuf clusters sont exprimés au début de la colonisation du pétiole (A) tandis que les gènes de trois autres clusters sont exprimés plus tardivement lors de la colonisation des pétioles (B).

Une autre limite concerne la souche qui a permis d'obtenir les transformants exprimant les effecteurs tardifs sélectionnés dès l'infection des cotylédons. Nous avons choisi la souche INV13.269 (Avr5-6-a/A8-a/A10-11-S), virulente pour la majorité des gènes de résistance actuellement présents dans les variétés cultivées. En effet, elle est virulente sur *Rlm1*, *Rlm2*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7* et *Rlm9*. En revanche, elle est avirulente pour *Rlm5*, *Rlm6* et *Rlm11*. Notre approche ne nous permet donc pas d'identifier des résistances aux effecteurs tardifs dans des génotypes comportant l'un de ces quatre gènes *Rlm*. Toutefois, les trois derniers gènes *Rlm* ne sont pas encore déployés. *Rlm5* est présent depuis quelques années seulement dans les variétés commerciales, et est absent dans la majorité des génotypes de la collection d'Innolea. Nous n'avons donc pas été contraints par le profil en gènes d'avirulence d'INV13.269. De plus, la comparaison des phénotypes d'interactions obtenus avec la souche sauvage et avec les transformants permet de faire la part entre une résistance potentielle à l'effecteur tardif utilisé, et une nouvelle résistance spécifique à la souche INV13.269.

Il convient également de préciser que les 11 effecteurs tardifs choisis et étudiés dans les chapitres I et II sont des effecteurs tardifs candidats. Ils n'ont pas encore été réellement validés. Une caractérisation fonctionnelle plus approfondie serait donc nécessaire et intéressante pour s'assurer de leur rôle en tant qu'effecteur.

Parmi les résultats du criblage variétal, plusieurs phénotypes se sont avérés difficiles à expliquer ou à exploiter. Certains génotypes répondaient de manière variable entre répétitions et leur caractérisation sera difficile. Nous avons également observé des variations entre conditions de tests (Innolea / INRAE). Il pourrait s'agir de gènes de résistance dont la cinétique d'expression ou le phénotype d'interaction seraient dépendants des conditions environnementales. D'autres génotypes répondaient différemment à l'inoculation de l'un ou l'autre des deux transformants d'un même effecteur tardif. Cela pourrait s'expliquer par une cinétique d'expression de l'effecteur tardif différente entre les deux transformants, l'expression des effecteurs tardifs n'ayant été vérifiée qu'à sept jours après inoculation. Certains RGA sont exprimés tardivement lors de l'infection des cotylédons, comme ceux des clusters 1, 3 et 6 (Figure 41). Une explication possible serait qu'un premier transformant aurait un niveau d'expression de l'effecteur tardif encore suffisant pour être reconnu par un RGA exprimé tardivement dans les cotylédons, contrairement au second transformant. Ces différents phénotypes n'ont pas été analysés dans le cadre de ma thèse, mais demeurent intéressants à disséquer dans une optique de diversification des sources de résistance.

3. Des interactions gène-pour-gène impliquées dans la résistance quantitative

3.1. Un effecteur tardif impliqué dans une interaction « gène-pour-gène »

L'approche novatrice mise au point pour identifier des génotypes reconnaissant des effecteurs tardifs a permis d'identifier une interaction gène-pour-gène entre l'effecteur tardif *LmSTEE98* et le locus de résistance nommé par la suite *RlmSTEE98*, identifié chez 'Yudal'. En interaction, avec l'UMR IGEPP (INRAE de Rennes), le contrôle de cette résistance a été déterminé comme monogénique.

Durant ma thèse, j'ai pu approfondir et valider cette interaction tout particulièrement intéressante (Chapitre I). En inactivant le gène codant l'effecteur *LmSTEE98*, j'ai pu valider que cet effecteur est bien reconnu au stade cotylédonaire lorsqu'il n'est pas inactivé. De plus, *LmSTEE98* est également reconnu lors de l'infection de la tige. En effet, lorsque le gène est inactivé, les mutants induisent plus de nécroses dans les tiges de 'Yudal' que les souches témoins, indiquant une reconnaissance de l'effecteur menant à une réponse partielle de 'Yudal'. Nous en avons donc conclu que cette interaction gène-pour-gène est impliquée dans la résistance quantitative. En revanche, à ce jour, nous n'avons pas plus d'informations quant à la fonction du gène *RlmSTEE98*.

Pour mon projet, j'ai également réalisé un criblage variétal, à la recherche de génotypes reconnaissant six effecteurs tardifs pertinents que j'ai sélectionné (Chapitre II). Une seconde interaction a été identifiée entre l'effecteur *Lm6826* et le génotype RG007, menant à une réponse hypersensible. Ce résultat nous indique donc que plusieurs effecteurs tardifs peuvent être reconnus et que *LmSTEE98* n'est pas un cas unique. Étonnamment, parmi les 10 effecteurs sélectionnés pour identifier de nouvelles sources de résistances, les deux induisant des réponses d'hypersensibilité sont deux gènes qui ne présentent pas d'homologue chez d'autres espèces fongiques. Cette caractéristique les apparente plus à des effecteurs précoces tels qu'on les connaît, et pourtant ce sont bien des effecteurs tardifs spécifiquement exprimés lors de la colonisation de la tige. Comme nous l'avons vu sur les Figures 39 et 40, *Lm6826* et *LmSTEE98* sont tous les deux situés dans des régions riches en gènes et sont tous les deux enrichis en marques hétérochromatiniennes H3K27me3. Bien qu'on ne sache pas l'expliquer, il est intéressant de noter que ces deux gènes, ainsi que *Lm1277*, sont localisés à proximité immédiate de l'un ou l'autre des transposons à ADN les plus représentés dans le génome et insérés en tant que copies uniques dans les régions GC, DTM_Sahana et DTX_Gimli (Figures 39 et 40).

La proximité d'un transposon à ADN ou l'absence d'homologue pourraient indiquer un transfert horizontal récent de la région, tel qu'il s'est produit pour le gène *ToxA*, dont le transfert horizontal entre trois espèces fongiques pathogènes du blé semble avoir été favorisé par un transposon à ADN (McDonald *et al.*, 2019). Ainsi, l'absence d'homologue ou la proximité d'un transposon à ADN pourraient constituer un critère de choix pour la découverte de candidats *Avr* tardifs.

Les gènes sans homologue ne représentent pas la majorité des effecteurs tardifs, puisque parmi les 40 effecteurs tardifs de la vague 5, seuls 13 ne présentent pas d'homologue dans les bases de données, dont *Lm1852* et *Lm6826*. De même, parmi les 56 effecteurs tardifs de la vague 4, 21 gènes n'ont pas d'homologue non plus, incluant *LmSTEE98*. Si l'on s'intéresse à la présence de transposon à ADN, un transposon DTX_Gimli est localisé à côté de deux gènes de la vague 4, *Lmb_jn3_07353* et *Lmb_jn3_08781*, tous les deux sans homologue dans les bases de données. Nous aurions donc 32 effecteurs spécifiquement exprimés lors de la colonisation de la tige, qui ne présentent pas d'homologue, et qui pourraient donc être de bons effecteurs candidats pour identifier des sources de résistance les reconnaissant.

Comme nous l'avons vu en introduction de ce manuscrit (cf. partie 4.2.2), des interactions gène-pour-gène impliquées dans la résistance quantitative ont été étudiées chez d'autres pathosystèmes. Des QTL de résistance chez l'orge sont impliqués dans des relations gène-pour-gène avec ceux du champignon *P. hordei* (González *et al.*, 2012). Chez *B. napus*, les gènes RGA sont principalement des RLK (Cantila *et al.*, 2021). De tels récepteurs, s'ils sont localisés dans des QTL de résistance, jouent très probablement un rôle dans la résistance quantitative (Poland *et al.*, 2011; Hurni *et al.*, 2015).

3.2. Des formes plus complexes de résistance quantitative

Lors du criblage de génotypes réalisés dans le chapitre II, nous avons identifiés sept génotypes présentant des phénotypes intermédiaires de réponse aux effecteurs tardifs. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I et dans la partie 3.1 de cette discussion, une interaction gène-pour-gène avec un effecteur tardif, *LmSTEE98*, est impliquée dans la résistance quantitative. On peut également imaginer qu'un effecteur soit reconnu par un gène de résistance et entraîne une réponse partielle, contribuant à une réponse quantitative, qui pourrait être fortement dépendante des cinétiques d'expression des gènes RGA. Les phénotypes intermédiaires que nous avons observés chez sept génotypes lors du second screening pourraient être expliqués par ce phénomène. En effet, on peut imaginer que ces génotypes portent un gène de résistance dont le produit reconnaît un effecteur tardif, mais que cette reconnaissance provoque une réponse seulement partielle et donc un phénotype intermédiaire. On peut également imaginer un décalage entre la cinétique d'expression des effecteurs tardifs, qui sont ici artificiellement exprimés lors de l'infection des cotylédons, et la cinétique d'expression des gènes de résistance leur correspondant. On observe en particulier de nombreux RGA exprimés à 7, 9 voire 12 et 15 jours après inoculation. De tels gènes reconnaîtraient l'effecteur leur correspondant au moment du développement ou de l'expansion des symptômes conduisant à des réponses intermédiaires, correspondant à la mise en place des réactions de défense alors que le symptôme est déjà établi. Ce phénomène pourrait mener à une réponse plus faible qu'avec des cinétiques d'expression en phase et donc à un phénotype intermédiaire.

Nous ne pouvons pas vraiment expliquer ces phénotypes intermédiaires pour le moment. Toutefois, s'ils sont le phénotype d'une résistance quantitative aux effecteurs tardifs, alors il serait intéressant d'approfondir ces résultats.

En revanche, les interactions gène-pour-gène ne constituent pas la majorité des mécanismes impliqués dans la résistance quantitative. Cette dernière est complexe, ses acceptations varient selon les auteurs et recouvrent sans doute des phénomènes très différents selon les modèles et également au sein d'un même modèle. Des interactions gène-pour-gène partielles entre effecteurs et protéines de résistance sont donc plutôt l'exception que la règle. Des formes plus complexes existent. Le cas du transporteur ABC Lr34 en est un exemple à plusieurs titres. Lr34 est un transporteur ABC, qui ne peut donc être impliqué dans la reconnaissance d'effecteurs fongiques, telle qu'on l'entend pour la résistance spécifique (Krattinger *et al.*, 2009). Avec un polymorphisme de seulement deux acides aminés entre la version résistante et la version sensible de Lr34, les deux versions de la protéine sont toutes deux fonctionnelles. Depuis cette étude, il a été montré que la protéine Lr34 est un transporteur de l'acide abscissique (Krattinger *et al.*, 2019). Son rôle n'est donc pas de reconnaître des effecteurs fongiques, mais plutôt de redistribuer l'ABA dans la plante.

L'ABA ayant des rôles divers dans la plante, il peut favoriser ou diminuer la résistance aux maladies, selon l'agent pathogène, le stade de l'hôte ou encore les tissus végétaux (Krattinger *et al.*, 2019). Par exemple, l'application d'ABA augmente la résistance du riz à *Cochliobolus miyabeanus* (De Vleeschauwer *et al.*, 2010) mais augmente sa sensibilité à *M. oryzae* (Ulferts *et al.*, 2015). Durant l'infection du blé, *M. oryzae* produit de l'ABA, et semble également activer la voie de signalisation hormonale de l'ABA (Cao *et al.*, 2016). Les auteurs ont émis l'hypothèse que *M. oryzae* active la voie de signalisation de l'ABA pour réprimer la signalisation immunitaire du riz lors de l'invasion initiale et réprime l'efflux de nutriments des cellules infectées pour une croissance massive au stade ultérieur de l'infection. Les rôles de l'ABA dans les interactions hôte/agent pathogène sont donc variables d'un pathosystème à l'autre. Lors de l'infection de *B. napus* par *L. maculans*, ce dernier exprime tous les gènes du cluster de l'ABA, durant la vague d'expression 2, correspondant à la biotrophie dans les cotylédons, les pétioles et les tiges (Gay *et al.*, 2021). On pourrait donc imaginer un rôle de l'ABA similaire au cas de *M. oryzae* lors de l'infection du riz. La production d'ABA par *L. maculans* pourrait inhiber la signalisation immunitaire du colza lors de la colonisation biotrophe des cotylédons.

De façon similaire, le gène *Lr67* chez le blé code un transporteur de sucres, ayant un rôle dans la résistance quantitative (Moore *et al.*, 2015). Il aurait pour effet d'augmenter le ratio hexose : saccharose dans l'apoplasme foliaire, ce qui induirait *via* une voie de signalisation liée aux sucres, des conditions non-favorables à la croissance de l'agent pathogène biotrophe.

Ces deux gènes participent non seulement à la résistance quantitative chez le blé mais ont également un rôle dans la résistance à de multiples agents pathogènes. En effet, le gène *Lr34* confère une résistance quantitative à *P. triticina*, *P. striiformis* et *Blumeria graminis*, les deux premiers étant des Basidiomycètes, tandis que le troisième est un Ascomycète (Krattinger *et al.*, 2009). De la même manière, le gène *Lr67* confère au blé une résistance quantitative à *P. triticina*, *P. striiformis* f. sp. *tritici*, *P. graminis* et *B. graminis* (Moore *et al.*, 2015). Tous ces agents pathogènes cités jusqu'ici ont un mode de vie biotrophe. Cela interroge sur la nature de cette résistance quantitative et sur la possibilité qu'il s'agisse d'un effet trophique.

Etonnamment, le transfert du gène *Lr34* chez le riz confère à ce dernier une résistance quantitative à *M. oryzae*, qui est un champignon hémibiotrophe, contrairement aux rouilles et oïdium cités précédemment (Krattinger *et al.*, 2016). De même, chez le maïs, l'insertion de ce gène permet d'acquérir une résistance quantitative au champignon biotrophe *P. sorghi* mais également à l'hémibiotrophe *Exserohilum turcicum* (Sucher *et al.*, 2017). Même s'il s'agit peut-être d'un effet trophique, ce type de résistance quantitative pourrait exister chez *B. napus*. Avec une longue phase de colonisation biotrophe qui dure plusieurs mois, ces diverses interactions, confèrent une résistance quantitative à l'hôte et parfois une résistance multi-pathogène, sans impliquer de gènes de résistance au sens strict. Avec l'approche de screening que nous avons utilisé durant ma thèse, il n'est pas possible d'identifier des résistances quantitatives de ce type. En effet, les effets de la résistance quantitative à *L. maculans* s'expriment plusieurs mois après l'infection primaire et les tests pathologiques effectués en conditions contrôlées sont donc peu adaptés. Si de telles formes de résistance quantitative existent chez *B. napus*, nous ne saurions pas les mettre en évidence facilement. Nous pouvons tout de même imaginer quelques possibilités. Par exemple, nous pourrions identifier les composantes monogéniques « gène-pour-gène » impliquées dans la résistance quantitative, puis cribler par GWAS les autres génotypes ayant un bon niveau de résistance quantitative et dépourvus de gènes *RlmSTEE* pour identifier d'autres types de gènes, impliqués dans la résistance quantitative de ces génotypes.

4. Durabilité des résistances aux effecteurs tardifs

4.1. Une capacité d'évolution restreinte

L'intérêt de rechercher des gènes de résistance aux effecteurs tardifs, au-delà du fait d'accroître le pool de gènes de résistance disponibles et efficaces, est d'identifier des gènes dont la résistance serait plus durable dans le temps. En effet, notre hypothèse considère que la résistance aux effecteurs tardifs serait plus durable que la résistance induite par les gènes *AvrLm*. Plusieurs arguments vont dans le sens de cette hypothèse.

Dans la partie 3.2.3 de mon introduction bibliographique, nous avons détaillé plusieurs caractéristiques des effecteurs tardifs, laissant supposer que les gènes de résistance les reconnaissant seraient moins rapidement contournés. Contrairement aux gènes d'avorulence, les gènes codant des effecteurs tardifs se situent dans les isochores GC du génome de *L. maculans* (Rouxel *et al.*, 2011). Se trouvant dans ces isochores riches en gènes, la perte d'une région entière qui contient des effecteurs tardifs, mais également des gènes utiles au champignon est moins probable que la perte d'une région dispensable, tel qu'un isochoire AT contenant majoritairement un unique gène d'avorulence isolé au milieu de mosaïques d'éléments transposables.

Un second mécanisme d'évolution connu chez les champignons, et présent chez *L. maculans*, est le mécanisme de RIP qui a pour objectif d'inactiver les éléments répétés. Ce mécanisme peut déborder sur les gènes situés à proximité des éléments répétés, en particulier lorsque ceux-ci sont isolés dans de grandes régions AT (Raffaele & Kamoun, 2012). Par exemple, les isolats portant la version du gène *AvrLm6* ayant subi le mécanisme du RIP sont virulents, tandis que les isolats avec la version native sont avirulents vis-à-vis du gène *Rlm6* (Fudal *et al.*, 2009). De même, avec le déploiement au champ du gène de résistance *Rlm7*, il a été possible de suivre quasiment en temps réel le RIP en action sur le gène *AvrLm4-7*, entraînant le contournement rapide du gène de résistance (Daverdin *et al.*, 2012; Plissonneau *et al.*, 2016; Balesdent *et al.*, 2019). A l'inverse des gènes d'avorulence, les effecteurs tardifs, localisés dans les isochores GC, ne sont pas inclus dans de grandes régions riches en ET et sont donc moins susceptibles de subir les effets du RIP. Il existe un cas particulier dans le génome de *L. maculans*: la famille d'effecteurs d'*AvrLm10A* et *AvrLm10B*, qui soulève une question. Ces deux gènes d'avorulence ont chacun plusieurs homologues dans le génome de *L. maculans*, *LmSTEE35* étant un effecteur 'tardif' et un des homologues d'*AvrLm10A*. La question qui se pose est donc la suivante : ces différents homologues d'un même gène sont-ils suffisamment identiques pour être considérés comme des éléments répétés et donc être affectés par le RIP ? L'homologie la plus élevée entre ces homologues est de 55% entre séquences protéiques. Concernant la séquence nucléotidique, l'homologie est trop faible pour être détectée par Blast sur le génome de *L. maculans* (Données non publiées).

Le mécanisme de RIP agissant à partir d'au moins 27% d'homologie entre séquences nucléotidiques, il est donc peu probable que les homologues d'*AvrLm10A* et d'*AvrLm10B* soient considérés comme des éléments dupliqués et ne soient inactivés par RIP (Gladyshev & Kleckner, 2014).

Une hypothèse alternative au « débordement » du RIP depuis les éléments répétés vers les gènes d'avirulence proches, peut être proposée en deux étapes : dans un premier temps, ces grandes régions AT hébergeant les gènes d'avirulence pourraient être facilement dupliquées, par recombinaison entre éléments répétés. A la génération suivante, le RIP inactiverait les copiés dupliqués des gènes d'avirulence, générant des allèles virulents (Daverdin *et al.*, 2012). La localisation des effecteurs tardifs en région GC serait un frein à un tel mécanisme, puisque, d'une part, les duplications *via* des recombinaisons génétiques ne sont pas possibles dans un contexte de telles régions, d'autre part, le RIP agirait sur tous les gènes ainsi dupliqués, inactivant des gènes essentiels pour le champignon. Toutefois, parmi les onze effecteurs tardifs étudiés, deux se situent en bordure d'isochores GC, deux autres se situent dans de petits isochores GC et au total, cinq sont en association directe avec un transposon à ADN. Il faudrait donc évaluer pour ces gènes, leur mutabilité par débordement du RIP ou par duplication / inactivation. Concernant les autres effecteurs tardifs étudiés dans ce projet, ils sont localisés dans le génome essentiel, moins plastique que les régions citées plus haut (Raffaele & Kamoun, 2012). Une question se pose alors : quels mécanismes pourraient permettre le contournement des résistances induites par ces effecteurs tardifs ?

Puisqu'ils sont situés dans des régions qui ne favorisent pas l'évolution des gènes, il est difficile d'en dire plus sur les mécanismes d'évolution qui impacteraient les effecteurs tardifs (Möller & Stukenbrock, 2017). Pour autant, cela ne signifie pas qu'ils ne peuvent pas muter ou être absents du génome. En effet, les gènes *LmSTEE35* et *LmSTEE98* semblent absents chez deux souches françaises différentes. L'absence de ces gènes dans certaines souches a été détecté par absence d'amplification par PCR. Pour comprendre les raisons de l'absence de ces deux gènes, il serait intéressant de vérifier leur absence, par PCR avec des amorces plus éloignées par exemple, ou bien par séquençage de la région complète chez ces souches. Si l'absence de ces deux gènes chez certaines souches de *L. maculans* est confirmée, il serait alors probable que les effecteurs tardifs soient soumis au rythme naturel des mutations aléatoires qui apparaissent dans le génome essentiel, mais qu'ils puissent également être absents. Les souches présentant des mutations avantageuses pour ces gènes, ou bien une absence de ces gènes pourraient donc être sélectionnées dans les populations de *L. maculans*. Dans la partie suivante, nous discuterons de la pression de sélection qui s'exerce sur ces gènes.

4.2. Une pression de sélection plus faible

Comme nous l'avons vu ci-dessus, plusieurs mécanismes favorisent l'évolution des gènes puis leur sélection sous la pression des gènes *Rlm*. Les effecteurs tardifs sont *a priori* peu soumis à ces mécanismes. Ils peuvent toutefois évoluer au gré des mutations aléatoires qui ponctuent le génome.

Les effecteurs tardifs semblent impliqués dans la résistance quantitative, comme l'illustrent les résultats du chapitre I. Ils interviennent lors de la colonisation de la tige. Les isolats qui produisent des effecteurs *AvrLm*, reconnus par les produits des gènes *Rlm* sont bloqués dès l'étape d'infection des cotylédons et des feuilles. Ils n'ont donc aucune chance d'arriver jusqu'au collet des plantes, puis d'effectuer leur reproduction sexuée. Ceci explique en partie le contournement rapide des résistances liées aux gènes *Rlm* : seules les souches virulentes peuvent participer à la reproduction sexuée et contribuer à la construction de l'inoculum de l'année suivante. Leur proportion augmente alors rapidement dans les populations naturelles.

A l'inverse, la reconnaissance des effecteurs tardifs, qui n'a pas lieu lors des phases initiales de la colonisation des tissus durant lesquelles ils ne sont pas exprimés, n'empêche donc pas la pénétration du champignon dans les tissus de son hôte, ni sa phase de multiplication asexuée sur les feuilles. De plus, la résistance quantitative est partielle et la contribution d'une unique interaction ne suffit pas à bloquer le développement du champignon, au moins, comme nous l'avons montré pour l'interaction LmSTEE98 / RlmSTEE98. Les génotypes arborant un bon niveau de résistance quantitative présentent tout de même des symptômes. *L. maculans* y est donc capable d'effectuer son cycle infectieux complet, incluant l'étape de reproduction sexuée sur les résidus de culture. Si une souche, malgré la reconnaissance d'un de ces effecteurs tardifs, peut effectuer sa reproduction sexuée, cela implique que le génotype correspondant exercera une pression de sélection moins forte que dans le cas d'une résistance spécifique bloquant l'infection primaire. On peut donc dire que la résistance quantitative et *a fortiori* la résistance aux effecteurs tardifs exerce une pression de sélection plus faible que celle exercée par les gènes *Rlm* sur les gènes d'avirulence. Elle permettrait également le maintien dans les populations de souches avirulentes, si celles-ci présentent un avantage sélectif avec la présence d'un effecteur important pour la réussite de la colonisation des tissus.

Cette pression de sélection plus faible pourrait être une explication au faible polymorphisme des effecteurs tardifs. En effet, comme nous l'avons vu dans les chapitres II et III, les onze effecteurs tardifs étudiés jusqu'ici sont présents dans la très grande majorité des souches et présentent seulement quelques rares polymorphismes. Les effecteurs tardifs présentent très peu d'allèles et de variants protéiques. De plus, l'allèle dominant est systématiquement présent à plus de 90% dans la population française étudiée, et le gène est présent dans toutes les souches étudiées.

En revanche, s'agissant des gènes *AvrLm*, certains gènes comme *AvrLm1* et *AvrLm4-7* présentent d'importantes variations de présence/absence du gène dans les souches. De même, les gènes *AvrLmS*, *AvrLm4-7* et *AvrLm3* sont très polymorphes et présentent de nombreux allèles et variants protéiques (Gautier, Laval et Balesdent, communication personnelle). Ces gènes d'avirulence sont sous pression de sélection, puisque les gènes de résistance efficaces au champ sont *Rlm3*, *Rlm7* et *RlmS* (cf. Tableau 3, partie 5.2 de l'introduction). Même si les effecteurs tardifs apparaissent aussi polymorphes que les gènes *AvrLm* les moins polymorphes, il sera indispensable de suivre l'évolution des résistances aux effecteurs tardifs. Cela permettrait de répondre à la question de la pression de sélection sur les effecteurs tardifs. Il serait également intéressant d'évaluer le polymorphisme des gènes à l'échelle du génome de *L. maculans*, afin de savoir si les rares polymorphismes que j'ai observés chez les effecteurs tardifs sont plus ou moins fréquents, en comparaison aux autres gènes des isochores GC. La question de la reconnaissance des différents allèles se pose, afin de savoir si le polymorphisme de ces effecteurs tardifs impacte l'efficacité des reconnaissances. Nous n'avons pas d'information à ce sujet. En revanche, il est intéressant d'aller voir quels sont les allèles présents chez les autres espèces, présentant des homologies pour ces effecteurs tardifs. L'effecteur *Lm1277* présente deux polymorphismes de séquence protéique : V>M(13) dans le peptide signal, qui ne devrait pas impacter la reconnaissance et L>M(100). Les neuf premières espèces qui présentent un homologue pour *Lm1277* possèdent une Leucine en 100^{ème} position, tout comme l'allèle de JN3. L'effecteur *Lm5465* présente un polymorphisme : L>F(41). Les onze premiers homologues ont également une Leucine en 41^{ème} position, tout comme JN3. Enfin, l'effecteur *Lm7919* présente un polymorphisme : V>I(38). Les douze premières espèces qui ont un homologue de *Lm7919* ont une isoleucine en 38^{ème} position, comme les 30 souches de l'analyse de polymorphisme et non pas une valine comme l'allèle présent chez JN3 et les autres souches étudiées. Pour ces trois effecteurs qui ont plusieurs variants protéiques dans les populations de *L. maculans*, la question de la reconnaissance des différents variants protéiques se pose, puisque nous avons seulement testé l'allèle de JN3.

Par ailleurs, quelques exemples indiquent que la résistance quantitative peut également s'éroder (Andriveau *et al.*, 2007). Si la pression de sélection qui s'exerce sur les effecteurs tardifs est réellement plus faible que celle exercée sur les gènes *AvrLm*, alors on peut supposer que la résistance quantitative due à la reconnaissance d'effecteurs tardifs serait plus durable que la résistance spécifique liée aux gènes *Rlm*. Afin de pouvoir valoriser les résistances aux effecteurs tardifs, il faudrait dans un premier temps évaluer leur efficacité au champ, puis dans un second temps, il serait nécessaire d'évaluer leur durabilité en conditions d'infection naturelle. Ceci fera l'objet de la partie suivante de cette discussion.

5. Valorisation des résistances identifiées

5.1. Les criblages de ressources génétiques

Les gènes de résistance étant rapidement contournés, un effort continu est nécessaire pour identifier de nouvelles sources de résistance. Les collections de génotypes constituant un réservoir important de diversité, le criblage de ressources génétiques est souvent utilisé pour tenter d'identifier des sources de résistance encore inconnues. Chez le riz par exemple, le criblage de 4246 accessions a permis d'identifier des génotypes aux réponses variées à *M. oryzae*. Lors de ce criblage, 289 accessions ont également présenté un phénotype de résistance à cinq isolats de *M. oryzae* (Vasudevan *et al.*, 2014). Pour le blé, lors du criblage de 89 cultivars dans deux essais au champ, plusieurs variétés tunisiennes ont présenté des niveaux variés de résistance à *Z. tritici* (Bel Hadj Chedli *et al.*, 2020). Ces deux exemples illustrent les efforts importants à déployer, en criblant de nombreuses accessions, pour espérer identifier de nouvelles sources de résistance.

Afin de caractériser le contenu en gènes *Rlm* et tenter d'identifier de nouvelles sources de résistance, des criblages de ressources génétiques ont été réalisés par le passé, chez *B. napus* (Rouxel *et al.*, 2003b) et chez le chou (Dilmaghani *et al.*, 2013). Le criblage de 392 variétés de chou n'a pas permis d'identifier de sources de résistance à *L. maculans*. De plus, le criblage de 453 accessions de *B. napus* a mis en lumière le fait que les quatre gènes *Rlm* étudiés sont plus rares en fréquence et en diversité dans les génotypes de printemps, en comparaison aux génotypes d'hiver (Rouxel *et al.*, 2003b). De plus, parmi les génotypes d'hiver, la sélection variétale, dans l'objectif d'améliorer la qualité de l'huile, a amélioré l'homogénéité des génotypes modernes, mais a conduit à l'appauvrissement de leur diversité en gènes *Rlm*. Cette étude a également permis d'identifier quelques nouvelles sources de résistance. En effet, 1,3% des accessions criblées ont présenté un phénotype de résistance homogène à la souche v11.1.1, virulente sur des génotypes contenant les gènes *Rlm* connus au moment de l'étude. De plus, 6,8% des accessions ont montré un phénotype de résistance hétérogène en réponse à cette même souche. Ces génotypes, susceptibles de contenir de nouveaux gènes de résistance, faisaient majoritairement partie des génotypes d'hiver moins « avancés ». Cela suggère que ce(s) source(s) de résistance ont été perdue(s) lors de la sélection variétale des génotypes d'hiver, conduisant à l'amélioration d'autres critères de sélection.

De rares ressources en gènes *Rlm* ont été identifiées chez le colza. En France, les gènes *Rlm2*, *Rlm3*, *Rlm4* et *Rlm9* sont présents depuis longtemps dans le genepool de *B. napus*, avant même qu'ils aient été clairement identifiés (Rouxel & Balesdent, 2017 ; Tableau 3). Les gènes *Rlm1* et *Rlm7* ont été introduits plus récemment, dans les années 1990 et 2000, respectivement. Certains gènes *Rlm* ont été identifiés chez d'autres espèces de *Brassica*, telles que *B. juncea* (*Rlm5* et *Rlm6*), *B. rapa* (*Rlm8* et *Rlm11*), *B. nigra* (*Rlm10*) et *B. oleracea* (*Rlm13*), comme indiqué dans le Tableau 1.

L'objectif des deux criblages réalisés dans les chapitres I et II était d'identifier de nouvelles sources de résistance reconnaissant des effecteurs tardifs. Toutefois, ils illustrent également la rareté des sources de résistance reconnaissant des effecteurs précoces. En effet, lors du premier screening, réalisé dans le chapitre I, sur 204 géotypes, puis lors du second screening réalisé sur 130 géotypes, dont 121 géotypes différents des 204 premiers, les géotypes ont été criblés avec JN2 et INV13.269. Ces deux souches, qui étaient des témoins, auraient pu permettre d'identifier de nouvelles sources de résistance à des effecteurs précoces. En dehors des géotypes réagissant à un ou des effecteur(s) tardif(s), ces deux screenings n'ont mis en évidence que des géotypes portant des gènes *Rlm* connus. En réalisant des criblages variétaux, il semble donc difficile d'identifier de nouveaux gènes majeurs de résistances, reconnaissant des effecteurs précoces.

En revanche, cribler des ressources génétiques avec les transformants exprimant précocement des effecteurs tardifs, nous a permis d'identifier de nouvelles sources de résistance insoupçonnées et diversifiées, dans le genepool de *B. napus*, parmi les géotypes « semi-winter ». Cette approche de criblage a conduit à l'identification de phénotypes de résistance diversifiés. Les sources de résistance qualitative, tout comme les géotypes au phénotype intermédiaire pourraient permettre de diversifier le pool assez restreint de gènes *Rlm*. Il serait donc intéressant de poursuivre ce type de criblage, comme discuté dans le chapitre II, puis de pouvoir utiliser au mieux ces ressources en tant que résistance quantitative ou bien spécifique. Pour cela, il serait possible de combiner ces nouvelles sources de résistance avec de futurs gènes *Rlm* isolés d'autres *Brassica* par exemple. Il serait également intéressant de mieux comprendre les résistances des géotypes qui reconnaissent Lm7919. Nous avons également vu que les profils d'expression des RGA au cours de l'infection sont variés au sein d'un même géotype. On peut donc imaginer que le profil d'expression d'un même RGA varie selon le fond génétique dans lequel il se situe. Dans ce cas, une fois la source de résistance identifiée (cartographie, identification de gènes candidats), il serait possible de sélectionner des géotypes selon le profil d'expression du gène d'intérêt. Poursuivre ce type de criblage dans des collections de géotypes diversifiés pourrait permettre d'identifier d'autres sources de résistance reconnaissant des effecteurs tardifs.

5.2. Comment utiliser les sources de résistance identifiées ?

A la fin de son projet de thèse, Julie Gervais avait identifié une source de résistance chez le génotype de printemps 'Yudal'. En partenariat avec l'IGEPP à Rennes, il a été déterminé que cette résistance est sous contrôle monogénique et que le gène, nommé *RlmSTEE98* se situe dans un intervalle de 266kb sur le chromosome A09, incluant 70 gènes prédits chez 'Darmor-bzh' (Jiquel *et al.*, 2021). Malgré les nombreuses études menées avec ce cultivar, aucun QTL n'a été détecté dans cette région de 266kb chez 'Yudal' (Pilet *et al.*, 1998, 2001; Jestin *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2014). Toutefois, il existe trois QTL de résistance au phoma sur ce chromosome. Malgré la sensibilité de 'Yudal' au phoma du colza, certains QTL proviennent de 'Yudal' chez les descendants du croisement 'Darmor-bzh' x 'Yudal' (Pilet *et al.*, 1998; Raman *et al.*, 2018). Durant sa thèse, Julie Gervais avait testé l'effet du silencing de *LmSTEE98* sur la colonisation de la tige du cultivar 'Yudal' (données non publiées). Aucun effet n'avait été détecté lors de tests sur plantes adultes. L'hypothèse principale était alors que *RlmSTEE98* n'était pas exprimé dans les tiges, ce qui aurait expliqué l'absence de QTL de résistance dans la région de *RlmSTEE98*.

En poursuivant ses travaux, j'ai inactivé *LmSTEE98* par la méthode CRISPR-Cas9 et j'ai observé un effet de l'inactivation du gène lors de la colonisation des tiges de 'Yudal' (Jiquel *et al.*, 2021). Il y a donc une reconnaissance de *LmSTEE98* par *RlmSTEE98* lors de la colonisation de la tige, qui permet une diminution des symptômes nécrotiques. *RlmSTEE98* a donc bien un rôle dans la résistance quantitative.

Dans ce cas, comment expliquer l'absence de QTL dans la région de *RlmSTEE98*? Dans les études d'identification de QTL de résistance, les QTL « majeurs », expliquant une proportion conséquente de la résistance quantitative sont plus facilement identifiés. Les QTL à plus faible effet peuvent donc ne pas être détectés, même s'ils existent et participent à la résistance quantitative. Une hypothèse serait donc que *RlmSTEE98* joue un rôle dans la résistance quantitative, mais avec un effet trop faible dans le génotype 'Yudal', pour être détecté lors des essais au champ.

En réalisant un second screening, nous avons identifié deux génotypes supplémentaires qui reconnaissent également *LmSTEE98* (Chapitre II). Ainsi, parmi les trois génotypes qui reconnaissent *LmSTEE98* ('Yudal', RG021 et RG047), il est possible que le niveau, ou bien la cinétique d'expression de *RlmSTEE98* diffèrent entre ces génotypes. L'un d'entre eux exprime peut-être plus, ou plus longtemps *RlmSTEE98* que 'Yudal', en conditions d'infection naturelle au champ. Pour de tels génotypes, un rôle dans la résistance quantitative, lors d'essais au champ pourrait peut-être alors être détecté.

Une seconde interaction s'est révélée tout particulièrement intéressante dans ce criblage variétal, celle entre l'effecteur tardif *Lm6826* et le génotype RG007. Cette seconde interaction menant à une réponse hypersensible est tout aussi nette et répétable que celle entre *LmSTEE98* et *RlmSTEE98*. De la même manière, une première étape serait donc de réaliser un croisement entre RG007 et un génotype sensible à *Lm6826*, pour en établir le déterminisme génétique du côté de la plante et identifier la ou les régions dans lesquelles se situeraient le(s) gène(s) de résistance. Avant d'envisager d'intégrer ces nouvelles sources de résistance dans des variétés modernes, il faudra ensuite évaluer leur importance dans la résistance quantitative au champ.

Tout comme 'Yudal', les génotypes RG021 et RG007 sont des génotypes de type semi-hiver. Dans un premier temps, il serait donc nécessaire de les tester pour leur contenu en gènes *Rlm* connus et d'évaluer leur niveau de résistance quantitative au champ. Puisque ce sont des génotypes semi-hiver, ce dernier point risque de s'avérer compliqué à tester au champ (floraison très précoce, parfois pendant l'hiver, avec un risque de ne pas pouvoir aller jusqu'à la note G2 en fin de culture). Malgré tout, ce sont des génotypes intéressants. Tout comme 'Yudal', ce sont des morphotypes « semi-hiver » mais ils sont peut-être plus adaptés pour introgresser les sources de résistance identifiées, dans des variétés modernes de colza d'hiver.

Avec la cartographie réalisée par l'IGEPP, les marqueurs encadrant *RlmSTEE98* ont été identifiés et il est donc possible de les utiliser pour faire de la sélection assistée par marqueurs. Idéalement, il serait intéressant d'identifier le gène permettant la reconnaissance de *LmSTEE98* parmi les 70 gènes prédits dans cet intervalle chez 'Darmor-*bzh*'. La difficulté réside dans le fait qu'il pourrait s'agir d'un gène spécifique de 'Yudal', d'un polymorphisme du gène entre 'Yudal' et 'Darmor' ou bien encore d'une différence de niveau ou de cinétique d'expression du gène, qui pourrait être due à un polymorphisme dans les régions régulatrices. Identifier précisément le gène *RlmSTEE98* serait un projet à part entière. Il faudrait caractériser plus finement la région, réaliser un « fine-mapping » de la région, avec une population plus large que celle utilisée pour la cartographie réalisée à l'INRAE de Rennes. Il faudrait ensuite effectuer une validation fonctionnelle du candidat identifié. Pour ces raisons, nous ne sommes pas allés plus loin pour le moment dans l'identification de candidats pour *RlmSTEE98*. Par ailleurs, dans l'optique de poursuivre la caractérisation de la résistance à *Lm6826* chez RG007, il serait nécessaire d'avoir des informations de génotypage et de séquençage pour ce génotype.

Enfin, si ces sources de résistance, une fois identifiées précisément, sont bien impliquées dans la résistance quantitative au champ, alors il pourrait être intéressant de les pyramider avec des gènes de résistance plus classiques, comme les gènes *Rlm*.

5.3. Comment caractériser les phénotypes intermédiaires et les valoriser ?

Avec cette approche de screening, nous avons identifié sept génotypes présentant des phénotypes de résistance intermédiaires en réponse à un ou deux effecteurs tardifs. Pour ces génotypes, la caractérisation des résistances risque d'être plus difficile. La possibilité la plus évidente serait de réaliser une analyse génétique à partir de croisements entre ces différents génotypes et un génotype sensible, pour établir le déterminisme génétique du phénotype observé. La difficulté résidera justement dans la distinction pas toujours évidente entre phénotypes sensibles et phénotypes intermédiaires.

Pour l'un des génotypes au phénotype de résistance intermédiaire, les descendants d'un croisement avec un génotype probablement sensible sont déjà disponibles. Une caractérisation phénotypique de ces descendants serait donc réalisable rapidement. Cela permettrait d'évaluer la faisabilité de ce phénotypage.

6. Optimiser l'évaluation de la résistance quantitative

L'évaluation du niveau de résistance quantitative d'un génotype repose sur des essais réalisés au champ, et sur la notation des symptômes au collet en fin de saison culturale, la note G2 (Figure 23). La résistance quantitative, sous le contrôle de plusieurs gènes, impliquent de nombreux QTL. L'efficacité de ces QTL étant souvent dépendante des conditions environnementales, les essais sont généralement répétés sur plusieurs années (Pilet *et al.*, 2001; Fopa Fomeju *et al.*, 2015; Jestin *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016; Raman *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2018). Pour une plante au cycle de culture qui s'étend sur 10 mois comme le colza d'hiver, réaliser plusieurs essais au champ, dans plusieurs localisations s'avère chronophage. Identifier des gènes marqueurs pertinents pourrait permettre d'effectuer une première sélection des génotypes avant de réaliser plusieurs essais au champ.

Dans les chapitres I et II, nous n'avons identifié aucune source de résistance aux 10 effecteurs tardifs testés dans 'Darmor', qui est pourtant un génotype avec un bon niveau de résistance quantitative. Cela peut paraître étonnant, mais plusieurs hypothèses peuvent l'expliquer. Nous avons sélectionné 10 effecteurs tardifs. D'autres effecteurs tardifs candidats permettraient peut-être d'identifier des sources de résistance leur correspondant dans 'Darmor'. De plus, la résistance quantitative de 'Darmor' est peut-être également liée à d'autres types de gènes, d'où l'intérêt de s'intéresser aussi dans le chapitre III aux gènes colocalisant avec des QTL de résistance, mais qui ne soient pas des RGA. Enfin, en termes de diversification des sources de résistance, il est intéressant d'avoir identifié des sources de résistance qui ne soient pas déjà présentes dans 'Darmor' (cf. génotypes semi-hiver du chapitre II). Tenter d'identifier d'autres marqueurs de la résistance quantitative dans le cadre du chapitre III restait donc tout à fait pertinent et intéressant.

Dans le chapitre III de ce manuscrit, nous avons donc tenté de sélectionner des gènes dont le niveau d'expression permettrait de distinguer un génotype sensible d'un génotype avec résistance quantitative. Ainsi, nous avons sélectionné 11 gènes candidats, marqueurs de la résistance quantitative. L'expression de ces 11 gènes diffère entre 'Darmor' (avec résistance quantitative) et 'Bristol' (sensible), dans les collets des plantes prélevées en 2018, mais également dans ceux de 2014. Ils devraient donc être robustes entre années d'expérimentation. De plus, ils sont significativement plus exprimés chez 'Darmor', et ils sont tous localisés dans des QTL de résistance au phoma. Parmi ces 11 gènes marqueurs candidats, cinq sont différenciellement exprimés entre 'Darmor' et 'Bristol', lors de l'infection des tiges en conditions contrôlées. Ces cinq gènes sont donc tout particulièrement intéressants. Ils permettraient d'effectuer une première sélection de génotypes avec des tests en conditions contrôlées, beaucoup plus rapides à mettre en œuvre. Ensuite, leur résistance quantitative pourrait être validée en effectuant des essais au champ.

Avant d'affirmer que ces 11 gènes candidats sont de bons marqueurs de la résistance quantitative, il est impératif de les valider sur un panel de génotypes ayant des niveaux de résistance quantitative variés. Comme nous l'avons vu dans le chapitre III, cette validation était prévue sur 15 génotypes, dont les collets ont déjà été prélevés, et dont la note G2 a été évaluée à la fin de la saison culturale. Au cours de mon projet de thèse, je n'ai pas eu le temps d'aller jusqu'à cette étape de validation des marqueurs. Il serait tout de même très intéressant de réaliser cette validation de l'expression des 11 gènes sur les échantillons des 15 génotypes, afin de tenter de corrélérer leur niveau d'expression avec la note G2.

Jusqu'à présent, les QTL de résistance au phoma ont été détectés à partir de croisements réalisés entre 'Darmor', présentant un bon niveau de résistance quantitative et des cultivars sensibles, comme 'Yudal', 'Bristol' et 'Samourai' (Kumar *et al.*, 2018). Les informations sur la résistance quantitative du colza proviennent donc toutes de ces croisements. Toutefois, le génotype 'Darmor' est un cultivar relativement ancien (inscrit en 1984). Depuis son inscription au catalogue, d'importants efforts de sélection ont été réalisés pour obtenir d'autres génotypes, plus récents et avec un bon niveau de résistance quantitative, même en l'absence de gènes *R/m*. Pouvoir caractériser la résistance quantitative des génotypes avec des marqueurs permettrait de l'évaluer plus facilement sur des génotypes modernes, et pourrait permettre de s'affranchir de 'Darmor', un cultivar plutôt ancien maintenant.

Enfin, cette étude est la première à poser la question des facteurs et déterminants de la résistance quantitative présents chez ces génotypes modernes. Pour cela, elle donne des pistes mentionnées dans le chapitre III, qu'il serait intéressant de réaliser sur un panel plus étendu de génotypes diversifiés : mise au champ, voire essais en conditions contrôlées, mesures d'expression par RT-qPCR ou RNAseq, validation de marqueurs et corrélation entre expression de ces marqueurs et note G2. Bien que ce soit frustrant de ne pas avoir pu valider ces marqueurs dans le cadre de ma thèse, il semble que de nouvelles pistes s'ouvrent pour faciliter l'évaluation de la résistance quantitative des génotypes.

Conclusion

Au début de mon projet de thèse, l'existence d'effecteurs tardifs avait été démontrée, à l'aide d'un premier projet pilote d'analyses transcriptomiques. Un premier phénotype de résistance à un effecteur tardif, artificiellement exprimé au stade précoce avait été identifié chez le cultivar 'Yudal'. En parallèle de mon projet de thèse, les vagues d'expression des gènes de *L. maculans* ont été affinées. Ces vagues d'expression plus fines nous ont guidés dans le choix de six effecteurs tardifs pertinents pour le criblage de ressources variétales.

- Mes travaux de recherche ont permis de valider une interaction gène-pour-gène, entre l'effecteur tardif *LmSTEE98* et le locus *RlmSTEE98*. Cette interaction a lieu lors de l'infection des tiges, contribuant ainsi à la résistance quantitative
- Les phénotypes de résistance aux effecteurs tardifs semblent variables selon la présence du gène ou selon son allèle. De plus, les gènes de résistance étant régulés au cours de l'infection, la cinétique d'expression du gène de résistance a probablement un impact sur le phénotype de résistance
- L'utilisation d'une approche novatrice de criblage, qui a fait ses preuves, m'a permis d'identifier de nouvelles sources de résistance, qui permettront de diversifier le pool de gènes de résistance connus. Etant identifiées dans des génotypes de *B. napus*, ces sources de résistances seront relativement faciles à introgresser dans des variétés d'intérêt. Cette approche permet de cribler facilement de nombreux génotypes, et les souches créées dans ce projet pourront permettre d'aller plus loin dans le criblage de ressources génétiques.

A l'issue de ce projet, de nombreuses hypothèses subsistent, ouvrant la voie à d'autres perspectives de projet : (I) Valider l'efficacité de ses nouvelles sources de résistances, en conditions d'infection naturelle, sera nécessaire avant d'aller plus loin. (II) Cloner et analyser le polymorphisme de *RlmSTEE98* permettrait d'en savoir plus quant à son importance dans la résistance quantitative. (III) Valider la pertinence des gènes candidats marqueurs de la résistance quantitative, permettrait de faciliter l'évaluation de cette dernière.

Annexes

Annexe A : Echantillons du projet de transcriptomique Leptolife / MetaPhoR

Le projet de métatranscriptomique Leptolife /MetaPhoR est un projet qui visait à décrire le cycle complet de *L. maculans*, au cours de l'infection de *B. napus*, par l'étude de 420 échantillons RNAseq.

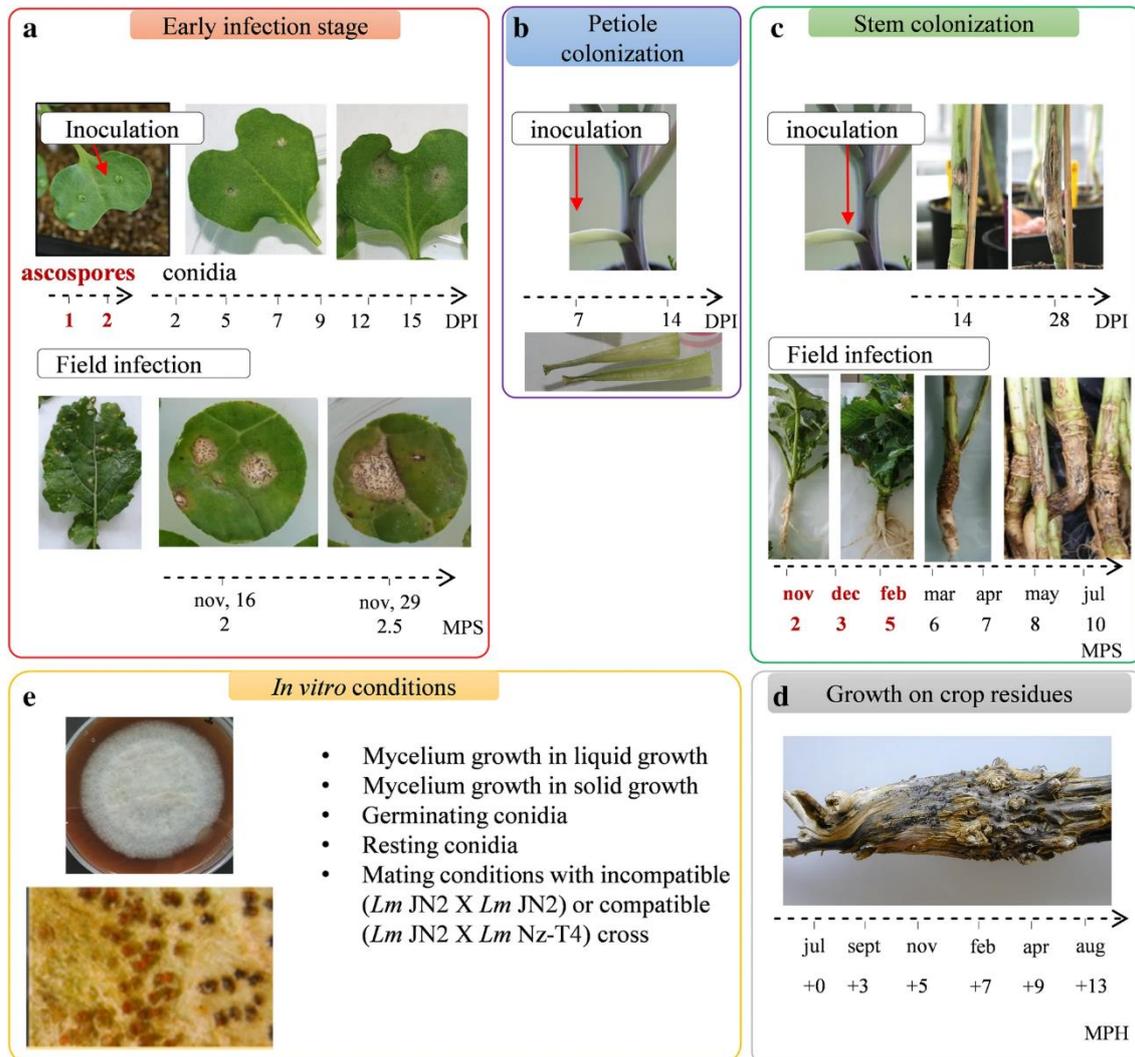


Figure 1 : Conditions et échantillons utilisés pour l'étude RNA-Seq du cycle de vie de *Leptosphaeria maculans*.

Les études temporelles sont représentées par une flèche et les points d'échantillonnage sont indiqués. **a** L'ARN a été extrait de cotylédons infectés par des ascospores 1 ou 2 jours après l'inoculation (DPI). Une autre étude temporelle a été réalisée par inoculation avec des conidies, avec extraction d'ARN à six points de temps, de 2 à 15 DPI. Les jeunes feuilles des champs naturellement infectés ont été échantillonnées 2 ou 2,5 mois après le semis (MPS). **b** La colonisation du pétiole a été réalisée sur des pétioles inoculés en conditions contrôlées, avec extraction de l'ARN à 7 et 14 DPI. **c** Les échantillons de colonisation de la tige ont été obtenus en conditions contrôlées, à 14 et 28 DPI. Des échantillons de base de tige provenant de champs naturellement infectés ont été collectés et utilisés pour l'extraction d'ARN tous les 2 à 3 mois pendant toute une saison culturale. **d** Les résidus de tige restants ont été échantillonnés tous les 2 à 3 mois pendant 1 an après la récolte (dates exprimées en mois après récolte, MPH). **e** Les conditions de croissance *in vitro* sont représentées par 10 ensembles de conditions, basés sur deux milieux différents (liquide ou solide) et correspondant à différents états physiologiques (mycélium, sporulation, conidies en germination et au repos, conditions de croisement *in vitro*) (D'après Gay *et al.*, 2021).



Références

[¹] Symptômes d' *Ustilago maydis* sur maïs, Auteur K. Hirdes. Disponible à l'adresse :

https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Fichier:Ustilago_maydis_de_1.jpg

[²] Symptômes de *B. cinerea* sur raisin, Auteur D. Blancard. Disponible à l'adresse :

<http://ephytia.inra.fr/fr/C/6979/Vigne-Principaux-symptomes>

[³] Données FAO. Disponible à l'adresse :

<http://www.fao.org/faostat/fr/#home>

[⁴] Terres Univia. Disponible à l'adresse :

<http://www.terresunivia.fr/produitsdebouches/non-alimentaire/biodiesel>

[⁵] Echelle BBCH de notation des stades du colza. Syngenta. Disponible à l'adresse :

<https://www.syngenta.fr/agriculture-durable/reglementation/dossier-bbch/article/echelle-bbch-colza>

[⁶] Terres Inovia. Disponible à l'adresse : <https://www.terresinovia.fr/colza>

[⁷] CRISPOR (2018). CRISPOR. [En ligne]. Disponible à l'adresse : <http://crispor.tefor.net/>

Almagro Armenteros JJ, Salvatore M, Emanuelsson O, Winther O, Von Heijne G, Elofsson A, Nielsen H. 2019. Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Science Alliance* **2**: 1-14.

Almeida F, Rodrigues ML, Coelho C. 2019. The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. *Frontiers in Microbiology* **10**: 214.

Amaro TMMM, Thilliez GJA, Motion GB, Huitema E. 2017. A perspective on CRN proteins in the genomics age: evolution, classification, delivery and function revisited. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1-12.

Andrивon D, Pilet F, Montarry J, Hafidi M, Corbière R, Achbani EH, Pellé R, Ellissèche D. 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* **97**: 338-343.

Ansan-Melayah D, Balesdent MH, Delourme R, Pilet ML, Tanguy X, Renard M, Rouxel T. 1998. Genes for race-specific resistance against blackleg disease in *Brassica napus* L. *Plant Breeding* **117**: 373-378.

Arnold AE. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* **21**: 51-66.

Aubertot JN, Sohbi Y, Brun H, Penaud A, Nutter Jr. FW. 2004. Phomadidacte: a computer-aided training program for the severity assessment of phoma stem canker of oilseed rape. *Integrated Control in Oilseed Crops* **29**: 247-254.

Badet T, Voisin D, Mbengue M, Barascud M, Sucher J, Sadon P, Balagué C, Roby D, Raffaele S. 2017. Parallel evolution of the POQR prolyl oligo peptidase gene conferring plant quantitative disease resistance. *PLoS Genetics* **13**: e1007143.

- Bagnaresi P, Biselli C, Orrù L, Urso S, Crispino L, Abbruscato P, Piffanelli P, Lupotto E, Cattivelli L, Valè G. 2012.** Comparative transcriptome profiling of the early response to *Magnaporthe oryzae* in durable resistant vs susceptible rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *PLoS ONE* **7**: 1-26.
- 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 ML, Rouxel T. 2002.** New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **92**: 1122-1133.
- Balesdent M-H, Coudard L, Pourcelor M, Leflon M, Delourme R, Faure S, Rouxel T. 2019.** Populations de phoma du colza : état des lieux des résistances. *Phytoma* **724**: 30-34.
- Balesdent M-H, Fudal I, Ollivier B, Bally P, Grandaubert J, Eber F, Chèvre A-M, Leflon M, Rouxel T. 2013.** The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytologist* **198**: 887-898.
- Balesdent M-H, Plissonneau C, Coudard L, Daverdin G, Le Meur L, Carpezat J, Leflon M, Pinochet X, Ermel M, Brun H, et al. 2015.** Résistance du colza au phoma : où en est l'efficacité de Rlm7 ? *Phytoma* **684**: 20-24.
- Barbacci A, Raffaele S. 2021.** La résistance quantitative aux maladies chez les plantes. In: Lannou C, Roby D, Hannachi M, Moury B, éd. L'immunité des plantes. Pour des cultures résistantes aux maladies. Versailles, 51-63.
- Beare-Rogers JL, Nera EA, Heggveit HA. 1974.** Myocardial alteration in rats fed rapeseed oils containing high or low levels of erucic acid. *Annals of Nutrition and Metabolism* **17**.
- Bel Hadj Chedli R, Ben M'Barek S, Souissi A, Yahyaoui A, Rezgui S, Chaabane H. 2020.** Screening for resistance of Tunisian, Moroccan and Algerian wheat cultivars to *Zymoseptoria tritici* in Northern Tunisia. *Journal of Plant Pathology* **102**: 1085-1095.
- Bell JM. 1982.** From rapeseed to canola: a brief history of research for superior meal and edible oil. *Poultry Science* **61**: 613-622.
- Blackwell M. 2011.** The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* **98**: 426-438.
- Böhm H, Albert I, Oome S, Raaymakers TM, Van den Ackerveken G, Nürnberger T. 2014.** A conserved peptide pattern from a widespread microbial virulence factor triggers Pattern-Induced Immunity in *Arabidopsis*. *PLoS Pathogens* **10**.
- Bonneuil C, Thomas F. 2012.** *Semences, une histoire politique: amélioration des plantes, agriculture et alimentation en France depuis la Seconde Guerre mondiale.*
- Brasier CM, Webber JF. 2019.** Is there evidence for post-epidemic attenuation in the Dutch elm disease pathogen *Ophiostoma novo-ulmi*? *Plant Pathology* **68**: 921-929.

- Brilli F, Luchi N, Michelozzi M, Calamai L, Cencetti G, Pecori F, Nigrone E, Santini A. 2020.** Volatile organic compounds (VOC) as biomarkers for detection of *Ceratocystis platani*. *Forest Pathology* **50**: e12618.
- Brun H, Chèvre AM, Fitt BD, Powers S, Besnard AL, Ermel M, Huteau V, Marquer B, Eber F, Renard M, et al. 2010.** Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* **185**: 285-299.
- Brundrett MC, Tedersoo L. 2018.** Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* **220**: 1108-1115.
- Van Den Burg HA, Harrison SJ, Joosten MHAJ, Vervoort J, De Wit PJGM. 2006.** *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 1420-1430.
- Buscot F. 2015.** Implication of evolution and diversity in arbuscular and ectomycorrhizal symbioses. *Journal of Plant Physiology* **172**: 55-61.
- Caffier V, Le Cam B, Al Rifai M, Bellanger MN, Comby M, Denancé C, Didelot F, Expert P, Kerdraon T, Lemarquand A, et al. 2016.** Slow erosion of a quantitative apple resistance to *Venturia inaequalis* based on an isolate-specific Quantitative Trait Locus. *Infection, Genetics and Evolution* **44**: 541-548.
- Caffier V, Lasserre-Zuber P, Giraud M, Lascostes M, Stievenard R, Lemarquand A, van de Weg E, Expert P, Denancé C, Didelot F, et al. 2014.** Erosion of quantitative host resistance in the apple × *Venturia inaequalis* pathosystem. *Infection, Genetics and Evolution* **27**: 481-489.
- Cai R, Lewis J, Yan S, Liu H, Clarke CR, Campanile F, Almeida NF, Studholme DJ, Lindeberg M, Schneider D, et al. 2011.** The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity. *PLoS Pathogens* **7**: e1002130.
- Cambareri EB, Jensen BC, Schabtach E, Selker EU. 1989.** Repeat-induced G–C to A–T mutations in *Neurospora*. *Science* **244**: 1571-1575.
- Cantila AY, Saad NSM, Amas JC, Edwards D, Batley J. 2021.** Recent findings unravel genes and genetic factors underlying *Leptosphaeria maculans* resistance in *Brassica napus* and its relatives. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 1-25.
- Cantu D, Segovia V, MacLean D, Bayles R, Chen X, Kamoun S, Dubcovsky J, Saunders DGO, Uauy C. 2013.** Genome analyses of the wheat yellow (stripe) rust pathogen *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* reveal polymorphic and haustorial expressed secreted proteins as candidate effectors. *BMC Genomics* **14**: 18.
- Cao J, Yang C, Li L, Jiang L, Wu Y, Wu C, Bu Q, Xia G, Liu X, Luo Y, et al. 2016.** Rice plasma membrane proteomics reveals *Magnaporthe oryzae* promotes susceptibility by sequential activation of host hormone signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **29**: 902-913.
- Carleson NC, Daniels HA, Reeser PW, Kanaskie A, Navarro SM, LeBoldus JM, Grünwald NJ. 2015.**

Novel introductions and epidemic dynamics of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum* in Oregon forests. *Phytopathology*. 1-66.

- Cen YK, Lin JG, Wang YL, Wang JY, Liu ZQ, Zheng YG. 2020.** The gibberellin producer *Fusarium fujikuroi*: methods and technologies in the current toolkit. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8**: 1-17.
- Chalhoub B, Denoed 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.
- Chevre AM, Eber F, Barret P, Tanguy X, Brun H, Delseny M, Renard M. 1996.** Characterization of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *B. napus*-*B. nigra* addition lines. *Plant Breeding* **115**: 113-118.
- Clairet C. 2019.** Contrôle chromatinien et transcriptionnel de l'expression des gènes codant des effecteurs chez *Leptosphaeria maculans*, champignon pathogène du colza.
- Clarke CR, Chinchilla D, Hind SR, Taguchi F, Miki R, Ichinose Y, Martin GB, Leman S, Felix G, Vinatzer BA. 2013.** Allelic variation in two distinct *Pseudomonas syringae* flagellin epitopes modulates the strength of plant immune responses but not bacterial motility. *New Phytologist* **200**: 847-860.
- Coleman JJ, Rounsley SD, Rodriguez-Carres M, Kuo A, Wasmann CC, Grimwood J, Schmutz J, Taga M, White GJ, Zhou S, et al. 2009.** The genome of *Nectria haematococca*: contribution of supernumerary chromosomes to gene expansion. *PLoS Genetics* **5**: e1000618.
- Collado IG, Viaud M. 2015.** Secondary metabolism in *Botrytis cinerea*: combining genomic and metabolomic approaches. In: Fillinger S, Elad Y, éd. *Botrytis - The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. 1-486.
- Collemare J, O'Connell R, Lebrun MH. 2019.** Nonproteinaceous effectors: the *terra incognita* of plant-fungal interactions. *New Phytologist* **223**: 590-596.
- Cook DE, Mesarich CH, Thomma BPHJ. 2015.** Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annual Review of Phytopathology* **53**: 541-563.
- Cosme M, Fernández I, Van der Heijden MGA, Pieterse CMJ. 2018.** Non-mycorrhizal plants: the exceptions that prove the rule. *Trends in Plant Science* **23**: 577-587.
- Cowger C, Brown JKM. 2019.** Durability of quantitative resistance in crops: greater than we know? *Annual Review of Phytopathology* **57**: 253-277.
- Cowger C, Mundt CC. 2002.** Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology* **92**: 624-630.

- Croll D, McDonald BA. 2012.** The accessory genome as a cradle for adaptive evolution in pathogens. *PLoS Pathogens* **8**: 8-10.
- Croll D, Zala M, McDonald BA. 2013.** Breakage-fusion-bridge cycles and large insertions contribute to the rapid evolution of accessory chromosomes in a fungal pathogen. *PLoS Genetics* **9**: e1003567.
- Dalmais B, Schumacher J, Moraga J, Le Pêcheur P, Tudzynski B, Collado IG, Viaud M. 2011.** The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Molecular Plant Pathology* **12**: 564-579.
- Darma R, Lutz A, Elliott CE, Idnurm A. 2019.** Identification of a gene cluster for the synthesis of the plant hormone abscisic acid in the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genetics and Biology* **130**: 62-71.
- Daverdin G, Rouxel T, Gout L, Aubertot JN, Fudal I, Meyer M, Parlange F, Carpezat J, Balesdent MH. 2012.** Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen. *PLoS Pathogens* **8**: e1003020.
- Delourme R, Chèvre AM, Brun H, Rouxel T, Balesdent MH, Dias JS, Salisbury P, Renard M, Rimmer SR. 2006.** Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 41-52.
- Delourme R, Pilet-Nayel ML, Archipiano M, Horvais R, Tanguy X, Rouxel T, Brun H, Renard M, Balesdent MH. 2004.** A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Phytopathology* **94**: 578-583.
- Dilmaghani A, Gout L, Moreno-Rico O, Dias JS, Coudard L, Castillo-Torres N, Balesdent MH, Rouxel T. 2013.** Clonal populations of *Leptosphaeria maculans* contaminating cabbage in Mexico. *Plant Pathology* **62**: 520-532.
- Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V, Kahnt J, Osorio S, Tohge T, Fernie AR, Feussner I, et al. 2011.** Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**: 395-398.
- Dobon A, Bunting DCE, Cabrera-Quio LE, Uauy C, Saunders DGO. 2016.** The host-pathogen interaction between wheat and yellow rust induces temporally coordinated waves of gene expression. *BMC Genomics* **17**: 1-14.
- Dodds PN, Rathjen JP. 2010.** Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Review Genetics* **11**: 539-548.
- Dolatabadian A, Bayer PE, Tirnaz S, Hurgobin B, Edwards D, Batley J. 2020.** Characterization of disease resistance genes in the *Brassica napus* pangenome reveals significant structural variation. *Plant Biotechnology Journal* **18**: 969-982.
- Doré J, Kohler A, Dubost A, Hundley H, Singan V, Peng Y, Kuo A, Grigoriev I V., Martin F, Marmeisse R, et al. 2017.** The ectomycorrhizal basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* undergoes early waves of transcriptional reprogramming prior to symbiotic structures differentiation. *Environmental Microbiology* **19**: 1338-1354.

- Dutheil JY, Mannhaupt G, Schweizer G, Sieber CMK, Münsterkötter M, Güldener U, Schirawski J, Kahmann R. 2016.** A tale of genome compartmentalization: the evolution of virulence clusters in smut fungi. *Genome Biology and Evolution* **8**: 681-704.
- Dutot M, Nelson LM, Tyson RC. 2013.** Predicting the spread of postharvest disease in stored fruit, with application to apples. *Postharvest Biology and Technology* **85**: 45-56.
- Dutreux F, Da Silva C, Agata L, Couloux A, Gay EJ, 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. *Scientific data* **5**: 1-11.
- Egerton-Warburton LM, Querejeta JI, Allen MF, Finkelman SL. 2005.** Mycorrhizal fungi. In: Hillel D, éd. *Encyclopedia of Soils in the Environment*. 533-542.
- Elliott CE, Callahan DL, Schwenk D, Nett M, Hoffmeister D, Howlett BJ. 2013.** A gene cluster responsible for biosynthesis of phomonoic acid in the plant pathogenic fungus, *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genetics and Biology* **53**: 50-58.
- Elliott CE, Fox EM, Jarvis RS, Howlett BJ. 2011.** The cross-pathway control system regulates production of the secondary metabolite toxin, sirodesmin PL, in the ascomycete, *Leptosphaeria maculans*. *BMC Microbiology* **11**: 169.
- Elliott CE, Gardiner DM, Thomas G, Cozijnsen A, Van De Wouw A, Howlett BJ. 2007.** Production of the toxin sirodesmin PL by *Leptosphaeria maculans* during infection of *Brassica napus*. *Molecular Plant Pathology* **8**: 791-802.
- Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ. 2013.** Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**: 1-18.
- Fitt BDL, Brun H, Barbetti MJ, Rimmer SR. 2006.** World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 3-15.
- Fitt BDL, Hu BC, Li ZQ, Liu SY, Lange RM, Kharbanda PD, Butterworth MH, White RP. 2008.** Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China; costs and benefits. *Plant Pathology* **57**: 652-664.
- Flor HH. 1971.** Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275-296.
- Fopa Fomeju B, Falentin C, Lassalle G, Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R. 2015.** Comparative genomic analysis of duplicated homoeologous regions involved in the resistance of *Brassica napus* to stem canker. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1-14.
- Fournet S, Kerlan MC, Renault L, Dantec JP, Rouaux C, Montarry J. 2013.** Selection of nematodes by resistant plants has implications for local adaptation and cross-virulence. *Plant Pathology* **62**: 184-193.
- Fox EM, Gardiner DM, Keller NP, Howlett BJ. 2008.** A Zn(II)2Cys6 DNA binding protein regulates the

sirodesmin PL biosynthetic gene cluster in *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 671-682.

Franceschetti M, Maqbool A, Jiménez-Dalmaroni MJ, Pennington HG, Kamoun S, Banfield MJ. 2017. Effectors of filamentous plant pathogens: commonalities amid diversity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **81**: 1-17.

Frantzeskakis L, Kusch S, Panstruga R. 2019. The need for speed: compartmentalized genome evolution in filamentous phytopathogens. *Molecular Plant Pathology* **20**: 3-7.

Fu D, Uauy C, Distelfeld A, Blechl A, Epstein L, Chen X, Sela H, Fahima T, Dubcovsky J. 2009. A novel kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. *Science* **323**: 1357-1360.

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

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

Fukuoka S, Saka N, Koga H, Ono K, Shimizu T, Ebana K, Hayashi N, Takahashi A, Hirochika H, Okuno K, et al. 2009. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* **325**: 998-1001.

Gardiner DM, Cozijnsen AJ, Wilson LM, Pedras MSC, Howlett BJ. 2004. The sirodesmin biosynthetic gene cluster of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Microbiology* **53**: 1307-1318.

Gay EJ, Soyer JL, Lapalu N, Linglin J, Fudal I, Da Silva C, Wincker P, Aury J-M, Cruaud C, Levrel A, et al. 2021. Large-scale transcriptomics to dissect 2 years of the life of a fungal phytopathogen interacting with its host plant. *BMC Biology* **19**: 55.

Gervais J. 2017. Identification et analyse fonctionnelle des effecteurs tardifs impliqués dans la colonisation systémique du colza par *Leptosphaeria maculans*.

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.

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

Ghanbarnia K, Ma L, Larkan NJ, Haddadi P, Fernando WGD, Borhan MH. 2018. *Leptosphaeria maculans* AvrLm9: a new player in the game of hide and seek with AvrLm4-7. *Molecular Plant*

Pathology **19**: 1754-1764.

- Gijzen M, Nürnberger T. 2006.** Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* **67**: 1800-1807.
- Gladyshev E, Kleckner N. 2014.** Direct recognition of homology between double helices of DNA in *Neurospora crassa*. *Nature Communications* **5**: 1-11.
- González AM, Marcel TC, Niks RE. 2012.** Evidence for a minor gene-for-minor gene interaction explaining nonhypersensitive polygenic partial disease resistance. *Phytopathology* **102**: 1086-1093.
- Goss EM, Tabima JF, Cooke DEL, Restrepo S, Frye WE, Forbes GA, Fieland VJ, Cardenas M, Grünwald NJ. 2014.** The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 8791-8796.
- Gout L, Fudal I, Kuhn ML, Blaise F, Eckert M, Cattolico L, Balesdent MH, Rouxel T. 2006.** Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Microbiology* **60**: 67-80.
- Grandaubert J, Lowe RGT, Soyer JL, Schoch CL, Van De Wouw AP, Fudal I, Robbertse B, Lapalu N, Links MG, Ollivier B, et al. 2014.** Transposable element-assisted evolution and adaptation to host plant within the *Leptosphaeria maculans*-*Leptosphaeria biglobosa* species complex of fungal pathogens. *BMC Genomics* **15**.
- Hammond KE, Lewis BG, Musa TM. 1985.** A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **34**: 557-565.
- Handa Y, Nishide H, Takeda N, Suzuki Y, Kawaguchi M, Saito K. 2015.** RNA-seq transcriptional profiling of an arbuscular mycorrhiza provides insights into regulated and coordinated gene expression in *Lotus japonicus* and *Rhizophagus irregularis*. *Plant and Cell Physiology* **56**: 1490-1511.
- Haridas S, Albert R, Binder M, Bloem J, LaButti K, Salamov A, Andreopoulos B, Baker SE, Barry K, Bills G, et al. 2020.** 101 *Dothideomycetes* genomes: a test case for predicting lifestyles and emergence of pathogens. *Studies in Mycology* **96**: 141-153.
- Haueisen J, Möller M, Eschenbrenner CJ, Grandaubert J, Seybold H, Adamiak H, Stukenbrock EH. 2019.** Highly flexible infection programs in a specialized wheat pathogen. *Ecology and Evolution* **9**: 275-294.
- Hawksworth DL, Lücking R. 2017.** Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum* **5**: 79-95.
- Hebinger H. 2013.** *Le colza*. Paris.

- Hemetsberger C, Herrberger C, Zechmann B, Hillmer M, Doehlemann G. 2012.** The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathogens* **8**: e1002684.
- Hirrel MC, Mehravaran H, Gerdemann JW. 1978.** Vesicular–arbuscular mycorrhizae in the *Chenopodiaceae* and *Cruciferae*: do they occur? *Canadian Journal of Botany* **56**: 2813-2817.
- Hou Y, Zhai Y, Feng L, Karimi HZ, Rutter BD, Zeng L, Choi DS, Zhang B, Gu W, Chen X, et al. 2019.** A *Phytophthora* effector suppresses trans-kingdom RNAi to promote disease susceptibility. *Cell Host and Microbe* **25**: 153-165.e5.
- Houtsmuller UMT, Struijk CB, Van Der Beek A. 1970.** Decrease in rate of ATP synthesis of isolated rat heart mitochondria induced by dietary erucic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* **218**: 564-566.
- Huang YJ, Jestin C, Welham SJ, King GJ, Manzanares-Dauleux MJ, Fitt BDL, Delourme R. 2016.** Identification of environmentally stable QTL for resistance against *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Theoretical and Applied Genetics* **129**: 169-180.
- Huang YJ, Paillard S, Kumar V, King GJ, Fitt BDL. 2019.** Oilseed rape (*Brassica napus*) resistance to growth of *Leptosphaeria maculans* in leaves of young plants contributes to quantitative resistance in stems of adult plants. *PLoS One* **14**: 20.
- Huang YJ, Pirie EJ, Evans N, Delourme R, King GJ, Fitt BDL. 2009.** Quantitative resistance to symptomless growth of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape). *Plant Pathology* **58**: 314-323.
- Huang YJ, Qi A, King GJ, Fitt BDL. 2014.** Assessing quantitative resistance against *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) in young plants. *PLoS ONE* **9**: eB4924.
- Hubbard M, Zhai C, Peng G. 2020.** Exploring mechanisms of quantitative resistance to *Leptosphaeria maculans* (blackleg) in the cotyledons of canola (*Brassica napus*) based on transcriptomic and microscopic analyses. *Plants* **9**: 1-23.
- Hurni S, Scheuermann D, Krattinger SG, Kessel B, Wicker T, Herren G, Fitze MN, Breen J, Presterl T, Ouzunova M, et al. 2015.** The maize disease resistance gene *Htn1* against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 8780-8785.
- Idnurm A, Howlett BJ. 2003.** Analysis of loss of pathogenicity mutants reveals that repeat-induced point mutations can occur in the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Genetics and Biology* **39**: 31-37.
- Idnurm A, Urquhart AS, Vummadi DR, Chang S, Van de Wouw AP, López-Ruiz FJ. 2017.** Spontaneous and CRISPR/Cas9-induced mutation of the osmosensor histidine kinase of the canola pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Fungal Biology and Biotechnology* **4**: 12.

- Jacotot B, Girardet M, Mendy F, Piganeau P, Beaumont JL. 1978.** *Effect on rat blood and aorta lipids of three edible oils (Arachid, Sunflower and Primor) with low saturated fatty acid content.*
- Jashni MK, Dols IHM, Iida Y, Boeren S, Beenen HG, Mehrabi R, Collemare J, De Wit PJGM. 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**: 996-1008.
- Jestin C, Bardol N, Lodé M, Duffé P, Domin C, Vallée P, Mangin B, Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R. 2015.** Connected populations for detecting quantitative resistance factors to phoma stem canker in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Molecular Breeding* **35**: 1-16.
- Jestin C, Lodé M, Vallée P, Domin C, Falentin C, Horvais R, Coedel S, Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R. 2011.** Association mapping of quantitative resistance for *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Molecular Breeding* **27**: 271-287.
- Jestin C, Vallée P, Domin C, Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R. 2012.** Assessment of a new strategy for selective phenotyping applied to complex traits in *Brassica napus*. *Open Journal of Genetics* **2**: 190-201.
- Jia Y, Zhou E, Lee S, Bianco T. 2016.** Coevolutionary dynamics of rice blast resistance gene *Pi-ta* and *Magnaporthe oryzae* avirulence gene AVR-*Pita* 1. *Phytopathology* **106**: 676-683.
- Jiquel A, Gervais J, Geistodt-Kiener A, Delourme R, Gay EJ, Ollivier B, Fudal I, Faure S, Balesdent MH, Rouxel T. 2021.** A gene-for-gene interaction involving a 'late' effector contributes to quantitative resistance to the stem canker disease in *Brassica napus*. *New Phytologist*. nph.17292.
- Jones JDG, Dangl JL. 2006.** The plant immune system. *Nature* **444**.
- De Jonge R, Van Esse HP, Kombrink A, Shinya T, Desaki Y, Bours R, Van Der Krol S, Shibuya N, Joosten MHAJ, Thomma BPHJ. 2010.** Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* **329**: 953-955.
- De Jonge R, Thomma BPHJ. 2009.** Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends in Microbiology* **17**: 151-157.
- Jupe J, Stam R, Howden AJM, Morris JA, Zhang R, Hedley PE, Huitema E. 2013.** *Phytophthora capsici*-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemibiotrophic lifestyle. *Genome Biology* **14**: R63.
- Keeling PJ, Burki F. 2019.** Progress towards the tree of Eukaryotes. *Current Biology* **29**: R808-R817.
- Kleemann J, Rincon-Rivera LJ, Takahara H, Neumann U, van Themaat EVL, van der Does HC, 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 Pathogens* **8**: e1002643.

- Kloppholz S, Kuhn H, Requena N. 2011.** A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Current Biology* **21**: 1204-1209.
- Kombrink A, Thomma BPHJ. 2013.** LysM effectors: secreted proteins supporting fungal life. *PLoS Pathogens* **9**: 1-4.
- Kommedahl T, Christensen JJ, Frederiksen RA. 1970.** A half century of research in Minnesota on Flax Wilt caused by *Fusarium oxysporum*. *Agricultural experiment station of University of Minnesota Technical*.
- Krattinger SG, Kang J, Bräunlich S, Boni R, Chauhan H, Selter LL, Robinson MD, Schmid MW, Wiederhold E, Hensel G, et al. 2019.** Abscisic acid is a substrate of the ABC transporter encoded by the durable wheat disease resistance gene *Lr34*. *New Phytologist* **223**: 853-866.
- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B. 2009.** A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* **323**: 1360-1363.
- Krattinger SG, Sucher J, Selter LL, Chauhan H, Zhou B, Tang M, Upadhyaya NM, Mieulet D, Guiderdoni E, Weidenbach D, et al. 2016.** The wheat durable, multipathogen resistance gene *Lr34* confers partial blast resistance in rice. *Plant Biotechnology Journal* **34**: 1261-1268.
- Kulkarni RD, Kelkar HS, Daen RA. 2003.** An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **28**: 118-121.
- Kumar V, Paillard S, Fopa-Fomeju B, Falentin C, Deniot G, Baron C, Vallée P, Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R. 2018.** Multi-year linkage and association mapping confirm the high number of genomic regions involved in oilseed rape quantitative resistance to blackleg. *Theoretical and Applied Genetics* **131**: 1627-1643.
- Lahrmann U, Ding Y, Banhara A, Rath M, Hajirezaei MR, Döhlemann S, Von Wirén N, Parniske M, Zuccaro A. 2013.** Host-related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 13965-13970.
- Lahrmann U, Zuccaro A. 2012.** *Opprimo ergo sum* - evasion and suppression in the root endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 727-737.
- Lanver D, Müller AN, Happel P, Schweizer G, Haas FB, Franitza M, Pellegrin C, Reissmann S, Altmüller J, Rensing SA, et al. 2018.** The biotrophic development of *Ustilago maydis* studied by RNA-seq analysis. *Plant Cell* **30**: 300-323.
- Larkan NJ, Lydiate DJ, Parkin IAP, Nelson MN, Epp DJ, Cowling WA, Rimmer SR, Borhan MH. 2013.** The *Brassica napus* blackleg resistance gene *LepR3* encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector AVRML1. *New Phytologist* **197**: 595-605.
- Larkan NJ, Ma L, Borhan MH. 2015.** The *Brassica napus* receptor-like protein RLM2 is encoded by a second allele of the *LepR3/Rlm2* blackleg resistance locus. *Plant Biotechnology Journal* **13**: 983-992.

- Larkan NJ, Ma L, Haddadi P, Buchwaldt M, Parkin IAP, Djavaheeri M, Borhan MH. 2020. The *Brassica napus* wall-associated kinase-like (WAKL) gene *Rlm9* provides race-specific blackleg resistance. *Plant Journal* **104**: 892-900.
- Ledesma-Ramírez L, Solís-Moya E, Iturriaga G, Sehgal D, Reyes-Valdes MH, Montero-Tavera V, Sansaloni CP, Burgueño J, Ortiz C, Aguirre-Mancilla CL, *et al.* 2019. GWAS to identify genetic loci for resistance to yellow rust in wheat pre-breeding lines derived from diverse exotic crosses. *Frontiers in Plant Science* **10**: 1-14.
- Lewis DH. 1973. Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biological Reviews* **48**: 261-278.
- Li H, Barbetti MJ, Sivasithamparam K. 2005. Hazard from reliance on cruciferous hosts as sources of major gene-based resistance for managing blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease. *Field Crops Research* **91**: 185-198.
- Liu Z, Latunde-Dada AO, Hall AM, Fitt BDL. 2014a. Phoma stem canker disease on oilseed rape (*Brassica napus*) in China is caused by *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae'. *European Journal of Plant Pathology* **140**: 841-857.
- Liu T, Song T, Zhang X, Yuan H, Su L, Li W, Xu J, Liu S, Chen L, Chen T, *et al.* 2014b. Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nature Communications* **5**: 4686.
- Lorrain C, Marchal C, Hacquard S, Delaruelle C, Pétrowski J, Petre B, Hecker A, Frey P, 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **31**: 695-706.
- Luginbuehl LH, Oldroyd GED. 2017. Understanding the arbuscule at the heart of endomycorrhizal symbioses in plants. *Current Biology* **27**: R952-R963.
- Ma L, Djavaheeri M, Wang H, Larkan NJ, Haddadi P, Beynon E, Gropp G, Borhan HM. 2018. *Leptosphaeria maculans* effector protein AvrLm1 modulates plant immunity by enhancing MAP Kinase 9 phosphorylation. *iScience* **3**: 177-191.
- Ma LJ, Van Der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi MJ, Di Pietro A, Dufresne M, Freitag M, Grabherr M, Henrissat B, *et al.* 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **464**: 367-373.
- Ma L, Lukasik E, Gawehns F, Takken FLW. 2012. The use of agroinfiltration for transient expression of plant resistance and fungal effectors proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Methods in Molecular Biology* **835**: 61-74.
- Manning VA, Ciuffetti LM. 2005. Localization of Ptr ToxA produced by *Pyrenophora tritici-repentis* reveals protein import into wheat mesophyll cells. *Plant Cell* **17**: 3203-3212.
- Manning VA, Hardison LK, Ciuffetti LM. 2007. Ptr ToxA interacts with a chloroplast-localized protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 168-177.

- Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EGJ, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, et al. 2008.** The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* **452**: 88-92.
- Martin K, Kopperud K, Chakrabarty R, Banerjee R, Brooks R, Goodin MM. 2009.** Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. *The Plant Journal* **59**: 150-162.
- Martin FM, Uroz S, Barker DG. 2017.** Ancestral alliances: plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. *Science* **356**: 819.
- Masachis S, Segorbe D, Turrà D, Leon-Ruiz M, Fürst U, El Ghalid M, Leonard G, López-Berges MS, Richards TA, Felix G, et al. 2016.** A fungal pathogen secretes plant alkalinizing peptides to increase infection. *Nature Microbiology* **1**: 1-8.
- Mawson R, Heaney RK, Zdunczyk Z, Kozłowska H. 1993.** Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects. Part 2. Flavour and palatability. *Food / Nahrung* **37**: 336-344.
- Mawson R, Heaney RK, Zdunczyk Z, Kozłowska H. 1994.** Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects Part 4. Goitrogenicity and internal organs abnormalities in animals. *Food / Nahrung* **38**: 178-191.
- McDonald BA, Linde C. 2002.** Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349-379.
- McDonald MC, Taranto AP, Hill E, Schwessinger B, Liu Z, Simpfendorfer S, Milgate A, Solomon PS. 2019.** Transposon-mediated horizontal transfer of the host-specific virulence protein ToxA between three fungal wheat pathogens. *mBio* **10**: e01515-19.
- Mendes-Pereira E, Balesdent MH, Brun H, Rouxel T. 2003.** Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*-*L. biglobosa* species complex. *Mycological Research* **107**: 1287-1304.
- Mentlak TA, Kombrink A, Shinya T, Ryder LS, Otomo I, Saitoh H, Terauchi R, Nishizawa Y, Shibuya N, Thomma BPHJ, et al. 2012.** Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell* **24**: 322-335.
- Menzies JG, Turkington TK. 2015.** An overview of the ergot (*Claviceps purpurea*) issue in western Canada: challenges and solutions. *Canadian Journal of Plant Pathology* **37**: 40-51.
- Michelmore RW, Christopoulou M, Caldwell KS. 2013.** Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future. *Annual Review of Phytopathology* **51**: 291-319.
- Möller S, Croning MDR, Apweiler R. 2001.** Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* **17**: 646-653.
- Möller M, Stukenbrock EH. 2017.** Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens. *Nature Reviews Microbiology* **15**: 756-771.

- Moore JW, Herrera-Foessel S, Lan C, Schnippenkoetter W, Ayliffe M, Huerta-Espino J, Lillemo M, Viccars L, Milne R, Periyannan S, et al. 2015.** A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. *Nature Genetics* **47**: 1494-1498.
- Mueller AN, Ziemann S, Treitschke S, Aßmann D, Doehlemann G. 2013.** Compatibility in the *Ustilago maydis*-Maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS Pathogens* **9**: e1003177.
- Mueth NA, Ramachandran SR, Hulbert SH. 2015.** Small RNAs from the wheat stripe rust fungus (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*). *BMC Genomics* **16**: 718.
- Mukherjee M, Mukherjee PK, Horwitz BA, Zachow C, Berg G, Zeilinger S. 2012.** *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. *Indian Journal of Microbiology* **52**: 522-529.
- Nakkeeran S, Renukadevi P, Aiyathan KEA. 2016.** Exploring the potential of *Trichoderma* for the management of seed and soil-borne diseases of crops. In: Muniappan R, Heinrichs EA, éd. *Integrated Pest Management of Tropical Vegetable Crops*. Dordrecht, 77-130.
- Naranjo-Ortiz MA, Gabaldón T. 2019.** Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews* **94**: 2101-2137.
- Nasser L, Weissman Z, Pinsky M, Amartely H, Dvir H, Kornitzer D. 2016.** Structural basis of haem-iron acquisition by fungal pathogens. *Nature Microbiology* **1**: 1-10.
- Neik TX, Ghanbarnia K, Ollivier B, Scheben A, Severn-Ellis A, Larkan NJ, Haddadi P, Fernando WGD, 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. 1-35.
- Nielsen H. 2017.** Predicting secretory proteins with SignalP. *Methods in Molecular Biology* **1611**: 59-73.
- Niks RE, Qi X, Marcel TC. 2015.** Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: concepts, misconceptions, and mechanisms. *Annual Review of Phytopathology* **53**: 445-470.
- Nilsson C. 2010.** Impact of soil tillage on parasitoids of oilseed rape pests. In: Williams I, éd. *Biocontrol-Based Integrated Management of Oilseed Rape Pests*. Dordrecht: Springer Netherlands, 305-311.
- Nováková M, Šašek V, Trdá L, Krutinová H, Mongin T, Valentová O, Balesdent M-H, Rouxel T, Burketová L. 2016.** *Leptosphaeria maculans* effector AvrLm4-7 affects salicylic acid (SA) and ethylene (ET) signalling and hydrogen peroxide (H₂O₂) accumulation in *Brassica napus*. *Molecular Plant Pathology* **17**: 818-831.
- O'Connell RJ, Thon MR, Hacquard S, Amyotte SG, Kleemann J, Torres MF, Damm U, Buiate EA, Epstein L, Alkan N, et al. 2012.** Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics* **44**: 1060-1065.

- Oh CS, Martin GB. 2011.** Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. *Trends in Plant Science* **16**: 132-140.
- Oldroyd GED. 2013.** Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 252-263.
- Oliver RP, Ipcho SVS. 2004.** Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology* **5**: 347-352.
- Oome S, Van Den Ackerveken G. 2014.** Comparative and functional analysis of the widely occurring family of Nep1-like proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 1081-1094.
- Orbach MJ, Farrall L, Sweigard JA, Chumley FG, Valent B. 2000.** A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* **12**: 2019-2032.
- Palloix A, Ayme V, Moury B. 2009.** Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist* **183**: 190-199.
- Palma-Guerrero J, Torriani SFF, Zala M, Carter D, Courbot M, Rudd JJ, McDonald BA, Croll D. 2016.** Comparative transcriptomic analyses of *Zymoseptoria tritici* strains show complex lifestyle transitions and intraspecific variability in transcription profiles. *Molecular plant pathology* **17**: 845-859.
- Park CH, Chen S, Shirsekar G, Zhou B, Khang CH, Songkumarn P, Afzal AJ, Ning Y, Wang R, Bellizzi M, et al. 2012.** The *Magnaporthe oryzae* effector AvrPiz-t targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. *Plant Cell* **24**: 4748-4762.
- Parlange F, Daverdin G, Fudal I, Kuhn ML, Balesdent MH, Blaise F, Grezes-Besset B, Rouxel T. 2009.** *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *AvrLm4-7* confers a dual recognition specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* resistance genes of oilseed rape, and circumvents Rlm4-mediated recognition through a single amino acid change. *Molecular Microbiology* **71**: 851-863.
- Parlevliet JE, Zadoks JC. 1977.** The integrated concept of disease resistance: a new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica* **26**: 5-21.
- Pedras MSC, Abrams SR, Séguin-Swartz G, Quail JW, Jia Z. 1989.** Phomalirazine, a novel toxin from the phytopathogenic fungus *Phoma lingam*. *Journal of the American Chemical Society* **111**: 1904-1905.
- Pellegrin C, Morin E, Martin FM, Veneault-Fourrey C. 2015.** Comparative analysis of secretomes from ectomycorrhizal fungi with an emphasis on small-secreted proteins. *Frontiers in Microbiology* **6**: 1-15.
- Perfect SE, Green JR. 2001.** Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology* **2**: 101-108.

- Petit-Houdenot Y, Degrave A, Meyer M, Blaise F, Ollivier B, Marais CL, 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 Phytologist* **223**: 397-411.
- Petit Y. 2017.** Comprendre l'implication des effecteurs fongiques dans l'infection d' une plante hôte : caractérisation fonctionnelle d'effecteurs de *Leptosphaeria maculans* , un champignon pathogène du colza.
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. 2009.** Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* **5**: 308-316.
- Pilet ML, Delourme R, Foisset N, Renard M. 1998.** Identification of loci contributing to quantitative field resistance to blackleg disease, causal agent *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not., in Winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **96**: 23-30.
- Pilet ML, Duplan G, Archipiano M, Barret P, Baron C, Horvais R, Tanguy X, Lucas MO, Renard M, Delourme R. 2001.** Stability of QTL for field resistance to blackleg across two genetic backgrounds in oilseed rape. *Crop Science* **41**: 197-205.
- Pilet-Nayel ML, Moury B, Caffier V, Montarry J, Kerlan MC, Fournet S, Durel CE, Delourme R. 2017.** Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. *Frontiers in Plant Science* **8**: 1-9.
- Plett JM, Daguette Y, Wittulsky S, Vayssières A, Deveau A, Melton SJ, Kohler A, Morrell-Falvey JL, Brun A, Veneault-Fourrey C, et al. 2014.** Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 8299-8304.
- Plett JM, Kempainen M, Kale SD, Kohler A, Legué V, Brun A, Tyler BM, Pardo AG, Martin F. 2011.** A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biology* **21**: 1197-1203.
- Plissonneau C, Daverdin G, Ollivier B, Blaise F, Degrave A, Fudal I, Rouxel T, Balesdent MH. 2016.** A game of hide and seek between avirulence genes AvrLm4-7 and AvrLm3 in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist* **209**: 1613-1624.
- Polak-Śliwińska M, Paszczyk B. 2021.** Trichothecenes in food and feed, relevance to human and animal health and methods of detection: a systematic review. *Molecules* **26**: 454.
- Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ. 2009.** Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science* **14**: 21-29.
- Poland JA, Bradbury PJ, Buckler ES, Nelson RJ. 2011.** Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 6893-6898.

- Porquier A, Moraga J, Morgant G, Dalmais B, Simon A, Sghyer H, Collado IG, Viaud M. 2019.** Botcinic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea* relies on a subtelomeric gene cluster surrounded by relics of transposons and is regulated by the Zn₂Cys₆ transcription factor BcBoa13. *Current Genetics* **65**: 965-980.
- 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**: 513-45.
- Rabe F, Ajami-Rashidi Z, Doehlemann G, Kahmann R, Djamei A. 2013.** Degradation of the plant defence hormone salicylic acid by the biotrophic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **89**: 179-188.
- Raffaele S, Kamoun S. 2012.** Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 417-430.
- Rahman M, Hoque A, Roy J. 2021.** Linkage disequilibrium and population structure in a core collection of *Brassica napus* (L.). *bioRxiv 2021.04.06.438572*: 1-48.
- Rajarammohan S, Pradhan AK, Pental D, Kaur J. 2018.** Genome-wide association mapping in *Arabidopsis* identifies novel genes underlying quantitative disease resistance to *Alternaria brassicae*. *Molecular Plant Pathology* **19**: 1719-1732.
- Raman H, McVittie B, Pirathiban R, Raman R, Zhang Y, Barbulescu DM, Qiu Y, Liu S, Cullis B. 2020.** Genome-Wide Association Mapping identifies novel loci for quantitative resistance to blackleg disease in canola. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1184.
- Raman H, Raman R, Coombes N, Song J, Diffey S, Kilian A, Lindbeck K, Barbulescu DM, Batley J, Edwards D, et al. 2016.** Genome-wide association study identifies new loci for resistance to *Leptosphaeria maculans* in canola. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1513.
- Raman H, Raman R, Diffey S, Qiu Y, McVittie B, Barbulescu DM, Salisbury PA, Marcroft S, Delourme R. 2018.** Stable quantitative resistance loci to blackleg disease in canola (*Brassica napus* L.) over continents. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1622.
- Rooney HCE, Van't Klooster JW, Van Der Hoorn RAL, Joosten MHAJ, Jones JDG, De Wit PJGM. 2005.** Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* **308**: 1783-1786.
- Roux F, Voisin D, Badet T, Balagué C, Barlet X, Huard-Chauveau C, Roby D, Raffaele S. 2014.** Resistance to phytopathogens *e tutti quanti*: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology* **15**: 427-432.
- Rouxel T, Balesdent MH. 2005.** The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. *Molecular Plant Pathology* **6**: 225-241.
- Rouxel T, Balesdent MH. 2017.** Life, death and rebirth of avirulence effectors in a fungal pathogen of *Brassica* crops, *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist* **214**: 526-532.

- Rouxel T, Grandaubert J, Hane JK, Hoede C, Van De Wouw AP, Couloux A, Dominguez V, Anthouard V, Bally P, Bourras S, et al. 2011.** Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nature Communications* **2**: 202.
- Rouxel T, Penaud A, Pinochet X, Brun H, Gout L, Delourme R, Schmit J, Balesdent MH. 2003a.** A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 871-881.
- Rouxel T, Willner E, Coudard L, Balesdent MH. 2003b.** Screening and identification of resistance to *Leptosphaeria maculans* (stem canker) in *Brassica napus* accessions. *Euphytica* **133**: 219-231.
- Rovenich H, Boshoven JC, Thomma BPHJ. 2014.** Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Current Opinion in Plant Biology* **20**: 96-103.
- Rusch A, Valantin-Morison M, Sarthou JP, Roger-Estrade J. 2011.** Multi-scale effects of landscape complexity and crop management on pollen beetle parasitism rate. *Landscape Ecology* **26**: 473-486.
- Saintenac C, Lee WS, Cambon F, Rudd JJ, King RC, Marande W, Powers SJ, Bergès H, Phillips AL, Uauy C, et al. 2018.** Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature Genetics* **50**: 368-374.
- Salcedo A, Rutter W, Wang S, Akhunova A, Bolus S, Chao S, Anderson N, De Soto MF, Rouse M, Szabo L, et al. 2017.** Variation in the *AvrSr35* gene determines *Sr35* resistance against wheat stem rust race Ug99. *Science* **358**: 1604-1606.
- Sánchez-Vallet A, Saleem-Batcha R, Kombrink A, Hansen G, Valkenburg DJ, Thomma BPHJ, Mesters JR. 2013.** Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization. *eLife* **2013**: 1-16.
- Schardl CL, Florea S, Pan J, Nagabhyru P, Bec S, Calie PJ. 2013.** The epichloae: alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. *Current Opinion in Plant Biology* **16**: 480-488.
- Schilling L, Matei A, Redkar A, Walbot V, Doehlemann G. 2014.** Virulence of the maize smut *Ustilago maydis* is shaped by organ-specific effectors. *Molecular Plant Pathology* **15**: 780-789.
- Schoch CL, Crous PW, Groenewald JZ, Boehm EWA, Burgess TI, de Gruyter J, de Hoog GS, Dixon LJ, Grube M, Gueidan C, et al. 2009.** A class-wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Studies in Mycology* **64**: 1-15
- Schweiger W, Steiner B, Ametz C, Siegwart G, Wiesenberger G, Berthiller F, Lemmens M, Jia H, Adam G, Muehlbauer GJ, et al. 2013.** Transcriptomic characterization of two major *Fusarium* resistance quantitative trait loci (QTLs), *Fhb1* and *Qfhs.ifa-5A*, identifies novel candidate genes. *Molecular Plant Pathology* **14**: 772-785.

- Sekhwai MK, Li P, Lam I, Wang X, Cloutier S, You FM. 2015.** Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **16**: 19248-19290.
- Selosse M-A, Le Tacon F. 1998.** The land flora: a phototroph–fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution* **13**: 15-20.
- Silayeva O, Barnes AC. 2018.** Gibson Assembly facilitates bacterial allelic exchange mutagenesis. *Journal of Microbiological Methods* **144**: 157-163.
- Song J, Win J, Tian M, Schornack S, Kaschani F, Ilyas M, Van Der Hoorn RAL, Kamoun S. 2009.** Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 1654-1659.
- Soyer JL, Clairet C, Gay EJ, Lapalu N, Rouxel T, Stukenbrock EH, 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*: 1-36.
- Soyer JL, El Ghalid M, Glaser N, Ollivier B, Linglin J, Grandaubert J, Balesdent MH, Connolly LR, Freitag M, Rouxel T, et al. 2014.** Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genetics* **10**: e1004227.
- Soyer JL, Grandaubert J, Haueisen J, Schotanus K, Stukenbrock EH. 2019.** In planta chromatin immunoprecipitation in *Zymoseptoria tritici* reveals chromatin-based regulation of putative effector gene expression. *bioRxiv 2019.02.08.544627*.
- Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev I V., Martin F, Stajich JE, Blackwell M. 2017.** The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiology Spectrum* **5**: 1-34.
- Sperschneider J, Gardiner DM, Dodds PN, Tini F, Covarelli L, Singh KB, Manners JM, Taylor JM. 2016.** EffectorP: predicting fungal effector proteins from secretomes using machine learning. *New Phytologist* **210**: 743-761.
- Stachowiak A, Olechnowicz J, Jedryczka M, Rouxel T, Balesdent MH, Happestadius I, Gladders P, Latunde-Dada A, Evans N. 2006.** Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **114**: 67-75.
- Stergiopoulos I, Collemare J, Mehrabi R, De Wit PJGM. 2013.** Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic Dothideomycete fungi. *FEMS Microbiology Reviews* **37**: 67-93.
- Sucher J, Boni R, Yang P, Rogowsky P, Heike B, Kastner C, Kumlehn J, Krattinger SG, Keller B. 2017.** The durable wheat disease resistance gene *Lr34* confers common rust and northern corn leaf blight resistance in maize. *Plant Biotechnology Journal* **15**: 489-496.
- Takahara H, Hacquard S, Kombrink A, Hughes HB, Halder V, Robin GP, Hiruma K, Neumann U, Shinya T, Kombrink E, et al. 2016.** *Colletotrichum higginsianum* extracellular LysM proteins play dual roles in appressorial function and suppression of chitin-triggered plant immunity. *The New Phytologist* **211**: 1323-1337.

- Tanaka A, Takemoto D, Chujo T, Scott B. 2012.** Fungal endophytes of grasses. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 462-468.
- Tedersoo L, Smith ME. 2017.** Ectomycorrhizal fungal lineages: detection of four new groups and notes on consistent recognition of ectomycorrhizal taxa in high-throughput sequencing studies. In: Tedersoo L, éd. *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*. 125-142.
- Tian B, Xie J, Fu Y, Cheng J, Li B, Chen T, Zhao Y, Gao Z, Yang P, Barbetti MJ, et al. 2020.** A cosmopolitan fungal pathogen of dicots adopts an endophytic lifestyle on cereal crops and protects them from major fungal diseases. *The ISME Journal* **14**: 3120-3135.
- Tirnaz S, Bayer PE, Inturrisi F, Zhang F, Yang H, Dolatabadian A, Neik TX, Severn-Ellis A, Patel DA, Ibrahim MI, et al. 2020.** Resistance gene analogs in the brassicaceae: identification, characterization, distribution, and evolution. *Plant Physiology* **184**: 909-922.
- Tommerup IC. 1984.** Development of infection by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in *Brassica napus* L. and *Trifolium subterraneum* L. *New Phytologist* **98**: 487-495.
- Tör M, Lotze MT, Holton N. 2009.** Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3645-3654.
- Torto TA, Li S, Styer A, Huitema E, Testa A, Gow NAR, Van West P, Kamoun S. 2003.** EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Research* **13**: 1675-1685.
- U N. 1935.** Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *Brassica napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan Journal of Botanic* **7**: 389-452.
- Ulferts S, Delventhal R, Splivallo R, Karlovsky P, Schaffrath U. 2015.** Abscisic acid negatively interferes with basal defence of barley against *Magnaporthe oryzae*. *BMC Plant Biology* **15**: 1-13.
- Vasudevan K, Vera Cruz CM, Gruissem W, Bhullar NK. 2014.** Large scale germplasm screening for identification of novel rice blast resistance sources. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1-9.
- Větrovský T, Kohout P, Kopecký M, Machac A, Man M, Bahnmann BD, Brabcová V, Choi J, Meszárošová L, Human ZR, et al. 2019.** A meta-analysis of global fungal distribution reveals climate-driven patterns. *Nature Communications* **10**: 1-9.
- Větrovský T, Morais D, Kohout P, Lepinay C, Algora C, Awokunle Hollá S, Bahnmann BD, Bílohnědá K, Brabcová V, D'Alò F, et al. 2020.** GlobalFungi, a global database of fungal occurrences from high-throughput-sequencing metabarcoding studies. *Scientific Data* **7**: 1-14.
- Vinatzer BA, Monteil CL, Clarke CR. 2014.** Harnessing population genomics to understand how bacterial pathogens emerge, adapt to crop hosts, and disseminate. *Annual Review of Phytopathology* **52**: 19-43.
- Vlaardingerbroek I, Beerens B, Schmidt SM, Cornelissen BJC, Rep M. 2016.** Dispensable chromosomes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Molecular Plant Pathology* **17**: 1455-1466.

- De Vleeschchauer D, Yang Y, Cruz CV, Höfte M. 2010.** Abscisic acid-induced resistance against the brown spot pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in rice involves MAP kinase-mediated repression of ethylene signaling. *Plant Physiology* **152**: 2036-2052.
- Voß S, Betz R, Heidt S, Corradi N, Requena N. 2018.** RiCRN1, a crinkler effector from the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*, functions in arbuscule development. *Frontiers in Microbiology* **9**: 1-18.
- Wang B, Sun Y, Song N, Zhao M, Liu R, Feng H, Wang X, Kang Z. 2017a.** *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (*Pst*-miR1), an important pathogenicity factor of *Pst*, impairs wheat resistance to *Pst* by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene. *New Phytologist* **215**: 338-350.
- Wang M, Weiberg A, Dellota E, Yamane D, Jin H. 2017b.** Botrytis small RNA *Bc*-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA Biology* **14**: 421-428.
- Wehner J, Antunes PM, Powell JR, Mazukatow J, Rillig MC. 2010.** Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: a role for fungal diversity? *Pedobiologia* **53**: 197-201.
- Weiberg A, Wang M, Lin FM, Zhao H, Zhang Z, Kaloshian I, Huang H-D, Jin H. 2013.** Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* **342**: 118-123.
- Welch TR, Williams RM. 2014.** Epidithiodioxopiperazines occurrence synthesis and biogenesis. *Natural Product Reports* **31**: 1376-1404.
- West JS, Fitt BDL. 2005.** Population dynamics and dispersal of *Leptosphaeria maculans* (blackleg of canola). *Australasian Plant Pathology* **34**: 457-461.
- West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ, Fitt BDL. 2001.** Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology* **50**: 10-27.
- Van de Wouw AP, Marcroft SJ, Barbetti MJ, Hua L, Salisbury PA, Gout L, Rouxel T, Howlett BJ, Balesdent MH. 2009.** Dual control of avirulence in *Leptosphaeria maculans* towards a *Brassica napus* cultivar with 'sylvestris'-derived resistance suggests involvement of two resistance genes. *Plant Pathology* **58**: 305-313.
- Yoshida K, Schuenemann VJ, Cano LM, Pais M, Mishra B, Sharma R, Lanz C, Martin FN, Kamoun S, Krause J, et al. 2013.** The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. *eLife* **2**: e00731.
- Yu H, Chen X, Hong Y-Y, Wang Y, Xu P, Ke S-D, Liu H-Y, Zhu J-K, Oliver DJ, Xiang C-B. 2008.** Activated Expression of an Arabidopsis HD-START Protein Confers Drought Tolerance with Improved Root System and Reduced Stomatal Density. *the Plant Cell Online* **20**: 1134-1151.
- Yu F, Lydiate DJ, Rimmer SR. 2005.** Identification of two novel genes for blackleg resistance in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* **110**: 969-979.

- Yuan FP, Zeng QD, Wu JH, Wang QL, Yang ZJ, Liang BP, Kang ZS, Chen XH, Han DJ. 2018.** QTL mapping and validation of adult plant resistance to stripe rust in chinese wheat landrace Humai 15. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1-13.
- Zeilinger S, Gupta VK, Dahms TES, Silva RN, Singh HB, Upadhyay RS, Gomes EV, Tsui CKM, Chandra Nayak S. 2016.** Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. *FEMS Microbiology Reviews* **40**: 182-207.
- Zeilinger S, Omann M. 2007.** *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene Regulation and Systems Biology* **1**: 227-234.
- Zeng J, Gupta VK, Jiang Y, Yang B, Gong L, Zhu H. 2019.** Cross-kingdom small RNAs among animals, plants and microbes. *Cells* **8**: 371.
- Zeng T, Holmer R, Hontelez J, te Lintel-Hekkert B, Marufu L, de Zeeuw T, Wu F, Schijlen E, Bisseling T, Limpens E. 2018.** Host- and stage-dependent secretome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *The Plant Journal* **94**: 411-425.
- Zhang Y, Crous PW, Schoch CL, Hyde KD. 2012.** Pleosporales. *Fungal Diversity* **53**: 1-221.
- Zuluaga AP, Vega-Arreguín JC, Fei Z, Ponnala L, Lee SJ, Matas AJ, Patev S, Fry WE, Rose JKC. 2016.** Transcriptional dynamics of *Phytophthora infestans* during sequential stages of hemibiotrophic infection of tomato. *Molecular Plant Pathology* **17**: 29-41.

Titre : Exploitation du répertoire d'effecteurs de *Leptosphaeria maculans* pour une diversification des sources de résistance à la nécrose du collet chez *Brassica napus*

Mots clés : Effecteurs tardifs, nécrose du collet, résistance quantitative, criblage variétal

Résumé : Responsable d'une maladie particulièrement dommageable chez le colza (*Brassica napus*), *Leptosphaeria maculans* est un champignon phytopathogène provoquant la nécrose du collet. Durant son cycle infectieux particulièrement complexe et long, *L. maculans* colonise de façon asymptomatique les tiges du colza, en produisant des effecteurs tardifs, spécifiques de cette étape de colonisation. Dans le contexte d'un besoin impérieux d'identification de nouvelles sources de résistance à la maladie, l'objectif de ma thèse était d'exploiter ce répertoire d'effecteurs 'tardifs' pour identifier des gènes pouvant contribuer à la résistance quantitative. Il s'agissait : (I) de valider l'interaction entre l'effecteur tardif LmSTEE98 et la résistance RlmSTEE98, par inactivation du gène codant l'effecteur LmSTEE98, (II) de rechercher de nouvelles sources de résistance, en utilisant une stratégie novatrice de criblage variétal, après sélection des effecteurs tardifs les plus pertinents

et (III) d'identifier des gènes marqueurs de la résistance quantitative, pour en faciliter l'évaluation. Ainsi, j'ai validé qu'une interaction gène-pour-gène, ayant lieu lors de l'infection des tiges, contribue à la résistance quantitative en conditions contrôlées. Le criblage, avec 10 effecteurs tardifs pertinents, de 130 génotypes diversifiés m'a permis d'identifier de nouvelles sources de résistance, présentant des phénotypes variés d'interaction. Enfin, avec des données RNAseq d'échantillons au champ, j'ai sélectionné 11 gènes candidats, marqueurs de la résistance quantitative. Ce projet nécessite des validations supplémentaires de l'efficacité des nouvelles sources de résistance au champ et de la validité des marqueurs de la résistance quantitative, mais il démontre l'existence de sources de résistance insoupçonnées et potentiellement plus durables que les gènes majeurs classiques.

Title: Exploitation of the *Leptosphaeria maculans* effector repertoire for diversification of resistances to blackleg in *Brassica napus*

Keywords: Late effectors, stem necrosis, quantitative resistance, screening of genotypes

Abstract: *Leptosphaeria maculans* is a phytopathogenic fungus causing stem necrosis and is responsible for a particularly damaging disease in oilseed rape (*Brassica napus*). During its particularly complex and long infectious cycle, *L. maculans* colonizes asymptotically the stems of rapeseed, producing late effectors specific to this colonization stage. In the context of a strong need to identify new sources of disease resistance, the objective of my thesis was to exploit this repertoire of 'late' effectors to identify genes that could contribute to quantitative resistance. The aim was : (I) to validate the interaction between the late effector LmSTEE98 and the resistance RlmSTEE98, by inactivation of the LmSTEE98 coding gene, (II) to search for new sources of resistance using a novel varietal screening strategy after selection of the most relevant late effectors, and (III) to identify marker genes for quantitative

resistance, to facilitate its evaluation. Thus, I validated that a gene-for-gene interaction, occurring during stem infection, contributes to quantitative resistance, in controlled conditions. This screening approach, with 10 relevant late effectors, of 130 diversified genotypes, allowed me to identify new sources of resistance, displaying diversified interaction phenotypes. Finally, with RNAseq data from field samples, I selected 11 candidate genes, markers of quantitative resistance. This project requires further validation of the efficacy of the new sources of resistance in the field and of the validity of the quantitative resistance markers, but it demonstrates the existence of unsuspected sources of resistance that are potentially more durable than the classic major genes.